Nachweis und Charakterisierung resistenzvermittelnder Varianten des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und nachgeschalteter Signalproteine unter EGFR-gerichteter Antikörpertherapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom und Kopf-Hals Tumoren

kumulative

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

am Fachbereich Chemie, der Fakultät für

Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Friederike Braig-Karzig

Hamburg 2016

„Nun, hier muß man nämlich so schnell rennen, wie man kann, um auf der Stelle zu bleiben.“

Lewis Carroll aus „Alice hinter den Spiegeln“

1. Gutachter: Prof. Dr. Mascha Binder
2. Gutachter: Prof. Dr. Edzard Spillner
Tag der Disputation: 18.11.2016

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Januar 2012 und September 2016 in der II. Medizinische Klinik und Poliklinik (Onkologie, Hämatologie und Knochenmarktransplantation mit Sektion Pneumologie) am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. med. Mascha Binder.

I Publikationsliste

I.I Akzeptierte Originalarbeiten mit Erstautorenschaft

1. *Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab.* Voigt M*, **Braig F***, Göthel M, Schulte A, Lamszus K, Bokemeyer C, Binder M. Neoplasia. 2012 Nov;14(11):1023-31.
2. *Epidermal growth factor receptor mutation mediates cross-resistance to panitumumab and cetuximab in gastrointestinal cancer.* **Braig F**, März M, Schieferdecker A, Schulte A, Voigt M, Stein A, Grob T, Alawi M, Indenbirken D, Kriegs M, Engel E, Vanhoefer U, Grundhoff A, Loges S, Riecken K, Fehse B, Bokemeyer C, Binder M. Oncotarget. 2015 May 20;6(14):12035-47.
3. *Liquid biopsy monitoring uncovers acquired RAS-mediated resistance to cetuximab in a substantial proportion of patients with head and neck squamous cell carcinoma.* **Braig F***, Voigtlaender M*, Schieferdecker A, Busch CJ, Laban S, Grob T, Kriegs M, Knecht R, Bokemeyer C, Binder M. Oncotarget. 2016 Apr 22. [Epub ahead of print]

I.II Originalarbeiten mit Erstautorenschaft in Revision

1. *$EGFR_{R521K}$ mediates resistance to cetuximab in head and neck cancer.* **Braig F**, Kriegs M, Habel B, Voigtlaender M, Grob T, Biskup K, Blanchard V, Sack M, Thalhammer A, Ben Batalla I, Braren I, Laban S, Danielczyk A, Goletz S, Knecht R, Riecken K, Fehse B, Loges S, Bokemeyer C, Binder M. Cancer Research. 2016.
2. *Antigen loss drives resistance to anti-CD19/CD3 bispecific T-cell engager in acute lymphoblastic leukemia and may be mediated by disrupted CD19 membrane trafficking.* **Braig F***, Brandt A*, Goebeler ME, Tony HP, Kurze A, Nollau P, Bumm T, Böttcher S, Bargou RC, Binder M. Blood, 2016.

I.III Akzeptierte Originalarbeiten mit Co-Autorenschaften

1. *Denosumab mimics the natural decoy receptor osteoprotegerin by interacting with its major binding site on RANKL.* Schieferdecker A, Voigt M, Riecken K, **Braig F**, Schinke T, Loges S, Bokemeyer C, Fehse B, Binder M. Oncotarget. 2014 Aug 30;5(16):6647-53.
2. *Radiosensitization of HNSCC cells by EGFR inhibition depends on the induction of cell cycle arrests.* Kriegs M, Kasten-Pisula U, Riepen B, Hoffer K, Struve N, Myllynen L, **Braig F**, Binder M, Rieckmann T, Grénman R, Petersen C, Dikomey E, Rothkamm K. Oncotarget. 2016 May 4. [Epub ahead of print]
3. *A transplant "immunome" screening platform defines a targetable epitope fingerprint of multiple myeloma.* Schieferdecker A, Oberle A, Thiele B, Hofmann F, Göthel M, Miethe S, Hust M, **Braig F**, Voigt M, von Pein UM, Koch-Nolte F, Haag F, Alawi M, Indenbirken D, Grundhoff A, Bokemeyer C, Bacher U, Kröger N, Binder M. Blood. 2016 Jun 23;127(25):3202-14

* geteilte Erstautorenschaft

II Inhaltsverzeichnis

I Publikationsliste 6

I.I Akzeptierte Originalarbeiten mit Erstautorenschaft 6

I.II Originalarbeiten mit Erstautorenschaft in Revision 6

I.III Akzeptierte Originalarbeiten mit Co-Autorenschaften 6

II Inhaltsverzeichnis 7

III Abkürzungsverzeichnis 9

1 Zusammenfassung 10

2 Abstract 11

3 Einleitung 12

3.1 Solide Tumore 12

3.1.1 Kolorektales Karzinom (CRC) 12

3.1.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereichs (HNSCC) 13

3.2 Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 14

3.2.1 Aufbau und Funktion 14

3.2.2 Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAPK)-Signalweg 15

3.2.3 Alternative EGFR-Signalwege 16

3.3 EGFR basierte Therapien 16

3.3.1 Therapeutische Antikörper 16

3.3.1.1 Ausgewählte klinische Studien 17

3.3.1.2 Nebenwirkungen 18

3.3.2 Tyrosinkinaseinhibitoren 19

3.4 Resistenzen 19

3.4.1 EGFR-basierte Resistenzen 19

3.4.2 Signalkaskaden-induzierte Resistenzen 20

3.5 Neue diagnostische Methoden 21

3.5.1 Liquid biopsy 21

3.5.2 Tiefensequenzierung 22

4 Zielsetzung 24

5 Synopsis 25

5.1 Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab 25

5.2 Epidermal growth factor receptor mutation mediates crossresistance to panitumumab and cetuximab in gastrointestinal cancer 27

5.3 Liquid biopsy monitoring uncovers acquired RAS-mediated resistance to cetuximab in a substantial proportion of patients with head and neck squamous cell carcinoma 29

6 Publikationen 31

7 Diskussion 62

7.1 Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab 62

7.2 Epidermal growth factor receptor mutation mediates cross-resistance to panitumumab and cetuximab in gastrointestinal cancer 63

7.3 Liquid biopsy monitoring uncovers acquired RAS-mediated resistance to cetuximab in a substantial proportion of patients with head and neck squamous cell carcinoma. 64

7.4 Zusammenfassung 65

7.5 Ausblick 65

8 Literaturliste *67*

9 Anhang *74*

9.1 Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS 74

10 Danksagung *75*

11 Eidesstattliche Versicherung *76*

III Abkürzungsverzeichnis

ADCC	zellvermittelte Zytotoxizität
AKT	Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
CDC	komplementabhängige Zytolyse
cfDNA	zellfreie DNA
CI	Konfidenzintervall
ctDNA	zirkulierende Tumor-DNA
DNA	Desoxiribonukleinsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ELISA	*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
ERK	*extracellular signal-regulated kinase*
FOLFIRI	Folinsäure, Fluoruracil und Irinotecan
FOLFOX	Folinsäure, Fluoruracil und Oxaliplatin
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin Nukletoid Austauschfaktoren
Grb	*growth factor receptor-bound protein*
GTP	Guanosintriphosphat
HB-EGF	*heparin binding EGF*
Her	*human epidermal growth factor receptor*
HNSCC	Kopf-Hals-Tumore
HPV	Humanes Papillom Virus
HR	Risikoquotient
JAK	Januskinase
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinasen
mCRC	metastasiertes kolorektales Karzinom
MEK	*mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mTOR	*mechanistic target of rapamycin*
NGS	Tiefensequenzierung
NSCLC	nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom
OS	Gesamtüberleben
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDPK1	*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*
PFS	progressionsfreies Überleben
PI3	Phosphatidylinositol 3
PIK3CA	*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform*
PIP_2	Phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphat
PIP_3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
RAF	*rapidly accelerated fibrosarcoma*
RAS	*rat sarcoma viral oncogene homolog*
SOS	*son of sevenless homolog*
STAT	*Signal transducers and activators of transcription*
TGF-α	*transforming growth factor alpha*
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor/en
tp	Tumorprotein

1 Zusammenfassung

Zu den drei elementaren Säulen der Krebstherapie (Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie) konnte in letzten Jahren ein weiterer Pfeiler hinzugefügt werden, die zielgerichtete Therapie, sog. *targeted therapy*. Zielgerichtete Therapeutika binden hoch spezifisch an auf Tumorzellen exprimierten Strukturen, sind somit lokal sehr effizient und schonen gesundes Gewebe (1,2). Eine solche Zielstruktur ist der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR). In gesunden Zellen führt die Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) an den EGFR zu einer Signalgenerierung am Rezeptor, die über eine zellinterne Signalkaskade zu Zellwachstum und Proliferation führt, bevor das Signal über strikte Regulationsmechanismen abgeschaltet wird (3). In vielen soliden Tumoren, wie z.B. beim metastasierten kolorektalen Karzinom (mCRC) und in Kopf-Hals-Tumoren (*head and neck squamous cell carcinoma* = HNSCC), ist diese Signalkaskade jedoch fehlreguliert, was zu ständigem, unkontrollierten Zellwachstum führt (4,5). Dies macht den EGFR zum idealen Angriffspunkt zielgerichteter Therapien: Der therapeutische anti-EGFR Antikörper Cetuximab ist bei Patienten mit mCRC und HNSCC zugelassen, alternativ kann beim mCRC der anti-EGFR Antikörper Panitumumab eingesetzt werden. Beide Antikörper binden an die extrazelluläre EGFR-Domäne, blockieren so die EGF-Bindung und dadurch die Signalgenerierung am Rezeptor, was letztlich zur Hemmung des Tumorzellwachstums und der Proliferation führt (6-11).

Leider sind viele Patienten bereits vor Beginn einer Antikörpertherapie resistent oder entwickeln im Laufe der Behandlung sekundäre Resistenzen. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind bisher nur teilweise geklärt (12-17). Ziel dieser Arbeit war die Wirkungsmechanismen therapeutischer Antikörper besser zu verstehen, molekulare Mechanismen, die zur Resistenz gegen anti-EGFR Antikörper führen aufzuklären und neue prognostische Biomarker zu etablieren.

Zunächst wurde das funktionelle Panitumumab-Epitop auf dem EGFR identifiziert und gegen das bereits bekannte Cetuximab-Epitop abgegrenzt. Anschließend wurde in Tumor-DNA und zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) von mCRC-Patienten unter Antikörpertherapie nach Mutationen in diesen Epitopbereichen gesucht. Als neue, resistenzvermittelnde EGFR-Mutation wurde in dieser Arbeit erstmalig die EGFR-Mutation G465R identifiziert welche zur Resistenz gegenüber beider EGFR-Antikörper Panitumumab und Cetuximab führt. Desweiteren konnte erstmalig gezeigt werden, dass es unter EGFR-Antikörpertherapie zu neu auftretenden aktivierenden *rat sarcoma viral oncogene homolog (RAS)*-Mutationen kommt, kommt welche neben den Mutationen im EGFR-Rezeptor die Entwicklung sekundärer Resistenzmechanismen im Tumor begründen.

Die Methode der *liquid biopsy* zeigt, dass resistenzvermittelnde minimale Subklone bereits detektiert werden können, noch bevor die Patienten eine klinische Resistenz gegen die therapeutischen Antikörper zeigen. Dadurch eignet sich das minimalinvasive Verfahren der *liquid biopsy* sehr gut für ein Monitoring möglicher resistenzvermittelnder Mutationen unter einer laufenden Therapie.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten in weiteren klinischen Studien an größeren Patientenkollektiven evaluiert werden, da sie helfen können resistenzvermittelnde Subklone frühzeitig zu erkennen und die Therapieoptionen schnell und individuell anzupassen, um so unnötige Nebenwirkungen der Therapeutika in den Patienten zu vermeiden.

2 Abstract

In addition to surgery, chemo- and radiotherapy, a novel therapy option was developed in recent years, called targeted therapy. Targeted therapeutics bind with high specificity to tumor cells, which makes them very efficient in targeting tumor cells and sparing healthy tissue (1,2). A promising target for this purpose is the epidermal growth factor receptor (EGFR). In healthy cells, the binding of the epidermal growth factor (EGF) to the EGFR triggers an internal signal cascade, leading to cell growth and proliferation (3). In healthy tissues, the signal cascade is tightly regulated. In many solid tumors, like metastatic colorectal cancer (mCRC) or head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) these mechanisms are dysregulated, which leads to constant, uncontrolled cell growth (4,5). Since the EGFR is located in the cell membrane, the receptor is the ideal point of attack for targeted therapeutic antibodies: Cetuximab, a therapeutic EGFR-antibody is used in patients with mCRC and HNSCC. For mCRC-treatment, the EGFR-antibody Panitumumab may be used alternatively. Both antibodies bind to the extracellular EGFR-domain, blocking EGF binding and therefore the growth signal generation (6-11).

Unfortunately, many patients are already resistant to theses therapeutic antibodies or develop resistances in the course of treatment. The underlying molecular mechanisms are so far only partially understood (12-17). The aim of this study is to better understand these antibodies' mechanisms of action and to discover novel molecular mechanisms leading to resistance against therapeutic EGFR-antibodies in patients with mCRC and HNSCC.

In the course of this study we first functionally dissected the exact epitopes of both therapeutic antibodies on the EGFR. This was followed by a screening for mutations within these epitopes in tumor and circulation tumor DNA (ctDNA) samples of antibody treated mCRC-patients. We found and functionally evaluated the EGFR-mutation G465R, which leads to resistance against Panitumumab and Cetuximab due to binding disruption. In ctDNA samples of HNSCC patients we did not find any *EGFR*-mutations. However, for the first time we could show that HNSCC-patients also developed activating *RAS*-mutations during Cetuximab therapy. A key feature of this work was a method called liquid biopsy, which enabled the detection of resistance mediating subclones, even before patients showed any clinical sign of resistance against the therapeutic antibodies. Therefore, liquid biopsy is suitable for monitoring resistance mediating mutations during therapy.

These results might help to detect resistance mediating tumor subclones even before clinical resistance occurs, which may help in tailoring EGFR-targeted therapies so unnecessary side effects can be avoided. A further validation of these results in large clinical studies of defined patient cohorts receiving EGFR-inhibiting antibodies is therefore highly desirable.

3 Einleitung

Krebserkrankungen sind, nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen, mit 223 758 Todesfällen im Jahr 2014, die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (18). Bei vielen Entitäten sind die Ursachen nicht bekannt, oder lassen sich nicht beeinflussen (19). Dennoch begünstigen gewisse Risikofaktoren eine Erkrankung. Hierzu gehören Alter, Tabakkonsum, ultraviolette- oder radioaktive Strahlung, Alkoholkonsum, bestimmte Chemikalien, manche Viren oder Bakterien, gewisse Hormone, familiäre Vorbelastung, Ernährung, Bewegungsmangel oder Übergewicht (19). Es ist jedoch nur ein Teil der Risikofaktoren aktiv beeinflussbar. Die Weltgesundheitsorganisation geht davon aus, dass sich ungefähr 30% aller Krebserkrankungen durch Prävention verhindern ließen (20). Dies macht die Entwicklung von neuen Therapeutika umso wichtiger.

Trotz des Einsatzes von neue Therapeutika mit vielversprechenden Ergebnissen in klinischen Studien gibt es immer wieder Patienten, die bereits zu Therapiebeginn resistent sind oder im Laufe der Behandlung Resistenzen ausbilden. Die Aufklärung der diesen Resistenzen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen ist somit von äußerster Wichtigkeit. Nur so kann eine optimale Versorgung der Patienten gewährleistet werden: Durch diagnostische und therapiebegleitende Untersuchungen können immer individuellere Therapiepläne erstellt und durch regelmäßige Kontrollen angepasst werden. So werden bestimmte Therapeutika nur dann eingesetzt, wenn auch ein Nutzen für den Patienten vorliegt. Im Gegensatz dazu können bei resistenten Patienten therapieinduzierte Nebenwirkungen und hohe Kosten für ohnehin unwirksame Medikamente vermieden werden. Des Weiteren eröffnen diese Forschungsergebnisse Angriffsstellen für die Entwicklung neuer und die Verbesserung bereits bekannter Therapeutika.

3.1 Solide Tumore

In einem gesunden Organismus sind der Vorgang der Zellteilung zur Bildung neuer Gewebe und das Beseitigen nicht mehr benötigter Zellen strikt reguliert. Durch externe Einflüsse oder zellinterne Vorgänge kann es in der Zelle zu Störungen kommen. Körperinterne Regulations- und Reparaturmechanismen sorgen in solchen Situationen dafür, dass Schäden repariert oder schadhafte Zellen zerstört werden. Häufen sich jedoch zu viele Schäden an, so können auch die zahlreichen Schutzmechanismen einer Zelle unzureichend sein. Die Zelle überlebt, statt abgetötet zu werden und wächst unkontrolliert weiter (21).

Im Gegensatz zu gesunden Zellen weisen Krebszellen folgende Kennzeichen auf, die allerdings nicht alle gleichzeitig auftreten müssen: ständiges unkontrolliertes Zellwachstum, Umgehen von wachstumslimitierenden Signalen, Widerstand gegen Zelltod, Vererbung der Unsterblichkeit auf Tochterzellen, Induktion von Angiogenese, sowie Invasion und Metastasierung in andere Gewebe (5).

Beispiele für solide Tumore sind mCRC, HNSCC, Mammakarzinome, Bronchialkarzinome, Nierenzellkarzinome und Ovarialkarzinome (22). Die Forschungsergebnisse dieser Arbeit beziehen sich ausschließlich auf das mCRC und HNSCC.

3.1.1 Kolorektales Karzinom (CRC)

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist in Deutschland bei Frauen die zweithäufigste und bei Männern die dritthäufigste Krebserkrankung mit einem mittleren Erkrankungsalter von 72 und 75 Jahren (19). Die Prognose hängt stark davon ab, in welchem Stadium der Erkrankung die

Diagnose erfolgt: bei einer frühen Diagnose beträgt die 5-jahres Überlebensrate 90 %, sind jedoch bereits Fernmetastasen vorhanden (mCRC), sinkt sie auf weniger als 10 % (23). Die Aufklärung der Molekularpathologie der Erkrankung ist somit wichtig um weitere Biomarker für eine noch frühere Diagnose zu identifizieren, eine personalisierte Therapie zur Behandlung zu erstellen und dadurch bei jedem Patienten bestmögliche Therapieergebnisse erzielen zu können (24).

CRC entstehen durch aktivierende Mutationen in Onkogenen wie z.B. dem *RAS*-Gen, sowie inaktivierende Mutationen in Tumorsuppressorgenen (z.B. *Tumorprotein 53, tp53*) innerhalb einer epithelialen Stammzelle. Hierbei ist es nicht wichtig in welcher Reihenfolge Mutationen auftreten, sondern die Art und Anzahl der in einer Zelle angehäuften Mutationen, da diese der Zelle einen Wachstumsvorteil verschaffen (25). Außerdem scheinen die DNA-Methylierung und Micro-RNA Biogenese beim CRC verändert zu sein, was zu weiteren fehlenden Regulationsmechanismen in der Zelle führen kann (26).

Therapeutisch wird, unabhängig vom Stadium der Erkrankung, eine Resektion des Primärtumors und gegebenenfalls vorhandener Metastasen angestrebt. In fortgeschrittenen Stadien wird dies mit einer vor- und/oder nachgeschalteten Chemotherapie kombiniert. Sind bereits Metastasen vorhanden, sind zu diesen beiden konventionellen Therapieansätzen noch die Antikörper Panitumumab und Cetuximab als zielgerichtete Therapeutika zugelassen (27).

3.1.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereichs (HNSCC)

Unter dem Sammelbegriff der Kopf-Hals-Tumore sind Tumore im Bereich des Kehlkopfs, des Rachens, der Mundhöhle, der Nasennebenhöhlen und der Nasenhöhle zusammengefasst. Histologisch sind ca. 90 % aller HNSCC Plattenepithelkarzinome. Alleine in Deutschland gab es im Jahr 2012 ca. 16.500 Neudiagnosen und 6.800 Todesfälle (19). Die Prognose bei fortgeschrittener Erkrankung ist mit einer 5-jahres Überlebensrate von 61 % bei Frauen im Vergleich zu Männern mit 48 % zwar günstiger, jedoch immer noch sehr gering (19). Eine Ursache hierfür ist das Fehlen von diagnostischen Biomarkern, vor allem in der Früherkennung. Dies führt dazu, dass nur ein Drittel aller Fälle in einem frühen Stadium diagnostiziert werden, alle anderen jedoch erst in fortgeschrittenem Zustand (28-30). Das durchschnittliche Alter der Patienten bei Erstdiagnose liegt zwischen 62 und 66 Jahren. Risikofaktoren sind hauptsächlich Tabak- und Alkoholkonsum. Eine Kombination beider ist besonders schädlich. Des Weiteren ist die Infektion mit hochrisiko-Stämmen des Humanen Papillom Virus (HPV) ein Risikofaktor, wobei HPV-positive Patienten eine signifikant bessere Prognose haben, als HPV-negative Patienten (31). Daher wird bei allen Patienten der HPV-Status in der Routinediagnostik bestimmt.

Die Entstehung von HNSCC kann unterschiedliche Ursachen haben: Die Ansammlung diverser Mutationen in Onkogenen (z.B. *HRAS* oder *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform, PIK3CA*) und Tumorsuppressorgenen (z.B. *tp53 und notch1*) von Stammzellen in der epithelialen Basalschicht führt zu einer abnormalen Zellproliferation und Zelldifferenzierung, verringerter Apoptose, sowie der Fähigkeit zur Migration und Invasion in andere Gewebe (32). Bei HPV-verursachten Erkrankungen binden virale HPV-Proteine an Tumorsuppressorgene und behindern so deren Funktion (33,34).

Therapeutisch wird die chirurgische Entfernung des Tumors mit anschließender Strahlen- oder Strahlen-/Chemotherapie kombiniert. Der therapeutische Antikörper Cetuximab ist in Kombination mit einer Strahlentherapie für lokal fortgeschrittene Erkrankungen zugelassen. Im

Fall eines Rezidivs oder vorhandenen Metastasen wird Cetuximab in Kombination mit einer Chemotherapie, gefolgt von einer reinen Cetuximab-Erhaltungstherapie eingesetzt (27).

3.2 Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor

Der EGFR wird in Geweben mit epithelialem, mesenchymalem und neuronalem Ursprung exprimiert (35). Die durch den EGFR ausgelösten Signalkaskaden sind für diese Zellen überlebenswichtig, da sie Zellwachstum, -überleben, -proliferation und -differenzierung steuern. Die Rezeptorüberexpression in vielen HNSCC- und mCRC-Tumoren (36,37) in Kombination mit der EGFR-Abhängigkeit der Zellen macht den Rezeptor in der Krebstherapie zu einem geeigneten Angriffsziel zielgerichteter Inhibitoren, wie z.B. therapeutischer Antikörper (4,5).

3.2.1 Aufbau und Funktion

Der EGFR, auch c-ErbB-1 oder *human epidermal growth factor receptor* (Her) 1 genannt, ist ein 170 kDa großes, transmembranes Glykoprotein (22). Es ist auf Chromosom 7p12.3-12.1 lokalisiert und besteht aus insgesamt 28 Exons. Sein Aufbau lässt sich in drei Einheiten unterteilen (Abbildung 1):

1. die glykosylierte, extrazelluläre, N-terminale, Liganden-bindende Domäne
2. eine einzelne transmembranäre Helix
3. die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne.

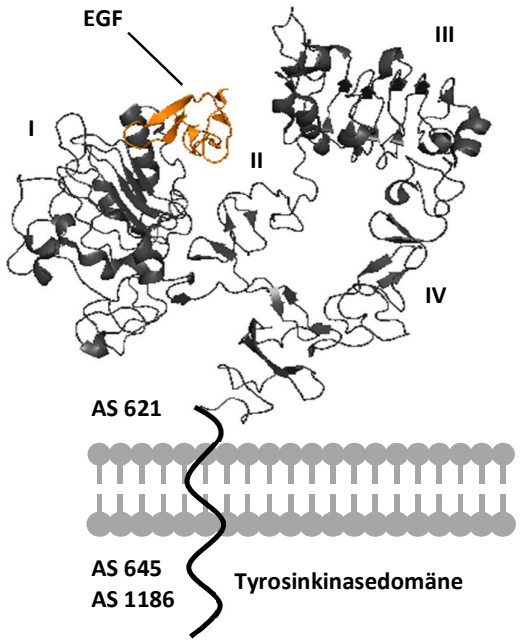

Abbildung 1: Schematische Darstellung des EGFR mit gebundenem EGF. Der EGFR besteht aus einer extrazellulären Domäne (Untereinheiten I-IV), einer Transmembrandomäne (AS 621-644) und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne (AS 645-1186). EGF bindet an den EGFR und ist in orange dargestellt. Das 3D Modell der extrazellulären EGFR Domäne, sowie des EGF wurde aus der pdb-Datei 1NQL erstellt (RCSB Protein Data Bank).

Die extrazelluläre Domäne lässt sich in 4 Untereinheiten unterteilen: Die Untereinheiten I und III sind kompakt und β-helikal gefaltet, wobei die Untereinheiten II und IV länglich sind und Cystein-haltige Elemente enthalten (38). Die Ligandenbindung erfolgt über Aminosäurereste der Untereinheiten I und III, wobei die Untereinheit II der Rezeptordimierisierung dient.

Der EGFR ist Teil der Erb-Rezeptorfamilie. Diese schließt außerdem die Rezeptoren Her2, Her3 und Her4 mit ein. Im inaktiven Zustand liegt der EGF-Rezeptor als Monomer vor, bildet jedoch nach der Aktivierung Homo- (Her1)- oder Heterodimere mit Her2 oder Her4 (3). Der EGFR hat diverse Liganden: EGF, *transforming growth factor alpha* (TGF-α), *heparin binding* EGF (HB-EGF), Amphiregulin, Betacellulin, Epigen und Epiregulin. Je nach Dimerisierungspartner können intrazellulär spezifische nachgeschaltete Proteine gebunden werden, die wiederum spezielle Signalwege aktivieren und so spezifische biologische und biochemische Reaktionen in der Zelle auslösen. Die Induktion von Zellproliferation, -differenzierung, Apoptose oder Zellmigration ist

somit durch die Art des gebundenen Liganden, Rezeptordimers und spezifische nachgeschaltete Proteine genauestens reguliert (3).

3.2.2 Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAPK)-Signalweg

Eine der bedeutendsten zellulären Signalkaskaden ist der MAPK-Signalweg (Abbildung 2), da er das Wachstum, das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen reguliert (39).

Die Bindung eines EGF-Moleküls an den EGFR bewirkt eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne von der gefalteten in die gestreckte Form. Der zuvor innerhalb der extrazellulären Domäne verdeckt liegende Dimerisierungsarm wird freigegeben und formt ein unsymmetrisches Homodimer mit einem anderen aktivierten EGFR. Im aktivierten Zustand werden C-terminal die Tyrosinreste des EGFR auto- und transphosphoryliert (38,40).

Der *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) - *son of sevenless homolog* (SOS)-Komplex bindet entweder direkt oder über das Adapterprotein Shc an den phosphorylierten EGFR. Aktiviertes SOS fördert die Guanosindiphosphat (GDP)-Freisetzung von RAS, welches nun Guanosintriphosphat (GTP) binden kann und dadurch aktiviert wird (41). RAS selbst aktiviert die Proteinkinase *rapidly accelerated fibrosarcoma* (RAF), welche durch Phosphorylierung die Kinasen *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase* (MEK) 1/2 aktiviert, die wiederum die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1/2 phosphorylieren und dadurch aktivieren (42). Aktivierte ERK1/2 phosphorylieren zytosolische und nukleäre Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren (43), welche dann die Transkription von Genen der Zellproliferation, -differenzierung und des -überlebens einleiten können (44). Durch die Internalisierung des EGFR wird die Signalkaskade abgeschaltet und der Rezeptor entweder degradiert oder recycelt (45).

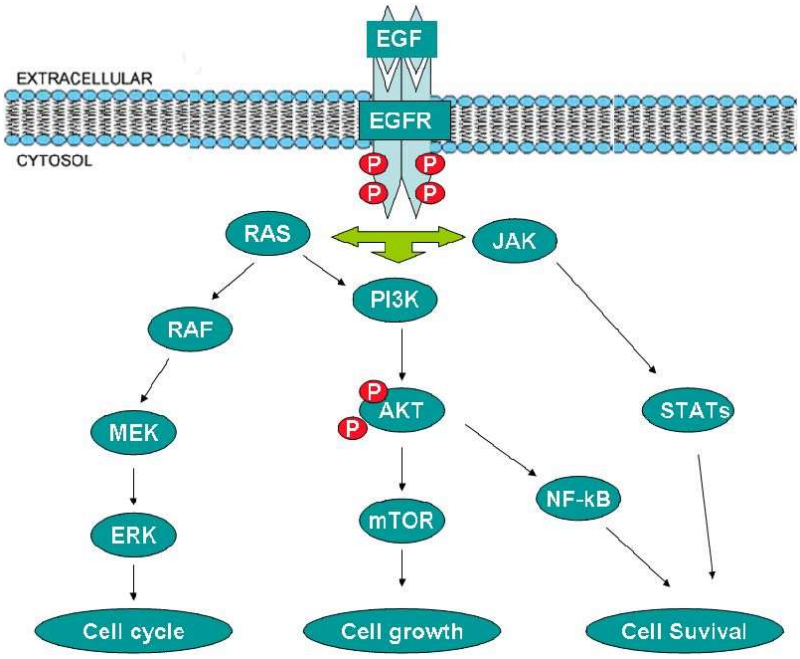

Abbildung 2: EGFR-Signalwege. Durch die intrazelluläre Phosphorylierung des EGFR werden der MAP-Kinase-, PI3-Kinase/AKT- und der JAK/STAT-Signalweg aktiviert, welche Wachstum, Überleben, Proliferation und Differenzierung der Zelle regulieren (46).

Punktmutationen im *RAS*-Gen können zu einer Daueraktivierung des RAS-Proteins führen (47). Diese Mutationen sind bei 40 – 45 % der mCRC-Patienten bereits vor Therapie vorhanden (primäre oder *de novo* Resistenzen) (48). Von sekundären Resistenzen spricht man bei den Patienten, die zunächst auf die Therapie ansprechen, aber im Verlauf resistent werden. Ursache hierfür kann entweder der Neuerwerb von resistenzinduzierenden *RAS*-Mutationen sein, oder ein Auswachsen von minimalen resistenten Zellsubpopulationen, die bereits vor Therapie im Tumor vorlagen (15,16). Bei HNSCC-Patienten sind solche resistenzvermittelnden Mutationen vor der Therapie sehr selten (49,50). Diese Patienten haben dann, im Gegensatz zu Patienten mit *RAS* Wildtyp Genen, eine schlechtere Prognose (8).

3.2.3 Alternative EGFR-Signalwege

Über die Phosphorylierung der Tyrosinkinasereste am EGFR können noch andere Proteine rekrutiert und dadurch weitere Signalkaskaden aktiviert werden. Im Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinase / Proteinkinase B (AKT)-Signalweg (Abbildung 2) wird die PI3-Kinase am EGFR aktiviert, wodurch diese Phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP_3) phosphoryliert. PIP_3 rekrutiert AKT und *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1* (PDPK1) an die Zellmembran und ermöglicht so die phosphorylierung von AKT durch PDPK1. Aktiviertes AKT kann selbst nun das *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) aktivieren. Über weitere nachgeschaltete Schritte hat die PI3-Kinase/AKT-Signalkaskade einen positiven Effekt auf das Zellwachstum und -überleben (51).

Die Aktivierung des Januskinase (JAK)/ *Signal transducers and activators of transcription* (STAT)-Signalwegs (Abbildung 2) führt zur Bildung eines EGFR/JAK/STAT-Komplexes mit anschließender STAT-Phosphorylierung, STAT-Translokation in den Zellkern und dortiger Aktivierung von Genen, welche das Überleben der Zelle gewährleisten (52).

3.3 EGFR basierte Therapien

Therapiesäulen in der Behandlung von soliden Tumoren sind chirurgische Verfahren und Strahlentherapie (lokale Verfahren), sowie die Chemotherapie (systemisches Verfahren). In den letzten Jahren wurden diese traditionellen Verfahren um eine weitere Therapiesäule ergänzt: Zielgerichtete Therapeutika greifen hoch spezifisch an einzelnen Molekülen an, die für das Tumorwachstum und die Tumorprogression nötig sind. So werden gesunde Gewebe geschont und Nebenwirkungen möglichst minimiert. Bei Patienten mit soliden Tumoren werden u.a. monoklonale Antikörper (z.B. bei HNSCC oder mCRC) oder Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI, z.B. beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, NSCLC) als zielgerichtete Therapeutika gegen den EGFR (1,2) eingesetzt.

3.3.1 Therapeutische Antikörper

Gegen den EGFR gerichtete therapeutische Antikörper binden an die extrazelluläre Domäne des EGFR und blockieren dadurch die Ligandbindungsstelle. Ohne Ligand wird der Rezeptor in der inaktiven Konformation gehalten und so die Signalgenerierung verhindert (38). Des Weiteren induziert die Bindungen eines therapeutischen Antikörpers die Rezeptorinternalisierung, -degradierung und dadurch seine Herunterregulation. Die durch die Antikörperbindung ausgelöste Ubiquitinierung des Rezeptors kann zum programmierten Zelltod (Apoptose) der Zelle führen. Auch Mechanismen des Immunsystems, wie die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und in einem geringeren Umfang auch die

komplementabhängige Zytolyse (CDC) werden durch die Antikörperbindung ausgelöst und führen zur Eliminierung der Zielzelle (2).

3.3.1.1 Ausgewählte klinische Studien

Cetuximab ist ein monoklonaler, human-murin chimärer anti-EGFR IgG1-Antikörper. Die Wirksamkeit von Cetuximab in Kombination mit anderen Therapieansätzen und als Monotherapie wurde für mCRC und HNSCC in diversen Studien untersucht. In der EXTREME-Studie wurden Patienten mit rezidiviertem oder metastasiertem HNSCC eingeschlossen und einer Chemotherapie mit oder ohne Cetuximab unterzogen. Die Zugabe von Cetuximab verlängerte das mittlere Gesamtüberleben (OS) von 7.4 auf 10.1 Monate (Risikoquotient (HR): 0.80; 95% Konfidenzintervall (CI): 0.64-0.99; p = 0.04) und das mediane progressionsfreie Überleben (PFS) von 3.3 auf 5.6 Monate (HR: 0.54; 95% CI: 0.43-0.67; p < 0.001) (7). In einer weiteren Studie, durchgeführt von der University of Alabama in Birmingham, wurde die Wirkung von Cetuximab bei lokal fortgeschrittenem HNSCC in Kombination mit Strahlentherapie untersucht. Auch hier verlängerte die zusätzliche Verabreichung von Cetuximab das mediane OS von 29.3 auf 49.0 Monate (HR: 0.74; 95% CI: 0.57-0.97; p = 0.03) und das mediane PFS von 12.4 auf 17.1 Monate (HR: 0.70; 95% CI: 0.54-0.90; p = 0.006) (6). Diesen Ergebnissen steht jedoch die Studie von Ang et al. entgegen. Hier wurden Patienten mit lokal fortgeschrittenem HNSCC einer Strahlen-/Chemotherapie (Cisplatin) mit oder ohne Cetuximab unterzogen. Keiner der untersuchten Parameter, z.B. 3-jahres OS oder 3-jahres PFS, waren durch die Gabe von Cetuximab erhöht. Grund hierfür könnte sein, dass die Mechanismen von Platin-basierten Derivaten (wie Cisplatin) und Cetuximab zur Sensibilisierung der Strahlentherapie gleich sind (53). Durch die Kombination beider Substanzen ergäbe sich somit kein Vorteil für die Patienten. Daher wird bei Strahlen-/Chemotherapien empfohlen Cetuximab mit Chemotherapeutika zu kombinieren, die unterschiedliche Wirkungsmechanismen haben, um einen zusätzlichen Effekt zu erzielen (54).

Die CRYSTAL-Studie verglich den Effekt einer Standardchemotherapie (Folinsäure, Fluoruracil und Irinotecan, FOLFIRI) mit und ohne Cetuximab beim mCRC. Die Zugabe von Cetuximab verbesserte das mediane OS von 18.6 auf 19.9 (HR: 0.93; 95% CI: 0.81-1.97; p = 0.31) und das mittlere PFS von 8.0 auf 8.9 Monate (HR: 0.85; 95% CI: 0.72-0.99; p = 0.048). In einer anschließenden Subgruppenanalyse wurde der *KRAS*-Status der Patienten bestimmt. Die Zugabe von Cetuximab zeigte einen signifikanten Vorteil bei Patienten mit dem *KRAS* Wildtyp Gen in Bezug auf das OS von 21.0 auf 24.9 Monate (HR: 0.84; 95% CI: 0.64-1.11; p = 0.22) und das PFS von 8.7 auf 9.9 (HR: 0.68; 95% CI: 0.50-0.94; p = 0.02). Im Gegensatz dazu profitierten Patienten mit mutiertem *KRAS* Gen nicht von der zusätzlichen Cetuximab-Gabe (8,11). Der Vergleich von Standardchemotherapie (Folinsäure, Fluoruracil und Oxaliplatin, FOLFOX) mit und ohne Cetuximab beim mCRC wurde ebenfalls in der OPUS-Studie untersucht. Auch hier verbesserte sich die Ansprechrate der Patienten mit dem *KRAS* Wildtyp Gen unter Cetuximab-Gabe von 37 % auf 61 % (Chancenverhältnis: 2.54; 95% CI: 1.24-5.23; p = 0.011) (9).

Panitumumab, ein monoklonaler humaner anti-EGFR IgG2-Antikörper, wird beim mCRC äquivalent zu Cetuximab eingesetzt. Die PRIME-Studie untersuchte den Unterschied von Chemotherapie mit oder ohne Panitumumab bei Patienten mit *KRAS* Wildtyp vs. mutiertem *KRAS* mit mCRC. Bei *KRAS* Wildtyp Patienten konnte durch die Zugabe von Panitumumab das PFS von 8.0 auf 9.6 Monate (HR: 0.80; 95% CI: 0.66-0.97; p = 0.02) verlängert werden. In der Patientengruppe mit mutiertem *KRAS* Gen wurde das PFS durch Panitumumab jedoch von 8.8 auf 7.3 Monate (HR: 1.29; 95% CI: 1.04-1.62; p = 0.02) reduziert (10). Cetuximab und Panitumumab wurden, jeweils in Kombination mit Chemotherapie, bei *KRAS* Wildtyp Patienten

mit mCRC in der ASPECCT-Studie vergleichen. Beide Therapeutika führten zum einem äquivalenten OS in beiden Patientengruppen (55).

Bei Patienten mit HNSCC wurde der Effekt von Panitumumab in Kombination mit Chemotherapie und Strahlentherapie untersucht. Hierfür wurden Patienten mit nicht-resektablem lokal fortgeschrittenem HNSCC in die Concert 1-Studie (Strahlen-/Chemotherapie mit und ohne Panitumumab) und Concert 2-Studie (Strahlen-/Chemotherapie vs. Strahlentherapie mit Panitumumab) eingeschlossen. Im Unterschied zu Studien mit mCRC-Patienten wurde hier der *RAS*-Status nicht bestimmt. In beiden Studien konnte durch Panitumumab kein signifikanter Überlebensvorteil erreicht werden. Daher wird Panitumumab in diesem Setting nicht eingesetzt (56-58). In der SPECTRUM-Studie wurde der Effekt einer Chemotherapie mit und ohne Panitumumab bei Patienten mit rezidiviertem oder metastasiertem HNSCC verglichen. Auch wenn das PFS der Patienten durch Panitumumab verbessert wurde, so bot der Antikörper keinen Vorteil im OS und wird daher bei diesen Patienten nicht eingesetzt (59).

Zusammenfassend zeigt die Analyse der klinischen Studien für mCRC-Patienten mit *RAS* Wildtyp Genen, dass diese von einer durch die therapeutischen Antikörpern Cetuximab und Panitumumab ergänzten Chemotherapie profitieren. Da bestimmte *RAS*-Mutationen eine Resistenz gegen diese therapeutischen Antikörper vermitteln, ist es unbedingt nötig mCRC-Patienten vor Therapiebeginn auf aktivierende *RAS*-Mutationen zu testen. Da diese Mutationen auch im Laufe einer zielgerichteten Antikörpertherapie erworben werden können, wäre es sinnvoll, diese Untersuchung ebenfalls therapiebegleitend durchzuführen.

Bei HNSCC-Patienten, welche *de novo* weniger häufig *RAS*-Mutationen tragen, konnte die zusätzliche Gabe von Panitumumab den Effekt der bereits verabreichten Strahlen- oder Chemotherapie nicht verstärken. Auch konnte der zusätzliche Effekt von Cetuximab zu einer Strahlen- oder Chemotherapie nicht in allen Studien validiert werden.

3.3.1.2 Nebenwirkungen

Von den Herstellern der therapeutischen Antikörper werden u.a. folgende Nebenwirkungen angegeben:

Panitumumab: Erkrankungen der Haut und des Unterhautzellgewebes (welche jedoch mit den pharmakologischen Wirkungen der Antikörper im Zusammenhang stehen), wie Hautausschlag, akneiforme Dermatitis und durch trockene Haut bedingte Nagelbettinfektion oder Nagelbettentzündung der Finger- oder Zehennägel; Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts wie Diarrhö, Übelkeit, Erbrechen, Konstipation und abdominale Schmerzen; allgemeine Erkrankungen wie Fatigue und Pyrexie; Stoffwechsel- und Ernährungsstörungen wie z.B. Anorexie und Gewichtsverlust (60).

Cetuximab: Erkrankungen der Haut und des Unterhautzellgewebes, wie akneartiger Hautausschlag, Hauttrockenheit, Hautabschuppung oder Nagelbettentzündung; Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, wie Diarrhö, Übelkeit, Erbrechen; Stoffwechsel- und Ernährungsstörungen, wie z.B. Hypomagnesiämie, Dehydratation, Hypokalzämie, Anorexie und Gewichtsverlust; Leber- und Gallenerkrankungen, wie Anstieg der Leberenzymwerte (61).

Diese Nebenwirkungen beeinflussen die Lebensqualität der Patienten und können sich in Einzelfällen derart auf den Gesundheitszustand auswirken, dass unter Umständen die Behandlung unterbrochen oder sogar vorzeitig beendet werden muss (60,61). Daher ist es

wichtig Patienten mit primären und sekundären Resistenzen nicht mit diesen Therapeutika zu behandeln, um ihnen mögliche Nebenwirkungen zu ersparen.

3.3.2 Tyrosinkinaseinhibitoren

Eine weitere Gruppe zielgerichteter Therapeutika sind die TKI. Sie gehören zu den *small molecule inhibitors*, sind Adenosintriphosphat (ATP)-Analoga und binden reversibel oder irreversibel an die ATP-Bindungsstellen der intrazellulären katalytischen Kinasedomäne von Rezeptortyrosinkinasen. Dadurch wird, trotz extrazellulärer Stimulation, die Phosphorylierung des Rezeptors verhindert, sodass nachgeschaltete Signalwege nicht aktiviert werden können.

Die EGFR-spezifischen TKI Erlotinib, Gefitinib oder Afatinib sind beim NSCLC zugelassen und binden an die ATP-Bindungsstellen der Kinasedomäne. So wird die Kinasedomäne trotz externer Ligandbindung intern nicht phosphoryliert (62). Hierbei ist jedoch zu betonen, dass Mutationen der intrazellulären EGFR-Domäne, wie z.B. L858R oder die Deletion des Exon 19, die Sensitivität gegen EGFR gerichtete TKIs nachweislich erhöhen (63). Daher sind TKIs auch nur bei Patienten, die diese Mutationen tragen, zugelassen. Da solche Mutationen weder bei mCRC- noch bei HNSCC-Patienten nachgewiesen wurden, sind TKI für diese Entitäten nicht zugelassen.

Daher ist es nicht verwunderlich, dass in einer durchgeführten Studie beim rezidivierten oder metastasierten HNSCC die Gabe von Gefitinib als Monotherapie im Vergleich zu einer Standardchemotherapie weder das OS noch die Ansprechrate verbesserte. Zudem waren die Nebenwirkungen durch Gefitinib stärker als durch die Chemotherapie (64).

3.4 Resistenzen

Auch wenn Patienten nachweislich von zielgerichteten Therapeutika profitieren, sprechen nicht alle Patienten auf diese Therapeutika an. Dem liegen oft primäre oder sekundäre Resistenzen zugrunde. Eine primäre Resistenz liegt schon zu Therapiebeginn vor. Sekundäre Resistenzen treten erst im Verlauf einer Therapie auf und sind häufig Folge eines Therapie-bedingten Selektionsdrucks. Hauptursachen für diese Resistenzen sind zufällig auftretende genomische Punktmutationen oder *in-frame* Deletionen. In Bezug auf den EGFR können diese Veränderungen im *EGFR*-Gen selbst, oder in Genen von nachgeschalteten Signalmolekülen auftreten, wie z.B. den *RAS*-Genen. Solche genetischen Veränderungen werden als prädiktive und prognostische Biomarker verwendet. Dadurch können Therapien, auf Grundlage individueller genetischer Resultate, festgelegt oder angepasst werden.

3.4.1 EGFR-basierte Resistenzen

Bestimmte Mutationen der extrazellulären Domäne können die Bindung therapeutischer Antikörper an den EGFR verhindern, wobei die Bindung des Liganden meist nicht beeinträchtigt ist. Bereits in mCRC-Patienten gefundene Mutationen der extrazellulären Domäne sind S492R, G465R, R451C, S464L, K467T und G465E (12-14,17). Da die Epitope von Panitumumab und Cetuximab auf dem EGFR zwar überlappen, jedoch nicht identisch seid, vermitteln die verschiedenen Mutationen Resistenzen entweder gegen einen oder beide Antikörper.

In-frame Deletionen, wie die *EGFR* vIII-Variante, sind in einzelnen Studien bei Patienten mit HNSCC beschrieben (65,66), treten aber in anderen Tumorentitäten, wie z.B. dem Glioblastom häufiger auf (67). Die *EGFR* vIII-Variante entsteht durch die Deletion der Exons 2-7, was zum Verlust eines Teils der extrazellulären Domäne führt und intrazellulär eine veränderte Konformation der ATP-Bindungstasche bewirkt. Dadurch kommt es zu einer konstitutiven

Aktivierung des EGFRs, was zu einer Resistenz gegen therapeutische Antikörper führt (56). Weder bei mCRC- (68) noch bei HNSCC-Patienten wurde die *EGFR* vIII-Variante bisher nachgewiesen.

Werden intrazellulär ATP-Bindungsstellen des EGFR durch Punktmutationen verändert, wie z.B. im Fall der T790M Mutation beim NSCLC, kann dies durch eine erhöhte ATP-Affinität zu einer verstärkten Aktivität des Rezeptors führen. Dies kann jedoch durch neuartige TKIs, welche kovalent an den Cysteinrest C797 binden, inhibiert werden. Durch die Punktmutation C797S kann es jedoch zur sekundären Resistenz gegen diese Inhibitoren kommen (63). Diese Art der Resistenz wurde ebenfalls weder beim HNSCC (69,70) noch beim mCRC beschrieben.

3.4.2 Signalkaskaden-induzierte Resistenzen

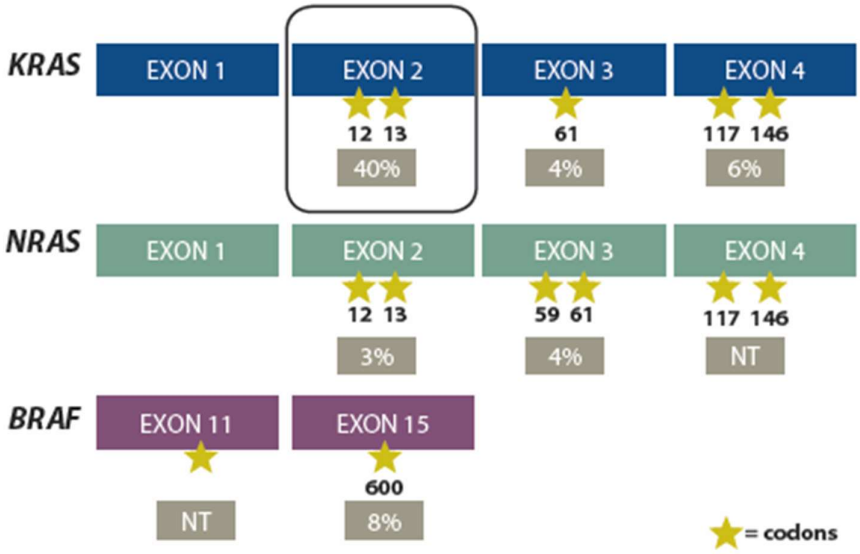

Abbildung 3: Häufigkeit der KRAS, NRAS und BRAF-Mutationen. Hotspot-Mutationen, welche zur Resistenz gegen EGFR-gerichtete Therapeutika führen sind in KRAS und NRAS im Exon 2, 3 und 4 lokalisiert, im BRAF in Exon 15 (71). NT = nicht getestet.

Nicht nur aktivierende Mutationen im *EGFR* selbst, sondern auch in den Proteinen nachgeschalteter Signalkaskaden, sind Ursache für Resistenzen gegen EGFR-Inhibitoren. Ein besonderes Beispiel hierfür ist das RAS-Protein der EGFR-nachgeschalteten MAPK-Signalkaskade. Humane Zellen exprimieren drei Isoformen: HRAS, NRAS und KRAS. Diese Proteine agieren als molekulare Schalter zur Regulierung des Signalwegs. In gesunden Zellen ist die Funktion strikt reguliert: Guanin Nukletoid Austauschfaktoren (GEFs) begünstigen die GDP-Dissoziation und GTP-Bindung, wobei GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die Umwandlung von GTP zu GDP stimulieren. Spezifische Punktmutationen dieser Sequenz- und Strukturhomologen kleinen GTPasen (Abbildung 3) führen zu einer reduzierten GTPase-Aktivität von RAS und somit zu einer verringerten GTP-Hydrolyse, was zu einer konstitutiven Aktivierung der RAS-Proteine führt (47,72). Die Bindung eines therapeutischen Antikörpers an die extrazelluläre EGFR-Domäne bleibt somit wirkungslos, da intrazellulär die Signalkaskade bereits aktiviert ist. Beim mCRC zeigte eine Subgruppenanalyse der PRIME-Studie, dass Patienten mit Mutationen in den Genen *KRAS* und *NRAS* nicht auf EGFR-gerichtete Therapien ansprechen (71).

BRAF, eine Serin/Threonin-spezifische Tyrosinkinase, wird durch RAS aktiviert und phosphoryliert die Kinase MEK. Die Mutation V600E ist mit über 90 % die häufigste *BRAF*

Mutation und führt durch den Aminosäureaustausch zu einer Konformationsänderung in der Proteinstruktur. BRAF wird in seiner aktiven Konformation gehalten und ist somit konstitutiv aktiv (73). Diese aktivierende *BRAF*-Mutation tritt vor allem in Patienten mit malignem Melanom auf (74). Im mCRC wurde diese Mutationen ebenfalls bei 8 % der Patienten beschrieben (71). Untersuchungen an kleinen, mit Chemotherapie und therapeutischen anti-EGFR Antikörpern behandelten mCRC-Patientenkohorten zeigten, dass Patienten mit *KRAS* Wildtyp Genen und der *BRAF*-Mutation V600E, im Gegensatz zu Patienten mit *BRAF* Wildtyp Genen, wenig bis keinen Vorteil von einer Therapie mit therapeutischen anti-EGFR Antikörpern haben (75-77). Mit einem Prozentsatz von ca. 3 % sind aktivierende *BRAF*-Mutationen bei Patienten mit HNSCC sehr selten (78,79). Dass diese Mutation in Patienten mit HNSCC zu einer Resistenz auf Cetuximab führt ist möglich, jedoch konnte dieser Zusammenhang bislang nicht belegt werden.

Da bereits 50 % der mCRC-Tumore vor Therapie *RAS*-Mutationen aufweisen, hat die Mutationsanalyse des *RAS*-Gens als molekularer Biomarker beim mCRC bereits Einzug in die Routinediagnostik gehalten (80). Die Tumore aller Patienten, die für eine anti-EGFR Antikörpertherapie in Frage kommen, werden auf diese Mutationen hin untersucht und nur Patienten mit *RAS* Wildtyp erhalten anschließend Cetuximab oder Panitumumab (27).

Zu den molekularen Mechanismen, die bei HNSCC-Patienten zu einer Resistenz gegen Cetuximab führen, ist bisher nur sehr wenig bekannt. Im Gegensatz zum mCRC sind hier *RAS*-Mutationen mit einer Mutationsrate von 4,6 % eher selten und die Bedeutung für diese Tumorentität ist nicht eindeutig geklärt (49,50). *BRAF*-Mutationen sind noch seltener und spielen diagnostisch keine Rolle (78). Prognostische und prädiktive Biomarker werden dringend benötigt, um die Erkrankung frühestmöglich zu diagnostizieren, Therapien zu individualisieren und neue Therapeutika zu entwickeln.

3.5 Neue diagnostische Methoden

Neue diagnostische Methoden eröffnen, im Gegensatz zur bisherigen Routinediagnostik, eine große Bandbreite an Analyseverfahren, die sich durch Zeit- und Kostenersparnis, einfache Handhabung und hohe Sensitivität sowie Spezifität auszeichnen. Durch die in dieser Arbeit verwendeten und für die spezifischen Fragestellungen etablierten Methoden der *liquid biopsy* in Kombination mit der Tiefensequenzierung (*next generation sequencing*, NGS) können z.B. diagnoserelevante genetische Biomarker in der ctDNA früher detektiert und auch unter Therapie weiter verfolgt werden.

3.5.1 Liquid biopsy

In der Routinediagnostik erfolgt die genetische Analyse von Tumoren standardmäßig über die Extraktion genomischer DNA aus in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe. Hierfür muss dem Patienten per Biopsie Tumorgewebe entnommen werden. Dieser Eingriff ist häufig mit hohen Risiken für den Patienten verbunden. Die traditionellen Biopsie hat noch weitere Nachteile: Die Analyse ist insgesamt sehr kostenintensive und zeitaufwändig und verzögert dadurch die Diagnostik. Außerdem gibt eine traditionelle Biopsie, aufgrund der genetischen Heterogenität des Primärtumors sowie möglicher Metastasen, immer nur einen Teilausschnitt des genetischen Tumorprofils wieder. Zudem unterscheidet sich die Tumorquantität zwischen verschiedenen Biopsien, da immer ein variabler Anteil an Stromazellen mit extrahiert wird. Alternativ dazu wurde in den letzten Jahren die Methode der *liquid biopsy* entwickelt. Diese Methode basiert auf zellfreien, zirkulierenden DNA-Fragmenten (cfDNA) die von apoptotischen oder nekrotischen Zellen ins Blut abgegeben werden (81). Zur Probengenerierung wird dem Patienten

Blut abgenommen und daraus die cfDNA extrahiert. Eine cfDNA-Probe eines Tumorpatienten enthält, neben ctDNA auch cfDNA gesunder Zellen. Unterscheidet sich das genetische Profil des Tumors jedoch von dem des gesunden Gewebes, so können diese Unterschiede, meist Punktmutationen, die nur in der Tumor-DNA zu finden sind, als prognostische und/oder prädiktive Biomarker verwendet werden. Ein Vorteil der *liquid biopsy*, im Gegensatz zur traditionellen Biopsie ist, dass die erhaltene ctDNA ein vollständigeres genetisches Profil des gesamten Tumors und eventueller Metastasen liefert. Des Weiteren korreliert die Menge an cfDNA mit dem Tumorstadium und der Prognose zum vorliegenden Zeitpunkt. Da sich das genetische Profil eines Tumors unter Therapie verändert, bietet die *liquid biopsy* die Möglichkeit schnell und einfach therapiebegleitend Proben zu analysieren, um die Veränderungen genetischer Biomarker in Echtzeit zu verfolgen und entsprechend darauf zu reagieren (82). Einige noch zu lösende Probleme sind u.a. die geringe Halbwertszeit der cfDNA von ca. 2 Stunden oder ein insgesamt hoher Hintergrund an cfDNA im Verhältnis zur nachzuweisenden ctDNA im Blut (83). Beides beeinträchtigt die Sensitivität der *liquid biopsy* und muss verbessert werden bevor die Methode in der Routinediagnostik eingesetzt werden kann.

3.5.2 Tiefensequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgt standardmäßig über das Verfahren der Sanger-Sequenzierung. Hierbei wird die Sequenzabfolge eines einzelnen DNA-Fragments bestimmt. Sollen unterschiedliche Sequenzen untersucht werden, muss dies in separaten Analysen erfolgen. Im Gegensatz dazu können beim NGS viele unterschiedliche Sequenzen, wie z.B. ganze Genome oder die gleichen Sequenzen unterschiedlicher Patienten oder Zeitpunkte in einer einzigen Analyse parallel ausgelesen werden (82). Die hohe Sensitivität erlaubt die Früherkennung bestimmter genetischer Marker in Tumorsubklonen noch bevor diese mit herkömmlichen Diagnostikmethoden detektiert werden können. Zudem ist die Handhabung einfach und durch die parallele Bearbeitung multipler Proben sind die Kosten pro Probe gering. Je nach Plattform müssen die zu analysierenden Genfragmente zuvor mit NGS-Plattform konformen Sequenzen und einem probenspezifischen Barcode versehen werden (Abbildung 4) (84,85).

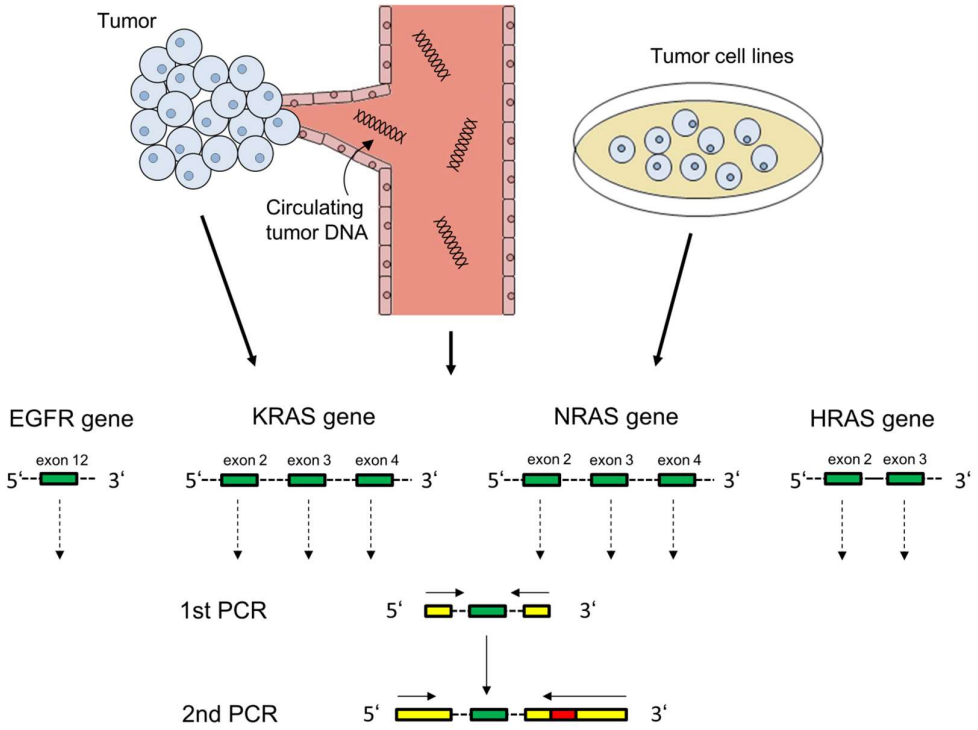

Abbildung 4: Extraktion von genomischer Tumor-DNA, sowie ctDNA und Aufbereitung für die Tiefensequenzierung. Als Ausgangsmaterialien können biopsiertes Tumormatieral in Paraffin eingebettet, ctDNA aus dem Blut oder Tumorzelllinien verwendet werden. Um in der DNA nach resistenzvermittelnden Mutationen zu suchen, werden folgende Exons in einer ersten Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert: *EGFR* Exon 12, *KRAS* Exons 2/3/4, *NRAS* Exons 2/3/4 und *HRAS* Exons 2/3 (grün). Für die Tiefensequenzierung müssen zudem in einer darauffolgenden PCR Illumina-spezifische Hybridisierungs- und Sequenzierungssequenzen (gelb) und probenspezifische Barcodes (rot) angefügt werden.

4 Zielsetzung

Zielgerichtete Therapeutika revolutionierten bereits die Therapie vieler Tumorentitäten. Beim mCRC und HNSCC konnte durch den zusätzlichen Einsatz therapeutischer, gegen den EGFR gerichteter Antikörper das PFS sowie das OS bereits verbessert werden. Trotz allem sind die bereits erzielten Resultate noch nicht zufriedenstellend: viele Patienten sind bereits vor Therapiebeginn resistent oder bilden im Laufe der Behandlung Resistenzen aus. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher nur teilweise geklärt.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung möglicher Resistenzmechanismen solider Tumore am Beispiel von mCRC und HNSCC unter anti-EGFR-gerichteter Antikörpertherapie.

Der Hauptfokus lag dabei auf folgenden Punkten:

1. Definition des funktionalen Panitumumab-Epitops und die Abgrenzung dessen zum Cetuximab-Epitop
2. Nachweis und Charakterisierung resistenzvermittelnder Varianten des *EGFR*-Gens und der *RAS*-Gene bei Patienten mit mCRC und HNSCC vor und unter Panitumumab- und/oder Cetuximab-Therapie
3. Verwendung der *liquid biopsy* auf Basis von ctDNA zum Nachweis von aktivierenden Mutationen des *EGFR*-Gens und der *RAS*-Gene

5 Synopsis

In dieser Dissertation wurden drei Arbeiten zusammengefasst, die sich mit den Resistenzen gegen EGFR-spezifische therapeutische Antikörper befassen. Die Definition des funktionalen Panitumumab-Epitops und die Abgrenzung zum Cetuximab-Epitop ermöglicht die Vorhersage von Resistenzen, da nun resistenzvermittelnde Punktmutationen in diesem Bereich der extrazellulären EGFR-Domäne einem oder beiden Epitopen zugeordnet werden können. Die Analyse von humanen Tumorproben und ctDNA führte zudem zur Identifikation der neuen Panitumumab- und Cetuximab-resistenzvermittelnden Mutation G465R in mCRC-Patienten und zur Aufklärung sekundärer Resistenzmechanismen durch aktivierende *RAS*-Mutationen in HNSCC-Patienten unter Cetuximab-Therapie.

Im Folgenden werden die entsprechenden Arbeiten kurz vorgestellt.

5.1 Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab

Panitumumab und Cetuximab sind therapeutische Antikörper die zur Behandlung des mCRC zugelassen sind (86-88). Beide binden extrazellulär an den EGFR und blockieren somit die Signalgenerierung an diesem Rezeptor. Montagut et al. stellten zum ersten Mal eine EGFR-Punktmutation vor, in diesem Fall S492R, die von einem mCRC-Patienten unter Cetuximab-Therapie erworben wurde und zur Cetuximab-Resistenz führte (12). Eine anschließende Behandlung mit Panitumumab reduzierte das Tumorvolumen jedoch erneut. Dies ließ vermuten, dass die Epitope beider Antikörper auf dem EGFR nicht identisch sind. Das Cetuximab-Epitop war bereits charakterisiert (89,90), das Panitumumab-Epitop jedoch noch unbekannt. In dieser Untersuchung sollte zuerst das Panitumumab-Epitop durch den Einsatz randomisierter Peptidphagenbanken lokalisiert und anschließend die funktionelle Relevanz der einzelnen Aminosäuren an der Antikörperbindung eingestuft werden. Es muss an dieser Stelle vermerkt werden, dass in dieser Publikation eine alternative Notation der EGFR-Proteinsequenz verwendet wurde. Die von Montagut et al. gefundene EGFR-Mutante wird hier statt mit S492R als S468R bezeichnet.

Panitumumab-bindende Peptidphagen aus den randomisierten Phagenbanken CX_7C (zyklisch) und X_{12} (linear) wurden über drei Selektionsrunden per *phage display* angereichert. Die spezifische Bindung selektierter Einzelklone wurde per ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) evaluiert. Durch die Sequenzierung der Peptide konnten zwei Konsensusmotive PXWDXXR und YPPXXRT herausgearbeitet werden. Mit dem MIMOX-Algorithmus, welcher nach Übereinstimmungen zwischen Konsensusmotiven und Aminosäuren auf der Proteinoberfläche sucht, konnte das PXWDXXR-Motiv auf dem EGFR der Region W386-P387-E388-R390 zugeordnet werden. Da ein diskontinuierliches Epitop, welches sich über mehr als ein *loop* des EGFR erstreckt, nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden benachbarte, exponierte *loops* manuell auf weitere Konsensusmotiv-Homologien hin untersucht und die Sequenz P349-F352-D355 identifiziert. Alle durch das *phage display* auf dem EGFR gefundenen Aminosäuren wurden sequenziell durch Alanin ersetzt und in EGFR-negativen Säugerzellen exprimiert. Es wurden außerdem Aminosäuren mit untersucht, die kritisch für die Bindung einer der beiden therapeutischen Antikörper waren (12,89-91), um zwischen den beiden Epitopen noch genauer differenzieren zu können. Die Bindungsmessung von Cetuximab und Panitumumab erfolgte, relativ zu einem polyklonalen EGFR Kontrollantikörper, an die anti-EGFR-Mutanten per durchflusszytometischer Analyse.

Einstufung der Bindungsstärke:

>50% Bindungsreduktionen → Aminosäure ist funktionell relevant

≥30% Bindungsreduktionen → Aminosäure ist nicht essentiell

<30% Bindungsreduktionen → Aminosäure ist nicht Teil des funktionalen Epitops

In Abbildung 5 sind die Durchflusszytometrie-Ergebnisse graphisch zusammengestellt.

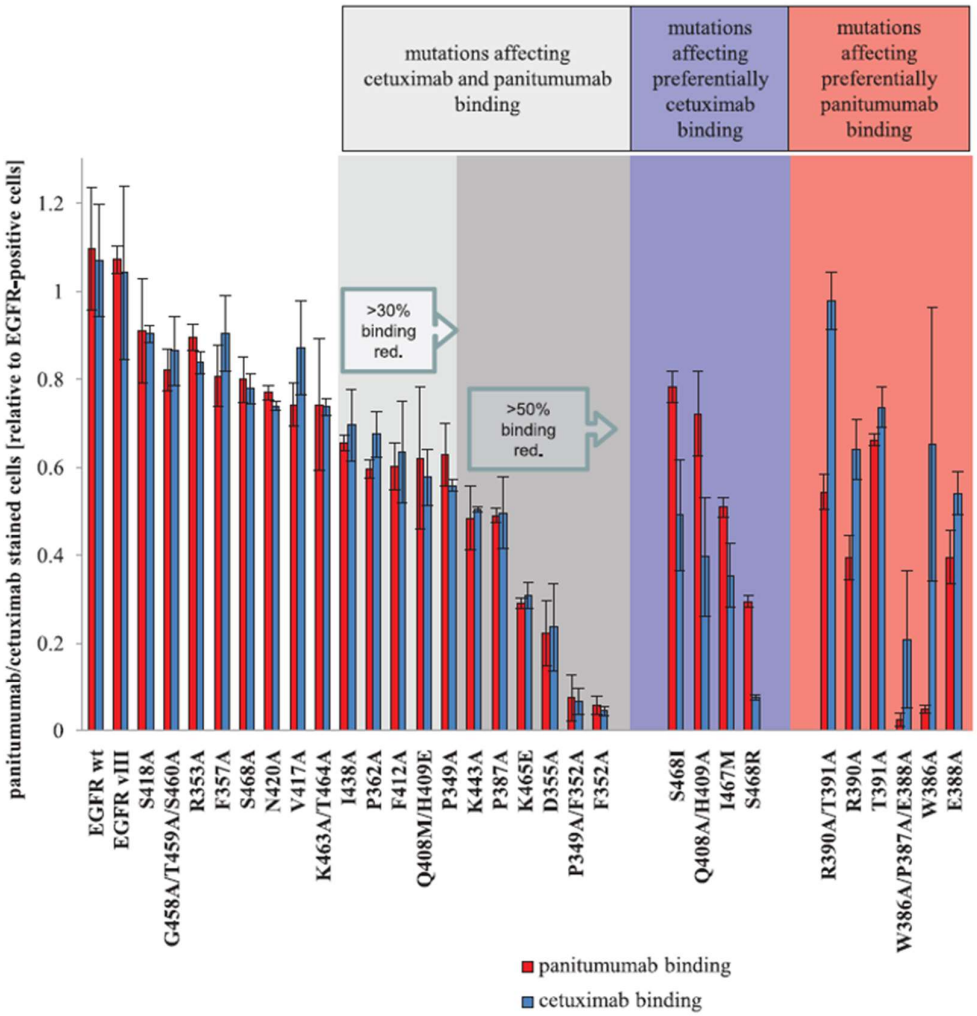

Abbildung 5: Mutationsanalyse des EGFR zur Abgrenzung der Cetuximab- und Panitumumab-Epitope. EGFR negative CHO-Zellen wurden mit EGFR Wildtyp oder Mutanten transfiziert. Die Bindung von Panitumumab, Cetuximab und eines polyklonalen anti-EGFR Antikörpers (Kontrolle) an diese Zellen wurde 48 Stunden nach der Transfektion gemessen. Dargestellt sind die mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) als Maß der Panitumumab- und Cetuximab-Bindung relativ zur MFI eines polyklonalen anti-EGFR Antikörpers (Mittelwerte aus Duplikaten ±SEM).

Alle durch das *phage display* identifizierten Aminosäuren (W386A/P387A/E388A, R390A/T391A, P349A/F352A, D355A) konnten als relevant für die Panitumumab-Bindung eingestuft werden und zeigten, bis auf R390A/T391A auch eine reduzierte Cetuximab-Bindung. Die Einzelanalysen aller Mutanten bestätigten die Bindungsergebnisse der mehrfach mutieren EGFR-Mutanten. Einige, durch die Analyse des Panitumumab-Epitops identifizierte Aminosäuren (v.a. F352, D355 und P387), zeigten ebenfalls eine Reduktion der Cetuximab-Bindung, wodurch diese zum Cetuximab-Epitop hinzugefügt werden konnten. Andererseits konnte das Panitumumab-Epitop

um die ursprünglich dem Cetuximab-Epitop zugeschriebenen Positionen Q408 und H409 erweitert werden. Wie bereits beschrieben führte der Austausch von Serin zu Arginin an Position 492 zu einer stark verminderten Cetuximab-Bindung, wo hingegen der Austausch zu Isoleucin nur einen sehr geringen Effekt zeigte. Der Alaninaustausch hatte keinen Einfluss auf die Cetuximab-Bindung. Die S492R-Mutante zeigte eine verringerte Affinität zu Panitumumab, jedoch weniger ausgeprägt als bei Cetuximab. Insgesamt konnten die Aminosäuren W386, E388, R390, T391 dem Panitumumab-Epitop, I467, S468, Q408, H409 dem Cetuximab-Epitop zugeordnet werden. Die Positionen D355, P362, F352, P349, P387, I438, K465, K443, F412 sind Teil beider Epitope. Durch diese Ergebnisse konnte das Panitumumab-Epitop auf dem EGFR lokalisiert und gegen das Cetuximab-Epitop abgegrenzt werden. Diese Erkenntnisse sind von klinischer Relevanz, da durch Mutationen dieser Aminosäuren möglicherweise Resistenzen gegen einen oder beide therapeutischen Antikörper induziert werden können. Weiterführend könnte durch eine weiterführende Analyse dieser Positionen ggf. das Therapie-Ansprechen von Patienten prognostiziert werden.

Im Folgenden wurden die hier gewonnenen Erkenntnisse weiter vertieft. Bei Patienten mit mCRC und anderen gastrointestinalen Tumoren wurde in Tumorsamples oder per *liquid biopsy* nach weiteren, rein natürlich vorkommenden resistenzvermittelnden Mutationen gesucht, sowie diese charakterisiert.

5.2 Epidermal growth factor receptor mutation mediates crossresistance to panitumumab and cetuximab in gastrointestinal cancer

Primäre und sekundäre Resistenzen gegen zielgerichtete Therapeutika treten bei Patienten mit mCRC häufig auf. Eine Hauptursache sind Mutationen der *RAS*-Gene (15,16,92). Am Beispiel der unter Cetuximab-Therapie erworbenen extrazellulären EGFR-Mutation S492R wurde zum ersten Mal ein Resistenzmechanismus beschrieben, der die Bindung des therapeutischen Antikörpers direkt beeinflusst (12). Da die Epitope der beiden therapeutischen Antikörper jedoch nur zum Teil überlappen wurde vermutet, dass weitere resistenzvermittelnde Punktmutationen in diesen Regionen unter Therapie erworben werden können (93). In dieser Arbeit wurden Tumorproben oder aus Blut extrahierte ctDNA von Patienten mit mCRC und anderen GI-Tumoren, welche mit Panitumumab oder Cetuximab behandelt wurden, auf Mutationen der extrazellulären EGFR-Domäne und den *KRAS*- und *NRAS*-Genen hin untersucht. Es wurde dabei die neue EGFR-Mutation G465R gefunden und charakterisiert, welche eine Kreuzresistenz gegen Panitumumab und Cetuximab vermittelt. Beide therapeutischen Antikörper sind bei Patienten mit mCRC zugelassen. Da sie außerdem im Rahmen von klinischen Studien bei Patienten mit anderen GI-Tumoren eingesetzt werden, wurden diese Patienten in die hier durchgeführten Analysen mit eingeschlossen.

Von einer ersten Patientenkohorte wurden Tumorproben vor und - falls vorhanden - nach Therapie untersucht. Per NGS wurden die Exons der extrazellulären EGFR-Domäne und die Exons von *KRAS* und *NRAS*, in denen aktivierende Mutationen bereits beschrieben wurden, analysiert. Patienten mit initialem *RAS* Wildtyp Status wiesen auch nach Therapie keine *RAS*-Mutationen auf. Ein Patient wies jedoch nach Behandlung mit Panitumumab die EGFR-Mutation G465R auf, welche in einem Lymphknoten desselben Patienten ebenfalls vorhanden war. Diese nicht zuvor beschriebene Mutation lag in großer räumlicher Nähe zur bereits charakterisierten, resistenzvermittelnden Mutation S492R und im Überlappungsbereich beider Antikörperepitope

(Abbildung 6) und bringt durch den Aminosäureaustausch eine positive Ladung ein, was zu einem Bindungsverlust beider therapeutischer Antikörper führte.

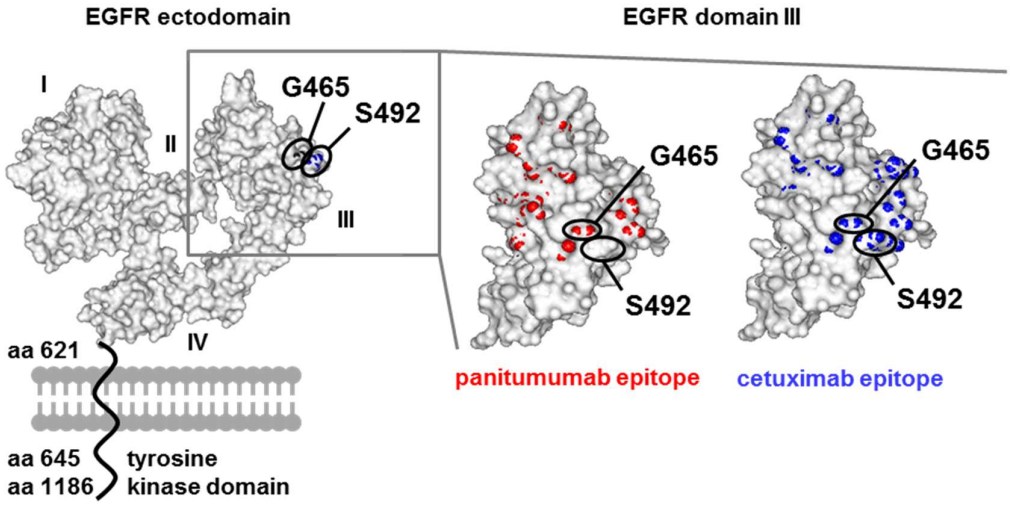

Abbildung 6: Lokalisation der EGFR-Mutationen G465R und S492R und der Panitumumab- sowie Cetuximab-Epitope auf der extrazellulären EGFR-Domäne. Die links in schwarz (G465) und blau (S492) dargestellten Aminosäuren liegen beide im Cetuximab-Epitop (Mitte, rot markiert), jedoch nur G465 liegt ebenfalls im Panitumumab-Epitop (rechts, blau markiert).

Um diese These zu überprüfen wurden rekombinante EGFR-Fc Konstrukte herstellt, welche die G465R-Mutation trugen. In einem ELISA konnte gezeigt werden, dass weder Panitumumab noch Cetuximab an die G465R-EGFR-Fc-Konstrukte binden. Zum Validieren der Resultate wurde die G465R-EGFR-Mutante in EGFR-negative Säugerzellen transferiert und der Bindungsabbruch beider therapeutischer anti-EGFR Antikörper per Durchflusszytometrie bestätigt. Im nächsten Schritt wurden die Funktionalität der G465R-EGFR-Mutante und die Wirkung beider therapeutischen Antikörper auf zellulärer Ebene getestet. EGFR-negative, IL-3 abhängige murine Ba/F3-Zellen wurden mit der G465R-EGFR-Mutante lentiviral transduziert. Der Austausch von IL-3 zu EGF im Medium führte zu einer EGF-Abhängigkeit der Zellen, was die Intaktheit des exprimierten G465R-EGFR und die Eigenschaft EGF zu binden bestätigte. Nach einer Behandlung der Zellen mit Panitumumab oder Cetuximab konnte per Western Blot keine EGFR-spezifische Phosphorylierung der EGFR Wildtyp Kontrollzellen detektiert werden, in den G465R-EGFR-Zellen blockierte jedoch keiner der beiden EGFR-spezifischen Antikörper die Phosphorylierung. Ein Wachstumsassay bestätigte die Resistenz der G465R-EGFR-Zellen gegen Panitumumab und Cetuximab, was funktional in eine Resistenz des Patienten gegenüber beiden Antikörpern übersetzt werden kann. Zur Validierung der Resultate wurden ctDNA-Proben von Patienten nach zielgerichteter anti-EGFR Antikörpertherapie per NGS analysiert. Auch durch diese Methode konnte die zuvor evaluierte G465R-EGFR-Mutation in der ctDNA eines weiteren Patienten unter Panitumumab-Therapie nachgewiesen werden. Obwohl in den Tumorproben nach Therapie keine *RAS*-Mutationen gefunden wurden, wiesen ca. 1/3 der analysierten ctDNA-Proben unter Therapie erworbene *RAS*-Mutationen auf. Dieser Unterschied könnte teilweise durch den fortgeschrittenen Krankheitsverlauf der Patienten erklärt werden, aus deren Blut die ctDNA-Proben gewonnen wurden.

Die Identifikation der G465R-EGFR-Mutation in Patienten unter Panitumumab-Therapie und deren funktionelle Validierung ist ein weiterer entscheidender Schritt in der Aufklärung von Resistenzentwicklungen unter EGFR-spezifischen Antikörpertherapien. Somit konnte gezeigt

werden, dass die bereits beschriebene EGFR-Mutation S492R kein Einzelfall ist, und einzelne Punktmutationen auch zu Resistenzen gegen beide therapeutische Antikörper führen können. Auch konnte in dieser Untersuchung die Entwicklung sekundärer Resistenzen durch *RAS*-Mutationen unter zielgerichteter Therapie bestätigt werden (15,16,92). Dies unterstreicht die Wichtigkeit der *RAS*-Statusanalyse vor Therapie, führt aber gleichzeitig auch zur Forderung nach therapiebegleitenden Mutations-Analysen der *RAS*-Gene sowie des *EGFR* auf Grundlage der per *liquid biopsy* einfach aus Blut zu isolierenden ctDNA.

Neben dem mCRC ist der EGFR auch in anderen Tumorentitäten ein Schlüsselmolekül für ein rapides Zellwachstum und der Zellproliferation (1,2). So wird bereits beim HNSCC der EGFR-spezifische Antikörper Cetuximab eingesetzt (27). Wie beim mCRC treten bei HNSCC-Patienten primäre und sekundäre Resistenzen gegen dies Therapeutikum auf, jedoch sind die hier zugrundeliegenden Mechanismen nicht bekannt. In der anschließenden Untersuchung wurden Tumor und ctDNA-Proben von HNSCC-Patienten, welche mit Cetuximab behandelt wurden, auf resistenzvermittelnde Mutationen hin analysiert.

5.3 Liquid biopsy monitoring uncovers acquired RAS-mediated resistance to cetuximab in a substantial proportion of patients with head and neck squamous cell carcinoma

Im Gegensatz zum mCRC weisen HNSCC-Patienten vor Therapiebeginn nur in <5 % aller Fälle Mutationen in den *RAS*-Genen auf (49,50). Daher wird der *RAS*-Mutationsstatus von HNSCC-Patienten vor einer Cetuximab-Therapie nicht bestimmt. Andere Biomarker für das Ansprechen dieser Patienten auf eine Cetuximab-haltige Therapie, wie z.B. resistenzvermittelnde Mutationen der extrazellulären EGFR-Domäne bei mCRC-Patienten (12-14), konnten hier bisher nicht identifiziert werden. Trotzdem spricht nur ein Teil der HNSCC-Patienten auf eine Cetuximab-haltige Therapie an oder wird im Laufe der Therapie resistent. Die den primären und sekundären Cetuximab-Resistenzen zugrundeliegende Mechanismen sind bisher noch nicht aufgeklärt.

Um zu prüfen, ob resistenzvermittelnde Mutationen der extrazellulären EGFR-Domäne oder der *RAS*-Gene die Grundlage der Cetuximab-Resistenz bei HNSCC-Patienten sind, wurden HNSCC-Zelllinien, humane Tumorproben vor Therapie sowie ctDNA nach Cetuximab-Therapie per NGS auf Mutationen der *KRAS*/*NRAS*/*HRAS* und *EGFR* (Exon 12)-Gene untersucht. Von den 46 untersuchten Tumorproben wiesen nur 2 resistenzvermittelnde Mutationen im *HRAS*-Gen auf. Alle 12 HNSCC-Zelllinien waren *RAS*- sowie *EGFR* Wildtyp, was die geringe Mutationsrate der Tumore vor Therapie bestätigt. Von 20 Patienten, von denen bereits Tumorgewebe analysiert worden war, wurde ctDNA aus peripherem Blut während und nach Chemotherapie mit Cetuximab und ggf. Cetuximab-Erhaltungstherapie analysiert (Abbildung 7). 30 % dieser untersuchten Patienten wiesen in den ctDNA-Analysen resistenzvermittelnde *RAS*-Mutationen auf, wobei diese sich nur auf Patienten im Progress beschränkten. Das Auftreten einer aktivierenden *RAS*-Mutation korrelierte signifikant mit dem Krankheitsverlauf dieser Kohorte.

Bei keinem der 7 Patienten ohne Progress wurden aktivierende Mutationen, weder im *EGFR* Exon 12, noch den *RAS*-Genen gefunden.

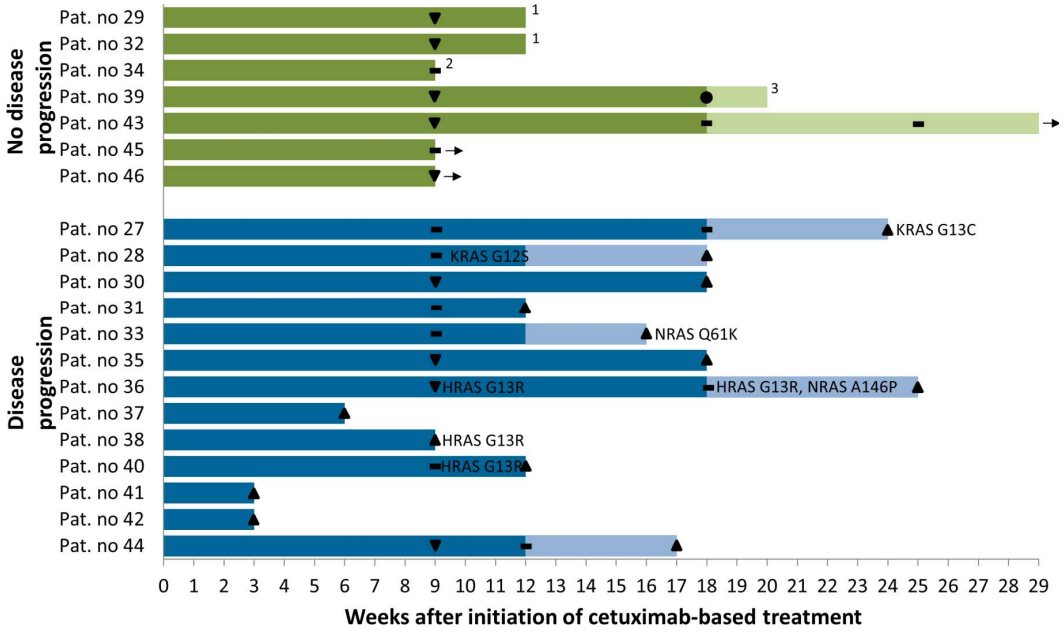

Abbildung 7: Behandlung, Ansprechen und erworbenen Mutationen von 20 HNSCC-Patienten. Alle Patienten erhielten Cetuximab plus Chemotherapie als Kombinationstherapie (dunkle Balken) oder Cetuximab-Erhaltungstherapie (helle Balken). Aktivierende *RAS*-Mutationen wurden entsprechend ihrem ersten Auftreten eingezeichnet. ● komplette Remission, ▼ partielle Remission, ▬ stabiler Verlauf, ▲ Progress. [1]Patient verweigerte die weitere Behandlung, [2]Patient verstarb an Pneumonie, [3]Therapie wurde aufgrund von Komplikationen (interne Blutungen) eingestellt.

Durch diese Arbeit wurde bestätigt, dass HNSCC-Tumore vor Therapie nur in sehr geringem Umfang aktivierende Mutationen enthalten. Neu war, dass ein erheblicher Teil dieser Patienten jedoch unter Cetuximab-Therapie sekundäre Resistenzen durch aktivierende *RAS*-Mutationen entwickelte, was direkt mit dem Krankheitsprogress dieser Patienten korrelierte. In weiterführenden Studien sollte die Analyse dieser Subklone dazu dienen einen Schwellenwert der Mutationslast zu definieren, um zuverlässig ein nicht-ansprechen von HNSCC-Patienten auf Cetuximab vorhersagen zu können. So könnten ineffektive Therapien vermieden und Patienten vor unnötigen Nebenwirkungen bewahrt werden.

6 Publikationen

Im Folgenden werden die unter Punkt 5 (Synopsis) zusammengefassten Publikationen aufgeführt.

1. *Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab.*Voigt M*, **Braig F***, Göthel M, Schulte A, Lamszus K, Bokemeyer C, Binder M. Neoplasia. 2012 Nov;14(11):1023-31.

2. *Epidermal growth factor receptor mutation mediates cross-resistance to panitumumab and cetuximab in gastrointestinal cancer.* **Braig F**, März M, Schieferdecker A, Schulte A, Voigt M, Stein A, Grob T, Alawi M, Indenbirken D, Kriegs M, Engel E, Vanhoefer U, Grundhoff A, Loges S, Riecken K, Fehse B, Bokemeyer C, Binder M. Oncotarget. 2015 May 20;6(14):12035-47.

3. *Liquid biopsy monitoring uncovers acquired RAS-mediated resistance to cetuximab in a substantial proportion of patients with head and neck squamous cell carcinoma.* **Braig F***, Voigtlaender M*, Schieferdecker A, Busch CJ, Laban S, Grob T, Kriegs M, Knecht R, Bokemeyer C, Binder M. Oncotarget. 2016 Apr 22. [Epub ahead of print]

* geteilte Erstautorenschaft

NEOPLASIA
www.neoplasia.com

Volume 14 Number 11 November 2012 pp. 1023–1031 1023

Functional Dissection of the Epidermal Growth Factor Receptor Epitopes Targeted by Panitumumab and Cetuximab[1,2]

Mareike Voigt*,[3], Friederike Braig*,[3], Markus Göthel*, Alexander Schulte†, Katrin Lamszus†, Carsten Bokemeyer* and Mascha Binder*

*Department of Oncology and Hematology with Sections Bone Marrow Transplant and Pneumology, Hubertus Wald Tumorzentrum/University Cancer Center Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; †Laboratory for Brain Tumor Biology, Department of Neurosurgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Abstract

Cetuximab and panitumumab, two antibodies targeting the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR), are of major clinical importance particularly in the treatment of metastatic colorectal cancer. As patients may acquire resistance-mediating mutations within the extracellular EGFR domain, functional dissection of the exact binding sites of EGFR targeting antibodies may help predict treatment responses. We therefore assessed the epitope recognition of panitumumab by screening phage-displayed random cyclic 7mer and linear 12mer peptide libraries on this antibody. Phage screenings revealed two strong, potentially epitope-mimicking consensus motifs targeted by panitumumab. A computational approach was used to map the sequences back to the potential epitope region on domain III of EGFR. The presumed epitope regions (386)WPEXRT(391) and a biochemically similar though discontinuous region P349-F352-D355 on a neighboring loop of domain III could be confirmed as part of the functionally relevant binding site of panitumumab by site-directed mutational analysis. To more accurately differentiate the panitumumab epitope from the previously characterized cetuximab epitope, binding studies were performed on a broad range of additional mutants. Taken together, this analysis revealed two large, partially overlapping functional epitopes consisting of 17 critical amino acid positions. Four of these positions were selectively targeted by cetuximab (I467, S468, Q408, and H409), whereas another four were selectively recognized by panitumumab (W386, E388, R390, and T391). In view of the clinical significance of extracellular domain mutations, our data may help guide treatment decisions in selected patients receiving EGFR-targeted therapies.

Neoplasia (2012) 14, 1023–1031

Introduction

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a major target in oncology, and monoclonal EGFR antibodies as well as small molecule tyrosine kinase inhibitors are used as standard treatment for patients with a variety of solid tumors [1,2]. The most important antibodies targeting the extracellular domain of the EGFR are the chimeric IgG1 mouse/human antibody cetuximab [3,4] and the fully human IgG2 antibody panitumumab [5]. On binding to EGFR, the antibodies compete with epidermal growth factor (EGF) binding, inhibit downstream pathway signaling, and therefore block proliferation of tumor cells [6]. While cetuximab has been approved for the treatment of

Address all correspondence to: Mascha Binder, MD, Department of Oncology and Hematology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany. E-mail: m.binder@uke.de

[1]This work was supported by the Wilhelm Sander-Stiftung (grant 2009.035.1 to M.B.). The authors declare no financial conflict of interest.

[2]This article refers to supplementary materials, which are designated by Figures W1 to W3 and are available online at www.neoplasia.com.

[3]These authors contributed equally.

Received 31 July 2012; Revised 20 September 2012; Accepted 25 September 2012

Copyright © 2012 Neoplasia Press, Inc. All rights reserved 1522-8002/12/$25.00

DOI 10.1593/neo.121242

colorectal cancer [3,7–9] as well as for head and neck cancer [10,11], panitumumab has only been approved for its use in colorectal cancer, so far [12,13]. Yet, recent preliminary data suggest a role for panitumumab in the treatment of patients with human papilloma virus–negative head and neck cancer [14] and the drug is under investigation for the treatment of malignant gliomas [15]. In metastatic colorectal cancer, both antibodies are considered equally effective. Nonetheless, primary resistance to these targeted agents has been extensively documented to be mediated by mutations in downstream signaling molecules [16,17]. Of these, KRAS is the only biomarker currently used in daily practice to select patients with metastatic colorectal cancer for anti–EGFR-targeted treatment. Other biomarkers such as BRAF, PIK3CA, PTEN, or NRAS are promising but so far lack enough evidence to be used in the clinics.

The conformational epitope recognized by cetuximab covers a large surface on domain III of the EGFR [18,19], whereas the exact binding site of panitumumab remains unclear. Previous studies suggest that the panitumumab epitope is in close proximity to the cetuximab epitope or may even partially overlap with the latter [20,21]. However, there is clear evidence that both epitopes are not identical. This notion may be supported by the description of effective treatment with panitumumab in patients after progression under cetuximab [22,23]. Most convincing data, however, come from a clinical study showing that a patient with colorectal cancer who acquired a point mutation under treatment with cetuximab, leading to the substitution of serine by arginine in position 468 of the extracellular EGFR domain (denominated 492 by Montagut et al. [24]), developed resistance to treatment with this antibody, whereas panitumumab was still effective in this patient. On the molecular level, this corresponded to an abrogation of cetuximab binding to the mutated EGFR, while panitumumab binding remained unaffected. Although extracellular domain mutations may only account for a small subset of clinically relevant resistance mechanisms to EGFR-targeted therapies in different tumors, characterization of the binding site of panitumumab could help predict the response to this targeted therapy in selected patients with resistance-mediating mutations [25].

We therefore explored the epitope recognition of panitumumab by screening random phage display peptide libraries that provide a powerful technical platform for epitope mapping of antibodies [26–30]. Phage display screenings on panitumumab identified a discontinuous epitope that overlapped with the large conformational cetuximab epitope. Our findings could subsequently be confirmed by mutational analysis and may help guide treatment decisions in selected patients with domain III EGFR mutations.

Materials and Methods

Phage Display Library Screening

The cyclic 7mer and linear 12mer phage libraries were purchased from New England Biolabs (Frankfurt, Germany). Three consecutive screening rounds on panitumumab (Amgen, Thousand Oaks, CA) were performed with both libraries. Each round started with a two-fold negative selection on polyclonal IgG (Octapharma, Lachen, Switzerland), followed by positive selection on panitumumab. Unbound phage were removed by washing with PBS–Tween 20. Bound phage were eluted with 0.2 M glycine (pH 2.2) and neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 9.0). Eluted phage were amplified in *Escherichia coli* strain K12 ER2738 (New England Biolabs) and purified by polyethylene glycol (PEG) precipitation. After three selection rounds, single-phage clones were amplified and tested for selective binding to panitumumab *versus* IgG or cetuximab (Bristol-Myers Squibb, New York, NY) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Therefore, phage were added to immobilized panitumumab and detected by an anti-M13, HRP-conjugated monoclonal antibody (GE Healthcare, Munich, Germany). ABTS solution (Roche Diagnostics, Grenzach-Wyhlen, Germany) was used as substrate and the absorption was measured at 405 nm using a Sunrise microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). Selectively binding phage were sequenced (GATC, Constance, Germany). Phage displaying the random peptide YMTPPLSSQQKS were used as control.

Computational Mapping of Epitope-mimicking Consensus Motifs

The MIMOX algorithm was used to search for similarities between the phage-displayed consensus motifs and accessible amino acids on the three-dimensional structure of the EGFR surface [31]. The algorithm is freely available as a web-based tool (http://immunet.cn/mimox/).

Blocking Assay with Glutathione S-Transferase Fusion Protein

The oligonucleotide encoding the phage-derived peptide IYPPLLRTSQAM was amplified from phage DNA by polymerase chain reaction, digested with *Bam*HI and *Eco*RI and ligated into pGEX-2TK (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Glutathione *S*-transferase (GST) fusion proteins were expressed in *E. coli* ER2655 (Invitrogen, Camarillo, CA), purified following GE Healthcare's instructions and used for a phage competition assay as previously described [26,28].

Generation of Human EGFR Mutants

The coding sequence for the human wild-type EGFR was amplified from cDNA of A431 cells (ATCC, Middlesex, United Kingdom) and cloned into pBluescript II KS(+) (Fermentas, St Leon-Rot, Germany). For expression in CHO cells (ATCC, Wesel, Germany), cDNAs coding for human wild-type EGFR or EGFRvIII (a kind gift from Dr Hrvoje Miletic) were cloned into pcDNA 3.1+ (Invitrogen). EGFR mutants with point mutations were generated from cDNA constructs using the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) as described [32] using individually designed oligonucleotides. Successful introduction of point mutations was verified by sequence analysis (Seqlab, Göttingen, Germany).

Flow Cytometry

CHO cells (ATCC, Middlesex, United Kingdom) were maintained in RPMI medium and NIH 3T3 cells (ATCC, Middlesex, United Kingdom) in DMEM medium, both containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. Cell lines were genotypically and phenotypically tested to confirm identity by the supplier; 5×10^5 CHO or NIH 3T3 cells were transfected with 15 μg of wild-type or mutant EGFR vector using polyethylenimine (jetPEI by Polyplus Transfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's protocol. After 48 hours, cells were either stained with a polyclonal goat anti-human EGFR antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN) or with panitumumab or cetuximab, respectively. Secondary antibodies were fluorescein isothiocyanate–labeled rabbit anti-human (Sigma-Aldrich, St Gallen, Switzerland) or polyclonal rabbit anti-goat antibodies (Dako Cytomation, Copenhagen, Denmark). Cells were analyzed on a FACS Calibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Data analysis was performed using the FlowJo software 7.6.5 (Tree Star, Ashland, OR).

Results

Identification of Epitope-mimicking Peptides by Phage Library Screenings on Panitumumab

To map the epitope targeted by panitumumab, we screened a cyclic 7mer (CX_7C) and a linear 12mer (X_{12}) random peptide phage display library on this antibody (C, cysteine; X, any amino acid). With both libraries specifically binding phage could be enriched over several selection rounds after negative selection on polyclonal IgG. Figure 1*A* shows the binding of selected phage pools to panitumumab and control IgG after each selection round for 7mer phage (left panel) and 12mer phage (right panel). After the third selection round, single-phage clones were amplified and their binding was evaluated by ELISA. All selected phage, but not random control phage, bound specifically to panitumumab as demonstrated in Figure 1*B* (7mer phage on the left and 12mer on the right). Sequencing of their inserts revealed two distinct consensus motifs (Table 1). While consensus motif I (PXWDXXR) appeared in both selections, consensus motif II (YPPXXRT) was only displayed by phage from the 12mer library. To validate that phage binding to panitumumab is mediated by the cognate peptide displayed on the phage surface, we performed competition assays using a representative phage peptide as fusion protein to block the phage-panitumumab interaction. The GST-conjugated peptide IYPPLLRTSQAM inhibited binding of phage IYPPLLRTSQAM to panitumumab in a dose-dependent manner, whereas GST alone had no effect on phage binding (Figure 1*C*).

The Epitope-mimicking Phage Selected on Panitumumab Are Not Recognized by Cetuximab

As cetuximab binds to a large conformational epitope on domain III of EGFR that may overlap with the panitumumab epitope, we asked whether phage clones mimicking the panitumumab epitope were recognized by cetuximab as well. The binding of one representative phage clone of each consensus motif was tested on panitumumab, cetuximab, and control IgG (Figure 1*D*). Both panitumumab-binding phage clones did not show any binding to cetuximab, indicating that neither of the phage-displayed peptides mimics the cetuximab epitope. We therefore concluded that the epitopes targeted by panitumumab and cetuximab are not identical. In fact, this lack of cross-reactivity was expected as entirely unrelated peptides had previously been described to structurally mimic the cetuximab epitope [33,34]. However, these data do not exclude a substantial overlap of both epitopes.

Computational Mapping of Panitumumab Epitope-mimicking Consensus Motifs to EGFR

The MIMOX algorithm was used to search for similarities between the consensus motifs and accessible amino acids on the three-dimensional EGFR surface. Whereas the YPP(XX)RT consensus motif did not yield any results by MIMOX analysis, the P(X)WD(XX)R motif gave one single hit with high accessibility (198.72 $Å^2$). This consensus motif was mapped back to the following region: **W**386-**P**387-**E**388-**R**390. Interestingly, the identified region belonged to domain III of the receptor, which—according to previous findings—is the domain targeted by panitumumab [20]. Figure W1 shows the localization of the potential epitope region on domain III of EGFR. Although both distinct consensus motifs could well structurally mimic the same linear epitope, we also had to consider a discontinuous epitope with critical amino acids on more than one loop. When manually aligning both consensus motifs with surface-exposed amino acids on neighboring loops, further potential homologies were found in spatial proximity to the previously identified region: **P**349-**F**352-**D**355. The computational and manual alignments of the epitope-mimicking peptides were therefore compatible with a discontinuous epitope targeted by panitumumab.

Mutational Analysis Dissects Functional Panitumumab and Cetuximab Epitopes on EGFR

To corroborate our findings, we assessed the contribution of each amino acid to the presumed epitope by mutation to alanine. In the context of a human EGFR construct for eukaryotic expression, we mutated the amino acids identified by our phage display screening (**W**386**A**/**P**387**A**/**E**388**A**, **W**386**A**, **P**387**A**, **E**388**A**, **R**390**A**/**T**391**A**, **R**390**A**, **T**391**A**, **P**349**A**/**F**352**A**, **P**349**A**, **F**352**A**, **D**355**A**) as schematically displayed in Figure W2. Moreover, we generated eight control mutants in different parts of domain III, some of them adjacent to the epitope regions in solvent-accessible surface areas (**R**353**A**, **F**357**A**, **P**362**A**, **V**417**A**, **S**418**A**, **N**420**A**) and some of them in a distant part of domain III (**G**458**A**/**T**459**A**/**S**460**A**, **K**463**A**/**T**464**A**; Figure W2). Primers used for the mutagenesis reaction are shown in Table 2. All constructs were transfected into EGFR-negative CHO cells. Polyclonal EGFR control antibody (used as a probe to assess proper presentation of EGFR on the surface of transfected CHO cells) as well as panitumumab and cetuximab binding to transfected CHO cells was then studied by flow cytometry. Transfection efficiency of the EGFR constructs ranged around 40% of viable cells. As a lot of mutants exhibited a slightly reduced binding of the monoclonal antibodies cetuximab and panitumumab compared to binding of the polyclonal EGFR control antibody and compared to wild-type EGFR, we had to specify arbitrary thresholds in binding reduction defining functionally relevant amino acid positions. A >50% binding reduction on mutation compared to the binding of polyclonal EGFR antibody was considered to indicate functionally relevant amino acid positions (although this threshold was arbitrary and not evaluated clinically). Positions with reproducibly at least 30% binding reduction were considered less essential for antibody binding. Positions that resulted in <30% binding reduction on mutation were not considered as part of the functional epitope.

All groups of amino acid positions identified by our phage display analysis—**W**386**A**/**P**387**A**/**E**388**A**, **R**390**A**/**T**391**A**, **P**349**A**/**F**352**A** and **D**355**A**—were confirmed to be critical for panitumumab binding by mutational analysis although **R**390**A**/**T**391**A** to a lesser extent [exemplary fluorescence-activated cell sorting (FACS) plots are shown in Figure 2*A*]. All of these mutants also exhibited reduced cetuximab binding, except for **R**390**A**/**T**391**A**. When we analyzed all single positions separately, all of these mutants displayed reduced panitumumab binding; only **P**349 and **T**391 proved to be less critical for this interaction (Figure 2*B*). Some of these single residues also proved to be of significant relevance for cetuximab binding, especially **F**352, **D**355, and **P**387 (Figure 2*B*). Neither the control mutations adjacent to the presumed epitope regions nor the distant ones had an impact on panitumumab or cetuximab binding (Figure 2*B*). Only control mutation **P**362, which is in close proximity to the critical residues, showed a minor binding reduction of about 40% for both antibodies (Figure 2*B*). EGFRvIII, a clinically relevant EGFR mutant exhibiting a deletion within domains I and II of EGFR [35], was used as a control. This deletion mutant showed preserved binding of cetuximab and panitumumab, as expected (Figure 2*B*).

In addition to the phage display–inspired mutational analysis, we generated a number of mutants presumably critical for cetuximab (**Q**408**A**/**H**409**A**, **Q**408**M**/**H**409**E**, **K**443**A**, **K**465**E**, **I**467**M**,

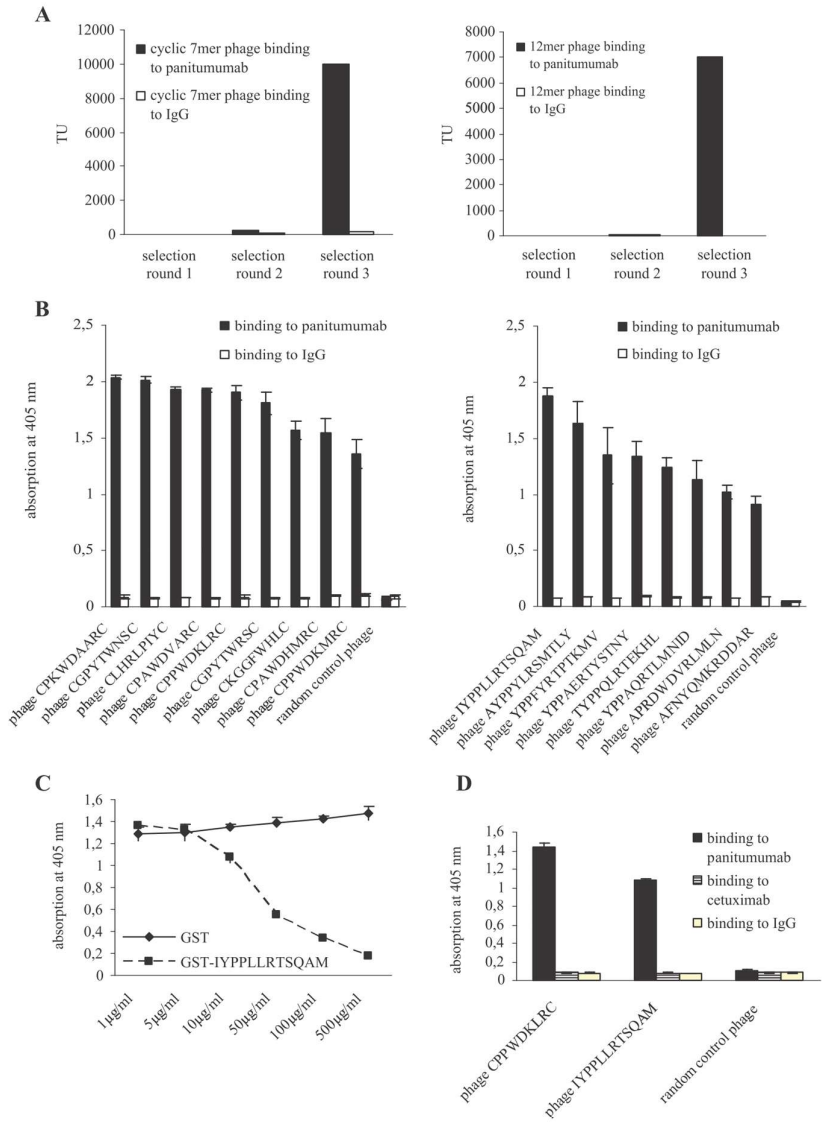

Figure 1. Selection of epitope mimics on panitumumab. (A) Panitumumab binding 7mer (left panel) and 12mer (right panel) phage were enriched over three selection rounds. Binding of recovered phage pools to panitumumab and control IgG was monitored after each selection round by measuring bacterial infection. TU, transducing units. (B) Single-phage clones displaying 7mer (left panel) or 12mer (right panel) peptides bind specifically to panitumumab but not to control IgG; 1×10^8 TU of phage displaying the selected peptides as well as random control phage were incubated on immobilized panitumumab or control IgG. Phage binding was measured by ELISA. Data are means from triplicate experiments ± SEM. (C) GST-IYPPLLRTSQAM blocks binding of phage IYPPLLRTSQAM to panitumumab; 1×10^8 TU of phage IYPPLLRTSQAM were incubated on immobilized panitumumab in the presence or absence of various concentrations of GST-IYPPLLRTSQAM or GST alone. Bound phage were quantified as described in B. Data are means from triplicate experiments ± SEM. (D) Representative phage selected on panitumumab are not recognized by cetuximab. Phage binding was measured by ELISA as described in B. Data are means from triplicate experiments ± SEM.

Table 1. Phage-Displayed Peptide Sequences Selected on Panitumumab*.

Amino Acid Sequence of Phage Clone	Absolute and Relative Frequency of Phage Clone
Selection of cyclic 7mer phage library	
Motif I	
C P K W D A A R C	1/9 (11%)
C G P Y T W N S C	1/9 (11%)
C L H R L P I Y C	1/9 (11%)
C P A W D V A R C	1/9 (11%)
C P P W D K L R C	1/9 (11%)
C G P Y T W R S C	1/9 (11%)
C K G G F W H L C	1/9 (11%)
C P A W D H M R C	1/9 (11%)
C P P W D K M R C	1/9 (11%)
Consensus motif I	
P X W D X X R	
Selection of 12mer phage library	
Motif I	
A P R D W D V R L M L N	1/10 (10%)
Motif II	
I Y P P L L R T S Q A M	3/10 (30%)
A Y P P Y L R S M T L Y	1/10 (10%)
Y P P F Y R T P T K M V	1/10 (10%)
Y P P A E R T Y S T N Y	1/10 (10%)
T Y P P Q L R T E K H L	1/10 (10%)
Y P P A Q R T L M N I D	1/10 (10%)
A F N Y Q M K R D D A R	1/10 (10%)
Consensus motif II	
Y P P X X R T	

*Sequences are displayed using a single-letter amino acid code.

S468**R**, **S**468**I**, **S**468**A**) [18,19,24,36] or panitumumab (**F**412**A**, **I**438**A**) [21] binding to more accurately differentiate between both epitopes. As expected, **Q**408 and **H**409, previously described as functional core positions within the cetuximab epitope, differentially affected cetuximab and panitumumab binding on mutation to alanine. The same applied for **I**467 on mutation to methionine. Interestingly, **K**443**A** and **K**465**E** resulted in a critical binding reduction of both antibodies, thereby adding two additional positions to the functional panitumumab epitope, which had not been suggested by the phage display analysis. Likewise, mutants **F**412**A** and **I**438**A** showed a somewhat reduced binding of both antibodies, although the inhibition ranged only between 30% and 40%. Mutations of position **S**468 (denominated 492 by Montagut et al. [24]) showed divergent results, depending on the amino acid used for replacement. While mutation to arginine completely abrogated cetuximab binding, as described [24], mutation to isoleucine showed only a weak binding reduction and an alanine replacement did not affect the binding of cetuximab at all. In addition, panitumumab binding was affected in the **S**468**R** mutant, although to a significantly lesser extent compared to cetuximab. As the interaction of panitumumab with this mutant had been described to be comparable to wild-type EGFR [24], we wished to further corroborate our discordant finding. Our sequence analysis of the **S**468**R** mutant did not show any additional mutations or deletions within the whole EGFR gene. In this way, we excluded that genetic aberrations other than the intentionally introduced point mutation of the target molecule accounted for reduced panitumumab binding. Moreover, we transfected the **S**468**R** mutant DNA into EGFR-negative NIH 3T3 cells that had been used for previously published experiments [24]. These additional transfection experiments resulted in exactly the same antibody binding profiles of all three **S**468 mutants as the transfections into CHO cells. Likewise, in these experiments, panitumumab binding to **S**468**R** was clearly reduced compared to binding of the polyclonal EGFR antibody and panitumumab binding to wild-type EGFR, thus confirming our findings (Figure W3). Figure 2*B* shows the binding profiles of all tested mutants.

Finally, we summarized the data generated by phage display and mutational analysis in a three-dimensional model of the two overlapping functional epitopes (Figure 3*A*). Four positions differentially interfering with the binding of panitumumab on mutation are depicted in red (**W**386, **E**388, **R**390, **T**391). In mutant **T**391**A**, we observed only very slight differences in cetuximab and panitumumab binding, but as these differences were amplified in combination with mutant R390A we considered this position as selectively targeted by panitumumab. Another four positions differentially affecting cetuximab binding on mutation are depicted in blue (**I**467, **S**468, **Q**408, **H**409). Nine residues critical for the binding of both antibodies are shown in light (>30% binding reduction) and dark (>50% binding reduction) gray. Both conformational epitopes overlapped with amino acids functionally characterized as critical for EGF binding (Figure 3*B*). This finding illustrates the underlying mechanism of competitive EGF inhibition by panitumumab and cetuximab.

Discussion

Targeting the extracellular domain of EGFR with the monoclonal antibodies cetuximab and panitumumab is a common treatment option in patients with solid tumors. Resistance has been found to be conferred by mutations in downstream signaling molecules such as KRAS [9,17,37]. However, very recently acquired extracellular domain mutations have been shown to mediate resistance to targeted agents as well [24]. Although little is known so far about the general incidence of such mutations in different tumors, these new findings put the epitopes of EGFR targeting antibodies into focus as the antibody binding sites may help predict responses to therapy in selected patients.

Table 2. Denomination and Sequences of Mutagenesis Primers*.

Primer Denomination	Primer Sequence
S418**A**	CAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCGCCCTGAACATAACATCC
G458**A**/**T**459**A**/**S**450**A**	GGAAAAAACTGTTTGCGGCCGCCGGTCAGAAAACC
R353**A**	CCGGTGGCATTTGCGGGTGACTCCTTCACAC
F357**A**	GGGGTGACTCCGCCACACATACTCCTCC
S468**A**	GGTCAGAAAACCAAAATTATAGCCAACAGAGGTGAAAACAGC
N420**A**	GCAGTCGTCAGCCTGGCCATAACATCCTTGG
V417**A**	CAGTTTTCTCTTGCAGTCGCCAGCCTGAACATAACATCC
K463**A**/**T**464**A**	GGGACCTCCGGTCAGGCAGCCAAAATTATAAGC
I438**A**	GGAGATAAGTGATGGAGATGTGGCAATTTCAGGAAAC
P362**A**	CCTTCACACATACTCCTGCTCTGGATCCACAGG
F412**A**	GCAACATGGTCAGGCTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
Q408**M**/**H**409**E**	CGCGGCAGGACCAAGATGCAGGGTCAGTTTTCTCTTGC
P349**A**	GATCTCCACATCCTGGCGGTGGCATTTAGGG
K443**A**	GGAGATGTGATAATTTCAGGAAACGCAAATTTGTGCTATGC
P387**A**	GCTGATTCAGGCTTGGGCTGAAAACAGGACGG
K465**E**	GGGACCTCCGGTCAGAAAACCGAAATTATAAGCAACAGAGG
D355**A**	GTGGCATTTAGGGGTGCCTCCTTCACACATAC
P349**A**/**F**352**A**	CTCCACATCCTGGCGGTGGCAGCTAGGGGTGAC
F352**A**	CTGCCGGTGGCAGCTAGGGGTGACTCCTTC
S468**I**	GGTCAGAAAACCAAAATTATAATCAACAGAGGTGAAAACAGC
Q408**A**/**H**409**A**	CGCGGCAGGACCAAGGCAGCTGGTCAGTTTTCTCTTGC
I467**M**	GGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATGAGCAACAGAGG
S468**R**	GGTCAGAAAACCAAAATTATAAGAAACAGAGGTGAAAACAGC
R390**A**/**T**391**A**	GCTTGGCCTGAAAACGCGGCGGACCTCCATGCC
R390**A**	CTTGGCCTGAAAACGCGACGGACCTCCATGC
T391**A**	CCTGAAAACAGGGCGGACCTCCATGCCTTTG
W386**A**/**P**387**A**/**E**388**A**	GCTGATTCAGGCTGGGGCTGCAAACAGGACGGACC
W386**A**	GCTGATTCAGGCTGGGCCTGAAAACAGGACG
E388**A**	GATTCAGGCTTGGCCTGCAAACAGGACGGACC

*All primers are designed in a 5′-3′ orientation. Only forward primers are shown; corresponding reverse primer sequences are complementary reverse. Base exchanges are underlined.

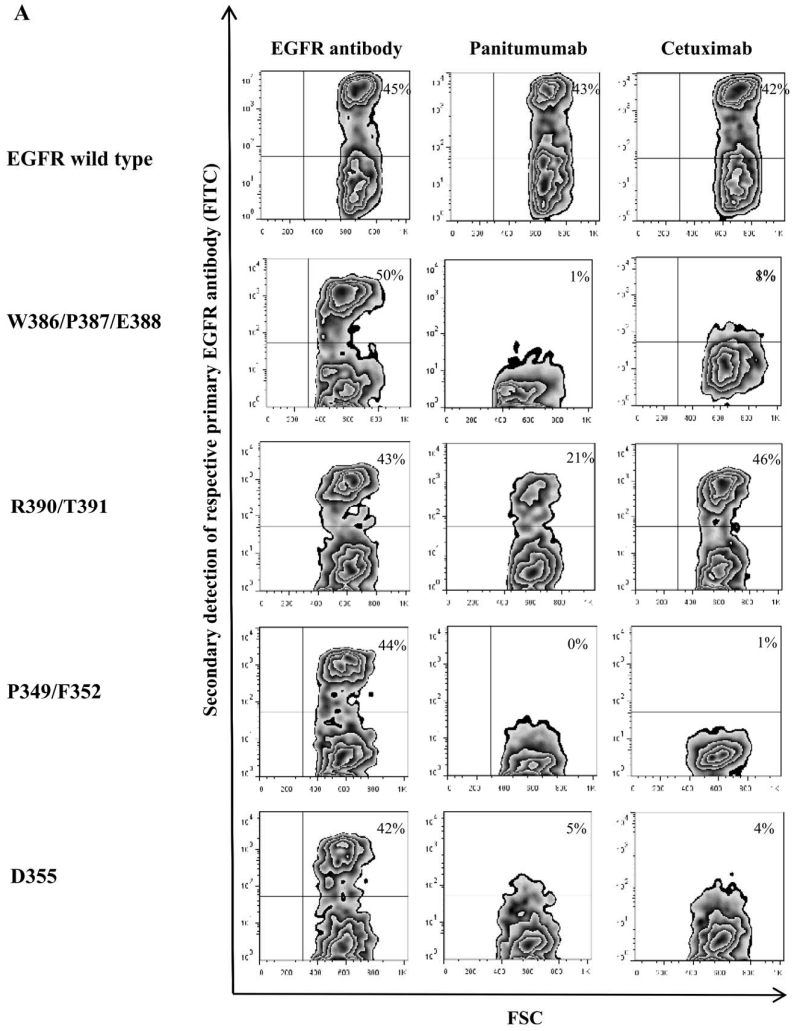

Figure 2. Mutational analysis of EGFR reveals functionally critical amino acid positions of the conformational epitopes of panitumumab and cetuximab. (A) Exemplary flow cytometry analysis of mutants W386A/P387A/E388A, P349A/F352A, D355A, and R390A/T391A. EGFR-negative CHO cells were transfected with wild-type EGFR or mutations thereof. Binding of panitumumab, cetuximab, or a control polyclonal EGFR antibody was assessed by FACS analysis 48 hours after transfection. FSC, forward scatter. (B) Evaluation of 30 mutants reveals the extent of the functional panitumumab and cetuximab epitopes. Flow cytometry experiments on transfected CHO cells were performed as in A. Data are shown as relative values compared to EGFR-positive cells (percentage of EGFR-positive cells set to 1) and are means of duplicate experiments ± SEM.

We therefore mapped the binding site of panitumumab by phage display library screenings and confirmed our findings by mutational analysis. In this way, we defined a functional epitope targeted by panitumumab, which substantially overlapped with the previously identified cetuximab epitope on domain III of EGFR. As our mutational analysis comprised a total of 30 mutants covering almost all surface accessible amino acid positions in the critical part of EGFR domain III, this analysis may provide a comprehensive picture of both functional epitopes.

Our data need to be discussed in the context of previously published work. So far, there has been only limited knowledge about the

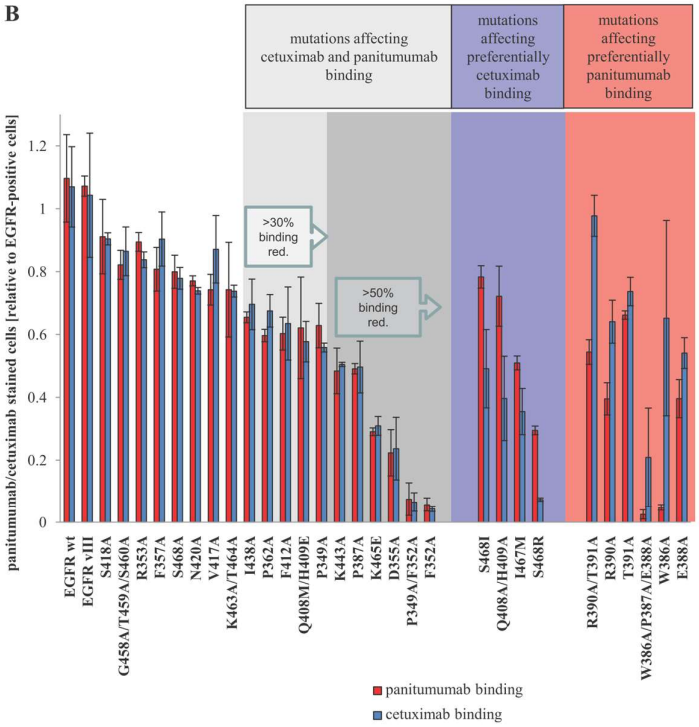

Figure 2. (*continued*).

epitope targeted by panitumumab. In line with our findings, however, the cross-blocking experiments by Dechant et al. [20] suggested that panitumumab and cetuximab bind to EGFR in close spatial proximity. Freeman et al. [21] describe several amino acid positions as critical for panitumumab binding: **P**349, **D**355, **F**412, and **I**438. While our phage display analysis also suggested that **P**349 and **D**355 may be part of the panitumumab epitope and our alanine mutational analysis clearly confirmed these two residues as critical positions, the mutation of **F**412 and **I**438 to alanine only resulted in a 30% to 40% abrogation of panitumumab as well as cetuximab binding to mutated EGFR in our hands. We therefore considered positions **F**412 and **I**438 less critical for the binding of both antibodies. Because **D**355 is involved in binding of the EGF to its receptor, the identification of **D**355 as part of the panitumumab epitope is especially meaningful as it may provide the molecular basis for the mechanism of action of this antibody. Thus, the experimentally observed competition of panitumumab with EGF [6] can be explained by an overlap of binding sites.

Our work also adds some new aspects to the functional definition of the previously identified cetuximab epitope. This epitope has been studied intensively by several groups both in a structural and in a functional way. The crystal structure of the EGFR-cetuximab complex revealed that the epitope covers a large surface on domain III of the EGFR [18]. Moreover, some functionally critical residues, such as **Q**384, **Q**408, **H**409, **K**443, **K**465, **I**467, and **S**468, have been identified by different groups [18,19,24,36]. By selective alanine scanning, we identified some more residues in two regions of EGFR domain III (**F**352, **D**355, **P**387), which are apparently involved in cetuximab binding as well, as their mutation results in an abrogation (>50%) of antibody binding to EGFR. Positions **P**349, **P**362, **W**386, **E**388, **R**390, **F**412, and **I**438 seem to be of some minor importance for the EGFR-cetuximab interaction as their mutation results in a binding reduction of 30% to 50%.

In most of our mutants, alanine replacement was used as it represents a standard technical tool for mapping of functional epitopes [38]. This amino acid is usually chosen as it does not impose conformational changes and extreme electrostatic or steric effects. In some specific cases, we generated mutants with alternative replacement mutations, if these had been well characterized previously. In this context, we noticed that some residues are not significantly impacted by mutation to alanine compared to substitutions with other amino acids. Whereas the clinically relevant mutation of serine in position 468 to arginine results in a complete abrogation of cetuximab binding, the substitution of the same residue with isoleucine only results in a partial binding inhibition and the replacement with alanine does not significantly alter the binding of cetuximab at all [24,36]. Vice versa, in position **D**355, the mutation to alanine results in a loss of cetuximab binding in our hands, whereas

the substitution with threonine [18] does not produce this effect. Likewise, our data indicated that the mutation of positions **S**418 and **R**353 to alanine does not impair antibody binding although these residues are part of the structurally defined binding site of cetuximab [18]. These findings nicely demonstrate the complexity of epitope definition, taking into account the structural as well as the functional dimension of the binding site, which are known to show imperfect congruence [39].

From a clinical perspective, this complexity may impede the prediction of resistance to antibody-based EGFR targeting. Residues defined as critical for cetuximab or panitumumab binding by an alanine scanning approach may well be mutated *in vivo* to other amino acids without functional consequences. Therefore, even if the binding site has been functionally defined *in vitro* by mutational analysis, every unrecognized domain III mutation occurring in an individual tumor sample would have to be tested *in vitro* for functional consequences to more reliably predict the response to therapy. Likewise, we currently lack a biologically meaningful *in vitro* binding threshold, allowing us to estimate if a given mutation will result in a clinically relevant abrogation of antibody binding *in vivo*. While a complete binding abrogation *in vitro* (as found for cetuximab binding to **S**468**R**) will most likely result in clinical ineffectiveness of the antibody (at least in the tumor subclone harboring the mutation), it remains unclear what clinical consequences will arise from mutations inducing only partial impairment of antibody binding. In this context, it is quite interesting to note that in our hands panitumumab binding to the **S**468**R** mutant was reduced to 30%, although the antibody has been described to be active in tumors harboring this mutation [24].

Taken together, we functionally defined the conformational epitope targeted by panitumumab within domain III of the EGFR, thereby

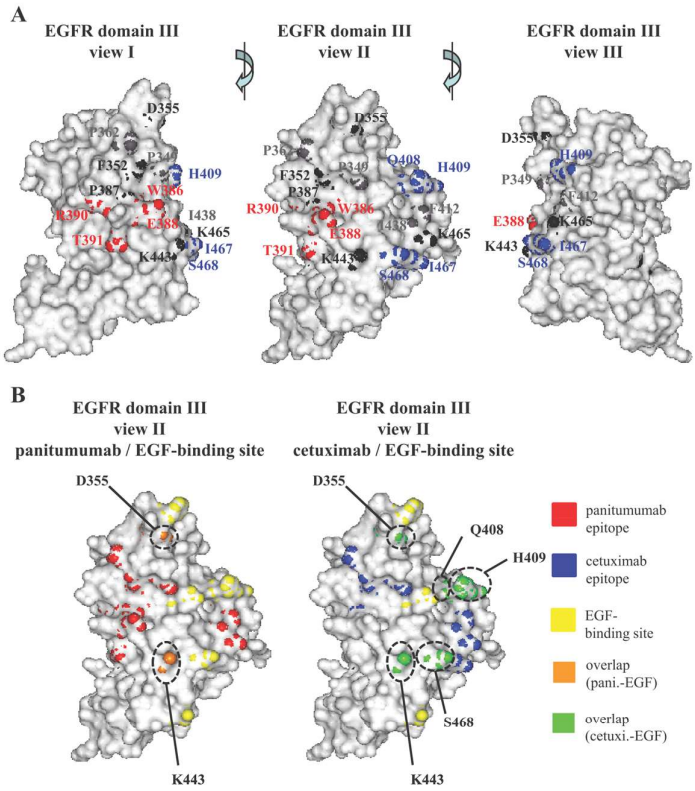

Figure 3. Three-dimensional model of the functional panitumumab and cetuximab epitopes. (A) Functional dissection of panitumumab and cetuximab epitopes. Amino acid positions critical for panitumumab binding are shown in red and for cetuximab in blue. Residues critical for the binding of both antibodies are shown in shades of gray (light gray, >30% binding reduction; dark gray, >50% binding reduction). (B) Overlap of panitumumab and cetuximab epitopes with EGF binding site. The left panel shows the panitumumab epitope in red and the EGF binding site in yellow. The overlapping amino acids are depicted in orange. In the right panel, the cetuximab epitope is depicted in blue, the EGF binding site is depicted in yellow, and the overlapping amino acid positions are shown in green (pani., panitumumab; cetuxi., cetuximab).

differentiating it from the cetuximab epitope. These data are of clinical relevance as they may help predict which patients with EGFR domain III mutations may benefit from cetuximab or panitumumab treatment and may therefore guide treatment decisions in selected patients.

Acknowledgments

We thank Hrvoje Miletic (Bergen, Norway) for providing a vector encoding the EGFR deletion variant III.

References

[1] Mendelsohn J (2001). The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* **8**, 3–9.

[2] Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, and Batra SK (2012). Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* **16**, 15–31.

[3] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, et al. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **351**, 337–345.

[4] Robert F, Ezekiel MP, Spencer SA, Meredith RF, Bonner JA, Khazaeli MB, Saleh MN, Carey D, LoBuglio AF, Wheeler RH, et al. (2001). Phase I study of anti–epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* **19**, 3234–3243.

[5] Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, and Davis CG (2001). Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* **38**, 17–23.

[6] Gill GN, Kawamoto T, Cochet C, Le A, Sato JD, Masui H, McLeod C, and Mendelsohn J (1984). Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem* **259**, 7755–7760.

[7] Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, et al. (2007). Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* **357**, 2040–2048.

[8] Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, et al. (2009). Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **27**, 663–671.

[9] Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G, et al. (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **360**, 1408–1417.

[10] Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D, et al. (2008). Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* **359**, 1116–1127.

[11] Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, et al. (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **354**, 567–578.

[12] Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G, et al. (2007). Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **25**, 1658–1664.

[13] Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, Andre T, Chan E, Lordick F, Punt CJ, et al. (2010). Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **28**, 4706–4713.

[14] Gilbert DC, Simcock R, Schache A, and Shaw R (2012). Epidermal growth factor receptor and the changing face of oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* **30**, 890–891.

[15] Berezowska S and Schlegel J (2011). Targeting ErbB receptors in high-grade glioma. *Curr Pharm Des* **17**, 2468–2487.

[16] Bardelli A and Siena S (2010). Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol* **28**, 1254–1261.

[17] Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, et al. (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **26**, 1626–1634.

[18] Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, and Ferguson KM (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* **7**, 301–311.

[19] Chao G, Cochran JR, and Wittrup KD (2004). Fine epitope mapping of anti-epidermal growth factor receptor antibodies through random mutagenesis and yeast surface display. *J Mol Biol* **342**, 539–550.

[20] Dechant M, Weisner W, Berger S, Peipp M, Beyer T, Schneider-Merck T, Lammerts van Bueren JJ, Bleeker WK, Parren PW, van de Winkel JG, et al. (2008). Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies. *Cancer Res* **68**, 4998–5003.

[21] Freeman D, Sun J, Bass R, Jung K, Ogbagabriel S, Elliot G, and Randinsky R (2008). Panitumumab and cetuximab epitope mapping and in vitro activity. In *Posterior session presented at the ASCO-Gastrointestinal Cancers Symposium*, Orlando, FL.

[22] Saif MW, Kaley K, Chu E, and Copur MS (2010). Safety and efficacy of panitumumab therapy after progression with cetuximab: experience at two institutions. *Clin Colorectal Cancer* **9**, 315–318.

[23] Wadlow RC, Hezel AF, Abrams TA, Blaszkowsky LS, Fuchs CS, Kulke MH, Kwak EL, Meyerhardt JA, Ryan DP, Szymonifka J, et al. (2012). Panitumumab in patients with KRAS wild-type colorectal cancer after progression on cetuximab. *Oncologist* **17**, e14–e35.

[24] Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M, Salido M, Gallen M, Marsters S, Tsai SP, et al. (2012). Identification of a mutation in the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med* **18**, 221–223.

[25] Bardelli A and Janne PA (2012). The road to resistance: EGFR mutation and cetuximab. *Nat Med* **18**, 199–200.

[26] Binder M, Otto F, Mertelsmann R, Veelken H, and Trepel M (2006). The epitope recognized by rituximab. *Blood* **108**, 1975–1978.

[27] Binder M, Vogtle FN, Michelfelder S, Muller F, Illerhaus G, Sundararajan S, Mertelsmann R, and Trepel M (2007). Identification of their epitope reveals the structural basis for the mechanism of action of the immunosuppressive antibodies basiliximab and daclizumab. *Cancer Res* **67**, 3518–3523.

[28] Binder M, Muller F, Jackst A, Lechenne B, Pantic M, Bacher U, Zu Eulenburg C, Veelken H, Mertelsmann R, Pasqualini R, et al. (2011). B-cell receptor epitope recognition correlates with the clinical course of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* **117**, 1891–1900.

[29] Scott JK and Smith GP (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**, 386–390.

[30] Vidal CI, Mintz PJ, Lu K, Ellis LM, Manenti L, Giavazzi R, Gershenson DM, Broaddus R, Liu J, Arap W, et al. (2004). An HSP90-mimic peptide revealed by fingerprinting the pool of antibodies from ovarian cancer patients. *Oncogene* **23**, 8859–8867.

[31] Huang J, Gutteridge A, Honda W, and Kanehisa M (2006). MIMOX: a web tool for phage display based epitope mapping. *BMC Bioinformatics* **7**, 451.

[32] Muller OJ, Kaul F, Weitzman MD, Pasqualini R, Arap W, Kleinschmidt JA, and Trepel M (2003). Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol* **21**, 1040–1046.

[33] Hartmann C, Muller N, Blaukat A, Koch J, Benhar I, and Wels WS (2010). Peptide mimotopes recognized by antibodies cetuximab and matuzumab induce a functionally equivalent anti-EGFR immune response. *Oncogene* **29**, 4517–4527.

[34] Riemer AB, Kurz H, Klinger M, Scheiner O, Zielinski CC, and Jensen-Jarolim E (2005). Vaccination with cetuximab mimotopes and biological properties of induced anti-epidermal growth factor receptor antibodies. *J Natl Cancer Inst* **97**, 1663–1670.

[35] Schulte A, Gunther HS, Martens T, Zapf S, Riethdorf S, Wulfing C, Stoupiec M, Westphal M, and Lamszus K (2012). Glioblastoma stem-like cell lines with either maintenance or loss of high-level EGFR amplification, generated via modulation of ligand concentration. *Clin Cancer Res* **18**, 1901–1913.

[36] Li S, Kussie P, and Ferguson KM (2008). Structural basis for EGF receptor inhibition by the therapeutic antibody IMC-11F8. *Structure* **16**, 216–227.

[37] Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, et al. (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* **66**, 3992–3995.

[38] Cunningham BC and Wells JA (1989). High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* **244**, 1081–1085.

[39] Cunningham BC and Wells JA (1993). Comparison of a structural and a functional epitope. *J Mol Biol* **234**, 554–563.

Epidermal growth factor receptor mutation mediates cross-resistance to panitumumab and cetuximab in gastrointestinal cancer

Friederike Braig[1], Manuela März[1], Aneta Schieferdecker[1], Alexander Schulte[2], Mareike Voigt[1], Alexander Stein[1], Tobias Grob[3], Malik Alawi[4], Daniela Indenbirken[5], Malte Kriegs[6], Erik Engel[7], Udo Vanhoefer[8], Adam Grundhoff[5], Sonja Loges[1,9], Kristoffer Riecken[10], Boris Fehse[10], Carsten Bokemeyer[1] and Mascha Binder[1]

[1] Department of Oncology and Hematology, BMT with section Pneumology, Hubertus Wald Tumorzentrum / UCCH, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

[2] Department of Neurosurgery, Laboratory for Brain Tumor Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

[3] Department of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

[4] Bioinformatics Service Facility, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

[5] Heinrich-Pette-Institute, Leibniz-Institute for experimental virology (HPI), Hamburg, Germany

[6] Radiation Biology and Radiooncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

[7] Hämatologisch-onkologische Praxis Altona (HOPA), Hamburg, Germany

[8] Marienkrankenhaus, Zentrum für Innere Medizin, Hamburg, Germany

[9] Institute for Tumor Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

[10] Research Department Cell and Gene Therapy, Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Correspondence to: *Mascha Binder,* ***email***: *m.binder@uke.de*

Keywords: Panitumumab, Cetuximab, EGFR antibody resistance, mutation, circulating tumor DNA

Received: *January 30, 2015* ***Accepted***: *February 20, 2015* ***Published***: *March 14, 2015*

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Acquired resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR) targeted antibodies represents a clinical challenge in the treatment of gastrointestinal tumors such as metastatic colorectal cancer, but its molecular mechanisms are incompletely understood. We scanned KRAS exon 2/3/4, NRAS exon 2/3/4 and the overlapping epitopes of the EGFR antibodies cetuximab and panitumumab for mutations in pre- and post-treatment tumor tissue of 21 patients with gastrointestinal cancer treated with chemotherapy +/- EGFR antibodies by next-generation sequencing ("tumor tissue" cohort). We describe a novel EGFR exon 12 mutation acquired in tumors of 1 out of 3 patients treated with panitumumab. The EGFR G465R mutation introduces a positive charge within the overlap of the panitumumab and cetuximab epitopes. It abrogates antibody binding and mediates cross-resistance to both antibodies in EGFR G465R-transfected Ba/F3 cells. In circulating tumor DNA from an independent "liquid biopsy" cohort of 27 patients, we found this novel mutation in 1 out of 6 panitumumab-treated cases while about one third of patients show acquired RAS mutations. We show that acquired resistance by epitope-changing mutations also emerges during panitumumab treatment, which can be easily detected by a liquid biopsy approach even before clinical resistance occurs and this may help in tailoring EGFR-targeted therapies.

INTRODUCTION

Monoclonal antibodies which inhibit downstream pathway signaling by targeting the extracellular ligand binding domain have become one of the mainstays of EGFR inhibition. For the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) the chimeric EGFR antibody cetuximab and the fully human antibody panitumumab were approved as single agents or in combination with chemotherapy [1-11]. Both antibodies were also used in patients with gastric or pancreatic cancer, cholangiocellular carcinoma (CCC) or other gastrointestinal cancers in clinical trials [12-17]. Resistance to these antibodies is mediated by mutations in downstream signaling molecules [18-21], with mutated *RAS,* which is currently the only validated and widely accepted molecular marker that predicts lack of response to EGFR antibodies and, therefore, guides treatment decisions in mCRC [20, 22-25]. Therefore, patients are routinely screened for *KRAS* exon 2/3/4 and *NRAS* exon2/3/4 mutations before the initiation of EGFR targeted therapy [26, 27]. However, even patients without *RAS* mutations who primarily respond well to EGFR antibodies will eventually develop secondary resistance limiting the clinical benefit of these drugs.

Some recent studies have addressed the molecular mechanisms underlying acquired resistance. Accumulating evidence suggests that *RAS* wt tested tumors may harbor small *RAS* mutated subclones at diagnosis that emerge and thus mediate secondary resistance under the selective pressure of treatment with EGFR antibodies [28-30]. Moreover, very recently a mutation in the ectodomain of *EGFR* leading to the substitution of serine by arginine in position 492 has been described. This mutation can be acquired during therapy with cetuximab and mediates resistance to this antibody (but not to panitumumab) by abrogating its binding to the EGFR [31, 32]. Differential resistance in this mutant is not surprising as we could recently show that the large conformational EGFR domain III epitopes of both antibodies only partially overlap and position S492 belongs exclusively to the cetuximab binding site [33].

Here, we investigated *EGFR* ectodomain and *RAS* mutations in patients with gastrointestinal cancer treated with EGFR-targeting antibodies and describe for the first time a panitumumab-induced EGFR mutation that mediates cross-resistance to both panitumumab and cetuximab by critically changing an amino acid position localized within the overlap of both antibody epitopes. Perspectively, screening of ctDNA for EGFR ectodomain mutations may be helpful in monitoring patients for resistance-mediating tumor subclones.

RESULTS

Clinical characteristics of the "tumor tissue" patient cohort

16 EGFR antibody-naïve patients of the "tumor tissue" patient cohort were treated with cetuximab or panitumumab in combination with chemotherapy as shown in Table 1. EGFR antibodies were applied after an average of one prior therapy and the majority of patients showed at least stable disease. The mean duration of EGFR antibody treatment prior to secondary surgery and thus post-treatment sample acquisition was 4.8 months. Five patients treated with the VEGF antibody bevacizumab in combination with chemotherapy were used as control group.

Targeted *NGS* of *EGFR* and *RAS* in samples from the "tumor tissue" cohort

KRAS 2/3 status of baseline samples (determined by routine clinical testing) was confirmed by targeted NGS of these exons. In addition, the mutational status of *KRAS* exon 4 and *NRAS* exon 2/3/4 was determined by NGS at baseline (Table 2). Interestingly, tissue samples from patients tested as *RAS* wt at baseline showed no evidence for *RAS* mutated minimal subclones after treatment.

In addition, we performed NGS to identify mutations in the *EGFR* ectodomain potentially interfering with antibody binding. None of the pre-treatment or control samples showed *EGFR* ectodomain mutations in exons 7-13. In 1 out of 3 patients treated with panitumumab we found an acquired *EGFR G465R* ectodomain mutation after treatment with panitumumab and FOLFOX in post-treatment tumor material (patient 2, Table 2). This novel exon 12 mutation was localized in proximity to the previously described cetuximab-induced *S492R* mutation (Figure 1A) [31]. It constituted 3.5% of all exon 12 reads and could also be detected in a tumor-infiltrated lymph node resected together with the local tumor after treatment with panitumumab and FOLFOX at a frequency of 6.8%. Deep sequencing of pre-treatment primary tumor (Table 2) as well as peripheral blood leukocyte DNA from this patient resulted in 100% germline sequence for exon 12 (data not shown) confirming the acquired nature of the mutation.

Binding profile of *EGFR* mutation *G465R*

Based on structure analysis position, G465 is located right in the center of the overlap region of the large conformational cetuximab and panitumumab epitopes previously characterized by our group (Figure 1A). We

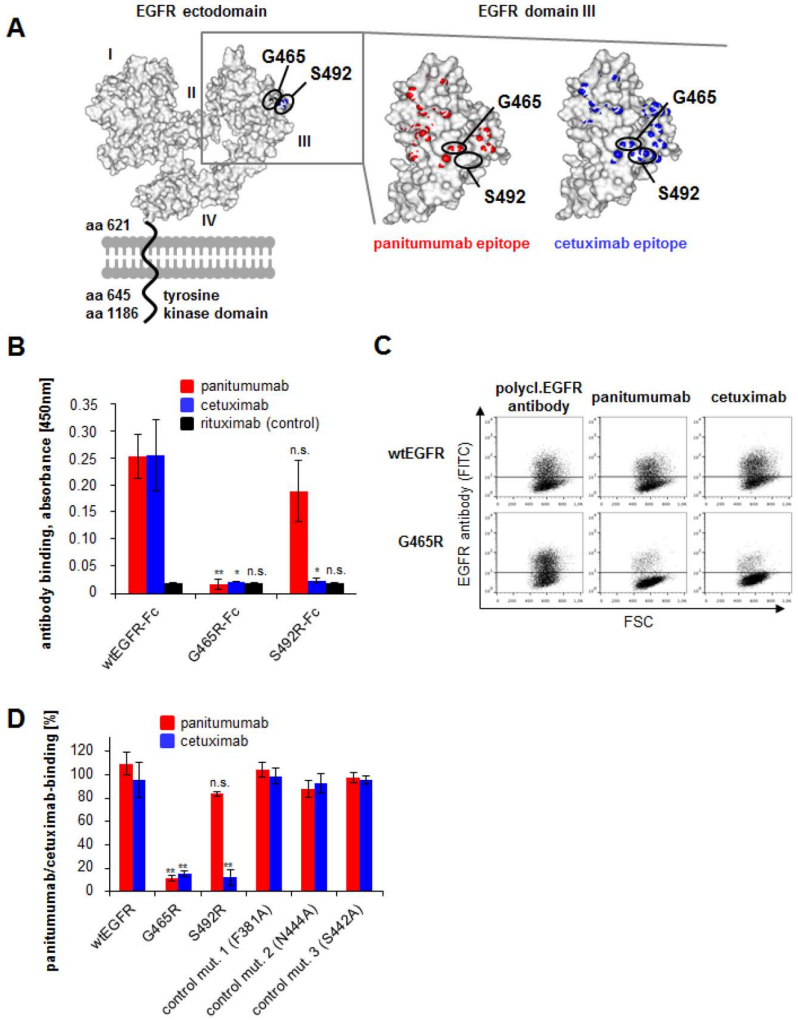

Figure 1: *EGFR G465R* mutant reveals almost complete abrogation of panitumumab and cetuximab binding. A: Localization of *EGFR* mutations *G465R* and *S492R* on the ectodomain of the *EGFR*. The 3-dimensional EGFR model was created from pdb file 1NQL from RCSB Protein Data Bank. The S492 position is shown in blue, the G465 position in black. The panel on the right shows the EGFR domain III alone with panitumumab epitope in red and cetuximab epitope in blue. Overlaps of mutated positions G465 and S492 with antibody epitopes are shown. B: *EGFR* mutation *G465R* abrogates binding of panitumumab and cetuximab at the protein level. Wile-type and mutant EGFR-Fc proteins were expressed and the binding of therapeutic antibodies to immobilized proteins was assessed by ELISA. Data are means from 3 experiments +/- SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, n.s. = not significant (student's T-test comparing binding of respective antibody to mutant versus wt EGFR-Fc) C and D: Panitumumab and cetuximab binding is abrogated in CHO cells transfected with *EGFR G465R*. *EGFR* negative CHO cells were transfected with wild type *EGFR* or mutants thereof. Binding of panitumumab, cetuximab or a control polyclonal *EGFR* antibody was assessed by FACS analysis 48h after transfection. FSC = forward scatter. Panel C shows exemplary FACS plots, panel D shows mean data from 5 experiments with binding of the polyclonal *EGFR* antibody set to 100% +/- SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, n.s. = not significant (student's T-test comparing binding of respective antibody to mutant versus wt EGFR)

Table 1: Clinical characteristics of the "tumor tissue" patient cohort.*

pat. #	category	age [years]	sex	tumor site	stage (AJCC/TNM)	KRAS status	no. of previous treatments	treatment	treatment duration [months]	best response
1	panitumumab group	36	m	rectum	IIIC	wt	1	Folfox/Pan	3	PD
2		50	m	colon	IV	wt	0	Folfox/Pan	3	PR
3		70	m	rectum	IV	wt	1	Folfiri/Pan	8	PR
4		59	m	colon	IV	wt	3	Folfiri/Pan	3	PD
5		46	f	colon	IV	wt	3	5-FU/FA/Pan	6	SD
6		62	m	CCC	IV	wt	0	Cis/Gem/Pan	6	SD
7		75	m	CCC	IV	wt	0	Cis/Gem/Pan	6	SD
8		62	m	rectum	IV	wt	1	Folfiri/Pan	6	PR
9	cetuximab group	76	m	rectum	IV	wt	1	Folfiri/Cet	3	SD
10		70	f	colon	IV	wt	1	Folfiri/Cet	6	SD
11		68	m	rectum	IIIB	wt	1	Iri/Cet/SM	6	PR
12		58	m	rectum	IV	wt	1	Iri/Cet	3	PR
13		59	m	rectum	IV	wt	2	Folfiri/Cet	3	PR
14		43	m	rectum	IV	wt	1	Folfiri/Cet	6	SD
15		47	f	CUP	IV	wt	0	Carbo/Pacli/Cet	4	PR
16		72	m	CUP	IV	wt	0	Carbo/Pacli/Cet	4	PD
17	control group	74	f	rectum	IV	mut.	0	5-FU/FA/Bev	3	SD
18		53	m	colon	IV	wt	0	Xelox/Bev	3	PR
19		58	m	rectum	IV	mut.	0	Folfoxiri/Bev	4	PR
20		65	m	colon	IV	mut.	0	Xelox/Bev, Xelox	2/6	PD
21		58	m	colon	IV	wt	0	Folfox/Bev	2	SD

* Stage refers to the stage at diagnosis; treatment, treatment duration and response refers to the indicated antibody-containing treatment or the control treatment, respectively; KRAS status was established by routine clinical testing at diagnosis covering exon 2 and 3 mutations; response was evaluated according to recist criteria. Bev = Bevacizumab, Carbo = carboplatinum, Cet = Cetuximab, Cis = cisplatinum, FA = folinic acid, Gem = gemcitabine, Iri = irinotecan, Pacli = paclitaxel, Pan = Panitumumab, SM = study medication, Xelox = Xeloda + oxaliplatinum, 5-FU = 5-fluorouracile; CCC = cholangiocellular cancer, CUP = cancer of unknown primary; CR = complete remission, PR = partial remission, SD = stable disease, PD = progressive disease

therefore hypothesized that the introduction of a positive charge at this position due to the glycine to arginine exchange in the malignant cells may abrogate not only panitumumab, but also cetuximab binding. To address this question, we generated a recombinant *EGFR* variant containing the same amino acid substitution (glycine to arginine: G465R). The mutation was introduced by site-directed mutagenesis in a vector suitable for protein expression of the EGFR ectodomain as Fc-fusion protein (EGFR-Fc) and a vector suitable for membrane expression of the whole receptor. Furthermore, the previously published *EGFR S492R* mutant was included in the experiment. Correct expression and immobilization of EGFR-Fc wt and mutant proteins was assessed by ELISA (Supplementary Figure 2). Whilst panitumumab did not bind to immobilized EGFR-Fc G465R protein, its binding to wt EGFR-Fc and EGFR-Fc S492R was preserved (Figure 1B). Cetuximab only bound to wt EGFR-Fc, but to neither of the mutant receptors (Figure 1B). Moreover, EGFR wt and mutant constructs were transfected into EGFR-negative CHO cells and binding of panitumumab and cetuximab to membrane-expressed wt and mutant receptors was analyzed by flow cytometry (Figure 1C and D). A polyclonal EGFR antibody served as a control for receptor expression. As previously shown, cetuximab binding was significantly inhibited in the *EGFR S492R* mutant, while panitumumab binding was preserved. In the *EGFR G465R* mutant, binding of both antibodies was almost completely abrogated (binding reduction of 85-90%), in concordance with the central localization of the mutation within the epitopes of both antibodies.

Functional validation of *EGFR* mutation *G465R* in Ba/F3 cells

Next, we asked i) if receptor function was still preserved in the *EGFR G465R* mutant and ii) if the significant inhibition of antibody binding to EGFR G465R translated into resistance to panitumumab and cetuximab in a cellular model. To address this experimentally,

Table 2: NGS of EGFR exons 7-13, KRAS exons 2/3/4 and NRAS exons 2/3/4 in pre- and post-treatment samples from the "tumor tissue" patient cohort.*

pat. #	category	time point 1				time point 2			
		sample 1	EGFR (ex. 7-13)	KRAS (ex. 2/3/4)	NRAS (ex. 2/3/4)	sample 2	EGFR (ex. 7-13)	KRAS (ex. 2/3/4)	NRAS (ex. 2/3/4)
1	panitumumab group	primary tumor	wt	wt	wt	liver metastasis	wt	wt	wt
2		primary tumor	wt	wt	wt	primary tumor/ LN1/LN2	**G465R (3.5%)/ G465R (6.8%)/wt**	wt/wt/wt	wt/wt/wt
3		primary tumor	wt	wt	wt	-	-	-	-
4		liver metastasis	wt	wt	wt	-	-	-	-
5		-	-	-	-	lung metastasis	wt	wt	wt
6		liver metastasis	wt	wt	wt	-	-	-	-
7		liver metastasis	wt	wt	**cod. 61 (Q->K, 22.2%)**	-	-	-	-
8		primary tumor	wt	wt	wt	-	-	-	-
9	cetuximab group	-	-	-	-	liver metastasis	wt	wt	wt
10		primary tumor	wt	wt	wt	-	-	-	-
11		-	-	-	-	primary tumor	wt	wt	wt
12		liver metastasis	wt	wt	wt	-	-	-	-
13		liver metastasis	wt	wt	wt	liver metastasis	wt	wt	wt
14		-	-	-	-	abdominal metastasis	wt	wt	wt
15		LN metastasis	wt	wt	wt	-	-	-	-
16		primary tumor	wt	wt	wt	-	-	-	-
17	control group (w/o EGFR-targeted therapy)	primary tumor	wt	**cod.12 (G->V, 20.4%)**	wt	liver metastasis	wt	wt	wt
18		liver metastasis	wt	wt	wt	liver metastasis	wt	wt	wt
19		-	-	-	-	liver metastasis	wt	**cod.12 (G->V, 38.7%)**	wt
20		liver metastasis	wt	**cod.12 (G->D, 40.2%)**	wt	-	-	-	-
21		primary tumor	wt	wt	wt	liver metastasis	wt	wt	wt

* time point 1 = pre-treatment (refering to panitumumab/cetuximab/control treatment), time point 2 = post-treatment (refering to panitumumab/cetuximab/control treatment); wt = wild-type, LN = lymph node, ex. = exon, cod. = codon, % = percentage of reads

we stably transfected murine *EGFR*-negative, IL-3-dependent Ba/F3 pro-B cells with the *EGFR* wt or mutant *G465R* and *S492R* constructs. After selection with G418, ectopic expression of wt and mutant *EGFR*in these cells conferred IL-3 independence in the presence of EGF, but not if erlotinib was added (Supplementary Figure 3). This indicated that EGF binding to the *EGFR* mutants was still preserved and receptor function intact. Stable Ba/F3 cell lines expressing wt or mutant *EGFR* were then treated with panitumumab, cetuximab, control antibody rituximab or erlotinib for 2 hours (Figure 2A). Whilst in *EGFR* wt cells cetuximab, panitumumab and erlotinib completely blocked EGFR phosphorylation, only panitumumab showed this effect in the *S492R* mutant. In the *G465R* mutant, none of the antibodies blocked EGFR phosphorylation. *EGFR* wt and *G465R* mutant Ba/F3 cells were then cultured for 108 hours in the presence of panitumumab, cetuximab or control antibody rituximab. Whilst *EGFR*wt transfected cells were sensitive to treatment with panitumumab and cetuximab, proliferation of *EGFR G465R* transfected cells was unaffected by treatment with either of these antibodies (Figure 2B). This data suggested that the *G465R* mutation, acquired under treatment with panitumumab, mediates cross-resistance to panitumumab and cetuximab by disrupting the antibody-EGFR interaction.

Targeted *NGS* of *EGFR* and *RAS* in ctDNA of independent "liquid biopsy" patient cohort

To validate our findings, ctDNA from an independent "liquid biopsy" cohort of 22 patients treated with EGFR antibodies and 6 control cases was subjected to NGS to detect acquired *EGFR* exon 12 and *RAS* mutations (Table 3). In contrast to the "tumor tissue" cohort, these patients had clinically more advanced disease with on average 2.4 prior therapies.

As expected, the ctDNA analysis confirmed the *RAS* status of the control group without EGFR antibody treatment. Well in line with previous studies, we found additional acquired *RAS* mutations in about one third of patients (Table 3) [28, 29]. *RAS* mutations were exclusively found in the cetuximab patient group.

Table 3: Clinical characteristics of the "liquid biopsy" patient cohort subjected to NGS of circulating tumor DNA.*

pat. #	category	age [years]	sex	tumor site	stage (AJCC)	KRAS status (initial)	no. of previous therapies	treatments	duration of antibody treatment [months]	response to antibody treatment	disease control at time point of plasma collection
22	panitumum abgroup	71	m	rectum	IV	wt	5	Folfoxiri/Bev, Folfiri/Pan, SM, Reg, Pan-mono	6	SD/PD	PD
23		49	m	colon	III	wt	5	Ox, Folfiri/Bev, 5-FU/Ox/Pan, Pan, Iri/Mito, Folfox/Bev	7	PR/PD	n.e.
24		59	m	colon	IV	wt	4	Folfox/Bev, Pan, Cap/Bev, Fufiri/Bev	1	-	-
25		69	m	CCC	III/IV	wt	1	Cis/Gem/Pan, Gem-mono	6	SD	SD
26		46	f	colon/rectum	IV	wt	4	Cap/Ox, Muc-1, Folfiri/Pan, Pan-mono, Folfox	6	PR/PD	PD
27		63	m	CCC	IV	wt	3	Cis/Gem/Pan, Cis/Gem, Gem/Ox, Cap/Ox	8	SD	SD
28	cetuximab group	41	f	colon/rectum	IV	wt	1	Folfiri/Cet	1	-	-
29		35	f	CUP	IV	wt	1	Carbo/Pacli/Cet	1	-	-
30		59	m	rectum	IV	wt	3	Folfox, Cap/Ox, Iri/Cet, Folfiri/Cet, Cap/Ox, Cap-mono	12	SD/PD	PR
31		51	m	rectum	IV	wt	3	Folfox/Bev, Folfiri/Ram, Folfox/Cet	6	CR	CR
32		44	m	colon/rectum	I	wt	2	Folfox, Folfiri/Cet, Folfox	6	PR	PD
33		70	m	colon	IV	wt	2	Folfox/Cet, Folfox/Cet, Folfox, Folfiri, Folfiri/Cet	17	PR/PR/PR	SD
34		77	m	colon	IV	wt	1	Folfiri/Cet, Cap	6	PR	SD
35		72	m	colon	III	wt	2	Folfox, Iri/Cet	3	PR	PD
36		52	f	rectum	IV	wt	3	Folfiri/Bev, Folfox, Iri/Cet	9	n.e.	n.e.
37		74	f	colon	III	wt	2	5-FU, Folfiri, Folfiri/Cet	5	PR	PR
38		71	f	rectum/sigma	IV	wt	5	Folfox, MGN17003, Folfiri/Bev, Cap/Bev, Folfiri/Bev, Folfox/Cet,	6	PD	PR
39		87	m	colon	IV	wt	2	5-FU/FA, Iri/Cet, Cet	10	SD	SD/PD
40		72	m	sigma	III	wt	2	5-FU/FA, Folfox/Cet, Folfiri/Bev	3	PR	PR
41		42	m	sigma	II	wt	1	Folfox, Folfox/Cet	4	CR	CR
42		54	f	rectum	III	wt	1	5-FU, Folfiri/Cet, Cap	6	PR	PR
43		50	f	colon	II	wt	1	Folfoxiri, Folfiri/Cet	1	-	-
44	control group (w/o EGFR targeted therapy)	70	m	colon	IV	wt	1	Cap/Ox	-	-	PD
45		53	m	colon	IV	**exon 2 (n.s.)**	1	Cap/Bev	-	-	SD
46		47	f	colon	n.e.	**cod.12 (G->D)**	1	Folfox/Bev, 5-FU/FA/Bev	-	-	SD
47		70	f	colon	n.e.	**cod.12 (G->V)**	2	Cap, Cap/Bev, Folfiri/Afli	-	-	SD
48		74	f	colon/rectum	IV	**cod.12 (G->V)**	2	Folfox/Bev, Cap/Bev, Folfiri, Iri-mono	-	-	PD
49	healthy control	29	f	-	-	-	-	-	-	-	-

* Stage refers to the stage at diagnosis; KRAS status was established by routine clinical testing at diagnosis covering exon 2 and 3 mutations; response was evaluated according to recist criteria. f = female, m = male, CCC = cholangiocellular cancer, CUP = cancer of unknown primary, wt = wildtype, mut. = mutated, Pan = Panitumumab, Cet = Cetuximab, Bev = Bevacizumab, Ram = Ramucirumab, Reg = Regorafenib, FA = Folic acid, Iri = Irinotecan, Cap = Capecitabine, Gem = Gemcitabine, Mito = Mitomycin-C, Afli = Aflibercept, Cis = Cisplatin, Ox = Oxaliplatin, SM = study medication, CR = complete remission, PR = partial remission, SD = stable disease, PD = progressive disease, n.e. = not evaluated

However, this apparent overrepresentation did not result statistically significant by χ^2 testing, corresponding to previously published work on acquired *RAS* mutations after both cetuximab and panitumumab treatment [28, 29].

Interestingly, 1 out of 6 panitumumab-treated patients showed evidence of the *EGFR G465R* mutation with a frequency of 7.7% (patient 25, Table 4). This patient with cholangiocellular carcinoma was unmutated for EGFR exon 12 at baseline as evidenced by NGS of his primary tumor tissue (data not shown) and had stable disease after 6 months of chemotherapy in combination with panitumumab. The blood sample was drawn 3 months after cessation of panitumumab. Of note, the previously described *S492R* mutation was not detected in our patient cohort.

DISCUSSION

Treatment and survival of patients with mCRC has improved over the past decade, largely due to the advent of new drugs, in particular targeted therapies. Around 60% of patients with *RAS* wt tumors respond to first-line chemotherapy plus EGFR-directed antibodies [2]. However, secondary resistance emerges in most patients at a median of 9 to 12 months [34]. Whilst drug resistance to EGFR-directed small molecule tyrosine kinase inhibitors has been well characterized in oncology and mutational analyses trigger therapeutic decisions in specific disease

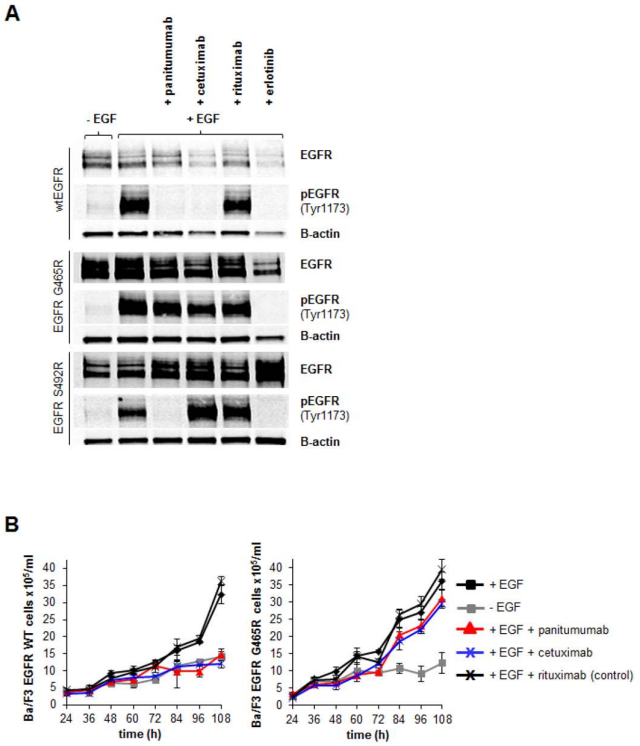

Figure 2: *EGFR G465R* mutation induces cross-resistance to panitumumab and cetuximab in an EGF-dependent Ba/F3 cellular model. A: *EGFR* signaling in EGF-dependent Ba/F3 model. Wt and S492R or *G465R* mutant EGFR-expressing Ba/F3 cells were cultured in the presence or absence of EGF and with addition of cetuximab, panitumumab, rituximab or erlotinib. After 2 hours, cells were harvested and EGFR/pEGFR expression analyzed by western blot analysis. B: Sensitivity of *EGFR* wt or *EGFR G465R* mutant-transfected Ba/F3 cells to treatment with EGFR-targeted antibodies. Ba/F3 cells were transformed to IL-3 independence with EGFR wt or mutant constructs and subsequently cultured in the presence or absence of EGF or with EGF in combination with panitumumab, cetuximab or control antibody rituximab. The number of viable cells was determined by trypan blue exclusion every 12 hours beginning 24 hours after seeding and plotted. Data are means from triplicate experiments +/-SEM.

Table 4: EGFR G465R and S492R ectodomain mutations and also KRAS and NRAS mutations after EGFR antibody treatment in circulating tumor DNA from the "liquid biopsy" patient cohort.*

pat. #	category	G465R mutation	S492R mutation	KRAS (ex. 2/3/4)	NRAS (ex. 2/3/4)
22	panitumumab group	wt	wt	wt	wt
23		wt	wt	wt	wt
24		wt	wt	wt	wt
25		G465R (7.7%)	wt	wt	wt
26		wt	wt	wt	wt
27		wt	wt	wt	wt
28	cetuximab group	wt	wt	cod.12 (G->V,3.6%)	wt
29		wt	wt	wt	wt
30		wt	wt	wt	wt
31		wt	wt	wt	wt
32		wt	wt	wt	wt
33		wt	wt	wt	wt
34		wt	wt	wt	wt
35		wt	wt	wt	wt
36		wt	wt	cod.12 (G->V, 10.4%)	wt
37		wt	wt	cod.12 (G->V. 5.7%)	wt
38		wt	wt	wt	wt
39		wt	wt	cod.61 (Q->H, 4.8%)	wt
40		wt	wt	wt	wt
41		wt	wt	wt	wt
42		wt	wt	cod.12 (G->V, 1.1%)	wt
43		wt	wt	cod.12 (G->V, 3.2%)	wt
44	control group (w/o EGFR targeted therapy)	wt	wt	wt	wt
45		wt	wt	exon 2 (n.s.)	wt
46		wt	wt	cod.12 (G->D, 1.1%)	wt
47		wt	wt	cod.12 (G->V, 3.8%)	wt
48		wt	wt	cod.12 (G->V, 25.0%)	wt
49	healthy control	wt	wt	wt	wt

* wt = wild-type; cod. = codon; n.s. = not specified, % = percentage of reads

settings, resistance to monoclonal antibodies is less well understood. In the context of EGFR targeting, recent publications shed light on some of the molecular mechanisms underlying clinical resistance to cetuximab and panitumumab. These incriminated the selection of subclones with activating *RAS* mutations [28, 29] as well as an epitope-changing point mutation [31] in the *EGFR* ectodomain acquired during cetuximab treatment. The latter mechanism is of particular interest since it represents the first mutation described to confer resistance by destroying a therapeutic antibody's epitope.

These data raised several questions: How frequently do *EGFR* ectodomain mutations contribute to clinical resistance to EGFR antibody treatment in relation to acquired *RAS* mutations? How early do they occur in the course of therapy? Are other *EGFR* ectodomain mutations than the previously described *S492R* mutation acquired during EGFR inhibition (particularly during treatment with panitumumab)?

Here, we investigated *EGFR* domain III and activating *RAS* mutations in a "tumor tissue" cohort of 21 patients with gastrointestinal cancers, mainly mCRC, including 16 patients with EGFR-targeted therapy. These patients were – in their majority – clinically responsive to the antibody-containing treatment. In 1 out of 3 patients with available post-treatment samples after panitumumab-

containing treatment we found a novel acquired mutation in exon 12 of the *EGFR* ectodomain. Since this mCRC patient had undergone surgery at partial remission after 3 months of FOLFOX in combination with panitumumab, we had post-treatment tumor material as well as tumor-infiltrated lymph nodes available for mutational analysis by NGS (unfortunately, no follow-up clinical data was available as this patient died due to post-surgery complications). Interestingly, the mutation was not only present in the post-treatment tumor, but also in one of the resected tumor-infiltrated lymph nodes in 3.5 and 6.8% of reads (excluding a potential sequencing artifact). The actual percentage of cells carrying the mutated receptor can, however, not directly be inferred from the percentage of reads showing the point mutation since signals of non-neoplastic cells are admixed in both materials and the sequencing of genomic DNA always yields sequences from the unmutated allele as well. Since the *G465R* mutation centrally introduces a positive charge in both epitopes, it was not surprising to find abrogation of panitumumab and cetuximab binding leading to cross-resistance to both antibodies in a cellular model. NGS of ctDNA in an independent "liquid biopsy" patient cohort showed that this mutation was present in one additional patient with cholangiocellular carcinoma. Altogether, this sums up to 2/9 patients with this resistance-mediating mutation after treatment with panitumumab. Correlating clinical outcomes of patients with the *EGFR G465* mutational status is, however, limited by the overall patient number (n=2 patients harboring the *G465R* mutation) in this study as well as the fact that these patients received antibody-chemotherapy combinations which makes it difficult to estimate the net clinical effect of the antibody. Since the mutation was found in patients who had stable disease or a partial response to chemotherapy in combination with panitumumab, we conclude that our technique may allow us to detect mutations before overt clinical resistance occurs [30, 35-38].

It remains an open question, however, if the addition of an EGFR targeting antibody to chemotherapy is entirely useless in a patient harboring a subclonal mutation or if patients may derive some benefit since the unmutated tumor cells may still be targeted. This issue needs to be prospectively addressed by future studies.

In addition to the newly discovered *EGFR* exon 12 mutation, we detected acquired *RAS* mutations in about one third of patients treated with EGFR antibodies in the "liquid biopsy" cohort, in line with previously published work [28, 29]. In contrast, sequencing performed on post-treatment tumors of the "tumor tissue" cohort did not show any acquired RAS mutations. This difference may be in part due to the fact that the "tumor tissue" cohort included less advanced disease stages than the "liquid biopsy" cohort. More importantly our data suggests that ctDNA sequencing may be more suitable for the identification of small resistant subclones since ctDNA reflects to a greater extent the genetic heterogeneity of the tumor.

Putting this investigation in relation to what other studies have shown, we most be aware that different patient cohorts were investigated. While this study was based on an unselected patient cohort with the majority of patient not considered clinically refractory to EGFR inhibition, other studies on acquired *RAS* and *EGFR S492R* mutations have been conducted in patient cohorts considered resistant to the antibody-containing regimen [28, 31]. This represents the most obvious difference between the studies and may help to explain disparities between mutational frequencies regarding the *EGFR S492R* mutation as well as acquired *RAS* mutations.

Taken together, our data shapes our understanding of epitope-changing *EGFR* mutations in gastrointestinal tumors showing that two different mutations can arise early on during EGFR-targeted treatment. These mutations are less frequently acquired as compared to *RAS* mutations and they can induce resistance or even cross-resistance depending on their localization within the panitumumab/cetuximab epitopes. Liquid biopsy strategies allow therapy monitoring and may perspectively help to guide treatment decisions in patients during EGFR targeted therapy. Validation in samples from large clinical studies of defined patient cohorts receiving chemotherapy in combination with EGFR-inhibiting antibodies are clearly warranted. We expect that these studies will help to define cut-offs for clinically significant mutational loads.

MATERIALS AND METHODS

Study design, patient cohorts and ethics statement

Data, tumor and blood samples of 48 patients with gastrointestinal cancer (41 CRC, 7 non-CRC) treated at our institution between February 2012 and August 2014 as well as one healthy donor were included in this prospective, longitudinal study after patients' written informed consent and approval by the ethics commission. In the first training cohort, tissue samples were analyzed pre- and post-treatment (if available) for *EGFR* and *RAS* genes as described below („tumor tissue" patient cohort). In the second cohort, ctDNA post-treatment was analyzed for *EGFR* and *RAS* genes in an independent set of patients („liquid biopsy" patient cohort).

Targeted next-generation sequencing (NGS)

EGFR exons 7-13, *KRAS* exons 2/3/4 and *NRAS* exons 2/3/4 were amplified from genomic DNA isolated from paraffin embedded tumor tissue or leukocyte DNA as described in the Supplementary Detailed NGS Methods Section using the primers shown in Supplementary Table 1. NGS was performed with a median number of 27694

reads per exon per patient to detect even small tumor subclones. Sequences were aligned with the reference sequences shown in Supplementary Table 2. A schematic overview of the amplification strategies is shown in Supplementary Figure 1A.

Generation of human *EGFR* wt and mutant constructs

cDNAs coding for the human wt EGFR ectodomain (aa1 to 645) and the human IgG1 Fc-fragment (for EGFR-Fc fusion protein expression) or the complete human wt EGFR (for membrane expression of the receptor in eukaryotic cells) were inserted into the vector pcDNA3.1(+) (Life Technologies, Carlsbad, USA). *EGFR* mutants were generated with the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) as described [39] using individually designed oligonucleotides (Supplementary Table 3).

Recombinant expression and purification of EGFR-Fc proteins

HEK293 cells (CRL-1573, ATCC, Manassas, USA) were transfected with *EGFR* -Fc wt and mutant constructs using Lipofectamin 2000 (Life Technologies, Carlsbad, USA). Conditioned serum-free medium was collected and EGFR-Fc proteins were purified via Protein A-Sepharose (Pierce, Appleton, USA).

ELISA with EGFR-Fc proteins

96-well ELISA plates were coated with recombinant wt or mutant EGFR-Fc proteins. Correct expression and immobilization of EGFR-Fc proteins was assessed by ELISA using a biotinylated anti-human EGFR antibody (R&D Systems, Minneapolis, USA) and streptavidin-peroxidase conjugate (Roche, Basel, Switzerland).

To study binding of therapeutic antibodies to the fusion proteins, immobilized EGFR-Fc proteins were incubated with cetuximab (Merck, Darmstadt, Germany), panitumumab (Amgen, Thousand Oaks, USA) or rituximab (Roche, Basel, Switzerland) at 100ng/ml and detected with a biotinylated goat anti-human kappa-specific antibody (Southern Biotech, Birmingham, USA) followed by secondary detection as above.

Transfection with *EGFR* wt and mutant constructs

EGFR -negative CHO cells (CCL-61, ATCC, Wesel, Germany) were chemically transfected with wt, *G465R* or *S492R EGFR* encoding vector. Ba/F3 cells (CSC-C2045, Creative Bioarray, New York, USA) kindly provided by Stefan Horn (Research Department Cell and Gene Therapy, Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany) were maintained in medium containing 10ng/ml murine IL-3 (Peprotech, Rocky Hill, USA, [40]). Electroporation-transfected cells expressing wt or mutant *EGFR* were G418-selected (1mg/ml) and subsequently cultured in the absence of IL-3 and in the presence of 10ng/ml EGF. Stable cells transformed to IL-3 independence were screened for EGFR functionality by treatment with EGF or EGF + erlotinib at 5µM (Roche, Basel, Switzerland) and subsequently used for drug-sensitivity experiments.

Flow cytometry of transfected cells

Transfected CHO or Ba/F3 cells were stained with a polyclonal goat anti-human EGFR antibody (R&D Systems, Minneapolis, USA), panitumumab or cetuximab followed by secondary detection with FITC-labeled rabbit anti-human (Sigma-Aldrich, St.Gallen, Switzerland), or rabbit anti-goat antibodies (Dako Cytomation, Copenhagen, Denmark). Cells were analyzed on a FACS Calibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA).

EGFR signaling and drug-sensitivity assays

EGFR wt or mutant transfected Ba/F3 cells were cultured for 2 hours with or without EGF (10ng/ml), in combination with panitumumab, cetuximab, rituximab (10µg/ml), or erlotinib. Lysates were subjected to western blot analysis using the following antibodies: EGFR and phospho-EGFR (Tyr1173) (53A5) (Cell Signaling, Danvers, USA), mouse anti-β-actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), IRDye 800CW goat anti-rabbit IgG, IRDye 800CW goat anti-mouse IgG and IRDye 680RD goat anti-rabbit IgG (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA). For drug-sensitivity assays, *EGFR* wt and *G465R* transfected Ba/F3 cells were cultured +/-EGF or with EGF/panitumumab, EGF/cetuximab or EGF/rituximab, as above. Viable cells were quantified by counting trypan blue excluding cells for 108 hours every 12 hours.

NGS of ctDNA

ctDNA was extracted from plasma using the QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Germany). *EGFR* exon 12 regions surrounding positions coding for *S492* and *G465*, *KRAS* exon 2/3/4 and *NRAS* exon 2/3/4 were amplified using the primer pairs shown in Supplementary Table 1 (ctDNA). Illumina-adapter sequences / sample-specific barcodes were added as schematically shown in Supplementary Figure 1B.

Sequencing (with a median number of 27 694 reads per exon per patient) as well as data analysis was performed as mentioned in the in the Supplementary Detailed NGS Methods Section.

Statistics

Overrepresentation of *RAS* mutations in one of the two EGFR antibody-treated groups (panitumumab versus cetuximab) of both patient cohorts ("tumor tissue" and "liquid biopsy" cohort) was evaluated by chi-square-test X^2 testing.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Anita Schulenkorf and Konstantin Hoffer for expert technical assistance.

REFERENCES

1. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. The New England journal of medicine. 2004; 351: 337-345.
2. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, Koralewski P. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. Journal of clinical oncology. 2009; 27: 663-671.
3. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. The New England journal of medicine. 2007; 357: 2040-2048.
4. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G, Wolf M, Amado RG. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. Journal of clinical oncology. 2007; 25: 1658-1664.
5. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, Andre T, Chan E, Lordick F, Punt CJ, Strickland AH, Wilson G, Ciuleanu TE, et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. Journal of clinical oncology. 2010; 28: 4706-4713.
6. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocakova I, Ruff P, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. Journal of clinical oncology. 2010; 28: 4697-4705.
7. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. The New England journal of medicine. 2009; 360: 1408-1417.
8. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, Vega-Villegas ME, Eng C, Steinhauer EU, Prausova J, Lenz HJ, Borg C, Middleton G, et al. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. Journal of clinical oncology. 2008; 26: 2311-2319.
9. Lang I, Kohne CH, Folprecht G, Rougier P, Curran D, Hitre E, Sartorius U, Griebsch I, Van Cutsem E. Quality of life analysis in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated first-line with cetuximab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin. European journal of cancer. 2013; 49: 439-448.
10. Tabernero J, Van Cutsem E, Diaz-Rubio E, Cervantes A, Humblet Y, Andre T, Van Laethem JL, Soulie P, Casado E, Verslype C, Valera JS, Tortora G, Ciardiello F, et al. Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. Journal of clinical oncology. 2007; 25: 5225-5232.
11. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, Heintges T, Lerchenmuller C, Kahl C, Seipelt G, Kullmann F, Stauch M, Scheithauer W, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. The lancet oncology. 2014; 15: 1065-1075.
12. Jensen LH, Lindebjerg J, Ploen J, Hansen TF, Jakobsen A. Phase II marker-driven trial of panitumumab and chemotherapy in KRAS wild-type biliary tract cancer. Annals of oncology. 2012; 23: 2341-2346.
13. Crosby T, Hurt CN, Falk S, Gollins S, Mukherjee S, Staffurth J, Ray R, Bashir N, Bridgewater JA, Geh JI, Cunningham D, Blazeby J, Roy R, et al. Chemoradiotherapy with or without cetuximab in patients with oesophageal cancer (SCOPE1): a multicentre, phase 2/3 randomised trial. The lancet oncology. 2013; 14: 627-637.
14. Philip PA, Benedetti J, Corless CL, Wong R, O'Reilly EM, Flynn PJ, Rowland KM, Atkins JN, Mirtsching BC, Rivkin SE, Khorana AA, Goldman B, Fenoglio-Preiser CM, et al. Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed

intergroup trial S0205. Journal of clinical oncology. 2010; 28: 3605-3610.

15. Waddell T, Chau I, Cunningham D, Gonzalez D, Okines AF, Okines C, Wotherspoon A, Saffery C, Middleton G, Wadsley J, Ferry D, Mansoor W, Crosby T, et al. Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine with or without panitumumab for patients with previously untreated advanced oesophagogastric cancer (REAL3): a randomised, open-label phase 3 trial. The lancet oncology. 2013; 14: 481-489.
16. Lordick F, Kang YK, Chung HC, Salman P, Oh SC, Bodoky G, Kurteva G, Volovat C, Moiseyenko VM, Gorbunova V, Park JO, Sawaki A, Celik I, et al. Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomised, open-label phase 3 trial. The lancet oncology. 2013; 14: 490-499.
17. Malka D, Cervera P, Foulon S, Trarbach T, de la Fouchardiere C, Boucher E, Fartoux L, Faivre S, Blanc JF, Viret F, Assenat E, Seufferlein T, Herrmann T, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without cetuximab in advanced biliary-tract cancer (BINGO): a randomised, open-label, non-comparative phase 2 trial. The lancet oncology. 2014; 15: 819-828.
18. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. Journal of clinical oncology. 2010; 28: 1254-1261.
19. Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. Nature reviews clinical oncology. 2010; 7: 493-507.
20. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. The New England journal of medicine. 2008; 359: 1757-1765.
21. Giampieri R, Scartozzi M, Del Prete M, Maccaroni E, Bittoni A, Faloppi L, Bianconi M, Cecchini L, Cascinu S. Molecular biomarkers of resistance to anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer, from classical to innovation. Critical reviews in oncology/hematology. 2013; 88: 272-283.
22. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer research. 2006; 66: 3992-3995.
23. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocakova I, Ruff P, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. The New England journal of medicine. 2013; 369: 1023-1034.
24. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. Journal of clinical oncology. 2008; 26: 1626-1634.
25. Kumar SS, Price TJ, Mohyieldin O, Borg M, Townsend A, Hardingham JE. KRAS G13D Mutation and Sensitivity to Cetuximab or Panitumumab in a Colorectal Cancer Cell Line Model. Gastrointestinal cancer research. 2014; 7: 23-26.
26. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-updagger. Annals of oncology. 2014; 25: iii1-iii9.
27. Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, Morvillo M, Bergamo F, Zoratto F, Salvatore L, Antoniotti C, Marmorino F, Sensi E, Lupi C, Fontanini G, Gregorio VD, et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. International journal of cancer. 2015; 136: 83-90.
28. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. Nature. 2012; 486: 532-536.
29. Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, Kinzler KW, Oliner KS, Vogelstein B. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. Nature. 2012; 486: 537-540.
30. Misale S, Arena S, Lamba S, Siravegna G, Lallo A, Hobor S, Russo M, Buscarino M, Lazzari L, Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Amatu A, Lauricella C, et al. Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. Science translational medicine. 2014; 6: 224ra226.
31. Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M, Salido M, Gallen M, Marsters S, Tsai SP, Minoche A, Seshagiri S, Serrano S, et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. Nature medicine. 2012; 18: 221-223.
32. Esposito C, Rachiglio AM, La Porta ML, Sacco A, Roma C, Iannaccone A, Tatangelo F, Forgione L, Pasquale R, Barbaro A, Botti G, Ciardiello F, Normanno N. The S492R EGFR ectodomain mutation is never detected in KRAS wild type colorectal carcinoma before exposure to EGFR monoclonal antibodies. Cancer biology & therapy. 2013; 14: 1143-1146.
33. Voigt M, Braig F, Gothel M, Schulte A, Lamszus K, Bokemeyer C, Binder M. Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab. Neoplasia. 2012; 14: 1023-1031.
34. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, Ciardiello F, Heeger S, Schlichting M, Celik I, Kohne CH. Addition

of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. European journal of cancer. 2012; 48: 1466-1475.

35. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Science translational medicine. 2014; 6: 224ra224.
36. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, Parkinson C, Chin SF, Kingsbury Z, Wong AS, Marass F, Humphray S, Hadfield J, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. Nature. 2013; 497: 108-112.
37. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. Nature medicine. 2008; 14: 985-990.
38. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, Kumagai T, Okuyama T, Okami J, Higashiyama M, Kodama K, Imamura F, Kato K. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. Clinical cancer research. 2011; 17: 7808-7815.
39. Binder M, Vogtle FN, Michelfelder S, Muller F, Illerhaus G, Sundararajan S, Mertelsmann R, Trepel M. Identification of their epitope reveals the structural basis for the mechanism of action of the immunosuppressive antibodies basiliximab and daclizumab. Cancer research. 2007; 67: 3518-3523.
40. Karasuyama H, Melchers F. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. European journal of immunology. 1988; 18: 97-104.

Research Paper

Liquid biopsy monitoring uncovers acquired RAS-mediated resistance to cetuximab in a substantial proportion of patients with head and neck squamous cell carcinoma

Friederike Braig[1,*], Minna Voigtlaender[1,*], Aneta Schieferdecker[1], Chia-Jung Busch[2], Simon Laban[2,3], Tobias Grob[4], Malte Kriegs[5], Rainald Knecht[2], Carsten Bokemeyer[1] and Mascha Binder[1]

[1] Department of Oncology and Hematology with Sections Bone Marrow Transplant and Pneumology, Hubertus Wald Tumorzentrum / University Cancer Center Hamburg, University Medical Center Hamburg, Hamburg, Germany

[2] Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Cancer Center of The University Cancer Center Hamburg, University Medical Center Hamburg, Hamburg, Germany

[3] Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Ulm University Medical Center, Ulm, Germany

[4] Department of Pathology, University Medical Center Hamburg, Hamburg, Germany

[5] Laboratory for Radiobiology and experimental Radiooncology, Head and Neck Cancer Center of The University Cancer Center Hamburg, University Medical Center Hamburg, Hamburg, Germany

[*] These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: *Mascha Binder*, ***email***: *m.binder@uke.de*

Keywords: head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), epidermal growth factor receptor (EGFR), RAS, resistance, cetuximab

Received: *March 25, 2016* ***Accepted***: *March 29, 2016* ***Published***: *April 22, 2016*

ABSTRACT

Resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapy is insufficiently understood in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), entailing the lack of predictive biomarkers.

Here, we studied resistance-mediating EGFR ectodomain and activating RAS mutations by next-generation sequencing (NGS) of cell lines and tumor tissue of cetuximab-naïve patients (46 cases, 12 cell lines), as well as liquid biopsies taken during and after cetuximab/platinum/5-fluorouracil treatment (20 cases). Tumors of cetuximab-naïve patients were unmutated, except for HRAS mutations in 4.3% of patients. Liquid biopsies revealed acquired KRAS, NRAS or HRAS mutations in more than one third of patients after cetuximab exposure. 46% of patients with on-treatment disease progression showed acquired RAS mutations, while no RAS mutations were found in the non-progressive subset of patients, indicating that acquisition of RAS mutant clones correlated significantly with clinical resistance (Chi square p=0.032). The emergence of mutations preceded clinical progression in half of the patients, with a maximum time from mutation detection to clinical progression of 16 weeks.

RAS mutations account for acquired resistance to EGFR-targeting in a substantial proportion of HNSCC patients, even though these tumors are rarely mutated at baseline. Liquid biopsies may be used for mutational monitoring to guide treatment decisions.

INTRODUCTION

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) arising in the larynx, pharynx, oral cavity, paranasal sinuses and nasal cavity are among the most common types of cancers, accounting for almost 60,000 newly diagnosed cases and more than 10,000 estimated deaths per year in the United States alone [1]. The prognosis of HNSCC patients with locoregionally advanced tumors is poor as indicated by five year overall survival rates of 40-60% in recent clinical trials [2-6]. In recurrent and metastatic disease the mean overall survival does not exceed 11 months despite intensive treatment protocols [7, 8].

Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the extracellular ligand binding domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR), is approved for the treatment of locoregionally advanced HNSCC in combination with radiotherapy [9] and for the treatment of recurrent or metastatic disease in combination with platinum-based chemotherapy [7]. However, not all patients treated with cetuximab respond well to therapy due to primary or acquired resistance, limiting significantly the clinical benefit of this drug.

Still, the molecular mechanisms underlying clinical resistance to cetuximab in HNSCC have not yet been elucidated. In metastatic colorectal cancer (mCRC) resistance mechanisms are by far better understood and involve mutations in EGFR downstream signaling molecules such as RAS [10]. Constitutive RAS signaling is mediated by mutations that prevent GTP hydrolysis, thus locking RAS in a permanently active state, independent of EGFR engagement. For this reason, colon tumors harboring activating RAS mutations do not respond to EGFR targeting and mutational screening is therefore routinely used for patient selection prior to treatment [11, 12]. In HNSCC, however, primary RAS mutations are rather uncommon with only 4.6% of HRAS mutated tumors and their significance for this entity remains unclear [13, 14]. Just as primary resistance, acquired resistance to cetuximab represents a challenge in the treatment of both mCRC and HNSCC. A recent series of pivotal studies on mCRC suggested that acquired resistance to cetuximab may not only be mediated by selection of rare RAS mutated subclones (from predominantly RAS wildtype tumors) [15, 16] but also by acquisition of epitope-modifying EGFR mutations during cetuximab (or panitumumab) treatment [17-19]. In fact, the extracellular domain mutations R451C, S464L, G465R, K467T, I491M and S492R of the EGFR (all located in exon 12) were found in post-therapeutic tumor subclones or antibody-resistant cell lines by next-generation or sanger sequencing. These mutations abrogated antibody binding and, therefore, resulted in clinical resistance to cetuximab and/or panitumumab depending on their localization within the antibody epitopes [17, 19].

To investigate if these or related mechanisms may play a role in cetuximab resistance of HNSCC as well, we set out to scan the cetuximab-interacting ectodomain of the EGFR as well as KRAS/NRAS exons 2/3/4 and HRAS exons 2/3 for mutations in a cohort of 46 HNSCC patients by targeted next generation sequencing, 20 of these with available post-cetuximab circulating tumor DNA (ctDNA). We found that RAS mutations can be acquired in a substational proportion of patients during cetuximab-based treatment and significantly correlate with disease progression. Future studies should quantitatively determine mutational loads that reliably predict the benefit - or lack thereof - from further cetuximab treatment in patients with acquired RAS mutations.

RESULTS

Patients and treatment

Of the 46 cetuximab-treated patients, 13 patients (28%) were in a curative and 33 patients (72%) were in a palliative treatment setting (Table 1). Although 19 of 46 patients (41%) had HNSCC of the oropharynx, HPV-positivity was rare with 5 of 46 patients (11%). The overall response rate (complete and partial responses) with cetuximab-based treatment was only 47% implying a high rate of treatment-resistant tumors in this cohort. About two thirds (13/20) of patients with liquid biopsies had progressive disease during combination therapy with Cis^{-} or carboplatin, 5-fluorouracil and cetuximab or cetuximab maintenance, respectively. Of the remaining seven patients without progressive disease, two patients refused cetuximab maintenance therapy, one patient died of pneumonia during combination therapy and one patient had severe bleeding complications requiring discontinuation of therapy. The median progression-free survival for patients in the liquid biopsy cohort was 4.9 months (95% CI 3.4-6.0), the median overall survival 5.2 months (95% CI 4.0-7.8).

NGS of the cetuximab-interacting EGFR ectodomain and RAS at baseline and in HNSCC cell lines

We sought to find out i) if tumor subclones expressing a mutated EGFR ectodomain or activating RAS mutations exist in HNSCC tumors before cetuximab-based treatment and ii) if such subclones emerge or expand under the selective pressure of EGFR-directed antibody treatment in this disease. We used NGS to screen EGFR exon 12, KRAS/NRAS exons 2/3/4 and HRAS exons 2/3 with a mean number of > 20,000 reads per exon, ensuring that even rare mutant subclones would be detected (targeted NGS approach schematically shown in Figure 1).

Table 1: Patient and tumor characteristics with sequencing data of tumor samples.

Pat.	Primary site	HPV-Status (p16/HPV-DNA)	Time of initial diagnosis		Time of relapse		Cetuximab treatment setting	Treatment combination	Origin of tumor sample	EGFR exon 12	KRAS exon 2/3/4	NRAS exon 2/3/4	HRAS exon 2/3
			TNM	UICC	TNM	UICC							
1	Oro-/Hypopharynx	negative (-/-)	cT3 cN2c cM0	IV A	n.a.	n.a.	curative	RT + Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	**G13R/wt**
2	Hypopharynx/Larynx	negative (-/-)	cT4a cN2c cM0	IV A	n.a.	n.a.	curative	TPF; RT + Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
3	Oropharynx	negative (-/-)	pT2 pN2c cM1	IV C	n.a.	n.a.	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
4	Oral Cavity	negative (-/-)	cT4a cN2c cM0	IV A	n.a.	n.a.	curative	TPF; RT + Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
5	Oropharynx	negative (-/-)	cT2 cN2b cM0	IV A	n.a.	n.a.	curative	TPF; RT + Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
6	Oral Cavity	negative (-/-)	pT2 pN2b cM0	IV A	rcT2 cN0 cM0	II	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
7	Oropharynx	negative (-/-)	cT4a cN2c cM1	IV C	n.a.	n.a.	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
8	Oropharynx	positive (+/+)	cT3 cN2b cM0	IV A	n.a.	n.a.	curative	RT + Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
9	Hypopharynx	negative (-/+)	cT2 cN2c cM0	IV A	n.a.	n.a.	curative	TPF; RT + Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
10	Larynx	negative (-/-)	cT2 cN3 cM1	IV C	n.a.	n.a.	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
11	Oropharynx	positive (+/+)	pT1 pN2b cM0	IV A	rcT0 cN0 cM1	IV C	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	n.e./n.e.
12	Oropharynx	negative (-/-)	cT4a cN1 cM0	IV A	rcT2 cN1 cM0	III	palliative	Carbo, Taxol, Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	n.e./wt
13	Hypopharynx	negative (-/-)	cT4a cN2c cM0	IV A	n.a.	n.a.	curative	TPF; RT + Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
14	Larynx	negative (-/-)	cT2 cN0 cM0	II	n.a.	n.a.	curative	TPF; RT + Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
15	Oral Cavity	negative (-/-)	cT4a cN2c cM0	IV A	n.a.	n.a.	curative	RT + Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
16	Oropharynx	negative (-/-)	cT4a cN2b cM0	IV A	rcT4a cN2b cM0	IV A	palliative	Carbo, Taxol, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
17	Paranasal Sinus	negative (-/-)	pT4a pN0 cM0	IV A	rcT4a cN2c cM0	IV A	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
18	Oro-/Hypopharynx	negative (-/-)	pT3 pN1 cM0	III	rcT3 cN0 cM0	III	palliative	RT + Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
19	Oropharynx	negative (-/-)	cTx cNx cM0	n.a.	rcT4a cN2b M1	IV C	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
20	Paranasal Sinus	negative (-/-)	cT4a cN2c cM0	IV A	rcT4a cN0 cM0	IV A	palliative	Gem, Vino, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
21	Oral Cavity	negative (-/-)	cT4a cN2c cM0	IV A	rcT3 cN0 cM1	IV C	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
22	Hypopharynx	negative (-/-)	cT3 cN2b cM0	IV A	n.a.	n.a.	curative	TPF; RT + Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
23	Oral Cavity	negative (-/-)	cT4a cN2c cM1	IV C	n.a.	n.a.	palliative	Carbo, Taxol, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	n.e./n.e.
24	Oral Cavity	negative (-/-)	cT3 cN2c cM0	IV A	n.a.	n.a.	curative	RT + Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
25	Oropharynx	negative (-/-)	cT4a cN2c cM0	IV A	n.a.	n.a.	curative	TPF; RT + Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
26	Oropharynx	positive (+/+)	cT4a cN2c cM0	IV A	n.a.	n.a.	curative	RT + Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
27	Hypopharynx	negative (-/-)	pT2 pN1 cM0	III	rcT4a cN0 cM0	IV A	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
28	Larynx	negative (-/-)	cT2 cN0 cM0	II	cT2 cN1 cM0	III	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
29	Hypopharynx	negative (-/-)	cT4a cN3 cM1	IV C	n.a.	n.a.	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
30	Oral Cavity	negative (+/-)	pT2 pN0 cM0	II	rcT3 cN0 cM1	IV C	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	**G13R/wt**
31	Oropharynx	negative (-/-)	pT2 pN2b cM0	IV A	rcTx cN1 cM1	IV C	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
32	Oral Cavity	negative (-/-)	cT4b cN3 cM1	IV B	n.a.	n.a.	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
33	Larynx	negative (-/-)	pT2 pN2b cM0	IV A	rcT3 cN0 cM0	III	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
34	Oropharynx	positive (+/+)	pT3 pN2c cM0	IV A	rcTx cNx cM1	IV C	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
35	Hypopharynx	negative (-/+)	cT3 cN2b cM0	IV A	rcTx cN3 cM1	IV C	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
36	Oral Cavity	negative (-/-)	pT2 pN3 cM0	IV B	rcTx cN1 cM1	IV C	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
37	Oral Cavity	negative (-/-)	pT4a pN0 cM0	IV A	rcT3 cN1 cM0	III	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
38	Oral Cavity	negative (-/-)	cT4a cN1 cM0	IV A	rcT3 cN2 cM1	IV C	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
39	Oropharynx	positive (+/+)	cT3 cN0 cM0	III	cT2 cN1 cM0	III	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
40	Hypopharynx	negative (-/-)	pT2 pN2c cM0	IV A	rcT2 cN2c cM0	IV A	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
41	Oral Cavity	negative (-/-)	cT4b cN2c cM1	IV C	n.a.	n.a.	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	n.e./wt
42	Oropharynx	negative (-/-)	pT2 pN1 cM0	III	rcT0 cN0 cM1	IV C	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
43	Hypopharynx	negative (-/-)	cT2 cN2b cM1	IV C	n.a.	n.a.	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
44	Oropharynx	negative (-/-)	pT1 pN2b cM0	IV A	rcT2 cN0 cM1	IV C	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	intial diagnosis	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
45	Oropharynx	negative (-/-)	cT4a cN2c cM0	IV A	rcT0 cN2c cM1	IV C	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt
46	Oropharynx	negative (-/-)	cT1 cN3 cM0	IV B	cT4 cN0 cM0	IV A	palliative	CDDP, 5-FU, Cet	relapse	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt

Abbreviations: *HPV* human papilloma virus; *n.a.* not applicable; *RT* radiotherapy; *Cet* Cetuximab; *TPF* Docetaxel/Cisplatin/5-Fluoruracil; *CDDP* 5-FU Cis-(or Carbo)platin/5-Fluoruracil; *Carbo, Taxol* Carboplatin/Paclitaxel; *Gem*, Vino Gemcitabine/Vinorelbine; *wt* wildtype; *n.e.* not evaluable

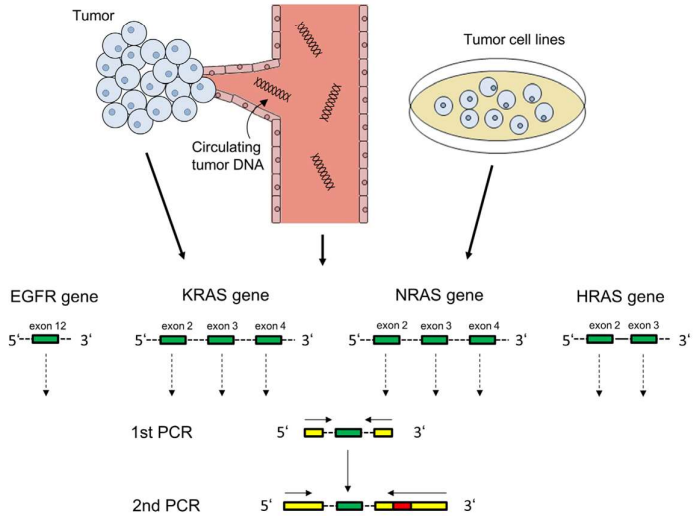

Figure 1: PCR amplification of EGFR and RAS exons for Illumina targeted next generation sequencing. EGFR exon 12, KRAS/NRAS exons 2/3/4 and HRAS exons 2/3 (green) were amplified from tumor tissue of 46 patients, post-cetuximab circulating tumor DNA of 20 patients and from 12 squamous carcinoma cell lines. Illumina-specific sequences for hybridization and sequencing (yellow) as well as patient-specific barcodes (red) were attached in a second PCR step.

Table 2: Characteristics and sequencing data of squamous cell carcinoma cell lines

Cellline	Origin	HPV	EGFR exon 12	KRAS exon 2/3/4	NRAS exon 2/3/4	HRAS exon 2/3	Reference
UT-SCC-5	Tongue	negative	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt	Lin et al. [25]
UT-SCC-8	Supraglotticlarynx	negative	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt	Lin et al. [25]
UT-SCC-14	Tongue	negative	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt	Lin et al. [25]
UT-SCC-15	Tongue	negative	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt	Lin et al. [25]
UT-SCC-29	Glotticlarynx	negative	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt	Lin et al. [25]
UT-SCC-42A	Supraglottis	negative	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt	Lin et al. [25]
UT-SCC-60A	Tonsil	negative	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt	Lange et al. [22]
Cal33	Tongue	negative	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt	Soffar et al. [24]
HSC-4	Tongue	negative	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt	Lin et al. [25]
FaDu	Hypopharynx	negative	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt	Eicheler et al. [26]
SAS	Tongue	negative	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt	Soffar et al. [24]
SAT	Oral cavity	negative	wt	wt/wt/wt	wt/wt/wt	wt/wt	Nii et al. [23]

Abbreviation: *wt* wildtype

None of the tumor tissue samples of all 46 patients showed evidence of mutations in the cetuximab-interacting EGFR ectodomain or KRAS/NRAS. In line with previous reports, activating HRAS mutations were found in primary tumor samples of two patients (4.3%) with one clonal (patient no. 1) and one subclonal mutation (patient no. 30), (Table 1).

All 12 HNSCC cell lines that derived from EGFR antibody-naïve patients were unmutated for EGFR, KRAS/NRAS and HRAS (Table 2).

NGS of the cetuximab-interacting EGFR ectodomain and RAS after cetuximab treatment

In 20 patients we obtained peripheral blood for ctDNA analysis during and after combination therapy with Cis⁻ or carboplatin, 5-fluorouracil and cetuximab +/- cetuximab maintenance (liquid biopsy). Overall, about one third of patients acquired activating RAS mutations in the course of cetuximab-based treatment (KRAS: G12S, G13C; NRAS: Q61K, A146P; HRAS: G13R), while no

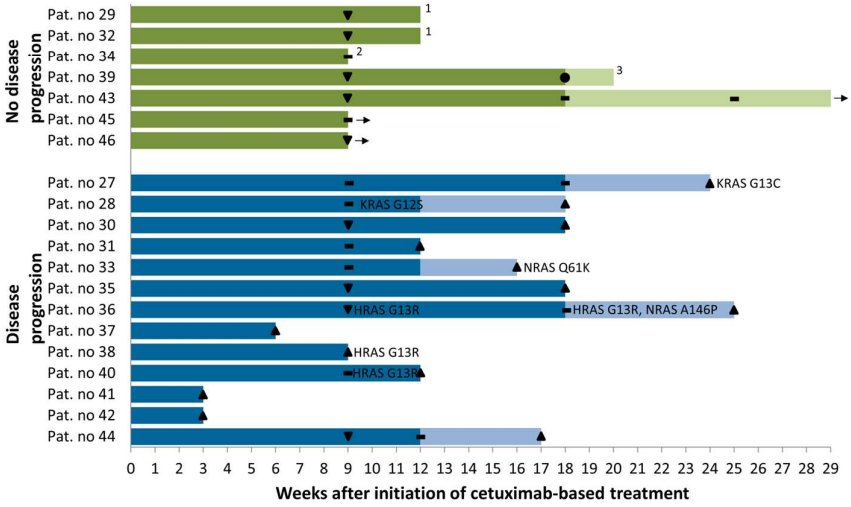

Figure 2: Swimmer plot illustrating treatment, responses and acquired mutations in liquid biopsy cohort of 20 HNSCC patients treated with cetuximab plus chemotherapy. Weeks of combination therapy with cis⁻ or carboplatin, 5-fluorouracil and cetuximab are shown in dark colors, weeks of cetuximab maintenance in light colors. ● Complete response, ▼ partial response, ▬ stable disease, ▲ progressive disease. Activating RAS mutations are mapped at the time of their first appearance. [1]Patients refused further treatment. [2]Patient died of pneumonia. [3]Therapy was stopped because of bleeding complications. → Ongoing treatment.

EGFR ectodomain mutations were recorded (Figure 2). The emergence of activating RAS clones correlated significantly with disease progression in this cohort (Chi-square, $P = 0.032$). While six of 13 patients (46%) with progressive disease during cetuximab-based treatment showed evidence of acquired activating RAS mutations, none of the seven responsive patients (0%) were mutated for any of the RAS genes at any time point (Figure 2). Some of these mutations appeared early during treatment (earliest detection nine weeks after initiation of cetuximab-based treatment) and preceded clinical progression in half of the patients with the maximum time from mutation detection to clinical progression being 16 weeks in our cohort (Figure 2).

DISCUSSION

Cetuximab-based treatment is only effective in a subset of patients with HNSCC [7]. However, little is known so far about the molecular mechanisms underlying clinical resistance and we currently lack appropriate biomarkers that could help in identifying patient subsets that are either likely or unlikely to derive benefit from this EGFR-targeted therapy or from prolonged antibody treatment in a cetuximab maintenance setting.

In this study we focused on potential modifications of the EGFR ectodomain that may interfere with antibody binding and activating mutations of RAS, which are known to confer resistance in metastatic colorectal cancer [10, 19]. While HNSCC tumors are largely negative for RAS mutations at diagnosis [14, 20] and EGFR ectodomain mutations have not been detected by conventional sequencing to date, we reasoned that potential resistance-mediating mutations could be present in rare tumor subclones before treatment (undetectable by conventional sequencing) and would subsequently be amplified under the selective pressure of EGFR-targeted antibody treatment. To be able to detect even minor subclones in a background of cells with unmutated EGFR and RAS, we used state-of-the-art targeted NGS technology for highly sensitive and specific identification of mutations in a heterogeneous tumor [21]. By comparing pre- and post-cetuximab genetic material we aimed at uncovering both primary and acquired resistance-mediating mutations. Utilizing a sequencing depth that would uncover even rare clones, none of the 46 patients included in this study showed evidence for mutations in EGFR exon 12 or KRAS/NRAS exons 2/3/4 at baseline, while two cases were HRAS mutated. About one third of cases acquired RAS mutations in the course of treatment and, interestingly, all of these cases showed progressive disease while receiving the EGFR antibody. This significant correlation suggests for the first time that activating RAS mutations represent a clinically relevant mechanism of acquired resistance in patients treated with cetuximab.

Two major limitations of this study need to be discussed: First, this study does not formally rule out the (unlikely) possibility that the platinum/5-FU treatment (and not the EGFR-targeted antibody) may induce activating RAS mutations in the HNSCC setting. In the colon cancer setting, however, there is no evidence for the induction of activating RAS mutations by chemotherapy, while there is persuasive evidence for their induction by EGFR-targeting antibodies [15]. Since patients treated with either platinum/5-FU or cetuximab alone are rare, this question is very hard to address. The second limitation of our study refers to the fact that baseline mutational profiling was performed on primary diagnosis tumor tissue (instead of tumor tissue at recurrence) in 7/20 patients and baseline liquid biopsies were not performed. Therefore, we cannot rule out acquisition of mutations between primary diagnosis and recurrence in these seven patients. Given the overall very low RAS mutational frequency in EGFR antibody-naïve patients this point may, however, be of minor clinical relevance.

Taken together, our data suggests that i) RAS mutant subclones can only be found in a minority of HNSCC tumor samples at baseline, but emerge in a substantial proportion of patients during cetuximab treatment, ii) these mutant subclones correlate significantly with disease progression, and iii) may be detectable with state-of-the-art sequencing technology before clinical resistance occurs. Prospectively, determination of such clones may help to tailor anti-EGFR strategies warranting an evaluation in larger prospective clinical trials. More specifically, mutational loads should be defined that reliably predict a lack of response to cetuximab.

METHODS - PATIENTS

Between October 2012 and January 2016, the Database of the Clinical Cancer Registry of the University Cancer Center Hamburg was screened for HNSCC patients with cetuximab-based treatment. Informed consent was obtained from a total of 46 patients for the use of their diagnostic material (tumor tissue and - in 20 cases - peripheral blood after initiation of cetuximab treatment) as approved by the institutional review board. HPV-Status was part of the routine diagnostic work-up and included a PCR for HPV-DNA and p16 immunohistochemistry. Patients were considered HPV-positive, if both HPV-DNA of a high-risk HPV type and overexpression of p16 were present. All other combinations were considered HPV-negative. All tumor samples were validated by a pathologist.

All 20 patients with available post-cetuximab peripheral blood samples were treated with a combination of cetuximab weekly (400 mg/m^2 as a loading dose, followed by 250 mg/m^2) and a chemotherapy regimen of cisplatin (100 mg/m^2 on day 1) or carboplatin (AUC 5 on day 1) plus 5-fluorouracil (1000 mg/m^2 on days 1-4) every

three weeks for a maximum of six courses. Subject to their consent, combination therapy was followed by weekly cetuximab maintenance in patients without progressive disease. Peripheral blood samples for isolation of ctDNA were taken at interim staging after three courses of combination therapy and after completion of combination therapy / maintenance (or at progression if applicable).

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and cell culture

All 12 squamos cell carcinoma cell lines derived from patients with head and neck tumors [22-25] were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, USA) containing 10% fetal bovine serum (Merck & Co., Inc., Kenilworth, USA), 4 mM glutamine (Gibco/Life Technologies) and 1% Penicillin Streptomycin (Gibco/Life Technologies) and were identified using a short tandem repeat multiplex assay (Applied Biosystems/Life Technologies). UT-SCC cell lines 5, 8, 14, 15, 29, 42A and 60A were kindly provided by R. Grenman, University of Turku, Finland. The HNSCC p53-negative subline of FaDu (hypopharynx) was obtained from W. Eicheler, University of Dresden, Germany [26], and all other cell lines were kindly provided by M. Baumann, University of Dresden, Germany.

Preparation of genomic DNA from tumor tissue and HNSCC cell lines

Formalin fixed paraffin embedded tumor tissue was deparaffinized by xylene and ethanol. After digestion with proteinase K at 56 °C overnight, genomic DNA was isolated with the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Genomic DNA from EGFR positive cell lines was extracted using NucleoSpin Tissue XS kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Quantity and quality of DNA was evaluated using a Nanodrop spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA).

Isolation of circulating tumor DNA (ctDNA) from blood

Blood samples were centrifuged at 1200 x g for 10 min within two hours after blood draw. ctDNA was isolated from the serum using the QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen).

PCR amplification of EGFR and RAS exons for Illumina targeted next generation sequencing

In two consecutive PCR reactions, EGFR exon 12, KRAS/NRAS exons 2/3/4 and HRAS exons 2/3 were amplified from tumor or ctDNA and adapters for next-generation sequencing (NGS) were attached (schematically shown in Figure 1). The primers for the first reaction annealed with exon-flanking intron regions (dotted lines) and contained Illumina-compatible adapters (yellow) for later hybridization of amplicons to the Illumina flow cell and for sequencing primer annealing. A second PCR reaction was performed to extend the Illumina adapter sequences and to add a 6 or 7 nucleotide barcode (red) allowing to match each sequence during data analysis to a certain patient / cell line and time point. All primers are shown in Supplementary Table S1.

The PCR was performed using Phusion HS II (Thermo Fisher Scientific Inc.). Amplicons were purified after agarose gel electrophoresis using the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel).

Illumina sequencing and data analysis

All amplicons were sequenced with a 500-cycle single indexed (8 nucleotides) paired-end run on a MiSeq (Illumina, San Diego, USA). Overlapping paired reads were merged using the software FLASH (v1.2.6) [27]. The format of the merged reads was subsequently converted to FASTA while non-overlapping reads were excluded from further analysis. Usearch (v6.0.307) [28] was employed to dereplicate and cluster the merged reads. Sequences observed less than 30 times were discarded and the remaining sequences were clustered according to their similarity with reference EGFR and RAS exon sequences (Supplementary Table S2). For each cluster of similar sequences, MAFFT (v7.045b) [29] was used to calculate a multiple sequence alignment.

Statistics

IBM® SPSS® version 22 (IBM, New York, USA) was used for statistical analysis. Contingency tables were calculated and compared using the Pearson Chi-square test. A p-value < 0.05 was considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Adam Grundhoff, Malik Alawi and Daniela Indenbirken for assistance with next-generation sequencing and Christopher Ford for proofreading the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have declared no conflicts of interest.

FUNDING

This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft [BI 1711/1-1 to M.B.]. MB holds a professorship supported by the Hubertus Wald foundation, Hamburg.

Editorial note

This paper has been accepted based in part on peer-review conducted by another journal and the authors' response and revisions as well as expedited peer-review in Oncotarget.

REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2015; 65:5-29.
2. Budach V, Becker ET, Boehmer D, Badakhshi H, Jahn U, Wernecke KD, Stromberger C. Concurrent hyperfractionated accelerated radiotherapy with 5-FU and once weekly cisplatin in locally advanced head and neck cancer. The 10-year results of a prospective phase II trial. Strahlentherapie Onkologie. 2014; 190:250-255.
3. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, Raben D, Baselga J, Spencer SA, Zhu J, Youssoufian H, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. Lancet oncology. 2010; 11:21-28.
4. Forastiere AA, Zhang Q, Weber RS, Maor MH, Goepfert H, Pajak TF, Morrison W, Glisson B, Trotti A, Ridge JA, Thorstad W, Wagner H, Ensley JF et al. Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. Journal of clinical oncology. 2013 31:845-852.
5. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, Mickiewicz E, Winquist E, Gorbounova V, Tjulandin S, Shin DM, Cullen K, Ervin TJ, Murphy BA, Raez LE, Cohen RB et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. The New England journal of medicine. 2007; 357:1705-1715.
6. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, Stewart JS, Jelic S, Betka J, Preiss JH, van den Weyngaert D, Awada A, Cupissol D et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. The New England journal of medicine. 2007; 357:1695-1704.
7. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. The New England journal of medicine. 2008; 359:1116-1127.
8. Vermorken JB, Stohlmacher-Williams J, Davidenko I, Licitra L, Winquist E, Villanueva C, Foa P, Rottey S, Skladowski K, Tahara M, Pai VR, Faivre S, Blajman CR et al. Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial. Lancet oncology. 2013; 14:697-710.
9. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. The New England journal of medicine. 2006; 354:567-578.
10. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. Journal of clinical oncology. 2008; 26:5705-5712.
11. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer research. 2006; 66:3992-3995.
12. Lievre A, Laurent-Puig P. Genetics: Predictive value of KRAS mutations in chemoresistant CRC. Nature reviews clinical oncology. 2009; 6:306-307.
13. Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. Nature reviews clinical oncology. 2010; 7:493-507.
14. Lui VW, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y, Lu Y, Zhang Q, Du Y, Gilbert BR, Freilino M, Sauerwein S, Peyser ND et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. Cancer discovery. 2013; 3:761-769.
15. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, Kinzler KW, Oliner KS, Vogelstein B. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. Nature. 2012; 486:537-540.
16. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. Nature. 2012; 486:532-536.
17. Arena S, Bellosillo B, Siravegna G, Martinez A, Canadas I, Lazzari L, Ferruz N, Russo M, Misale S, Gonzalez I, Iglesias M, Gavilan E, Corti G et al. Emergence of Multiple

EGFR Extracellular Mutations during Cetuximab Treatment in Colorectal Cancer. Clinical cancer research. 2015; 21:2157-2166.

18. Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M, Salido M, Gallen M, Marsters S, Tsai SP, Minoche A, Seshagiri S, Serrano S et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. Nature medicine. 2012; 18:221-223.
19. Braig F, Marz M, Schieferdecker A, Schulte A, Voigt M, Stein A, Grob T, Alawi M, Indenbirken D, Kriegs M, Engel E, Vanhoefer U, Grundhoff A et al. Epidermal growth factor receptor mutation mediates cross-resistance to panitumumab and cetuximab in gastrointestinal cancer. Oncotarget. 2015; 6:12035-12047. doi: 10.18632/oncotarget.3574.
20. Bissada E, Abboud O, Abou Chacra Z, Guertin L, Weng X, Nguyen-Tan PF, Tabet JC, Thibaudeau E, Lambert L, Audet ML, Fortin B, Soulieres D. Prevalence of K-RAS Codons 12 and 13 Mutations in Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Impact on Clinical Outcomes. International journal of otolaryngology. 2013; 2013:848021.
21. Samuel N, Hudson TJ. Translating genomics to the clinic: implications of cancer heterogeneity. Clinical chemistry. 2012; 59:127-137.
22. Lange MJ, Lasiter JC, Misfeldt ML. Toll-like receptors in tonsillar epithelial cells. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2009; 73:613-621.
23. Nii M, Kayada Y, Yoshiga K, Takada K, Okamoto T, Yanagihara K. Suppression of metastasis by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in a newly established human oral squamous cell carcinoma cell line. International journal of oncology. 2000; 16:119-124.
24. Soffar A, Storch K, Aleem E, Cordes N. CDK2 knockdown enhances head and neck cancer cell radiosensitivity. International journal of radiation biology. 2013; 89:523-531.
25. Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, Gollin SM, Whiteside TL, Koch WM, Ferris RL, Lai SY. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. Head & Neck. 2007; 29:163-188.
26. Eicheler W, Zips D, Dorfler A, Grenman R, Baumann M. Splicing mutations in TP53 in human squamous cell carcinoma lines influence immunohistochemical detection. Journal of histochemistry & cytochemistry. 2002; 50:197-204.
27. Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. Bioinformatics. 2011; 27:2957-2963.
28. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics. 2010; 26:2460-2461.
29. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic acids research. 2002; 30:3059-3066.

7 Diskussion

mCRC und HNSCC machen bei Erwachsenen in Deutschland ungefähr 15 % aller Krebsneuerkrankungen aus (19). In der Therapie werden zielgerichtete Therapeutika, wie die therapeutischen Antikörper Cetuximab (mCRC und HNSCC) und Panitumumab (mCRC) seit einigen Jahren eingesetzt. Da primäre und sekundäre Resistenzen gegen diese Therapeutika in beiden Entitäten bislang unzureichend geklärt sind, sollten die molekularen Mechanismen in der hier vorliegenden Arbeit genauer untersucht und um mögliche zusätzliche Mechanismen erweitert werden. Grundlage hierfür war zuerst die Lokalisierung des funktionalen Panitumumab-Epitops auf dem EGFR.

7.1 Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab

Eine Subgruppe neuer zielgerichteter Therapeutika sind therapeutische Antikörper. Diese binden hoch spezifisch an für Tumorzellen überlebenswichtige Strukturen und tragen über Mechanismen wie Apoptoseinduktion, ADCC und CDC zur Vernichtung der Tumorzellen bei. Resistenzen gegen anti-EGFR gerichtete Therapien, durch aktivierende Mutationen in nachgeschalteten Signalkaskadenmolekülen, spielen vor allem beim mCRC eine große Rolle (15,16). Aber auch durch Punktmutationen ausgetauschte Aminosäuren auf der extrazellulären EGFR-Domäne führen zum Bindungsabbruch der therapeutischen Antikörper und somit zur Resistenz. Allgemein ist nur sehr wenig über die Inzidenz solcher Mutationen in verschiedenen Tumorentitäten bekannt.

Um entscheiden zu können, ob bestimmte Mutationen der extrazellulären EGFR-Domäne das Therapieansprechen in Patienten beeinträchtigen, war zuerst die Lokalisation des funktionalen Panitumumab-Epitops und dessen Abgrenzung zum Cetuximab-Epitop nötig. Durch den Einsatz einer *phage display* Bibliothek konnte das Panitumumab-Epitop auf dem EGFR identifiziert und durch einen anschließenden Austausch aller beteiligter Aminosäuren zu Alanin bestätigt werden. Des Weiteren führten Bindungsstudien der therapeutischen Antikörper an insgesamt 30 EGFR-Mutanten zu einem umfangreichen Bild beider funktionaler Epitope.

Die große räumliche Nähe beider Epitope einschließlich Überlappungsbereich wird durch die Ergebnisse von Dechant et al. (94) unterstützt: Kreuzblockade-Assays von Cetuximab und Panitumumab auf EGFR-exprimierenden Tumorzelllinien lassen darauf schließen, dass beide Epitope sehr dicht beisammen liegen. Die Arbeit von Montagut et al. legt jedoch Nahe, dass die Epitope nicht identisch sind (12): Die EGFR-Mutation S492R führt *in vivo* nur zur Resistenz gegen Cetuximab, nicht jedoch Panitumumab. Freeman et al. (91) definierte einige für die Panitumumab-Bindung relevante EGFR-Positionen (P349, D355, F412 und I438), von denen P349 und D355 von uns bestätigt wurden. Da in unseren Analysen die Mutationen F412A und I438A nur zu einer Bindungsreduktion von 30 – 40 % führten, können diese beiden Positionen als weniger kritisch für die Panitumumab-Bindung eingestuft werden. Die Kristallstruktur von Cetuximab in Kombination mit dem EGFR zeigte die großflächige Ausdehnung des Epitops (89), was durch die Identifikation funktional wichtiger Aminosäuren bestätigt wurde (12,89,90). Die anscheinend ebenfalls zum Cetuximab-Epitop gehörenden Positionen F352, D355, P387 konnten durch einen Austausch gegen Alanin bestätigt werden. Zusammenfassend führen diese Daten zur Abgrenzung des von uns identifizierten Panitumumab-Epitops zum Cetuximab-Epitop, was ein wichtiger Grundstein für therapeutische Entscheidungen in Bezug auf Patienten mit resistenzvermittelnden EGFR-Mutationen ist.

Die hier durchgeführten Analysen wurden alle *in vitro* durchgeführt. Die Translation *in vivo* kann jedoch nicht direkt abgeleitet werden. Auch wenn einzelne Positionen *in vitro* als kritisch für die Bindung der Antikörper eingestuft wurden, so könnte der Austausch zu anderen Aminosäureresten *in vivo* ggf. keinen Einfluss auf die Bindung haben. Um eine zuverlässige Aussage über das Therapieansprechen in Bezug auf einzelne Mutation machen zu können, müsste dies im Tiermodell überprüft werden. Ebenso fehlt ein zuverlässiger Schwellenwert des Bindungsabbruchs *in vitro*. Eine zuverlässige Aussage, ab welchem Grad des *in vitro* gemessenen Bindungsabbruchs auch eine Resistenz *in vivo* folgt, kann nicht getroffen werden. Dies wird durch die *in vitro* Analyse der Mutante S492R bestätigt. Hier führte ein *in vitro* gemessener Panitumumab-Bindungsabbruch von 70 % trotzdem zum Ansprechen des Patienten auf die Panitumumab-Therapie (12). Daher ist es fraglich, ob ein solcher Schwellenwert überhaupt pauschal bestimmt werden kann, oder ob dieser für jede resistenzvermittelnde Mutation einzeln bestimmt werden müsste.

7.2 Epidermal growth factor receptor mutation mediates cross-resistance to panitumumab and cetuximab in gastrointestinal cancer

Am Beispiel gastrointestinaler Tumore wurde *in vivo* nach Antikörpertherapie-induzierten Epitop-verändernden Mutationen gesucht, um die verschiedenen resistenzvermittelnden Mechanismen näher zur charakterisieren. Auf der Basis von Tumorproben oder ctDNA wurden *KRAS* und *NRAS*, sowie die extrazelluläre Domäne des EGFR per NGS analysiert. In zwei mit Panitumumab behandelten Patienten wurde die EGFR-Mutation G465R beschrieben und die Funktionalität der Mutation durch *in vitro*-Analysen bestätigt. Da G465 im Überlappungsbereich der Cetuximab- und Panitumumab-Epitope liegt, führt das Einbringen des positiv geladenen Arginins *in vitro* zu einer Kreuzresistenz gegen beide therapeutischen Antikörper. Aufgrund der geringen Patientenzahl, bei der die Mutation gefunden wurde, ist es nicht möglich den Mutationsstatus mit dem klinischen Verlauf der Patienten zu korrelieren. Die Mutation wurde jedoch bei Patienten mit stabilem Krankheitszustand und partiellem Ansprechen auf Chemotherapie mit Panitumumab identifiziert, noch bevor diese klinisch eine Resistenz gegen Panitumumab zeigten. Dies verdeutlicht die Sensitivität der NGS-Analyse, welche einen großen Vorteil gegenüber konventionellen Sequenzierungsverfahren bietet (92,95-98). Zusätzlich zur neu gefundenen Mutation im *EGFR* Exon 12 konnten in etwa einem Drittel der Patienten durch ctDNA-Analysen *RAS*-Mutationen gefunden werden, was das Auftreten von *RAS*-Mutationen unter anti-EGFR Therapie in bereits veröffentlichten Arbeiten bestätigt (15,16). Im Vergleich dazu wurden in Tumorproben nach Antikörpertherapie keine *RAS*-Mutationen gefunden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Patienten, von denen die Tumorproben analysiert wurden, in ihrem Krankheitsverlauf nicht so weit fortgeschritten waren, wie die Patienten von denen ctDNA analysiert wurde. Des Weiteren zeigten unsere Daten, dass die Analyse von ctDNA für die Identifikation resistenzvermittelnder Subklone geeigneter ist als die Analyse von Tumorbiopsien. Die genetischen Profile von Primärtumoren und Metastasen stimmen, durch die intrinsische molekulare Heterogenität der Gewebe, nicht immer überein (99). Zudem kann sich das genetische Profil der Tumore unter Therapie verändern (17). Die Analyse von ctDNA zeigt somit ein vollständigeres Profil der molekularen Diversität der aktuellen Tumorlast eines Patienten. Die S492R- und *RAS*-Mutationsfrequenz in unseren Daten liegt mit 0 %, bzw. 30 % unter den Werten anderer Analysen (12,16). Dies lässt sich jedoch mit den unterschiedlichen Patientenkohorten, die für die jeweiligen Studien analysiert wurden, erklären: Der Großteil der in unsere Kohorte eingeschlossenen Patienten wurde als nicht resistent gegen EGFR-gerichtete Therapeutika angesehen, wobei andere Analysen zum gleichen Thema an bereits resistenten

Patientenkohorten durchgeführt wurden. Die Vermutung, dass unter Antikörpertherapie noch andere resistenzvermittelnde Punktmutationen der extrazellulären EGFR-Domäne auftreten können, wurde von Arena et al. an einer Kohorte Cetuximab-resistenter Patienten und Zelllinien gezeigt (13).

Wie bereits für primär auftretende *RAS*-Mutationen in mCRC-Patienten geschehen (71), muss die Vielfalt und Frequenz resistenzvermittelnder aktivierender *EGFR*-Mutationen in klinischen Studien an genauer definierten Patientenkohorten validiert werden. Des Weiteren muss erst noch geklärt werden, in wieweit der Einsatz von EGFR-gerichteten therapeutischen Antikörpern bei Patienten mit resistenzvermittelnden *EGFR*-Mutationen weiterhin sinnvoll ist. Es wurde bereits gezeigt, dass Tumore selbst heterogene Gewebe sind (100). Daher könnte der weitere Einsatz therapeutischer Antikörper, trotz vorhandener resistenter Subklone, zur Vernichtung des mutationsfreien Tumorgewebes führen.

7.3 Liquid biopsy monitoring uncovers acquired RAS-mediated resistance to cetuximab in a substantial proportion of patients with head and neck squamous cell carcinoma.

Beim HNSCC, im Gegensatz zum mCRC, kann der Prozentsatz an primär resistenten Patienten nicht durch aktivierende *RAS*-Mutationen erklärt werden (50,101). Trotz einer verbesserten Ansprechrate auf Cetuximab in Kombination mit Chemotherapie liegt das mittlere OS bei nur 10.1 Monaten (7). Aus diesem Grund ist es äußerst wichtig die Mechanismen aufzuklären, die hier zur Ausprägung von Resistenzen führen. In der von uns durchgeführten Studie wurde Tumorgewebe und ctDNA von HNSCC-Patienten, welche mit Cetuximab behandelt wurden, auf aktivierende Mutationen in den *RAS*-Genen und *EGFR* Exon 12 untersucht. Diese Genabschnitte sind im mCRC bereits als *hotspots* resistenzvermittelnder Mutationen gegen therapeutische anti-EGFR Antikörper bekannt (14,102). In den vor Therapie entnommenen Tumorproben der 46 Patienten konnten weder Mutationen im *EGFR* Exon 12, noch in den *KRAS*- und *NRAS*-Genen gefunden werden. Nur 2 Patienten waren *HRAS* mutiert, was die aus anderen Arbeiten bekannten geringen Mutationsraten von Primärtumoren bestätigte (49,50). Ungefähr 30 % aller untersuchten Patienten entwickelte *RAS*-Mutationen im Laufe ihrer Cetuximab-haltigen Therapie. Alle diese Patienten wurden während der Therapie progredient. Durch die Korrelation zwischen erworbenen aktivierenden *RAS*-Mutationen und klinischer Progredienz unter Cetuximab-Therapie wurde hier zum ersten Mal gezeigt, dass aktivierende *RAS*-Mutationen ein klinisch relevanter Mechanismus sekundärer Resistenzen bei HNSCC-Patienten unter Cetuximab-Therapie sind.

Ein wichtiger Punkt, der in unserer Studie nicht geklärt werden konnte, war die Frage, ob die Chemotherapie und nicht die Cetuximab-Gabe das Auswachsen von Tumorzellen mit aktivierenden *RAS*-Mutationen fördert. Da HNSCC-Patienten jedoch nur in Ausnahmefällen eine reine Chemotherapie oder Cetuximab-Monotherapie erhalten, kann diese Frage nur schwer beantwortet werden. Beim mCRC jedoch gibt es keine Anzeichen dafür, dass die reine Chemotherapie zur Induktion aktivierender *RAS*-Mutationen führt, wo hingegen es starke Indizien für eine Induktion durch zielgerichtete anti-EGFR-Therapien gibt (15). Eine zweite Restriktion unserer Arbeit ist, dass die Tumorproben von 7 der 20 Patienten, von denen ebenfalls ctDNA analysiert wurde, Primärmaterial war und nicht Gewebe des rezidivierten Tumors. Daher kann die Entwicklung sekundärer Resistenzen zwischen der primären Diagnostik und dem Rezidiv nicht ausgeschlossen werden. Durch die jedoch allgemein geringe Mutationsrate in Patienten vor Cetuximab-Therapie, sollte dieser Punkt klinisch wenig relevant

sein. Der klinische Fokus sollte eher auf die Ermittlung resistenzvermittelnder *RAS*-Subklone unter Cetuximab-Therapie gerichtet werden, um die Therapiestrategie je nach individuellem Mutationsprofil anpassen zu können. Dies, sowie die Definition eines Mutationsschwellenwerts, welcher zuverlässig eine Resistenz auf Cetuximab vorhersagt, sollte an größeren prospektiven Patientenkollektiven im Zuge klinischer Studien untersucht werden.

7.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit, dass über die bereits bekannte Punktmutation S492R hinaus noch weitere Punktmutationen in den Epitopen beider zielgerichteter anti-EGFR Antiköper Cetuximab und Panitumumab, zur Therapieresistenz bei Patienten mit mCRC führen können. Die Bedeutung der hier gefundenen Mutation G465R wird dadurch unterstrichen, dass sie in einer weiteren Arbeit, welche sich mit der Resistenzentwicklung gegen Cetuximab beim mCRC befasst, ebenfalls detektiert wurde (13). Im Gegensatz dazu konnten in der in dieser Arbeit analysierten HNSCC-Patientenkohorte keinerlei resistenzvermittelnde extrazelluläre EGFR-Mutationen identifiziert werden. Diese Art von Resistenzmechanismus scheint bei HNSCC-Patienten somit nicht von Bedeutung zu sein.

Wie bereits in vorangegangenen Arbeiten konnten in dieser Arbeit aktivierende *RAS*-Mutationen bei HNSCC-und mCRC-Patienten vor und unter Therapie mit zielgerichteten anti-EGFR Antikörpern nachgewiesen werden (15,16,49,50). Von großer Bedeutung war hierbei, dass durch die hoch sensitive Methode der *liquid biopsy* solche Punktmutationen in der ctDNA der Patienten nachgewiesen werden konnten, noch bevor diese klinisch eine Resistenz gegen den verabreichten therapeutischen anti-EGFR Antikörper zeigten.

7.5 Ausblick

Therapien mit zielgerichteten anti-EGFR Antikörpern sind äußerst vielversprechend. Allerdings sich sie sehr kostenintensiv und können bei einer Behandlung Nebenwirkungen verursachen. Um Patienten mit primären Resistenzen diese Nebenwirkungen *a priori* zu ersparen oder bei sekundär auftretenden Resistenzen die Therapie frühzeitig abbrechen zu können, ist die Identifikation und Evaluierung prognostischer und prädiktiver molekulargenetischer Biomarker unbedingt nötig. Ein Beispiel hierfür ist die *RAS*-Diagnostik bei mCRC-Patienten: Nur Patienten mit *RAS* Wildtyp werden zu einer Panitumumab- oder Cetuximab-haltigen Therapie zugelassen. Erste Ansätze in dieser Richtung, basierend auf NSG-Analysen von Tumorproben, zeigten jedoch bei Patienten mit HNSCC ein sehr heterogenes Bild an Mutationen in den dort analysierten Genen (50,69,103). Darauf aufbauende Studien mit einheitlicheren Patientensubkohorten müssen durchgeführt werden, um die diversen differenzierten Mutationsprofile der unterschiedlichen Kohorten als prognostische Biomarker evaluieren zu können.

Zusätzlich zur Analyse weiterer primärer und sekundärer Resistenzmechanismen gegen therapeutische Antikörper sollte daran gearbeitet werden, die Resistenzen durch andere Therapeutika oder Therapiestrategien zu überwinden. Eine Möglichkeit ist der Einsatz von zielgerichteten anti-EGFR Antiköper-Kombinationen bei Patienten mit resistenzvermittelnden extrazellulären EGFR-Mutationen, welche die EGF-Bindung unterbinden (104,105). Alternativ zeigten mCRC-Patienten mit sekundären, unter anti-EGFR Antikörpertherapie entwickelten Resistenzen ein erneutes Ansprechen auf dieselben Therapeutika, nachdem die Gabe eine gewisse Zeit lang unterbrochen wurde (17,106). Aktuell erfolgt eine Studie, in der mCRC-Patienten mit aktivierenden *RAS*- oder *BRAF*-Mutationen mit einer Kombination aus

Panitumumab und MEK-Inhibitoren behandelt werden, um parallel mutierte und unmutierte Tumorzellen gleichermaßen zu bekämpfen (107).

Sind EGFR-alternative Signalwege, wie z.B. der PI3K-Pathway durch PIK3CA-Mutationen konstitutiv aktiviert, so könnte dieser durch spezifische PI3K-Pathway-Inhibitoren blockiert werden (50,108).

Doch auch die bisher eingesetzten Antikörper Cetuximab und Panitumumab können weiter optimiert werden, um zu einer Effizienzsteigerung zu führen: Modifizierte Antikörper, wie die Cetuximab-Variante CetuGEX™, führen durch ihr verändertes Glykosylierungsmuster zu erhöhter ADCC (109,110). Durch diese Neuerungen können Tumorzellen noch effektiver bekämpft werden, da es über die Modifizierung des Antikörpers zu einer Bekämpfung des Tumors über mehrere, parallel aktivierte Zytotoxizitäts-Mechanismen kommt. Affinitätsoptimierte anti-EGFR Antikörper (111) sollten ebenfalls weiter evaluiert werden. Zum einen könnte so die Dosis der anti-EGFR Antikörper verringert werden, was die damit verbundenen Nebenwirkungen ebenfalls reduzieren würde. Der Einsatz anti-EGFR-spezifischer mono- oder biparatopische Nanobodies mit verbesserter Gewebspenetration könnte dazu führen, auch schwer zugängliche Tumorzellen zu erreichen und durch die Rekrutierung von Effektorzellen einen weiteren spezifischen Zytotoxizitäts-Effekt zur Tumorbekämpfung zu nutzen (112,113).

Neue diagnostische Verfahren, wie die *liquid biopsy* in Kombination mit NGS, werden in der Routinediagnostik dringend benötigt, um diagnostische und prognostischer DNA-basierte Biomarker noch sensitiver nachweisen zu können. So kann die Tumorfrüherkennung weiter verbessert und unter Therapie auftretende minimale, resistente Tumorsubpopulation direkt therapiebegleitend nachgewiesen werden. Die Zuverlässigkeit der Methode muss jedoch noch weiter verbessert werden, bevor die Methode in der Routinediagnostik eingesetzt werden kann.

Auf Grundlage der durch diese Arbeit erworbenen Erkenntnisse laufen in der Arbeitsgruppe bereits weiterführende Studien im Bereich der primären HNSCC-Resistenzmechanismen gegen Cetuximab und der Überwindung von Resistenzmechanismen gegen die derzeit beim mCRC und HNSCC zugelassenen therapeutischen Antikörper. Es ist zu erwarten, dass durch diese und zukünftige Studien, weitere wichtige Erkenntnisse für die Tumortherapie erlangt werden können.

8 Literaturliste

1. Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. Endocrine-related cancer 2001;8(1):3-9.
2. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. Expert opinion on therapeutic targets 2012;16(1):15-31.
3. Bazley LA, Gullick WJ. The epidermal growth factor receptor family. Endocrine-related cancer 2005;12 Suppl 1:S17-27.
4. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. Endocrine-related cancer 2004;11(4):689-708.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011;144(5):646-74.
6. 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. The New England journal of medicine 2006;354(6):567-78.
7. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. The New England journal of medicine 2008;359(11):1116-27.
8. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. The New England journal of medicine 2009;360(14):1408-17.
9. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2009;27(5):663-71.
10. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2010;28(31):4697-705.
11. Windsor AC, Cohen R, Jiao LR, Stebbing J. Cetuximab in the first-line therapy of metastatic colorectal carcinoma: not so CRYSTAL clear. Future oncology (London, England) 2008;4(6):741-4.
12. Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M, et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. Nature medicine 2012;18(2):221-3.
13. Arena S, Bellosillo B, Siravegna G, Martinez A, Canadas I, Lazzari L, et al. Emergence of Multiple EGFR Extracellular Mutations during Cetuximab Treatment in Colorectal Cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2015;21(9):2157-66.
14. Braig F, Marz M, Schieferdecker A, Schulte A, Voigt M, Stein A, et al. Epidermal growth factor receptor mutation mediates cross-resistance to panitumumab and cetuximab in gastrointestinal cancer. Oncotarget 2015;6(14):12035-47.
15. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. Nature 2012;486(7404):537-40.
16. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. Nature 2012;486(7404):532-6.

17. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. Nature medicine 2015;21(7):827.
18. Todesursachen in Deutschland. In: Bundesamt S, editor. Volume Fachserie 12 Reihe 42016.
19. Krebs in Deutschland 2011/2012. In: Bundes Gd, editor. Volume 10. Ausgabe: Robert Koch Institut; 2015. p 18-25.
20. McGuire S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. Advances in nutrition (Bethesda, Md) 2016;7(2):418-9.
21. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100(1):57-70.
22. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. International journal of radiation oncology, biology, physics 2004;59(2 Suppl):21-6.
23. Coppede F, Lopomo A, Spisni R, Migliore L. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. World journal of gastroenterology 2014;20(4):943-56.
24. Yiu AJ, Yiu CY. Biomarkers in Colorectal Cancer. Anticancer research 2016;36(3):1093-102.
25. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990;61(5):759-67.
26. Goel A, Boland CR. Epigenetics of colorectal cancer. Gastroenterology 2012;143(6):1442-60.e1.
27. Preiß J H, Claßen, Dornoff W. Taschenbuch Onkologie. Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2016/17. W. Zuckschwerdt Verlag München2016.
28. Mao L, Hong WK, Papadimitrakopoulou VA. Focus on head and neck cancer. Cancer cell 2004;5(4):311-6.
29. Mydlarz WK, Hennessey PT, Califano JA. Advances and Perspectives in the Molecular Diagnosis of Head and Neck Cancer. Expert opinion on medical diagnostics 2010;4(1):53-65.
30. Schaaij-Visser TB, Brakenhoff RH, Leemans CR, Heck AJ, Slijper M. Protein biomarker discovery for head and neck cancer. Journal of proteomics 2010;73(10):1790-803.
31. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. Journal of the National Cancer Institute 2008;100(4):261-9.
32. Rothenberg SM, Ellisen LW. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. J Clin Invest 2012;122(6):1951-7.
33. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2009;15(22):6758-62.
34. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clinical science (London, England : 1979) 2006;110(5):525-41.
35. Yano S, Kondo K, Yamaguchi M, Richmond G, Hutchison M, Wakeling A, et al. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. Anticancer research 2003;23(5a):3639-50.
36. Maiti GP, Mondal P, Mukherjee N, Ghosh A, Ghosh S, Dey S, et al. Overexpression of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma is associated with inactivation of SH3GL2 and CDC25A genes. PloS one 2013;8(5):e63440.
37. Krasinskas AM. EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. Pathology research international 2011;2011:932932.
38. Kovacs E, Zorn JA, Huang Y, Barros T, Kuriyan J. A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor. Annu Rev Biochem 2015;84:739-64.

39. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. Molecular systems biology 2005;1:2005.0010.
40. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. Experimental cell research 2003;284(1):31-53.
41. Batzer AG, Blaikie P, Nelson K, Schlessinger J, Margolis B. The phosphotyrosine interaction domain of Shc binds an LXNPXY motif on the epidermal growth factor receptor. Molecular and cellular biology 1995;15(8):4403-9.
42. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. International journal of radiation oncology, biology, physics 2004;58(3):903-13.
43. Marais R, Wynne J, Treisman R. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. Cell 1993;73(2):381-93.
44. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. Journal of cell science 2004;117(Pt 25):5965-73.
45. Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, Cavallaro E, Polo S, Di Fiore PP. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. Developmental cell 2008;15(2):209-19.
46. Belli C, Anand S. Malignant Mesothelioma. InTech; 2012.
47. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. Cancer research 2012;72(10):2457-67.
48. Leto SM, Trusolino L. Primary and acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer: impact on future treatment strategies. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany) 2014;92(7):709-22.
49. Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. Nature reviews Clinical oncology 2010;7(9):493-507.
50. Lui VW, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y, et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. Cancer discovery 2013;3(7):761-9.
51. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. Apoptosis : an international journal on programmed cell death 2004;9(6):667-76.
52. Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. Cellular signalling 2006;18(12):2089-97.
53. Ang KK, Zhang Q, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Sherman EJ, Weber RS, et al. Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2014;32(27):2940-50.
54. Nakata E, Hunter N, Mason K, Fan Z, Ang KK, Milas L. C225 antiepidermal growth factor receptor antibody enhances the efficacy of docetaxel chemoradiotherapy. International journal of radiation oncology, biology, physics 2004;59(4):1163-73.
55. Price TJ, Peeters M, Kim TW, Li J, Cascinu S, Ruff P, et al. Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. The Lancet Oncology 2014;15(6):569-79.
56. Psyrri A, Seiwert TY, Jimeno A. Molecular pathways in head and neck cancer: EGFR, PI3K, and more. American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO American Society of Clinical Oncology Meeting 2013:246-55.
57. Giralt J, Trigo J, Nuyts S, Ozsahin M, Skladowski K, Hatoum G, et al. Panitumumab plus radiotherapy versus chemoradiotherapy in patients with unresected, locally advanced

squamous-cell carcinoma of the head and neck (CONCERT-2): a randomised, controlled, open-label phase 2 trial. The Lancet Oncology 2015;16(2):221-32.
58. Mesia R, Henke M, Fortin A, Minn H, Yunes Ancona AC, Cmelak A, et al. Chemoradiotherapy with or without panitumumab in patients with unresected, locally advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck (CONCERT-1): a randomised, controlled, open-label phase 2 trial. The Lancet Oncology 2015;16(2):208-20.
59. Vermorken JB, Stohlmacher-Williams J, Davidenko I, Licitra L, Winquist E, Villanueva C, et al. Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial. The Lancet Oncology 2013;14(8):697-710.
60. Amgen. Gebrauchsinformation: Information für Anwender Vectibix 20 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung. 2014.
61. Merck. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels Erbitux. 2014.
62. Bersanelli M, Minari R, Bordi P, Gnetti L, Bozzetti C, Squadrilli A, et al. L718Q mutation as new mechanism of acquired resistance to AZD9291 in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer 2016.
63. Jia Y, Yun CH, Park E, Ercan D, Manuia M, Juarez J, et al. Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors. Nature 2016;534(7605):129-32.
64. Stewart JS, Cohen EE, Licitra L, Van Herpen CM, Khorprasert C, Soulieres D, et al. Phase III study of gefitinib compared with intravenous methotrexate for recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck [corrected]. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2009;27(11):1864-71.
65. Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2006;12(17):5064-73.
66. Szabo B, Nelhubel GA, Karpati A, Kenessey I, Jori B, Szekely C, et al. Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. Oral oncology 2011;47(6):487-96.
67. Liu L, Backlund LM, Nilsson BR, Grander D, Ichimura K, Goike HM, et al. Clinical significance of EGFR amplification and the aberrant EGFRvIII transcript in conventionally treated astrocytic gliomas. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany) 2005;83(11):917-26.
68. Azuma M, Danenberg KD, Iqbal S, El-Khoueiry A, Zhang W, Yang D, et al. Epidermal growth factor receptor and epidermal growth factor receptor variant III gene expression in metastatic colorectal cancer. Clinical colorectal cancer 2006;6(3):214-8.
69. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. Science (New York, NY) 2011;333(6046):1157-60.
70. Feldman R, Gatalica Z, Knezetic J, Reddy S, Nathan CA, Javadi N, et al. Molecular profiling of head and neck squamous cell carcinoma. Head & neck 2016;38 Suppl 1:E1625-38.
71. Sridharan M, Hubbard JM, Grothey A. Colorectal cancer: how emerging molecular understanding affects treatment decisions. Oncology (Williston Park, NY) 2014;28(2):110-8.
72. Knickelbein K, Zhang L. Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer. Genes & Diseases 2015;2(1):4-12.
73. Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. Molecular cancer therapeutics 2011;10(3):385-94.
74. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. Journal of translational medicine 2012;10:85.

75. Rebersek M, Boc M, Cerkovnik P, Benedik J, Hlebanja Z, Volk N, et al. Efficacy of first-line systemic treatment in correlation with BRAF V600E and different KRAS mutations in metastatic colorectal cancer - a single institution retrospective analysis. Radiology and oncology 2011;45(4):285-91.
76. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. British journal of cancer 2009;101(4):715-21.
77. Saridaki Z, Tzardi M, Sfakianaki M, Papadaki C, Voutsina A, Kalykaki A, et al. BRAFV600E mutation analysis in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) in daily clinical practice: correlations with clinical characteristics, and its impact on patients' outcome. PloS one 2013;8(12):e84604.
78. Weber A, Langhanki L, Sommerer F, Markwarth A, Wittekind C, Tannapfel A. Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oncogene 2003;22(30):4757-9.
79. Bruckman KC, Schonleben F, Qiu W, Woo VL, Su GH. Mutational analyses of the BRAF, KRAS, and PIK3CA genes in oral squamous cell carcinoma. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics 2010;110(5):632-7.
80. Atreya CE, Corcoran RB, Kopetz S. Expanded RAS: refining the patient population. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2015;33(7):682-5.
81. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales 1948;142(3-4):241-3.
82. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2014;32(6):579-86.
83. Millner LM, Strotman LN. The Future of Precision Medicine in Oncology. Clinics in laboratory medicine 2016;36(3):557-73.
84. Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists 2011;32(4):177-95.
85. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature 2008;456(7218):53-9.
86. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. The New England journal of medicine 2004;351(4):337-45.
87. Robert F, Ezekiel MP, Spencer SA, Meredith RF, Bonner JA, Khazaeli MB, et al. Phase I study of anti--epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2001;19(13):3234-43.
88. Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG. Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. Critical reviews in oncology/hematology 2001;38(1):17-23.
89. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. Cancer cell 2005;7(4):301-11.
90. Chao G, Cochran JR, Wittrup KD. Fine epitope mapping of anti-epidermal growth factor receptor antibodies through random mutagenesis and yeast surface display. Journal of molecular biology 2004;342(2):539-50.

91. D. Freeman JS, R. Bass, K. Jung, S. Ogbagabriel, G. Elliott and R. Radinsky. Panitumumab and cetuximab epitope mapping and in vitro activity Journal of Clinical Oncology 2008;26(15S).
92. Misale S, Arena S, Lamba S, Siravegna G, Lallo A, Hobor S, et al. Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. Science translational medicine 2014;6(224):224ra26.
93. Voigt M, Braig F, Gothel M, Schulte A, Lamszus K, Bokemeyer C, et al. Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab. Neoplasia 2012;14(11):1023-31.
94. Dechant M, Weisner W, Berger S, Peipp M, Beyer T, Schneider-Merck T, et al. Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies. Cancer research 2008;68(13):4998-5003.
95. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Science translational medicine 2014;6(224):224ra24.
96. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. Nature 2013;497(7447):108-12.
97. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. Nature medicine 2008;14(9):985-90.
98. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, Kumagai T, Okuyama T, Okami J, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2011;17(24):7808-15.
99. Tan IB, Malik S, Ramnarayanan K, McPherson JR, Ho DL, Suzuki Y, et al. High-depth sequencing of over 750 genes supports linear progression of primary tumors and metastases in most patients with liver-limited metastatic colorectal cancer. Genome biology 2015;16:32.
100. Heppner GH. Tumor heterogeneity. Cancer research 1984;44(6):2259-65.
101. Bissada E, Abboud O, Abou Chacra Z, Guertin L, Weng X, Nguyen-Tan PF, et al. Prevalence of K-RAS Codons 12 and 13 Mutations in Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Impact on Clinical Outcomes. International journal of otolaryngology 2013;2013:848021.
102. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2008;26(35):5705-12.
103. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. Nature 2015;517(7536):576-82.
104. Arena S, Siravegna G, Mussolin B, Kearns JD, Wolf BB, Misale S, et al. MM-151 overcomes acquired resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancers harboring EGFR extracellular domain mutations. Science translational medicine 2016;8(324):324ra14.
105. Dienstmann R, De Dosso S, Felip E, Tabernero J. Drug development to overcome resistance to EGFR inhibitors in lung and colorectal cancer. Mol Oncol 2012;6(1):15-26.
106. Santini D, Vincenzi B, Addeo R, Garufi C, Masi G, Scartozzi M, et al. Cetuximab rechallenge in metastatic colorectal cancer patients: how to come away from acquired resistance? Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 2012;23(9):2313-8.
107. Schirripa M, Lenz HJ. Colorectal cancer: Overcoming resistance to anti-EGFR therapy - where do we stand? Nature reviews Gastroenterology & hepatology 2016;13(5):258-9.

108. Hammerman PS, Hayes DN, Grandis JR. Therapeutic insights from genomic studies of head and neck squamous cell carcinomas. Cancer discovery 2015;5(3):239-44.
109. Derer S, Cossham M, Rosner T, Kellner C, Beurskens FJ, Schwanbeck R, et al. A Complement-Optimized EGFR Antibody Improves Cytotoxic Functions of Polymorphonuclear Cells against Tumor Cells. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 2015;195(10):5077-87.
110. Lohse S, Meyer S, Meulenbroek LA, Jansen JH, Nederend M, Kretschmer A, et al. An Anti-EGFR IgA That Displays Improved Pharmacokinetics and Myeloid Effector Cell Engagement In Vivo. Cancer research 2016;76(2):403-17.
111. Lippow SM, Wittrup KD, Tidor B. Computational design of antibody-affinity improvement beyond in vivo maturation. Nature biotechnology 2007;25(10):1171-6.
112. Roovers RC, Laeremans T, Huang L, De Taeye S, Verkleij AJ, Revets H, et al. Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EFGR Nanobodies. Cancer immunology, immunotherapy : CII 2007;56(3):303-17.
113. Roovers RC, Vosjan MJ, Laeremans T, el Khoulati R, de Bruin RC, Ferguson KM, et al. A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. International journal of cancer Journal international du cancer 2011;129(8):2013-24.

9 Anhang

9.1 Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS

CAS-RN	Stoffname	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
1239-45-8	Ethidiumbromid	Gesundheitsgefahr, akute Toxizität	302-330-341	260-281-284-310
79-06-1	Acrylamid	Gesundheitsgefahr, akute Toxizität	301-312-332-315-317-319-340-350-361f-372	201-280-302+352-304+340-305+351+338-308+310
67-66-3	Chlorophorm	Gesundheitsgefahr, akute Toxizität	351-361d-331-302-372-319-315	302+352-314

10 Danksagung

Wer mich kennt, der kennt auch meine Liebe zu Listen und Bandwurmsätze. Daher, in diesem Sinne, ein aufgelistetes, z.T. verschachteltes Dankeschön an alle, die mich durch meine Promotionszeit getragen haben:

- Mascha! Dafür, dass du dich auf mich eingelassen hast und mir die Chance gabst, in deiner Arbeitsgruppe diese Arbeit anzufertigen (auch wenn es die Stelle in der Form zu Anfang gar nicht gab). Für alle interessanten Fragestellungen und fruchtbaren Diskussionen, an denen ich über die Jahre wachsen durfte und die großartige Führung durch all den Daten- und Projektdschungel hindurch. Für deine große Hilfe und Unterstützung bei allen Hindernissen, die es im Laufe der Jahre zu überwinden gab. Ich weiß, ich hab es dir oft nicht einfach gemacht.
- Die tragenden Pfeiler meiner täglichen Arbeit: Anna, Aneta, Anita. Für eure Freundschaft und Unterstützung, sowie alle hilfreichen Diskussionen und Ratschläge. Für die ansteckende Freude und Begeisterung, die ihr an den Tag legt und die mich mitgerissen und getragen haben. Für jeden zusätzlichen Meter, den ihr immer und ohne Frage bereit wart für mich und mit mir zu gehen. Für die kleinen und großen Aufmunterungen, die ihr mir täglich entgegengebracht habt, oftmals ohne es selbst zu merken.
- Alle anderen AG Binder-Mitarbeiter und FACS-Damen, die mich im Laufe der Jahre mit Rat und sehr viel Tat unterstützt haben. Ich habe von und mit euch so vieles gelernt, das weit über das praktische und theoretische Laborleben hinausgeht.
- Meinen Kooperationspartnern Malte, Konstantin, Alex und Toffi die im Laufe der Jahre zu Freunden geworden sind und deren Telefonnummern ich immer noch auswendig kenne. Vielen Dank für die große Unterstützung in Wort, Tat und Material. Eure Hilfe kann nicht in Gummibärchen aufgewogen werden.
- Allen weitern Kooperationspartnern nah und fern. Solch große Unterstützung bei all den spannenden Fragestellungen war und ist immer noch grandios!
- Allen Mitarbeitern aller anderen Arbeitsgruppen im 4. Stock des Campus Forschung und allen früher dort ansässigen und bereits weitergereisten. Für die ganze schnelle und unkomplizierte Hilfe und jedes Lächeln auf dem Flur!
- Meinen Familien und meinen Freunden, die in den letzten Jahren sicher gern mehr von mir gesehen hätten. Für das Verständnis und die Toleranz, die ihr mir immer entgegengebracht habt, wenn's abends im Labor doch mal wieder später wurde. Für alle Treffen, egal ob in Hamburg, Deutschland oder weltweit, bei denen ich abschalten und Kraft tanken konnte. Für alle Care-Pakete, Telefonate, Karten und E-Mails – ich hab mich über jede einzelne sehr gefreut!
- Torsten… für deine Liebe, Kraft, Geduld, Ruhe und Nachsicht, die mich geformt haben. Für die weite Wegstrecke, die du jedes Mal auf dich genommen hast, um bei mir zu sein. Deine ständige Unterstützung ist unglaublich. Danke dass du es trotz allem immer noch mit mir aushältst ;-).

11 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.