

# **A Daganatos Betegellátás Innovatív Fejlesztése Genomikai Módszerekkel**

Országos Onkológiai Intézet, AstraZeneca Kft, Auroscience  
kft, GlaxoSmithKline kft, Janssen-Cilag Kft, Roche  
Magyarország kft, Szilak Labor kft, Zenon Bio Kft  
Alvállalkozók: Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet,  
MTA Enzimológiai Intézete

project vezető: dr. Tímár József

2006-2008

### 1.1. Bevezetés, előzmények

Hazánkban évente több mint 30 000 ember hal meg daganatos megbetegedésben, amely mindkét nemet egyformán sújtja. Számos daganatféleség esetében hazánk az európai mortalitási és morbiditási statisztikákban is vezető helyet tölt be, így tüdő-, vastagbélrák és fej-nyaki daganatok vonatkozásában, de előkelő helyen állunk az emlőrákok esetében is. Az elmúlt évtizedek során a daganatos halálozás hazánkban dinamikusan emelkedett, mely trend csak az utóbbi néhány évben látszik megtörni. E szomorú statisztikai adatok ellenére helyezik hazánkat az európai listák élére, hogy egyre nagyobb társadalmi és szakmai figyelem övezi a kérdést, és egyre nagyobb anyagi erőket mozgat meg a társadalom a betegség felderítésére, diagnosztikájára és terápiájára. Bár a daganat elleni küzdelem legsikeresebb módja kialakulásának megelőzése, hazánkban több mint 150000 daganatos beteggel kell számolnunk, akiknek sorsát a gondos és hatékony kezelés dönti el. Bár egyes tumorféleségek mai eszközeinkkel is már gyógyíthatóvá váltak (gyermekkori ALL, hererák, Wilms-tumor), a felnőttkori rosszindulatú daganatos megbetegedések esetében még a legjobb esetben sem tudjuk a betegek felét megmenteni, s egyes esetekben esélyeink ennél sokkal rosszabbak (tüdőrák, melanoma). 2001-ben létrejött a Nemzeti Onkológiai Kutatás-fejlesztési Konzorcium, mely az Országos Onkológiai Intézet (OOI) vezetésével szerteágazó daganatkutató programot valósított meg, melynek eredményei folyamatosan jelentek meg a Magyar Onkológia hasábjain (1,2,3), melyet az alábbiak foglalunk össze.

A 2001-2004 közötti periódusban a Konzorcium az emlőrákokra vonatkozó kutatások keretében az örökletes daganatokban szerepet játszó BRCA1 gén hazai mutációs sajátosságait illetve splicing-mechanizmusainak részleteit tisztázta. Sporadikus emlődaganatok esetében kiderült, hogy a szövettani típustól függően érintettek a DNS repair-gének (4-5). Csontáttétképzésre hajlamos daganatokban az NM23 metasztatikus szuppresszor csökkent expresszióját és a c-met, c-erbB2 és p53 fokozott expresszióját észleltük. Ugyanakkor megállapítottuk, hogy az áttétek c-erbB2 genotípusa nem feltétlenül egyezik a primer tumoréval, ami a Herceptin terápia indikációs feltételeinek átgondolását igényli. A chip-technológia és mennyiségi PCR technikák bevezetésével lehetőség nyílt a daganatok terápiás érzékenységeinek előzetes becsülésére.

A vastagbélrákra vonatkozó kutatásaink során epidemiológiai vizsgálataink felderítették kistérségi előfordulásának egyenetlenségeit, amelyek ún. klastrokat mutattak Budapesten, Heves, Jász-Nagykun-Szolnok, Nógrád, Komárom-Esztergom és Baranya megyékben, míg a végbélrák a Dunántúl egyes megyéiben halmozódott. Miután ez az egyik leggyakoribb rosszindulatú daganat mindkét nemből, igen nagy a jelentősége a hatékony szűrésnek, aminek alapja a rejtett bélvérzés kimutatása, mely célból laktoferrin-tesztet illetve egy kettős-antitestes módszert dolgoztunk ki, szabadalmaztattuk és teszteltük nagyszámú beteganyagban. A sporadikus vastagbélrákok genetikai hátterére vonatkozó vizsgálataink azt mutatták, hogy a mikroszatellita instabilitás nemcsak allélvesztés révén, hanem hipermetiláció útján is kialakulhat. Ugyanez a metilációs mechanizmus gyakran játszik szerepet az APC és E-cadherin szuppresszor-gének inaktiválódásában is. Bemutattuk, hogy a vastagbélrák progressziójában a c-met gén fokozott expressziója játszik szerepet ezért ezt prognosztikus markerként is fel lehet használni. A vastagbélrákok terápiájának alapját képező 5-FU molekuláris targetjének (TS) vizsgálata során meghatároztuk a gén hazai polimorfizmusának mintázatát és annak összefüggését a terápiás érzékenységgel, illetve a betegség prognózisával (10-13).

A fejnyaki daganatokat nagyszámú beteg esetében vizsgáltuk keresve az egyre növekvő hazai incidenciát genetikai hátterét. Megállapítottuk, hogy az MTHFR DNS metilációs enzim génjének polimorfizmusai eltérő szerepet játszhatnak (védő illetve elősegítő tényezők) a daganat kialakulása szempontjából. Ugyancsak fontos megfigyelés ebből a szempontból az hogy a hazai fejnyaki rákok 40%-ban mutatható ki a HPV vírus ami felveti etiológiai szerepét. A már kialakult daganatokban igen gyakori lokális immunszuppressziót detektáltunk. Igazoltuk azt, hogy a fejnyaki laphámrákok jelentős részében funkcionális ösztrogén receptor expresszió van (9). Megállapítottuk, hogy ezen daganatféleség radioterápiájának hatékonyságát a daganatos erekre gyakorolt hatás alapján már korán mérni lehet.

A melanoma progresszió molekuláris hátterének kutatása során több klinikailag is tesztelt progressziós markert azonosítottunk ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin, CD44v3 proteoglikán, AMF-receptor). A malignus melanómára vonatkozó kutatások során sikerrel alkalmaztuk a DNS-chip technikát új melanoma-specifikus (4 db) és melanoma-progresszióban szerepet játszó (2 db) gének azonosítására. Preklinikai vizsgálatokban 3 gyógyszer esetében sikerült specifikus antimetasztatikus hatást igazolni: az alacsony mólsúlyú heparin (7), az ösztrogén-metabolit 2-metoxisztradiol valamint az erythropoetin- $\alpha$  (EPO, 8) esetében (ez utóbbinak vaszkuláris perfúzió-növelő hatása látszik döntőnek). Ezek alapján a heparin és EPO terápia indikációs területeinek megváltoztatását

javasoltuk. Kutatási eredményinket csaknem 100 idegen nyelvű közlemény, egy szabadalom, számos újonnan bevezetett diagnosztikus eljárás és több gyógyszer alkalmazásának kiszélesítésére vonatkozó javaslat fémjelezte.

A Konzorcium az új kiíráshoz alkalmazkodva átalakult és egy lényegesebben koncentráltabb, termék-orientált programot dolgozott ki. Az elmúlt években paradigmaváltás történt az onkológiában, mert a genomika eredményei megkezdtek átalakítani a korábban használt diagnosztikus és terápiás protokollokat. Ezek az eredmények a daganatkutatás minden területén forradalmi változásokat generálnak, amely lassan, de biztosan egyre inkább átalakítja a mindennapi klinikai rutint is. Hatásai meg kell hogy nyilvánuljanak a primer prevenció illetve korai szűrésben, de lassan szinte új tudományt kell hogy formáljanak a talán legkonzervatívabb szakma, a patológiából is. Ahogyan az alap kutatások előre haladnak, ezek eredményei kezdenek beépülni a diagnosztikába is. Úgy tűnik, hogy az új klinikai onkológia egyik alappillére az ún. molekuláris célzás (targetálás) elve lesz. Ennek az elvnek az átültetése a mindennapi diagnosztikus és terápiás gyakorlatba az egyik legfontosabb célja az új kutatás-fejlesztési programnak, mely a nagy hazai gyakoriságú daganatfélésekre koncentrált (emlő-, vastagbél-, tüdő-, fej-nyaki rákok, melanoma).

## **1.2.K+F Program-Csomagok**

- 1./ Molekuláris diagnosztikai szolgáltatások kifejlesztése*
- 2./ Daganateroződés diagnosztikus, prognosztikus jelentősége és terápiás kiaknázása*
- 3./ Új melanoma diagnosztikumok és terápiás eljárások kifejlesztése*
- 4./ Terápia-individualizálás farmakogenomikai módszerekkel*

Részletes munkaterv

### *1./ Programcsomag: Molekuláris diagnosztikai szolgáltatások kifejlesztése*

#### *1.1. Örökletes daganatok predikciója és detektálása Magyarországon (dr. Oláh Edit)*

##### **Célkitűzések, újdonságtartalom**

Az örökletes rákhajlam molekuláris alapjainak feltárása az utóbbi évtized orvosbiológiai kutatásainak egyik legsikeresebb területe. Számos rákra hajlamosító gént ismertünk meg, többnyire a betegség családi halmozódásával járó daganatszindrómákban. Az EU támogatást is élvező konzorciumok – hazai résztvevőkkel (Oláh Edit munkacsoportja) – jelentős mértékben járultak hozzá az örökletes daganatokról meglévő korszerű ismeretek megszerzéséhez. Kiemelhető a BRCA1 és BRCA2 génekkel kapcsolatos nemzetközi kutatások koordinálása, a daganatos családok összegyűjtése és elemzése. Azonban nagy kihívást jelent a molekuláris daganatképződésről szerzett új tudás felhasználása a rákkockázat felmérésének pontosításában és a kockázat kezelésében, vagyis az új tudományos ismeretek klinikai gyakorlati alkalmazásában. Ennek európai felgyorsítását kívánja elősegíteni az EU 1. prioritású programjában a „Familiáris daganatok észlelése, megelőzése és kezelése” (LSH-2004-2.2.0-6) témakör. A multidiszciplináris kutatások célja az ismert hajlamosító gének további jellemzése, új gének felfedezése, a molekuláris ujjlenyomatok azonosítása, és új modellek kidolgozása a korai észlelés, diagnózis és a pontosabb kockázatbecslés érdekében. Ehhez kapcsolódva munkacsoportunk eddigi molekuláris genetikai/genomikai kutatásainak továbbfejlesztését tervezzük, amelynek fő célkitűzése, hogy új ismereteket szerezzünk a genetikailag determinált daganatokról, hazai előfordulásukról, és a rák iránti genetikai fogékonyság molekuláris alapjairól. *A rák iránti genetikai hajlam meghatározása révén olyan célpopuláció azonosítására nyílik lehetőség, amely legtöbbet profitál a rákkockázat és a halálozás csökkentését célzó beavatkozásokból. Ezért a témajavaslat hosszú távú célja, hogy javítsa az örökletes daganatok megelőzését és kezelését Magyarországon.*

##### *A projektet megelőző, azt megalapozó tevékenység, elért eredmények*

Az OOI Molekuláris Genetikai Osztálya 1986-ban történt megalapítása óta kutatja a daganatképződés molekuláris genetikai történéseit, az egészséges és daganatos szövetek közötti molekuláris genetikai különbségeket. Az utóbbi évtizedben kezdtük meg az örökletes daganatok molekuláris genetikai hátterének feltárását. E kutatásokkal kapcsolódtunk a

Nemzetközi Emlőrák/Hererák Konzorcium koordinálásával folyó (EU-támogatást élvező) nemzetközi projektekhez. A témában nagyszámú közlemény és több Ph.D. készült.

#### *Tervezett tevékenység*

A projektjavaslat elsősorban az emlőrák, nőgyógyászati daganatok (petefészek, méh), vastagbél- és hererák vonatkozásában tervezi a genetikai predispozíció jobb megértését. Ezen szerv-lokalizációk kiválasztását több tényező indokolja: (1) a populáció szintjén gyakori előfordulású daganatokról van szó, így várható, hogy a viszonylag ritka, familiáris megjelenésű daganatos megbetegedések tanulmányozása hasznos információkkal szolgál a populáció daganatos megbetegedéseinek többségét (90-95%-át) adó sporadikus esetek vonatkozásában is; (2) többnyire ugyanazon elméleti és módszertani megközelítések alkalmazhatók ezekre a daganatos szervekre, sőt néhány esetben a hajlamosító gén is megegyezik; (3) a betegcsoportokat már azonosítottuk, és a megfelelő biológiai mintákat összegyűjtöttük a biobankunkban; (4) a Konzorciummal együttműködő klinikusok, patológusok nagy tapasztalattal rendelkeznek ezen daganatok vonatkozásában, a genetikai kockázat kezelésében és folyamatosan biztosítják a biológiai mintákat.

A rákra hajlamosító gének többségét az ezredfordulóra ismertük meg (a humán genom öröklött mutációt hordozó génjeiről van szó). Ma még keveset tudunk ezekről a különböző mértékű kockázatot örökítő allélekről, kölcsönhatásaikról más genetikai és környezeti tényezőkkel, amit mutat az is, hogy jelenleg mindössze nyolc daganatszindróma molekuláris szűrése épült be a klinikai gyakorlatba, de még ezekben az esetekben is az eredmények folyamatos tudományos értékelése szükséges. Az OOI Molekuláris Genetikai Osztálya az Intézet Pathológiai és Klinikai Osztályaival együttműködve a következő kutatási tevékenységet tervezi:

##### *1.1.1. Rákra hajlamosító gének daganatos családokban*

A mutációhordozói státusz meghatározása familiáris daganatos megbetegedésekben továbbra is fő tevékenységünk lesz abból a célból, hogy - a populáció szintjén ritka előfordulású - örökletes rákszindrómák újabb eseteit azonosíthassuk a vizsgálataink számára. Minden esetben EDTA-val konzervált vérből nyert DNS-ben vizsgáljuk a BRCA1/2, CHECK-2 (emlő- petefészekrák), APC, STK-11, MYH, MADH4 (polyposis), MLH1, MSH2 (endometriumrák, vastagbélrák) *öröklött mutációk* jelenlétét. (A munkaterv 200 emlő-/petefészekrákos, 40 polyposisos, és 60 vastagbélrákos család mutációelemzését tervezi.) A gének valamennyi kódoló szekvenciájára kiterjedő mutációvizsgálatot a hagyományos SSCP, HDA és közvetlen DNS szekvenálási módszerekkel végezzük. A *konzorcium 6.sz. kisvállalkozó partnerével* (Zenon Bio Kft) szoros együttműködésben már megkezdtuk *új mutációelemző* módszerek bevezetését (így pl. DHPLC-t, és nagy genomi deléciók azonosítását) abból a célból, hogy javítsuk az öröklött génmutációk kimutatásának hatékonyságát a BRCA1/2, APC, MLH1 és MSH2 gének esetében. Nemzetközi együttműködésben kimutattuk, hogy a c-KIT gén mutációk jelenléte az ellenoldali hererák kialakulásának kockázatára figyelmeztet (Looijenga és mtsai, Cancer Res 63:7674, 2003). Mivel hererákra hajlamosító géneket még nem sikerült felfedezni, és az emlőrákos családok 50%-ában (valamint a petefészekrákos családok 20%-ában) sem tudtunk hajlamosító génmutációt azonosítani, ezért a Nemzetközi Emlőrák/Hererák Konzorciumok keretében végzett genomszintű kutatásaink folyamatos célkitűzése *új daganatkeltő gének* megismerése az ismert gének mutációira negatív 30 emlőrákos és 13 hererákos családban.

##### *1.1.2. Poliallélikus daganathajlam emlőrákban*

A viszonylag ritka, nagy áthatolóképességű daganatszindrómáktól eltekintve a családi daganatos megbetegedések hátterében álló molekuláris változásokat nem ismerjük. Még kevesebbet tudunk ezek szerepéről a populáció szintjén. Előzetes vizsgálatainkban 500 emlőrákos esetben vizsgáltuk az emlőrákos családok öt gyakori öröklött mutációjának előfordulási gyakoriságát (van der Looij és mtsai, Int. J. Cancer, 2000). Eddigi kutatásaink

továbbfejlesztéseként az emlőrákos családokban azonosított 12 káros mutáció és 7 ismeretlen hatású variáns szerepének vizsgálatát tervezzük az OOI-ben kezelt 1000 feletti magyar emlőrákos eset kialakulásában. A populáció szintjén „gyengén hajlamosító” *genetikai variánsok* kitűnő jelöltek arra, hogy nagy kockázatú génhordozók rákkockázatát módosítsák. Ezért tervezzük e kis áthatolóképességű allélok (módosító genotípusok) azonosítását. Asszociációs vizsgálatokkal értékeljük a velük kapcsolatos *daganatos fenotípusokat* az ismert génhordozó személyekben. A „kis áthatolóképességű” allélok vizsgálatát itt is a familiáris daganatos esetekkel kezdjük,  $p < 0,5$  valószínűségű lókusztokat elemezzük tovább emlőrákos esetek nagyobb populációjában (>1000 ilyen DNS minta áll rendelkezésre a bio-bank-ban.) A BRCA1/2 és több más gén hatás *kockázati predikcióját* a BOADICEA modell segítségével értékeljük az IBCCS (International Breast Cancer Cohort Study) keretében folyó prospektív vizsgálatban, amely jelenleg 2000 BRCA1/2 mutáció hordozót (köztük 110 magyar esetet) foglal magába.

### 1.1.3. *Molekuláris profilvizsgálatok emlő- és hererákban*

A rák az öröklött és a sorozatosan megszerzett genetikai hibák felhalmozódása következtében jöt létre. Tervezzük a familiárisan halmozódó, és a sporadikus daganatok, valamint az egészséges sejtek és a rákos sejtek közötti molekuláris genetikai/genomikai különbségek feltárását.

A helyspecifikus emlőrákok és hererákok kialakulásáért felelős *molekuláris profilok* azonosítását, és a rákra hajlamosító géneket is magukba foglaló fontos *genetikai útvonalak* (génkölcsonhatások) jobb megismerését tervezzük. A vizsgálatokhoz 100 friss műtéti anyagra (egészsége és tumoros szövetmintára) lesz szükség, amelyet a konzorciumban résztvevő klinikus és patológus kollégák biztosítanak.

## 1.2. *Molekuláris diagnosztikai szolgáltatások kifejlesztése*

A daganatok új molekuláris osztályozása a gén expressziós profilokra van alapozva, ami a vizsgálati anyagban az RNS integritásának megőrzését kívánja meg. A daganat-diagnosztika, valamint annak klinikai kipróbálása és rutin alkalmazása azonban stabilabb molekuláris markereket (pl. DNS, fehérje), továbbá objektív, jól megalapozott és költséghatékony molekuláris technikákat is megkíván. Ezen projekt fő célja olyan molekuláris módszerek kifejlesztése és molekuláris markerek megtalálása, amelyek a tumorok osztályozásában, prognózisának és molekuláris célpontú terápiájának meghatározásában hasznosíthatók.

### 1.2.1. *Fúziós gének kimutatására alkalmas módszerek kidolgozása (lágyrész tumorokban és non-Hodgkin lymphomákban)*

Kromoszómális strukturális génátrendeződések gyakoriak lymphomákban, leukaemiákban, lágyrész tumorokban és közös (chimaeric) transcriptot eredményeznek, ami a fúziós gének terméke és a résztvevő génekről íródik át a kromoszómális töréspont egyik és másik oldalán. A különféle lágyrész daganatokat előidéző fúziós gének annyira jellemzőek az adott tumorra, hogy kimutatásuk patológiai diagnosztikai értékű, továbbá segít meghatározni a prognózist és az egyedi daganatellenes terápiát (Mackall et al, 2002, McArthur, 2004). Célunk, hogy lágyrész daganatokat (esetleg más szolid tumorokat) saját molekuláris eltéréseik alapján osztályozzuk és ennek megfelelő kezelési javaslatot adjunk.

A follicularis lymphomák az újonnan diagnosztizált non-Hodgkin lymphomák mintegy 30 %-át teszik ki. Az ilyen betegek rendszerint jól reagálnak a kezelésre, de a komplett remissio ritka. A betegek többségében különösen előrehaladott stádiumban a betegség rendszerint kiújul, mert kevés tumor sejt a kezelés után is visszamaradt. Néhány klinikai megfigyelés azt mutatja, hogy ha Bcl-2/IgH génátrendeződést mutató sejtek a csontvelőben vagy a vérben nem mutatható ki, a betegség kiújulásának veszélye sokkal kisebb (Corradini, 2004). Előzetes vizsgálataink során valósidejű PCR technikára alapozott olyan diagnosztikus rendszert fejlesztettünk ki, ami  $2 \cdot 10^4$  sejt közül 2 daganatsejtet ki tud mutatni. Ezen diagnosztikus rendszerünket arra kívánjuk használni, hogy follicularis lymphomás betegek vérében a keringő daganatsejtek számát meghatározzuk, a csontvelőben a minimális reziduális betegséget felismerjük és remissióban a fenntartó MabThera kezelést optimalizáljuk.

### 1.2.2. *Familiáris és sporadikus vastagbél rákok prognosztikája új genetikai módszerekkel*

A carcinoma kialakulása komplex folyamat, amely a kezdeti sejtcikluszavaroktól a betegség progressiójáig sok gént érint. Legújabban Kammerer és mtsai 2005. azt találták, hogy a 11q13 kromoszóma régióra lokalizált NuMA gén A794G allél variációja megnövekedett emlőrák hajlammal jár együtt. NuMA egy sejtciklussal összefüggő fehérje, amely alapvetően fontos a normális mitósishez és a korai apoptózisban lebomlik. NuMA/retinoidsav  $\alpha$  fúziós fehérjét találtak akut promyelocytás leukémiában. Jelenleg a NuMA gén elváltozásainak biológiai jelentősége még nem teljesen tisztázott, ezért azt tervezzük, hogy a génmutációk gyakoriságát vizsgáljuk a címben említett tumorokban illetve összefüggést keresünk a NuMA gén elváltozásai és a korai emlőrák elváltozások genetikai eltérései között.

Az epidermális-növekedési-faktor receptort (EGFR) mint a rákellenes kezelés egyik célpontját tekintjük, tekintve, hogy részt vesz a sejtproliferációban, differenciációban és a migrációban. Az EGFR-t blokkoló monoklonális antitesteket és kis molekulájú inhibitorokat alkalmazhatjuk gyógyszerként különböző daganatos betegségekben, mint kissejtes tüdőrák vagy kemoterápia-rezisztens áttéti vastagbélrák. Újabban Henley és mtsai (2004) azt is kimutatták, hogy a thymus carcinomák igen gyakran EGFR receptor fehérjét fejeznek ki. A thymus carcinomás betegek további potenciális terápiás célpontnak számítanak. Azonban a nem kissejtes tüdőrákok kb. 10%-a reagál csak pozitívan az EGFR ellenes gyógyszerekre. Az áttétes vastagbélrák kezelése szintén kemoterápiára van alapozva de ezek a tumorok gyakran nem reagálnak a szokásos kezelésre, ezért feltételezhető volt, hogy az EGFR ellenes monoklonális ellenanyagok (cetuximab és panitumumab) valószínűleg hatásos kezelésnek számítanak. Érdekes módon azonban az EGFR fehérje expressziója nem mutat korellációt a terápiás hatással (Salcz és mtsai 2004). Azt is megfigyelték, hogy EGFR negatív tumorok egy része hatásosan reagál az EGFR ellenes kezelésre. Ezért mi azt tervezzük, hogy az EGFR génmutációját és amplifikációját fogjuk vizsgálni a terápiás hatás függvényében, vastagbél rákokban és thymus carcinomákban.

Egyes tumorokban gyakrabban fordulnak elő nagy genetikai átrendeződések és a koromozómák szintjén megjelenő instabilitás. A tumorok második csoportjában az egy vagy néhány bázispárt érintő mutációk, deléciók, inszerciók fordulnak elő, ami a leolvasási keret eltolódáshoz vezet. Ezekre a változásokra viszont legjobban a mikrosatellita locusok vizsgálatával következtethetünk. Ekkor ugyanis a stabil mikrosatellita méretek helyett új hosszúságú ismétlődő szakaszokat kapunk, ez a mikrosatellita instabilitás (MSI) jelensége, ami szükségszerűen a DNS hibajavító rendszerének inaktivációját jelzi. Mai tudásunk szerint az MSI és a kromozómális instabilitás egymást kölcsönösen kizárják és mindkettő önmagában elegendő a tumorok kialakuláshoz. Az összes vastagbélrákot a mikrosatellita státus alapján három fő csoportra lehet osztani. A daganatok nagyobb csoportjában a kromozómális instabilitás és a mikrosatellita stabilitás (MSS) mutatható ki, a másik kisebb csoportra pedig a magas fokú mikrosatellita instabilitás (MSI-H), a harmadik csoportra az alacsony fokú mikrosatellita instabilizás (MSI-L) a jellemző (Haydon and Jass, 2002) A BRAF gén V600E missense mutációját 80%-os előfordulási gyakorisággal találták cutan melanoma sejtvonalakban (Davies és mtsai, 2002). Előzetes adataink arra utalnak, hogy az MSI-H sporadikus vastagbél rákokban a BRAF gén mutációja gyakori. Jelenlegi ismereteink alapján feltételezzük, hogy a BRAF mutáció az illető daganatcsoporton belül egy genetikailag különböző alcsoportot reprezentál, eltérő várható körlefoyással és terápiás érzékenységgel. Ezt a feltételezésünket kívánjuk igazolni. A tirozin kináz csoportba tartozó mutáció által aktivált BRAF fehérje egy újfajta rákellenes kemoterápia célpontja lehet.

### *1.2.3. Genetikai eltérések vizsgálata thymus daganatokban*

A thymus rosszindulatú daganatai között a lymphomák és epithelialis daganatok a gyakoribbak. A lymphomákról relative sokkal több ismeretünk van genetikai téren is azonban az epithelialis tumorok ebből a szempontból feltáratlanok, és ezért differenciáldiagnosztikájuk, prognosztikájuk valamint terápiájuk is az un. Első generációs eszközökkel valósul meg. Bár a thymus daganatai rika daganatok, az OOI-ben jelentős hazai tumorbank áll rendelkezésre és nagy beteganyag lehetőséget ad arra, hogy ezen ritka daganat genetikai sajátosságait meghatározhassuk. Az előzőekben más daganatokban alkalmazott eljárásokkal megkíséreljük jellemezni athymus epithelialis daganatit, különös figyelemmel az EGFR expressziójára és esetleges mutációjára.

## **2. Programcsomag: Daganatereződés diagnosztikus, prognosztikus jelentősége és terápiás kiaknázása**

A malignus tumorokat a daganatsejteken kívül stroma sejtek, extracelluláris mátrix és a sejtes elemeket oxigénnel és tápanyagokkal ellátó - szintén a stromális komponenshez tartozó - érhálózat építi fel. Az 1970-es évek elején leírt elképzelés szerint a daganatsejtek egy bizonyos tumorátmérő (szolid tumorok esetében 1-2 mm) elérése után a megfelelő oxigén- és tápanyagellátáshoz pusztán diffúzió útján már nem képesek hozzájutni, a daganat további növekedésének elengedhetetlen feltétele a megfelelő érhálózat kialakítása, melyet a tumorsejtek a szöveti hypoxia hatására felszabaduló angiogén faktorok termelése révén indítanak meg (un.: „angiogén switch”<sup>6</sup>). Ezt követően a tumorszövetnek a növekedéssel szorosan lépést tartó, állandóan megújuló, a tumorsejtekkel folyamatosan kommunikáló érhálózatot szükséges fenntartania. A fenti modell alapján a

daganatot tápláló kapilláris hálózatot a daganat- és stromasejtek által termelt citokinek hatására újonnan képződött kapillárisok építik föl, melyeknek építőkövei, az endothelsejtek genetikailag stabilak (szemben a neoplasztikus komponenssel), ugyanakkor a terápiás céllal a keringésbe juttatott antiangiogén szerek számára könnyen hozzáférhetőek. E felismerésekre alapozva a közelmúltban robbanásszerű fejlődésen átment angiogenezis kutatás a daganatellenes terápia új célpontjaként az endothelsejteket jelölte meg, időközben pedig több antiangiogén ágens kipróbálása is klinikai kísérleti fázisba jutott. A vizsgálatok előrehaladtával azonban világossá vált, hogy a kezdeti teória a továbbiakban nem tartható fenn, túl általánosító, kiegészítésre szorul morfológiailag, tumorbiológiailag és klinikailag egyaránt, sőt egyre több adat arra utal, hogy bizonyos szervek esetében nincs is szükség aktív angiogenezisre a daganat növekedéséhez. Mai ismereteink szerint a daganatok vérellátása neoangiogenezis, angioblasztos angiogenezis, ér-kooptáció vagy ún. vaszkuláris mimikri révén valósulhat meg. Az is nyilvánvaló mára, hogy az egyes szövettani típusú daganatok esetében a vaszkularizáció teljesen eltérő lehet. Mindezen információk pedig fontosak volnának a prognózis szempontjából, de az új korszerű angioszuppresszív terápiák célszerű indikációja szempontjából is. Ezen ismeretek birtokában alakítottuk ki célkitűzéseinket.

## *2.1. A daganat-ereződés sajátosságainak meghatározása az egyes tüdőrák-altípusokban.*

*Témavezető: dr. Döme Balázs*

A tüdőrákok minimálisan négy szövettani csoportba tartoznak, s kérdés, hogy ezek ereződési sajátosságai hasonlóak vagy eltérőek. Ezt kívánjuk vizsgálni nagyszámú klinikai mintán korszerű morfológiai eljárásokkal. A tüdőrákok vérellátásnak alapvető jelentősége van a tumorok terápia-rezisztenciájának kialakulásában, mert mind a citosztatikumok daganatba való eljutása, mind azok hatékonysága, mind a besugárzással szembeni érzékenység vérellátás-függő biológiai jelenségek, ahol a szöveti hipoxia terápiás hatástalansághoz vezet. Ennek figyelembe vételével tanulmányozni kívánjuk klinikai mintákon a különböző szövettani típusú tüdőrákok vérellátásának sajátosságait. Irodalmi adatok szerint a klasszikus neoangiogenezis tüdőrákok esetében kevés szerepet játszik, hiszen a tüdőszövet az egyik legjobban oxigenizált szövet igen magas alap érdenzitással. Ezért tanulmányozni kívánjuk ezeket az alternatív mechanizmusokat: 1./ A posztnatális vaszkulogenezis (keringő endotheliális prekursorok) 2./ A glomeruloid angiogenezist 3./ Az ún. „vaszkuláris mimikri” jelenségét. A program egyes lépései:

### *2.1.1. Vaszkularizáció sajátosságai különböző típusú tüdőrákokban*

*20-20 tüdőrák altípusban (laphámrák, adenokarcinóma, kissejtes rák) vizsgáljuk az érellátás sajátosságait immunhisztokémiai módszerrel*

### *2.1.2. Tüdőrák vaszkularizáció kapcsolata a tüdőrák progressziójával*

*A korábban vizsgált 60 esetben megvizsgáljuk a progresszióval való kapcsolatot és statisztikai elemzést végzünk.*

### *2.1.3. Keringő Angioblaszt kimutatás különböző típusú tüdőrákokban*

Mintegy 50 tüdőrákos beteg esetében perifériás vérből tervezzük vizsgálni az angioblasztok jelenlétét molekuláris módszerekkel illetve immunhisztokémiai eszközökkel áramlási citométer segítségével (multiparaméteres vizsgálatok a CEP marker CD133/VEGFR2/VCAM segítségével). Célunk gyors és költséghatékony eljárás kidolgozása a daganatos angiogenezis intenzitásának tesztelésére, ami nemcsak prognosztikus értékű lehet, hanem alkalmas a citosztatikus terápia illetve főleg a most bevezetésre kerülő angioszuppresszív terápiák hatásosságának mérésére. Célunk a kidolgozott eljárást szabadalmaztatni és diagnosztikus kit formájában kifejleszteni.

## *2.2. Innovatív molekulatervezés felhasználása új anti-angiogenetikus szerek kifejlesztésére :*

*Témavezető: dr. Patthy László*

A daganatindukált angiogenezis egyik gyakori markere a tumoros erek avb3 integrin expressziója aminek hátterében a proliferáló erek megváltozott integrin-profilja és szignalizációja áll. Ezeket az ereket specifikusan lehet gátolni avb3 elleni antitestekkel, de az antitestterápia használata jelentős korlátokba ütközik klinikailag, ezért célszerű volna kismolsúlyú orálisan adagolható gátló szer(ek) kialakítása. A tumor növekedést és

metasztázisok kialakulását gátló terápia kidolgozása céljából a tumor angiogenezist megakadályozó, az  $\alpha_v\beta_3$  integrinen keresztül ható angiogenezis inhibitorok és receptorok közötti kölcsönhatás vizsgálata a célja ezen témának.

Néhány extracelluláris mátrix fehérje degradációjából származó fragmentről kimutatták, hogy gátolja az angiogenezist. Ilyen fehérjék a plazmin degradációjával keletkező angiosztatin a XVIII kollagén fragmentje az endosztatin, a IV kollagénból származó tumstatin, a thrombospondin egyik fragmentje, a fibronektin fragment anastellin és a zselatináz A PEX doménje. A fehérjék angiogenezist gátló hatásának molekuláris mechanizmusát vizsgálva kimutatták, hogy a fehérjék egy része integrineken keresztül fejt ki hatását. A tumstatin, angiosztatin, PEX domén az  $\alpha_v\beta_3$ , az endosztatin, anastellin pedig az  $\alpha_5\beta_1$  integrinhez kötődik. Az angiogenezisben mind proteolitikus mind sejtadhéziós folyamatok lényeges szerepet játszanak. A plazmin/angiosztatin és a zselatináz A/PEX domén esetében is kimutatták, hogy az antiangiogenetikus hatással rendelkező fehérje fragmentek az  $\alpha V\beta 3$  integrinhez kötődve gátolják a proteázok (plazmin, zselatinázA) kötődését, ezáltal mind a felszíni proteolízist, mind a integrinen keresztül kiváltott sejtproliferációt gátolják.

*Célunk elsősorban a zselatináz A PEX doménje és receptora közötti kölcsönhatás szerkezet-funkció összefüggéseinek kiderítésével a daganatterápiában jól alkalmazható, kis méretű, inhibitorok tervezése.*

A daganatterápiában jól alkalmazható, kis méretű, az PEX domain hatásával megegyező hatású inhibitor előállításához tisztáznunk kell a PEX domén és receptora közötti kölcsönhatás szerkezet-funkció összefüggéseit: meg kell határozni a kölcsönhatás kialakításában részt vevő régiókat/aminosav oldalláncokat mind a PEX doménben, mind az  $\alpha_v\beta_3$  integrinen. Ennek ismeretében tervezhetünk a PEX/integrin kölcsönhatást mimelő kis méretű ligandokat.

Munkánk során

2.2.1./előállítjuk a rekombináns PEX fehérjét és származékait, valamint az  $\alpha_v\beta_3$  integrin extracelluláris régióját és vizsgáljuk kölcsönhatásukat.

2.2.2./A kölcsönhatás jellemzését követően lokalizáljuk a kölcsönhatás kialakításában részt vevő régiókat és számítógépes eljárások segítségével olyan kis méretű ligandot tervezünk, amely az  $\alpha_v\beta_3$  integrinhez kötődve gátolja az angiogenezist.

2.2.3. Az új kis molekulatömegű ligandokat in vitro teszteljük emberi endotelsejteken illetve angiogenezis modelleken (csirke chorioallantois membrán assay, illetve daganat-indukált angiogenezis).

*2.3. Erythropoetin-indukált érelváltozások funkcionális jelentőségének elemzése daganatokban. Témavezető dr Tímár József*

Korábbi laphámrákon folytatott vizsgálataink felvetették, hogy az erythropoetin (EPO) szerepet játszhat az angiogenezisben vagy az erek morfogenezisében (7). Adataink szerint az EPO kezelés érdilatációt okoz a daganatban, aminek többféle jótékony hatása volt, fokozta a perfúziót, növelte a citosztatikumok által támadott daganat-területet és fokozta a besugárzás antitumorális hatásait. Fentiek alapján vizsgálatainkat ki kívánjuk terjeszteni vastagbélrákra és melanómára is, mivel ezek vaszkularizációjának mechanizmusa alapvetően eltérő. Kísérleti modelleken tesztelni kívánjuk, hogy vastagbélrákok és melanomák esetében milyen hatással van az EPO a primer tumor és áttétei daganatos ereire, és hogy módosítja-e ezen erek révén a tumorok perfúzióját. Ugyanakkor tesztelni kívánjuk klinikai körülmények között is az EPO daganatos erekre gyakorolt hatását részben korábban EPO-kezelt betegek eltávolított daganatainak vizsgálatával, részben prospektív tanulmány keretében, ahol a diagnózis felállításakor előrehaladott rectumrák illetve fejnyaki daganat esetében súlyos anaemia miatt EPO kezelés indokolt és neoadjuváns kezelést alkalmaznak a műtét előtt. A programban párhuzamosan folytatunk preklinikai és klinikai vizsgálatokat. A program egyes lépései:

2.3.1. EPO kezelés hatása vastagbélrák és fejnycaki rák ereződésére neoadjuváns kezelés során: fázis-III vizsgálat

Kisérletet teszünk arra, hogy megvizsgáljuk, hogy a neoadjuváns kezelésben részesülő rektumrákos betegek esetében esetlegesen alkalmazott EPO kezelés okoz e változást a daganatos erekben. Ezt a kezelés előtti és utáni biopsziás minták ereinek analízisével tervezzük

2.3.2. EPO kezelt rectumrákos és fejnycaki daganatos betegek tumoros mintáinak elemzése.

EPO hatása humán vastagbélrák és melanóma ereződésére SCID egérben

Neoadjuváns kezelésben és ezzel párhuzamosan EPO kezelt betegek biopsziás és a kezelés utáni sebészeti mintáiban megvizsgáljuk az erek sajátosságait, 20-20 esetet tervezünk, kontrollként olyan eseteket, ahol csak neoadjuváns kezelés történt. Párhuzamosan primer xenograftokban és xenograft metasztázis modellekben vizsgáljuk az EPO kezelés hatását a daganatos erek paramétereire (érendítés, méret, szerkezet)

2.3.3. EPO kezelés hatásainak klinikai kiértékelése. EPO hatása vastagbélrák (5-FU) és melanóma (DTIC) kemoterápiás hatásaira preklinikai modellekben

A klinikai értékelés során a neoadjuváns kezelés hatásának változását értékeljük az erekben létrejött esetleges változásokhoz képest. Kisérleti rendszerekben megkíséreljük modellezni az EPO hatását a kemoterápiára, amit vastagbélrák és melanóma xenograft modellben tesztelünk (máj és tüdő áttéti modellek).

*2.4. ZD6474 angioszuppresszív szer tesztelése előrehaladott NSCLC tüdőrákos betegeken (prof. Frühling János, Kovács Gábor)*

2.4.1. A protokoll kidolgozása

2.4.2. 20 NSCLC beteg beválasztása és kezelése ZD6474 el

A pre- és poszt-kezelési vérmintákban a keringő angioblasztok kimutatása citokémiai és molekuláris módszerekkel

2.4.3. ZD6474 kezelés hatásainak feldolgozása, az angioblaszt monitorozás értékének kielemezése

*3 Programcsomag: / Új melanoma diagnosztikumok és terápiás eljárások fejlesztése*

*3.1. Melanoma-marker azonosítása globális genomika segítségével. Témavezető: dr. Timár József*

A melanoma-diagnosztika mind a mai napig olyan markereket használ, amelyek melanocita-specifikusak, így a patológiai határesetek (diszplasztikus nevus-léziók) diagnosztikája pusztán morfológiai alapú. Ezért nagy szükség van olyan markerre, amely a melanómákat a jóindulatú nevusoktól el tudja különíteni. Korábbi DNS-chip-vizsgálataink számos gén fokozott expresszióját mutatta a melanómákban; köztük néhány esetében (cyclin E, ryanodin R2,  $\beta$ 3 endonexin, decorin) felmerült, hogy hasznos diagnosztikus markerré fejleszthető. A jelen kutatási periódusban e gének mRNS- és proteinszintű expresszióját tesztelnénk jó- és rosszindulatú pigmentsejtes tumorokon és ún. diszplasztikus állapotokban. Amennyiben a rendelkezésre álló antitestek nem megfelelőek paraffinos minták analízisére, új monoklonális antitesteket tervezünk és készítünk alvállalkozóként hazai biotechnológiai kisvállalkozást bevonva. A program egyes lépései:

3.1.1. Új melanóma markerek expressziójának vizsgálata naevusban és melanómában-RT-PCR segítségével

A programban a CyclinE,  $\beta$ 3endonexin, decorin expressziót határozzuk meg 50 melanoma, 20 naevus, 10 dysplastikus naevus esetében

3.1.2. Új melanóma markerek expressziójának vizsgálata naevusban és melanómában lézer-mikrodisszekció segítségével:CyclinE,  $\beta$ 3endonexin, decorin

A fenti 80 minta esetében, ahol az megvalósítható, a tumort lézer-mikrodisszekció útján a metszetekből eltávolítva q-PCR útján ellenőrizzük a differenciált génexpressziókat.

3.1.3. Új melanóma markerek protein expressziójának vizsgálata immunhisztokémiával naevusban és melanómában

A fenti 80 mintában immunhisztokémiai módszerrel azonosítjuk a 3 antigént és teszteljük differenciáldiagnosztikus erejüket.

A kutatási periódus végére egy multiplex molekuláris diagnosztikus PCR-kit és egy immunhisztokémiai kit prototípusának létrehozása a cél.

*3.2. Melanóma áttétképzési képességét meghatározó genetikai konstellációk meghatározása.*

Miután a rosszindulatú daganatok, így a melanóma progressziójában alapvető szerepe van a daganatsejtek migrációs képességének, hipotézisünk az, hogy amennyiben meghatározzuk a daganatsejtmigrációban meghatározó szerepet betöltő jelátviteli útvonalakat, ennek révén a melanóma biológiai viselkedése megjósolható (prognosztizálható) és ennek a képességnek felfüggesztése pedig a melanóma progressziót hátráltatja. Ennek megfelelően célunka következő:

3.2.1. A motilitási szignálút vonal kulcs-elemeinek expressziós mintázatának meghatározása eltérő klinikai lefolyású melanómákban makrochip segítségével 10-10 progrediáló illetve gyógyult esetben

A vizsgálatokhoz általunk tervezett makrochipet fogunk használni, mely segítségével a korábban azonosított motilitási mintázatot elemezzük. A fenti anyagban lézer-mikrodisszekció, q-PCR segítségével elemezzük a chipen megváltozott gének expresszióját.

3.2.2. A motilitási szignálút vonal kulcs-elemeinek protein-szintű expressziós mintázata eltérő klinikai lefolyású melanómákban: paraffinos minták elemzése.

3.2.3. A vizsgálatok eredményeként egy ún. Melanóma-progressziós PCR-kit illetve immunhisztokémiai kit prototípusának kialakítása.

*3.3. A melanóma progressziójának gátlása alacsony mólsúlyú heparinnal*

Korábbi vizsgálataink során igazoltuk, hogy alacsony mólsúlyú heparinnal az emberi melanoma sejtek motilitása és áttétképző képessége in vitro és kísérleti rendszerekben gátolható (8). Mindezen megfigyelések alapján kutatásainkat két irányba kívánjuk folytatni. Egyrészt klinikai körülmények között teszteljük az LMWH heparin hatását III stádiumú melanómás betegek daganatának progressziójára, másrészt preklinikai modellekben igyekszünk meghatározni a kulcsfontosságú molekuláris mechanizmusokat amelyek a melanóma mozgásának heparin-függőségét okozzák.

3.3.1. Klinikai Protokoll kidolgozása, engedélyeztetése. A melanoma sejtek mozgását gátló heparin-szerű ún. Oligosaccharidok tesztelése

Az oligo-szaharidokat dr. Gallagher laboratóriuma (Paterson Institute for Cancer Research, Manchester, UK) szolgáltatja a szükséges mennyiségben (a munka egy közös EU FP6 pályázat kialakításához kapcsolódik). A tesztelés in vitro migrációs assay segítségével történik. A szerek hatásának szélesebb körű kivizsgálása a tumorsejtek proliferációs/ és túlélő képességének meghatározására is irányul.

A klinikai vizsgálatba 20-20 III. Stádiumú melanomas beteget vonunk be akik a standard DTIC kezelést kapják a regionális nyirokcsomóáttét fellépte illetve eltávolítása után. A kezelést a műtét után 1 hónapos időtartamra tervezzük a szokásos thrombosis-profilaktikus dózisban. A betegek követése két évig történik: ebben a stádiumban a betegek közel felének daganata 2 éven belül progrediál.

3.3.2. LMWH heparin+DTIC kezelés St-III melanómás betegek esetében. Genomikai illetve géntechnológiai eljárásokkal vizsgáljuk a melanóma heparán szulfát proteoglikánjainak (CD44v3 és syndecan-4) szerepét a sejtek proliferációjában és motilitásában in vitro.

### 3.3.3. A kezelt betegek kórlefolyásának kiértékelése (48 hónap)

A túlélési illetve terápiás válasz-adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel értékeljük, ennek alapján javaslatot teszünk a heparin alkalmazási javallatának változtatására. Genomikai illetve géntechnológiai eljárásokkal vizsgáljuk a melanóma heparán szulfát proteoglikánjainak (CD44v3 és syndecan-4) szerepét a sejtek proliferációjában és motilitásában in vivo melanoma-metastasis modellekben.

## **4 Programcsomag: Terápia-individualizálás farmakogenomikai módszerekkel**

### *4.1. Növekedési faktor receptor és hormonreceptor kölcsönhatás farmakogenomikája emlő- és fejnyaki daganatokban (dr. Csuka Orsolya)*

Vizsgálataink célkitűzéseit az indokolja, hogy az emlő daganatok proliferációját, metasztázis képzését a hormon receptorok mellett tirozin kináz típusú növekedési faktorok (EGFR, HER2) szabályozzák. Felvetődött az a lehetőség, hogy ezen receptorok az emlő daganatok mellett fej-nyaki daganatokban is előfordulnak. Feltételezik, hogy az estrogen receptorok és növekedési faktorok szignalizációja közötti kölcsönhatás „cross talk” eredményezi az antiestrogén kezeléssel szembeni rezisztenciát. Ezen feltételezést támasztja alá az a tény, hogy az ER+ daganatok megközelítőleg 50%-a rezisztensé válik az antiestrogén kezeléssel szemben. Ugyanakkor ezen daganatokban a HER2 és EGFR szint megemelkedik.

A hormon dependens tumorok optimális terápiás tervének kialakításához tehát ismerni kell a daganat ER státusa mellett az EGFR és HER2 státust is. Bebizonyosodott ugyanis, hogy ezen növekedési faktor receptorok overexpressziója az antiestrogén rezisztencia mellett Cisplatin és sugárkezeléssel szembeni rezisztenciát eredményezhet. A rezisztencia alapja feltehetően az, hogy tirozin kinázok szignalizációját ezen gyógyszerek nem befolyásolják és a daganatos proliferációt a növekedési faktor receptorok továbbra is stimulálják. Ennek alapján olyan kombinációs terápia kifejlesztése indokolt, amely mind a HER2, mind az EGFR működését is gátolja. Az individuális terápiás terv kialakításához nyújthat segítséget az ER szignalizáció és a növekedési faktorok szignalizációjának együttes meghatározása, amely DNS chip alkalmazásával realizálható. A hormon dependens daganatok terápiájában fontos szerepe van az aromatáz gátlóknak. Az estrogenek lokális bioszintézisében többek között az aromatáz cytochrome P450 (P450 arom) vesz részt, amely a CYP19 gén terméke. A CYP19 gén polimorfizmusa és a magas prostaglandin szint (PGE2) az aromatáz fokozott transzkripciójához vezet. Ugyanakkor a PGE2 szintet mint ismeretes, a cyclooxygenase (cox) enzim szabályozza. A daganatok metasztázisát növekedési faktor receptor szintek (HER2, EGFR) változása kísérheti, amely alapvetően megváltoztatja a metasztatizáló daganatok terápiás tervének kialakítását. Ennek értelmében meghatározni kívánjuk a primer daganatok és a csontvelőben kialakuló micrometasztázisok EGF és HER2 expressziójának szintjét, összefüggést keresünk a csontmetasztázist jelző szérumszintek között azzal a céllal, hogy a csontvelő metasztázis szérumszintek prediktív értékét meghatározzuk.

4.1.1. Molekuláris célpontok screenelése genomikai módszerekkel emlő- és fejnyaki daganatokban

4.1.2. Célzott kombinációs terápiás eljárások preklinikai kidolgozása

4.1.3. Hormon- és növekedési faktor receptor expressziós mintázat jelentőségének meghatározása a csonttátek kialakulásában

### *4.2. Fejnyaki rákok „hormonterápiájának” kidolgozása. Témavezető: dr. Frühling János*

Korábbi vizsgálataink fej-nyaki laphámrákokban funkcionális ösztrogénreceptor-expressziót igazoltak, amely kedvezőtlenül befolyásolja a zömében férfibetegek túlélését. A program lépései:

Klinikai mintákban meghatározzuk az Er+ és ER- fejnnyaki rákok hormon-jelátviteli pályáinak sajátosságait DNS chip technika segítségével.

4.2.1. ER+ fejnnyaki laphámrákok kiegészítő hormon-terápiás protokolljának kidolgozása és engedélyeztetése

4.2.2. 20 ER+ előrehaladott fejnnyaki laphámrákos beteg beválasztása, és kezelése a standard kemoradioterápia mellett: kontroll 20 ER- fejnnyaki laphámrákos beteg.

4.2.3 A Kiegészítő hormon-terápia hatásainak kiértékelése 48 hónapos utánkövetés esetében.

#### *4.3. Daganatok Antraciklin terápiajának monitorozása non-invazív molekuláris képalkotó eljárással. Témavezető: dr. Kásler Miklós*

A daganatterápiában manapság alkalmazott citosztatikumok tumorszövetben való jelenlétét rutinszerűen nem-invazív módon ma nem tudjuk kimutatni, kizárólag farmakológiai/biokémiai módszerekkel, de ez esetben a tumorszövetből minimálisan biopsziát kell venni. Az egyik legszélesebb körben alkalmazott citosztatikum (antraciklin) azonban lehetőséget ad arra, hogy fizikai tulajdonságai miatt nem-invazív módon is nyomon követhessük, miután az antraciklinek spontán fluoreszcenciával rendelkeznek. A projekt célja olyan preklinikai vizsgálatok végzése *in vitro* és *in vivo*, emberi daganatok, elsősorban emlőrákok felhasználásával, amelyekben az antraciklinek szervezetben való eloszlását, a tumorban való feldúsulását mutatjuk ki fluoreszcencia alapján. A projekt másik aspektusa olyan készülék tervezése, amely emberi testben képes ilyen módon az antraciklinek daganatszövetben való jelenlétét kimutatni. A program lépései:

4.3.1. Antraciklin sejten belüli lokalizációjának kimutatása humán emlőráksejtekben fibroblasztban és endotélsejtben

A gyógyszerfelvétel dinamikájának és koncentráció-függésének meghatározása az első célunk, esetleges normál/daganatos eltérések rögzítése fluoreszcens mikroszkóppal.

4.3.2. Antraciklin tumorszövetben való kimutatása humán metasztatikus emlőrák SCID modellben

Ebben a periódusban *in vivo* SCID egereket kezelünk terápiás dózisu antraciklinnel és vizsgáljuk az egyes szervekben megjelenő gyógyszert fluoreszcens mikroszkóppal fagyasztott metszetben és megkíséreljük az egésztest fluoreszcenciás vizsgálatot **módosított fluoreszcens mikroszkóppal**. SCID egerekbe humán emlőrákot oltunk ortotopikusan és a primer tumorban majd az áttétekben (agy, csont, máj) vizsgáljuk az antraciklin jelenlétét illetve halmozódásának dinamikáját.

4.3.3. Antraciklin szöveti jelenlétének tesztelése non-invazív képalkotó eljárással neoadjuváns kezelésben részesülő emlő- illetve rektumrákos betegekben

A neoadjuváns antraciklin kezelésben részesülő emlő- és/vagy rektumrákos betegeket biológiailag nem káros hullámhossztartományú UV fényvel exponálunk, vizsgáljuk az autofluoreszcencia hullámhosszát és paramétereit, az adatokat digitális kamerával rögzítjük. A kapott adatokat a klinikai válasz szempontjából is értékeljük és a későbbi műtéti anyagban is keressük fagyasztott mintában az antraciklint (normál szövet és tumorszövet, esetleg metasztázis).

#### *4.4. Vastagbélrák kemoterápiájának farmakogenomikája. Témavezető: dr. Kralovánszky Judit.*

A vastag- és végbéldaganat a férfiak esetében a második, a nők esetében a harmadik halált okozó rosszindulatú daganatos megbetegedés. Az utóbbi években az *5-fluorouracil* (5-FU) mellett új hatóanyagok, orális fluoropirimidin készítmény (*capecitabin, UFT*), antifolatok (*raltitrexed, pemetrexed*), topoizomeráz gátló (*irinotecan*) és az új platina származék (*oxaliplatin*) kerültek klinikai alkalmazásra a fenti daganatokban. A közeljövőben várható a molekuláris célpontok ellen tervezett citosztatikumok pl. a vaszkuláris növekedési faktort (VEGF) gátló *bevacizumab* a jelátviteli mechanizmus gátlását eredményező EGFR receptor gátló *cetuximab* és COX-2 gátlók rutinszerű bevezetése a klinikai gyakorlatba. A fentiek ismeretében a terápia optimális, költségkímélő megtervezésében elengedhetetlen a daganatok gyógyszerekkel szembeni

érzékenységet/túlérzékenységet és prognózisát meghatározó molekuláris farmakológiai és farmakogenetikai vizsgálatok eredményeinek ismerete. Vizsgálni kell azoknak a géntermékeknek, molekuláris targeteknek, metabolikus enzimeknek expresszióját, genetikai variánsait (mutációk, polimorfizmusok), amelyek farmakogenetikai szereppel bírnak az 5-FU és fent említett új hatóanyagok és kombinációjuk hatékonyságában/toxicitásában.

Korábbi vizsgálataink eredményei igazolták, hogy az 5-FU molekuláris target enzimének timidilátszintáz (TS) szintje [10], génpolimorfizmusai [11] mellett a folát ciklus enzimeinek expressziója és génpolimorfizmusai/mutációi [12] jelentősen befolyásolják a fluoropirimidinek és a TS között kialakuló ternier komplex mennyiségét és stabilitását, ami a kezelés hatékonyságának feltétele. Ugyancsak kimutattuk, hogy az 5-FU lebontásának elmaradása súlyos mellékhatások kialakulásához vezet [13], amelynek elhárítása a kezelés költségeinek jelentős emelkedését okozza.

Vizsgálataink során, korábban megkezdett munkánk folytatásaként a vastag- és végbéldaganatokban a közelmúltban bevezetett gyógyszerek prediktív markereinek vizsgálatát tervezzük tumorszövet és vérmintákon. Az *oxaliplatin* rezisztenciában szerepet játszó exciziós nukleotid repair mechanizmusért felelős gén (XPD) expressziójáért felelős polimorfizmus (Lys751Gln) ismerete fontos a gyógyszer által okozott sejtkárosodás kijavításának és így az oxaliplatinnal szembeni rezisztenciának az előrejelzésében. A pirimidin és folátciklus támadáspontú gyógyszerek farmakogenomikája magába foglalja a TS szintjét befolyásoló faktorok: TS expresszió, TS polimorfizmus (TSER, TSUTR), TS génamplifikáció és LOH vizsgálatát, valamint a folátanyagcsere enzimeit: 5,10-metiléntetrahidrofolát reduktáz (MTHFR) C677T és A1298C, szerinhidroximetil-transzferáz (SHMT1) C1420T, metionin szintáz (MS) A2756G polimorfizmusának valamint a homocisztein szintnek a vizsgálatát. A klinikai hatékonyság mellett, az esetleg kialakuló súlyos mellékhatások prediktálása is, a biztonságos kombinációs terápia tervezésének fontos eleme. Vizsgálni kívánjuk az UDP glukuronát-transzferáz UGT1A1\*28 polimorfizmusát, amely az *irinotecan* súlyos mellékhatásainak kialakulásában játszik szerepet, hasonlóképpen az *5-FU* ill *capecitabine* toxicitásában szerepet játszó DPD IVS14+1G>A mutációt.

Az utóbbi évek vizsgálatai igazolták, hogy a szelektív COX-2 gátlóknak nem csak a colon daganatok kemoprevenciójában van szerepe hanem önmagukban, vagy a citotoxikus terápiával kombinációban, daganatellenes hatásuk is van. A COX-2 inhibitorok hatását in vitro és in vivo kísérletes rendszeren ill a COX-2 -765G>C génpolimorfizmust tervezzük vizsgálni.

A farmakogenetikai vizsgálatok és a gyógyszeres kezelése eredményességének értékelése (remissziók, betegségmentes túlélés, teljes túlélés, mellékhatások) a betegek követése, számítógépes adatbázis létrehozása és annak statisztikai értékelése alapján történik. Jelen vizsgálataink célja vastag- és végbéldaganatos betegek műtétet követő adjuváns, és a metasztázis kialakulását követő palliatív kemoterápiás kezelése során nagyszámú betegen a fenti farmakogenetikai markerek vizsgálata, és a kezelés hatékonyságának a betegek prognózisának statisztikai kiértékelése után, egy olyan vizsgálati rendszer kialakítása, amelynek rutinszerű alkalmazása a gyógyszerek optimálisabb, költséghatékonyabb alkalmazását teszi lehetővé. Mindezek alapján terveink az alábbiak:

- 4.4.1. A CRC-k adjuváns kezelésének költséghatékony optimalizálása a farmakogenomikai vizsgálatok alapján.
- 4.4.2. A farmakogenomika alkalmazása a metasztatikus CRC-k palliatív kemoterápiája költség hatékonyságának növelésére.
- 4.4.3. Új gyógyszerkombinációk tervezése és experimentális vizsgálata CRC-ban.

### 1.3. Az eredmények hasznosítása

#### *1. Programcsomag: Molekuláris diagnosztikai eljárások kifejlesztése*

A multidiszciplináris munkacsoport (OOI) Magyarországon és a régióban úttörő módon vezette be az emlőrákos családok és más daganatszindrómák (FAP, HNPCC) esetében a

molekuláris rákgenetikai tesztek. A munkaterv sikeres megvalósításától várható új ismeretek közvetlenül alkalmazhatók lesznek a magas kockázatú rákos családok részére végezhető *molekuláris rákgenetikai szűrővizsgálatokban*, továbbá a familiáris daganatok 4 csoportjában a korai detektálás, diagnózis és kockázatszámítás új modelljeinek kifejlesztésében. A Klinikai Genetikai Szakmai Kollégium megbízásából (Oláh Edit) által készített „Családirag halmozódó betegségek” c. Szakmai Protokoll aktualizálható lesz. Az örökletes daganatok kialakulásával kapcsolatos új molekuláris genetikai ismeretek közvetlenül orvosi-egészségügyi hasznosításra kerülnek a familiáris daganatos megbetegedések kapcsán felajánlott molekuláris genetikai szűrővizsgálatokban.

A kifejlesztésre kerülő, a sporadikus daganatok molekuláris diagnosztikájára alapozva új szolgáltatásokat vezetünk be az OOIben. A szolgáltatások alapja a kialakítandó molekuláris diagnosztikus csomagok létre hozása amit a partner vállalkozások kívánnak piacra vinni.

Bár a daganatkeletkezésre hajlamosító genetikai tényezők meghatározása illetve vizsgálata költségigényes (egy komplex molekuláris teszt a leggyakoribb daganatfélésekre való hajlam esetében elérheti a 100.000 Ft-ot), ennek mégoly magas költségei is eltörpülnek a már kialakult daganat diagnosztizálásának, primér ellátásának és a munkából történő kiesésnek együttes költségeitől. Tipikusan egy emlőrákos beteg primer ellátása magasabb mint 100000 Ft és amennyiben kemo- és radioterápiára is szükség van akkor annak költsége a biztosító számára újabb 100000 Ft, amikor a táppénzes hónapok miatti költségeket nem is számoltuk. Mindebből látható, hogy a költséges molekuláris rákhajlam-megállapítás ténylegesen jelentős költség-megtakarítást jelent a biztosító számára.

Például, a molekuláris staging felhasználásával el lehet dönteni, hogy egy lymphomás beteg 6 vagy 8 MabThera kúrát kapjon illetőleg a fenntartó kezelés 1 vagy 2 évig tartson. Azok a betegek, akik rövidebb kezelést kapnak, egyénenként 3.000.000 Ft-nyi gyógyszerrel kevesebbet igényelnek. Ez egész Magyarországon 50-100 beteget is érinthet, így 1 éves megtakarítás 150-300.000.000 Ft is lehet.

Az EGFR ellenes kemoterápia a tumorok immunhisztokémiai pozitívására van alapozva. Az eddigi adatok arra utalnak, hogy az ilyen daganatok kb. fele reagál megfelelően az EGFR ellenes kezelésre. Ezekben a daganatokban várhatóan az EGFR génmutáns vagy amplifikált. Ha a nem reagáló tumorokat genetikai vizsgálattal kiválasztjuk, az betegenként 3.000.000 Ft felesleges gyógyszerkiadás megtakarítását jelent. Ez a megtakarítás az egész országra számítva legalább 1000 beteget érinthet.

## *2 Programcsomag: Daganatereződés diagnosztikus, prognosztikus jelentősége és terápiás kiaknázása*

A tervezett vizsgálatoktól azt várjuk, hogy kideríti, hogy mekkora jelentősége van az un. embrionális angiogenezisnek a daganatos vérellátásban. Egyik mellékterméke lehet az, vajon felhasználható-e a keringő angioblaszt kimutatása a malignus tüdődaganat korai jelzésére illetve az angiosztatikus terápiák hatásainak monitorozására. Ehhez megfelelő diagnosztikus PCR és/vagy immuncitokémiai kit prototípusát fogjuk létrehozni. A vaszkularizációs sajátosságok szövettani típus szerinti sajátosságai azzal a klinikai előnnyel is járhatnak, hogy az új és költséges angioszuppresszív terápiás eljárások szempontjából optimális altípusokat azonosíthatunk.

Az avb3 integrin/PEX domén kölcsönhatást függesztő kismolekulású ligandok révén új angioszuppresszív molekulacsaládot szabadalmazunk. Az erythropoetin klinikai hatásainak elemzése révén javaslatot tehetünk klinikai onkológiai alkalmazásának módosítására/kiszélesítésére. A mai költséges citosztatikus kezelések hatásfokának növelése a későbbi kiújulások illetve progresszió gyakoriságának csökkentésével hatékonyabbá teheti több rosszindulatú daganatfélése (emlőrák, fejnyaki rák, tüdőrák) kezelését.

## *3. Programcsomag: Új melanoma diagnosztikumok és terápiás eljárások kifejlesztése*

Célunk egy többkomponensű molekuláris melanóma-diagnosztikus csomag kialakítása, szabadalmaztatása és prototípusának elkészítése, amely alkalmazható a malignus/benignus melanocita léziók elkülönítésére.

A melanóma-motilitási expressziós mintázat meghatározásától azt várjuk, hogy néhány melanóma-specifikus progressziós markert segít azonosítani, amelyre egy ún. Prognosztikus makrochip vagy multiplex PCR kit illetve azt kiegészítő immunhisztokémiai kit szabadalma és prototípusa alapozható.

Az alacsony mólsúlyú heparinok melanómában történő tesztelése hozzájárulhat ahhoz, hogy ezen gyógyszer-család új alkalmazási területét (progresszió-gátlás) azonosítsa és ezzel hozzá járjon a ma még alig befolyásolható előrehaladott melanómás betegek hatékony kezeléséhez.

#### *4. Programcsomag: Terápia-individualizálás farmakogenomikai módszerekkel*

A vizsgálat sorozat egyik eredménye lehet új terápiás targetek azonosítása estrogen és growth faktor receptorok szignál átviteli útjainak DNS chip alapú azonosításával. A molekuláris target szintek (HER2, EGF, Cox-2, aromatáz) meghatározása primer és metasztatizáló daganatokban az optimális terápiás terv kialakítása érdekében ma már az optimalizált tehát hatékonyabb és kevesebb mellékhatást okozó klinikai ellátás alapja. Preklinikai eredményeink alapján kombinációs terápiás eljárás kerülhet kidolgozásra antiestrogének és tirozin kináz gátlók együttes alkalmazására.

A fejnyaki laphámrákok hormonterápiás lehetőségének klinikai igazolása egy a ma használatos citosztatikus kezeléseknél kevésbé veszélyes (kevesebb mellékhatással járó) terápia alkalmazását készítheti elő, amely kevés kockázattal fokozhatja a standard terápia hatásosságát. Miután hazánkban igen nagyszámú ilyen beteg kerül kezelésre, ennek társadalombiztosítási előnyei is igen jelentősek lehetnek a kiújulások és a progresszió csökkentése illetve az újabb kezelések szükségtelenné válása révén.

Az antraciklinek az egyik leggyakrabban használt daganatgátló szerek, amelyek hatásosságát csak hetekkel/hónapokkal alkalmazásuk után lehet ma lemérni. Ebből a szempontból igen fontos lehet az, hogy a klinikai alkalmazás során a bevezetendő molekuláris képalakító eljárással (teljestest fluoreszcencia-makroszkópia vagy endoszkópia) a daganatszövetben történő gyógyszer-felhalmozódást ki lehet majd mutatni. Ennek elmaradása ugyanis a terápia azonnali módosítását teszi szükségessé, ami a kemoterápia hatékonyságának illetve individualizálásának lehetőségét teremti meg azon daganatok esetében, ahol az antraciklin terápia a mai protokollok egyik pillére.

A kemoterápiás kezelés mellékhatásai a colon és rectum tumorok esetében a különböző kezelési protokollok miatt eltérnek. A colon tu esetében 5%-ban enyhe és 5%-ban súlyos toxicitás (neutropénia, hányás, hasmenés) fordulhat elő. Rectum tumor esetében 40% és 10% az enyhe és súlyos toxicitások aránya. Ezeknek gyógyszeres ellátása (antibiotikumok, csontvelő stimuláló faktor, vérkészítmény, stb) plusz költséget ró az OOI-re és az egészségügyi finanszírozóra. Ez, az évi kb. 600 CRC-s beteg esetén, melyet az OOI kemoterápiás osztályain kezelnek, hozzávetőleg 12 millió Ft többletköltséget jelent. A vizsgálandó polimorfizmusok alapján a toxikus kezelések kiválthatók és így a többletköltség jelentősen csökkenthető. Az eddigi vizsgálataink alapján megállapítható, hogy egyes gén polimorfizmusok befolyásolják a CRC-s betegek tünetmentes és teljes túlélését is. Belátható, hogy a farmakogenetikai vizsgálatokon alapuló kemoterápia a rosszabb prognózisú betegek túlélésén javíthat és ezzel hosszabb kezelésmentességet és munkaképességet biztosítva a társadalom egészségügyi ráfordítását jelentősen csökkentheti.

#### *Publikációs aktivitás*

Valamennyi alprogram esetében várható több nemzetközi jelentőségű közlemény keletkezése, amit a Konzorcium korábbi 3 éves munkája alapján (9 alprogram-100 közlemény) a tervezett 4 alprogram esetében közel 40-re tehető. Ugyanakkor azt tervezzük, hogy a

szabadalmazható eredmények esetében a szabadalmi folyamat prioritásai lesznek az elsődlegesek és nem a publikációsak. A klinikai vizsgálatok esetében ugyanakkor (alacsony mólsúlyú heparin, antiösztrogénok, EPO) alapvető fontosságú a klinikai közlemények elkészítése, ami a szélesebb körű alkalmazásaik kidolgozásának elemi feltétele.

#### *Munkaerőpiaci hatások*

A Konzorcium a 3 éves program során minimálisan 3 új PhD hallgató és egy posztdoktor biológus alkalmazását vállalja az OOI-ben. A klinikai vizsgálatok vezetésével a nemzetközi hírű és nagy tapasztalatokkal rendelkező *Frühling professzort* kívánja a Konzorcium megbízni, ezzel elősegítve külföldön élő kutatók/ orvosok hazatérését.

Egy másik igen fontos munkaerő-piaci hatása lehet a többretegű programnak az, hogy melanómás, tüdőrákos- vagy fejnnyaki daganatos betegek kezelése hatékonyabbá válik és ezek a betegek visszatérhetnek munkájukhoz, nem kell őket táppénzen tartani. Figyelembe véve a kezelt daganatos betegek nagy számát ( $2 \times 10^5$ ), ha csak 1%-os javulást tudunk hosszabb távon elérni a munkába történő visszatérésük arányában, ennek évi táppénz-kihatásai igen jelentősek: 50.000 Ft/hó táppénzzel számolva ez 1 MRD forintos nagyságrendű megtakarítás lehetne. Miután kutatás-fejlesztési programunk a nagy gyakoriságú daganatfészeségek (tüdőrák, emlőrák, fejnnyaki daganatok, melanóma) klinikai kezelésének javítását célozza, az új eljárások későbbi széleskörű bevezetése esetén a fenti nagyságrendű megtakarítás keletkezése valószínűsíthető.

#### *K+F hatások*

A Konzorcium több tagja is (2., 6., 7.) TKV, amelyek a biotechnológiai szolgáltató iparban illetve a sejtbiológiai iparban érintettek, és eddig még nem álltak kapcsolatban a hazai rákkutatással. Együttműködésünk eredményeként sajátos, a nemzetközi piacon is versenyképes termékkel bővíthet kínálati palettájuk, másrészt a hazai alapkutatói laboratóriumok számára képezhetnek megfelelő fejlesztési partnert.

A Konzorcium ipari partnerei közül az AstraZeneca hazai vállalatának Közép-európai kutatási központjával kialakuló kapcsolat hosszabb távon azzal kecsegtet, hogy a hazai onkológiai kutatási műhelyek, elsősorban az Országos Onkológiai Intézet, olyan fejlesztési potenciállal kerülhet kapcsolatba amely képes a keletkező alapkutatói eredmények további hasznosítására. A Janssen-Cilag-al kialakult most már hagyományos K+F kapcsolat a hazai onkológiai kutatási műhelyek hypoxia-tárgyú fejlesztéseinek ipari továbbvitelével is kecsegtet. A Konzorcium új tagja a GSK, mely regionális centrumként eddig kevésbé volt érdekelt onkológiai K+F-ben, remélhetőleg a sikeres program után ilyen irányú aktivitása is fokozódik

#### **Irodalom**

1. Timár J. A Nemzeti Onkológiai Kutatás-fejlesztési Konzorcium első évi tevékenysége. Magyar Onkológia 46:297-300,2002.
2. Timár J. Beszámoló a Nemzeti Onkológiai Kutatás-fejlesztési Konzorcium 2003.évi tevékenységéről. Magyar Onkológia 48:75-79,2004.
3. Timár J. Beszámoló a Nemzeti Onkológiai Kutatás-fejlesztési Konzorcium 2004.évi tevékenységéről. Magyar Onkológia 49:3-7,2005.
4. Orbán T. I., Oláh E.: Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. J CLIN PATHOL: MOL PATHOL – Review 56: 191-197, 2003.
5. Orbán, T.I., Oláh, E.: Purifying selection on silent sites – a constraint from splicing regulation? TRENDS GENET 17: 252-253, 2001
6. Timár J, Döme B, Fazekas K, Janovics Á, Paku S. Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. Pathol Oncol Res 7:85-95, 2001
7. Tóvári J, Gilly R, Paku S, Bereczky B, Varga N, Vágó Á, Timár J. Recombinant human erythropoietin alpha targets intratumoral blood vessels improving chemotherapy in human xenografts models. Cancer Res 2005 (elfogadva)
8. Bereczky B, Gilly R, Rásó E, Vágó Á, Timár J, Tóvári J. Selective antimetastatic effect of heparins in preclinical human melanoma models is based on inhibition of migration and microvascular arrest. Clin Exp Metast 2005 (elfogadva)

9. Tímár J, Csuka O, Remenár É, Répássy G, Kásler M. Progression of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Metast Rev* 24:107-127, 2005
10. Kralovánszky J., Köves I., Orosz Zs., Katona Cs., Tóth K., Rahóty P., Czeglédi F., Kovács T., Budai B., Hullán L., Jeney A.: Prognostic significance of the thymidylate biosynthetic enzymes in human colorectal tumors. *Oncology* 62:167-174, 2002.
11. Adleff V., Hitre E., Köves I., Orosz Zs., Hajnal A., Kralovánszky J.: Heterozygote deficiency in thymidylate synthase enhancer region polymorphism genotype distribution in hungarian colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 108:852-856, 2004.
12. Budai B., Hitre E., Adleff V., Czeglédi F., Gyergyay F., Láng I., Kralovánszky J.: A metiléntetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR) C677T polimorfizmus klinikai jelentősége a metasztatikus colorectalis daganatok 5-fluoropirimidin alapú kezelésében. *Magyar Onkológia* 48:253-257, 2004.
13. Kralovánszky J., Adleff V., Budai B., Pandi E.: A kolorektális rákok gyógyszeres terápiájának hatékonyságát meghatározó tényezők. *Motesz Magazin* 2:15-21, 2004.

## 2. Költségterv

A konzorcium költségtervét az ajánlásoknak megfelelően alakítottuk ki. A teljes program költsége 484.89 Mft amely 4 programcsomagra fordítódik. A teljes költség mintegy 75%-át pályázzuk támogatásként, míg 25%-át a vállalkozói kör adja döntően dologi költség formájában. A vállalkozói kör tevékenysége alkalmazott (klinikai) kutatás és kísérleti fejlesztés lesz 50-50%-os arányban, ezért a tervezetben a vállalkozói kör 50%-os finanszírozási arányt követett.

A Konzorcium koordináló intézménye az Országos Onkológiai Intézet, amely a teljes költség közel felét 232 Mft-ot pályázik 100%-os támogatás formájában. A korábbi gyakorlattól eltérően az intézet nem tud önrészt vállalni tőke formájában, de továbbra is biztosítja a kutatásban résztvevők bérét. Az OOI költségvetésében a beruházási költségek a szükséges kisebb műszerek beszerzését jelentik és a teljes támogatás 1/3-ra rúgnak, ebben a kutatás-fejlesztések molekuláris eszközparkjának kisebb kiegészítései szerepelnek csak. Az OOI támogatás másik 1/3-a dologi költség, hiszen a kutatás döntően itt fog történni, itt lesz a legnagyobb az anyagfelhasználás. A személyi költségek a harmadik harmadot adják, amit a vállalt új PhD hallgatók és posztdoktor alkalmazását illetve a hazatelepülő külföldi professzor bérét valamint a sok kiegészítő technikai személyzet bérét jelenti.

A támogatás 35%-a a vállalkozásoknál jelentkezik, ezek elsősorban dologi költségekre használják, de a Roche esetében ez egy nagyműszer beszerzését jelenti (29 Mft), amely laborautomata a szérum csontmarker monitorozását fogja végezni a kutatási programban (4.1). **Külön felhívjuk a figyelmet arra, hogy az vállalkozói kör esetében amennyiben a pénzügyi tervben a sajátrésze vonatkozó költségvetésben ÁFA külön nem szerepel, ez azt is jelenti, hogy a saját rész erejéig ezen költségekre a vállalkozók nem érvényesítik ÁFA-levonási jogukat.**

Az alvállalkozói kör a teljes költségből kevesebb mint 10%-al részesül. Az AstraZeneca alvállalkozója az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet lesz az angiogenezis-gátló gyógyszer klinikai tesztelésére 20 Mft erejéig (2.4. program). Az Országos Onkológiai Intézet alvállalkozóként 20 Mft-os költségvetéssel az angiszuppresszív gyógyszer-család kifejlesztésére alkalmazza az MTA-SZBK Enzimológiai Intézetét, amely nagy tapasztalatokkal rendelkezik a témában (2.2. alprogram).

---

## 6. A project menedzsment bemutatása

A Konzorcium jogi személyiségei a témavezetőt dr. Tímár Józsefet bízták meg a program irányításával. A gazdasági/pénzügyi vezetést pedig a Konzorcium koordináló intézetének gazdasági vezetője Barna Zsolt látja el. A Konzorcium vezetőjének megfelelő tapasztalata van a sokszereplős program szakmai irányításában, miután a 2001-2004 periódusban a Nemzeti Onkológiai Konzorcium vezetője volt (NKFP1/48/2001). Az előző program tapasztalatai alapján a Konzorcium vezetésének szakmai és gazdasági testületét célszerű létrehozni.

A szakmai vezető testületben a 4 alprogram vezetője illetve azok vezető kutatói szerepelnek, akik félévente egyeztetik Konzorciális Ülésen a program végrehajtását. Az évi második Konzorciumi ülés a szakmai jelentési periódust megelőző 1 hónappal kerül megtartásra, amikor a szakmai jelentés előkészítése a cél.

Ugyanakkor az egyes alprogramok vezetői és résztvevő kutatói 3 havonta üléseznek a kutatás-fejlesztési programok előre haladásáról és arról elektronikusan tájékoztatják a témavezetőt. A köztes periódusban a kapcsolattartás alapvető módja az elektronikus levelezés illetve a munkaértekezlet amelyeket a szükséges gyakorisággal tart az alprogramvezető.

Nagy jelentősége van az alkalmazott kutatások esetében (klinikai mintákon történő vizsgálatok) a szükséges etikai engedélyek beszerzése, ami a munkák elkezdésének feltétele. Ezért célszerűnek látszik a program teljes periódusára valamennyi engedély beszerzését a szerződéskötéssel egyidejűleg elindítani.

Hasonlóan kiemelkedő jelentőségű és a témavezető működésének egyik legfontosabb része, valamennyi tervezett klinikai vizsgálat ún. Protokolljának az első évben történő elkészítése és az engedélyeztetési eljárásra bocsájtása.

Célszerűnek látszik a Konzorcium számára hogy a kutatási fejlesztési periódusra állandó szabadalmi ügyvivőt foglalkoztasson, akit az egyes alprogramok témavezetői a lehetséges szabadalmi és egyéb szellemi tulajdonvédelemmel kapcsolatos ügyeikkel folyamatosan megkereshetnek, illetve a lehetséges bejelentéseket a lehető legkorábban elindíthatják.

A Konzorcium gazdasági működésének koordinálásába célszerű a témavezetőnek is befolyjni a Konzorciális partnerek gazdasági vezetői mellett. Ezesetben is célszerű évente 2 ülést tartani. Az egyiket a project tényleges megkezdésekor (az előlegek leutalását követően), amikor is a tényleges pénzügyi aktivitás megkezdésének szabályait áttekintik. A másik ülésre pedig az éves pénzügyi jelentés elkészítését megelőző 1 hónappal látszik indokoltnak, amikor a jelentés elkészítésének módozatait és a tényleges pénzügyi aktivitást mérik fel. A gazdasági vezető testület a két ülés között elektronikusan érintkezik a koordinátoron keresztül. Abban az esetben, ha szakmailag indokolt költségvetés-módosítási igény lép fel valamely Konzorciumi tagnál, ezt a kérelmet haladéktalanul jelenteni kell a Konzorcium gazdasági és szakmai vezetésének, amely rendkívüli ülést hív össze ahol a grémium eldönti az igény jogosságát és szükség szerint kezdeményezi a módosítást a finanszírozó felé. Minden eszközzel el kívánjuk kerülni, hogy az éves pénzügyi jelentéskor derüljön csak ki az, hogy egyes Konzorciumi tag(ok) a pénzügyi tervétől eltért.

