

Artykuły przeglądowe • Review articles**Teoretyczne podstawy molekularnego leczenia celowanego w onkologii**Paweł Różanowski¹, Tomasz Kos², Grzegorz Zając³, Janusz Pawłęga¹

Dotychczas stosowane leczenie farmakologiczne nowotworów oparte jest w głównej mierze na lekach cytotoksycznych i antyproliferacyjnych, uszkadzających nie tylko komórki guza, ale również zdrowe tkanki ustroju, powodując groźne działania niepożądane ze strony różnych narządów i układów. W ostatnich latach ogromny postęp nauk podstawowych (biologii molekularnej, biochemii), czy biotechnologii przyczynił się do lepszego zrozumienia mechanizmów molekularnych procesu nowotworowego, a zwłaszcza tych elementów, które decydują o nadmiernym podziale, wroście i przetrzutowaniu komórek. Właśnie one stały się „celem uderzenia” nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej zwanej molekularną terapią celowaną, bo skierowaną przeciwko bardzo konkretnym i najlepiej, jeśli specyficznym dla komórki nowotworowej elementom. Wybiórcze działanie na komórki guza zapewnia, przynajmniej teoretycznie, lepszą skuteczność i niższą toksyczność leczenia. W artykule przedstawiono podstawy teoretyczne i zastosowanie praktyczne wybranych elementów terapii celowanej w onkologii. Śledząc kolejne etapy od pobudzenia receptora (przez aktywację związanych z nim kinaz, białka transdukcji (przekazu) sygnału, ekspresję określonych genów) do produkcji białek (odpowiedzialnych między innymi za pobudzanie podziałów komórki), przedstawiono grupy leków blokujących poszczególne elementy wspomnianego łańcucha reakcji.

Omówiono leki hamujące aktywność receptorów odpowiedzialnych m.in. za przekazywanie komórce sygnałów do podziału, poprzez blokowanie ich domeny zewnątrzkomórkowej (przeciwciała monoklonalne – cetuximab, trastuzumab), jak i wewnątrzkomórkowej (inhibitory kinaz tyrozynowych – gefitinib, erlotinib, imatinib). Przedstawiono związki skierowane przeciwko białkom transdukcji (przekazu) sygnału (R115777, BAY 43-9006). Skutecznym sposobem hamowania syntezy białek, będących np. produktami onkogenów (w tym wybranych białek transdukcji sygnału), może się okazać terapia antysensowa, blokująca ich powstawanie na etapie produkcji mRNA (ISIS 2503 i 5132). Wreszcie nadmierne podziały komórek nowotworowych można zatrzymać poprzez uderzenie w białka kontrolujące prawidłowy przebieg cyklu komórkowego (UCN-01, flawopirydol). Terapia molekularna to także leki skierowane przeciwko białkom pełniącym funkcje ochronne w komórce (białka szoku termicznego), istotne dla jej funkcjonowania (geldanamycyna, 17-AAG) oraz związki hamujące aktywność proteosomów (bortezomib).

Theoretical basics of molecular targeted therapy in oncology

Currently used anti-cancer pharmacological treatment modalities mainly base on cytotoxic and antiproliferative agents, which affect not only tumour cells, but also healthy tissue causing severe adverse effects within various organs and systems. Recent years have seen significant progress in molecular biology and biochemistry, contributing to a better understanding of the molecular mechanisms of cancer, especially those involved in cell division, growth and migration. These processes have now become the target for modern anticancer treatment called molecular targeted therapy, which is specifically aimed. Selective action against tumour cells provides, theoretically at the least, improved efficacy and decreased toxicity of the treatment. The article presents both the theoretical basics and the practical application of targeted therapy in oncology.

Following the levels of the transduction signal from receptor activation (through receptor kinase, signal transduction proteins and the expression of certain genes) to synthesis of proteins which are involved in promoting cell division, we present the groups of drugs that inhibit these elements of cell signaling.

We present inhibitors of receptor activity, which stop excessive cancer cell proliferation, by blocking their extracellular (monoclonal antibodies- cetuximab, trastuzumab), and intracellular (tyrosine kinase inhibitors- gefitinib, erlotinib, imatinib) domain. We also discuss chemical compounds directed against signal-transduction proteins (R115777, BAY 43-9006). Antisense therapy may prove to be a successful method of inhibiting protein synthesis (e.g. products of oncogenes) by

¹ Katedra i Klinika Onkologii Collegium Medicum
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

² Instytut Farmakologii
PAN w Krakowie

³ Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

blocking this process at the transcription level (ISIS 2503 and 5132). Furthermore, cancer cell proliferation may be stopped by direct blocking of the cycle control proteins (UCN-01, flavopiridol) and the proteasome inhibitors (bortezomib).

Słowa kluczowe: molekularna terapia celowana, EGFR (HER), białka transdukcji sygnału, terapia antysensowa, białka kontrolne cyklu komórkowego

Key words: (molecular) targeted therapy, EGFR (HER), signal-transduction proteins, antisense therapy, cycle control proteins

1. Wstęp

Analizując aktualne statystyki i prognozy epidemiologiczne na najbliższe dziesięciolecie trudno nie odnieść wrażenia, że onkologia potrzebuje nowych pomysłów i rozwiązań w zakresie zapobiegania, wczesnej diagnostyki i leczenia nowotworów.

Niemal do końca XX wieku leki przeciwnowotworowe wykrywane były zazwyczaj przypadkowo, poprzez testowanie dziesiątek tysięcy różnych substancji na specjalnych hodowlach komórek nowotworowych. W pewnym uproszczeniu program badań polega na inkubowaniu komórek uzyskanych z wybranych typów ludzkich nowotworów w zawiesinie analizowanej substancji. Jeśli pod wpływem jej działania ponad połowa komórek przestaje się dzielić, daną substancję uważa się za wystarczająco aktywną, by poddać ją dalszym badaniom. Niestety z uwagi na zbyt słabe działanie przeciwnowotworowe i/lub silną toksyczność ogromna większość związków zostaje zdyskwalifikowana z dalszych badań jeszcze na etapie prób przedklinicznych. Dlatego niemal 50 lat wysiłków badawczych zaowocowało tylko ponad 60 lekami, które znalazły zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych u ludzi.

Dotychczas stosowane leczenie farmakologiczne oparte jest w głównej mierze na lekach cytotoksycznych i antyproliferacyjnych, uszkadzających nie tylko komórki nowotworowe, ale również zdrowe tkanki ustroju, wywołując niekiedy groźne działania niepożądane. Nasilenie działań niepożądanych może utrudnić, lub wręcz uniemożliwić dalsze leczenie, co pogarsza jego wyniki [1].

W ostatnich latach, ogromny postęp biologii molekularnej, biochemii, czy biotechnologii przyczynił się do lepszego zrozumienia mechanizmów molekularnych procesu nowotworowego, a zwłaszcza tych elementów, które decydują o nadmiernym podziale, wzroście i przerzutowaniu komórek. Właśnie one stały się „celem uderzenia” nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej zwanej molekularną terapią celowaną, bo skierowaną przeciwko bardzo konkretnym i najlepiej, jeśli specyficznym dla komórki nowotworowej elementom. Wybiórcze działanie na komórki guza zapewnia, przynajmniej teoretycznie, lepszą skuteczność i niższą toksyczność leczenia.

2. Podstawy teoretyczne i zastosowanie praktyczne molekularnej terapii celowanej

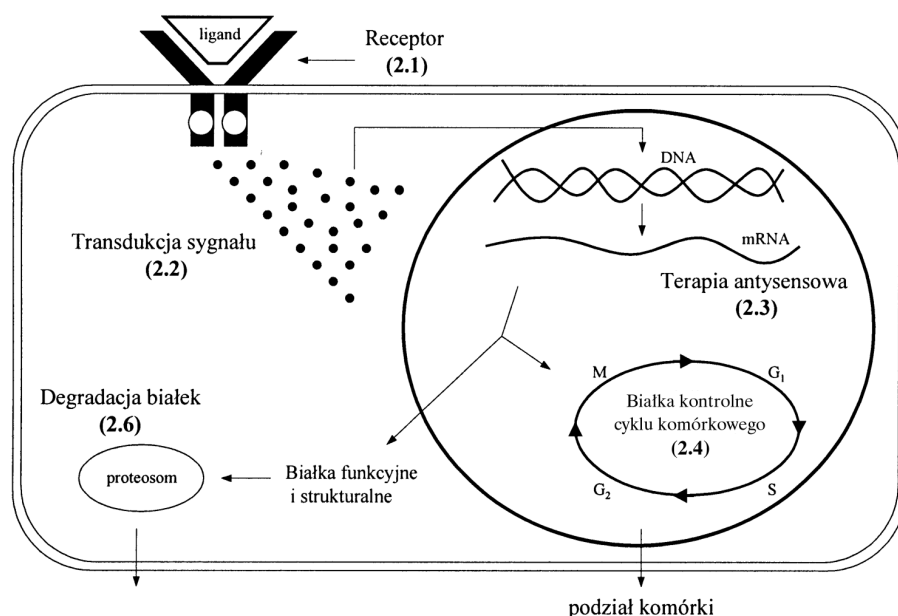
Jeśli w pewnym uproszczeniu założymy, że choroba nowotworowa polega na utracie kontroli organizmu nad przebiegiem szeroko rozumianych procesów metabolicznych w określonej komórce, a zwłaszcza nad jej zdolnością do

podziałów, to potencjalnie każdy element łańcucha reakcji odpowiadającego za tą nieprawidłową cechę komórki, może stać się celem dla nowoczesnej terapii onkologicznej. Na Ryc.1 przedstawiono ogólny schemat kierowania przebiegiem procesów w komórce. Każde z ogniw tego łańcucha jest badane pod kątem możliwości wykorzystania go jako potencjalnego punktu uderzenia dla terapii celowanej [2]. Poniższa praca traktuje wyłącznie o lekach skierowanych przeciwko poszczególnym elementom przedstawionego na rycinie 1 łańcucha reakcji.

2.1. Receptory

Spośród wielu różnych receptorów, które znalazły się w centrum zainteresowania badaczy, do najlepiej poznanych należy rodzina receptorów dla naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (*epidermal growth factor receptor*). Do najważniejszych członków rodziny EGFR zaliczamy cztery typy monomerów: HER-1 (tzw. właściwy receptor dla EGF), HER-2, HER-3 i HER-4, które po aktywacji odpowiednim ligandem tworzą aktywne dimery. Wewnątrzkomórkowe domeny tych glikoprotein z wyjątkiem HER-3 wykazują aktywność kinazy tyrozynowej. Występują one dość powszechnie na powierzchni komórek nabłonkowych, mezenchymalnych i nerwowych. Receptory te w normalnych warunkach współodpowiadają za prawidłowe podziały, różnicowanie i przeżycie komórek, szczególnie w okresie rozwoju płodowego. Jednak w wielu typach nowotworów (rak piersi, jajnika, jelita grubego, niedrobnokomórkowy rak płuc) często obserwujemy 10-, a nawet 100-krotny wzrost ich ilości na powierzchni komórek. Mówimy wówczas o nadekspresji określonego typu receptora. Stan taki sprawia, że komórka poprzez wspomniane receptory otrzymuje szereg sygnałów stale pobudzających ją do podziału [3-5].

W raku piersi uważa się, że niekorzystnym czynnikiem rokowniczym jest nadekspresja receptorów HER-2. Receptor ten, jako jedyny z rodziny EGFR, prawdopodobnie nie wymaga do swojej aktywności obecności liganda (tzw. receptor sierocy). To sprawia, że w sytuacji jego nadekspresji, szansa spotkania się na powierzchni błony komórkowej dwóch nieaktywnych monomerów HER-2 i utworzenie stale czynnego (bo nie wymagającego liganda) homodimeru HER-2/HER-2 jest wysoce prawdopodobna [6]. Z kolei powstawanie heterodimerów z udziałem monomeru HER-2, pozwala na jego udział w przekazywaniu sygnału do wnętrza komórki dzięki transaktywacji przez ligandy specyficzne dla pozostałych typów monomerów HER. Jest to o tyle istotne, że heterodimery zawiera-



Ryc. 1. Uproszczony schemat kierowania czynnościami/metabolizmem komórki (w nawiasach podano numery odpowiednich rozdziałów artykułu)

Figure 1. A simplified diagram showing the regulation of the cell functions/metabolism (appropriate chapters of the article are supplied in brackets)
[Ligand; Receptor; Signal transduction; Protein degradation, Anti-sense therapy, cycle control proteins, Proteosome, Functional and structural proteins, Cell division]

jące HER-2 wykazują szczególnie wysoką aktywność wiązania ligandów i transdukcji sygnałów [7].

Najnowsze badania przedkliniczne sugerują, że jeszcze bardziej niekorzystna sytuacja ma miejsce wtedy, gdy na powierzchni komórki nowotworowej obserwujemy nadekspresję nie tylko HER-2, ale także HER-3. Spowodowane jest to wzrostem prawdopodobieństwa utworzenia heterodimerów HER-2/HER-3, złożonych z monomerów: HER-2, receptor sierocy, który pobudza jeden z najaktywniejszych szlaków mitogennych w komórce, oraz HER-3, bardzo silnie pobudzający najważniejszy szlak antyapoptyczny [8-10].

Z przeprowadzonych badań wynika, że hodując komórki linii nowotworowych raka piersi z nadekspresją poszczególnych typów monomerów z rodziny EGFR, najwyższy indeks mitotyczny obserwowano wśród tych z nadekspresją heterodimerów HER-2/HER-3. Wynosił on 10,5 [11]. Na podstawie badań Clayтона wiadomo, że kobiety z rakiem piersi, u których stwierdzono ponad 4,5 figury podziału w polu widzenia, mają 2,8 razy większe ryzyko zgonu, niż chore z niższym wskaźnikiem [12]. Jest to tym bardziej istotne, że indeks mitotyczny jest jednym z trzech elementów uwzględnianych w skali Blooma i Richardsona, stosowanej do histopatologicznej oceny stopnia złośliwości raka [13]. Skala ta, obok wielkości i typu guza, obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, statusu receptorów steroidowych oraz wieku chorej, należy do powszechnie akceptowanych czynników rokowniczych w raku piersi [14, 15].

W trakcie wspomnianych badań na liniach komórkowych zauważono także, iż spośród badanych grup komórek najwyższą aktywność mitotyczną wykazywały te z na-

dekspresją heterodimerów, w których jednym z monomerów był HER-2. Dla układu HER-1/HER-2 i HER-2/HER-3 indeksy mitotyczne wynosiły odpowiednio 5,0 i 10,5 (przykładowo dla układu HER-1/HER-1 miał wartość 3,2). Niewątpliwie jedną z istotnych przyczyn wysokich wartości indeksów dla układów heterodimerycznych, zawierających monomer HER-2, jest fakt, iż HER-2 prawdopodobnie nie wymaga do swojej aktywności obecności liganda. Niemniej w trakcie kolejnych badań wykazano, że monomer HER-2 posiada jeszcze jedną właściwość, która może wpływać na wysokość indeksu mitotycznego opisanych komórek. Powszechnie wiadomo, że komórka jest tworem dynamicznym, stale odnawia szereg budujących ją struktur. Dotyczy to także receptorów. W procesie endocytozy pochłaniania dimery z powierzchni błony komórkowej do wnętrza endosomów, by uległy w nich degradacji. Spośród możliwych kompilacji monomerów EGFR, dimery złożone z przynajmniej jednego monomeru HER-2, w panującym wewnątrz endosomu pH, są wyjątkowo niestabilne i zanim ulegną strawieniu, wydostają się z powrotem na powierzchnię komórki, by znów tworzyć aktywne układy [11, 16].

Jak wspomniano, receptory HER-1, 3 i 4 do tego, aby stać się aktywne, wymagają obecności swoistego liganda. W przypadku HER-1 są to głównie EGF (naskórkowy czynnik wzrostu) oraz TGF-alfa, natomiast ligandami dla HER-3 i HER-4 są hereguliny (HRGs) [5]. HRGs to rodzina polipeptydowych czynników wzrostu, których zewnątrzkomórkowa domena (zwana HEX) działa promitotycznie, z kolei wewnątrzkomórkowa proapoptycznie. Część śród błonowa odpowiada za wiązanie z receptorem HER-3 i jego aktywację. Wykazano, że w guzach, w któ-

rych stwierdzono obecność zmutowanych heregulin (z nadekspresją domen HEX) monomery HER-3 charakteryzują się wyjątkową tendencją do tworzenia aktywnych heterodimerów z HER-2 [17-19]. To wyjaśnia, dlaczego m.in. w komórkach raka piersi wykazano wzrost autokrynnej produkcji heregulin [20]. Opisany mechanizm jest, jak się wydaje, jedną z metod uniezależnienia się komórek nowotworu od ogólnoustrojowych mechanizmów, kontrolujących wzrost i różnicowanie komórek [21]. Warto w tym miejscu dodać, że hereguliny odpowiadają także za regulację ekspresji czynników odpowiedzialnych za trawienie podścieliska komórkowego, tj. aktywatora plazminogenu (uPA) i jego receptora. Aktywator plazminogenu jest proteazą serynową, która poprzez degradację macierzy zewnątrzkomórkowej ułatwia komórkom nowotworowym migrację, a zatem odpowiada za ich inwazyjność i przerzutowanie [22, 23]. W niektórych nowotworach (rak piersi, jelita grubego) wykazano niekorzystne rokownicze znaczenie zwiększonego stężenia uPA w obrębie guza [22, 24-27].

W miarę poszerzania się wiedzy na temat receptorów EGFR, ich znaczenia w procesie karcinogenezy i wpływu nadekspresji w komórkach różnych typów nowotworów na

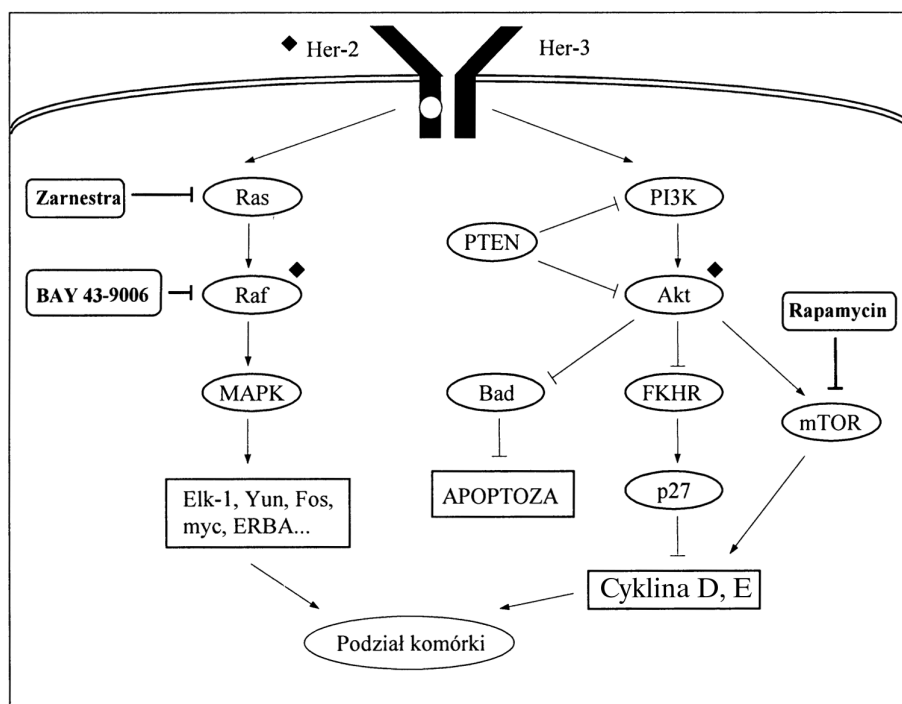
gorsze rokowanie, podjęto działania w kierunku produkcji czynników blokujących ich aktywność.

Leki wykazujące takie właściwości dzielimy na dwie podstawowe grupy (Tab. I.). Pierwsza z nich to przeciwciała, które wiążą się z zewnątrzkomórkowymi domenami receptorów i uniemożliwiają ich aktywację poprzez zablokowanie miejsc wiążących swoiste ligandy, lub jako przeszkoda przestrzenna, utrudniają powstawanie aktywnych dimerów. Drugą grupę stanowią leki, które działają na domenę wewnątrzkomórkową receptora, hamując aktywność związanych z nią kinaz tyrozynowych, poprzez blokowanie miejsc wiążących ATP (TKIs – tyrosin kinase inhibitors). Właściwa aktywność kinaz tyrozynowych, związanych z receptorem, jest niezbędna do jego prawidłowego funkcjonowania, w tym do aktywacji białek uczestniczących w transdukcji (przekazaniu) sygnału (np. o pobudzeniu receptora) do wnętrza komórki. Zablokowanie miejsc wiążących ATP uniemożliwia jego rozpad do ADP i Pi, przez co fosforylacja i aktywacja białek transdukcji, a zatem przekazanie sygnału stają się niemożliwe [34].

Do najszerzej badanych i najbardziej znanych przedstawicieli pierwszej grupy leków należą: trastuzumab

Tab. I. Leki blokujące aktywność rodziny receptorów EGFR [17, 21, 28-33]
Table I. Drugs blocking the activity of the EGFR receptor family

Leki działające na receptory	Nazwa leku	Charakterystyka	Faza badań klinicznych	Lokalizacja/rodzaj nowotworu
Leki działające na zewnątrzkomórkową domenę receptorów (przeciwciała)	Przeciwciała przeciwko receptorowi EGFR (HER-1)	Cetuximab (Erbix®)	II, III	NDRP, jelito grube, głowa i szyja, trzustka, nerka
		Panitumumab/ABX-EGF	I, II, III	NDRP, nerka, jelito grube, przełyk, trzustka, prostata
		EMD 72000	I	głowa i szyja, przełyk, jelito grube, szyjka macicy
		h-R3	I, II	głowa i szyja
	Przeciwciała przeciwko receptorowi HER-2	Trastuzumab (Herceptin®)	II, III, IV	NDRP, pierś, jajnik, trzustka, pęcherz moczowy
Leki działające na wewnątrzkomórkową domenę receptorów (inhibitory kinaz tyrozynowych, TKIs)	Specyficzne	Erlotinib/OSI-774 (Tarceva®)	II, III	NDRP, jajnik, trzustka, głowa i szyja,
		Gefitinib/ZD1839 (Iressa®)	II, III, IV	NDRP, prostata, żołądek, pierś
	Niespecyficzne	PKI 166	I, II	
		GW 2016	I	
		EKI-569	I	
	CI-1033	nieodwracalny inhibitor wszystkich receptorów rodziny EGFR (HER-1,2,3 i 4)	I, II	skóra



Ryc. 2. Białka transdukcji sygnału. Kaskada najważniejszych białek pobudzanych przez heterodimer HER-2/HER-3 oraz wybrane leki blokujące ich aktywność (→ – aktywacja, ⊥ – hamowanie, ♦ – elementy zależne od HSP)

Figure 2. Transduction signal proteins: cascade of the main proteins activated by the HER-2/HER-3 heterodimer and assorted drugs blocking their activity

(Herceptin®) i cetuximab (Erbix®). Trastuzumab, poprzez wzrost stężenia białka P27 w komórce (Ryc. 2) powoduje zahamowanie podziałów [21, 35]. Aktualnie jest on zarejestrowany w kilkudziesięciu krajach świata (także w Polsce) do leczenia przerzutowego raka piersi u kobiet z wysokim poziomem nadekspresji receptora HER-2. Cetuximab pierwotnie uzyskał oficjalną rejestrację w Szwajcarii w terapii przerzutowego raka jelita grubego po niepowodzeniu leczenia irinotekaniem. W połowie 2004 roku zakończono centralną procedurę rejestracyjną na kraje Unii Europejskiej.

Gefitinib (Iressa®) i erlotinib (Tarceva®) to najważniejsi przedstawiciele inhibitorów kinazy tyrozynowej. Pierwszy z nich już w 2003 roku uzyskał rejestrację w leczeniu opornego na chemioterapię niedrobnokomórkowego raka płuc w Japonii, Australii i USA. Aktualne zalecenia ASCO, dotyczące zasad postępowania w niedrobnokomórkowym raku płuca w stadium nieoperacyjności, proponują gefitinib jak terapię III rzutu po niepowodzeniu pochodnych platyny i docetakselu [36].

W tym miejscu warto wspomnieć o leku, który stanowi modelowy przykład zastosowania molekularnej terapii celowanej w praktyce klinicznej. Jego dostępność stała się podstawą nowej jakości leczenia w onkologii i hematologii. Podobnie jak gefitinib czy erlotinib, blokuje aktywność kinazy, tyle, że związanej z innym typem receptora.

U 95% chorych na przewlekłą białaczkę szpikową obserwuje się obecność anomalii chromosomowej, polegającej na występowaniu tzw. chromosomu Philadelphia. Powstaje on poprzez wzajemną translokację, przemieszcze-

nie się końcowych odcinków długich ramion chromosomów 9 i 22. W wyniku tego procesu dochodzi do przeniesienia genu *ABL*, znajdującego się na chromosomie 9, na chromosom 22, w ściśle określone miejsce jego złamania zwane *BCR*. Tak powstaje hybryda *BCR-ABL*, która koduje nieprawidłowe białko o aktywności kinazy tyrozynowej, zwane kinazą *BCR-ABL*. Nadmierna aktywność tej kinazy prowadzi do aktywacji białek istotnych dla procesów wzrostu i podziału komórek. W wyniku tego obserwujemy nadmierną ich proliferację, co w rezultacie może doprowadzić do rozwoju przewlekłej białaczki szpikowej [37, 38].

Aktualnie dostępny jest lek, który hamuje aktywność kinazy *bcr-abl*, odpowiedzialnej w większości przypadków za powstanie tej choroby. Imatinib, znany bardziej pod nazwą Glivec®, jest inhibitorem wspomnianej kinazy i stanowi jeden z najbardziej spektakularnych przykładów postępów biologii molekularnej i rozwoju onkohematologii [39].

Dalsze eksperymenty z imanitibem przyniosły nowe informacje, które szybko znalazły zastosowanie w klinice. W toku kolejnych badań okazało się, iż związek ten hamuje aktywność także dwóch innych kinaz: *C-KIT* oraz *PDGFR*. Protoonkogen *C-KIT* koduje przezbłonowy receptor, którego wewnątrzkomórkowa część wykazuje aktywność kinazy tyrozynowej. W normalnych warunkach białko *KIT* odgrywa istotną rolę w prawidłowym przebiegu hematopoezy oraz melano- i gametogenezy. Liganem dla tego receptora jest cytokina *SCF* (*stem-cell factor*) wytwarzana przez komórki podścieliska szpiku kostnego.

Mutacja genu dla białka KIT obserwowana jest w około 85% guzów stromalnych przewodu pokarmowego (*gastrointestinal stromal tumors*, GISTs). Dlatego zastosowanie imanitibu w leczeniu wspomnianych guzów stało się przedmiotem zaawansowanych badań klinicznych. Analizy uzyskanych wyników pozwoliły uznać leczenie imatinibem w wielu krajach za standard postępowania w pierwotnie lub wtórnie nieoperacyjnych guzach stromalnych przewodu pokarmowego. Prowadzone są badania nad jego znaczeniem w leczeniu uzupełniającym. Dotychczasowe wyniki nie pozwalają na takie zastosowanie w praktyce klinicznej.

Próby terapii z użyciem tego leku podjęto także w wielu innych nowotworach złośliwych, w których wykazano mutację receptora KIT (włókniakomięsak skóry guzowaty, mięsak Ewinga, mięsak naczyńniowy, czerniak, rak gruczołowo-torbielowaty, nasieniak, a także rak piersi, jajnika, drobnokomórkowy rak płuca, niektóre typy chłoniaków) [40-43].

Kolejnym białkiem hamowanym przez imatinib jest kinaza PDGFR (*platelet-derived growth factors*) typu A i B. Nadmierną jej aktywność obserwujemy w niektórych wariantach przewlekłej białaczki mielomonocytovej [40]. Wg najnowszych badań, kinaza ta (zwłaszcza typu A) może być odpowiedzialna za rozwój tych typów GISTs, w których nie obserwujemy mutacji w obrębie genu C-KIT [42].

2.2. Transdukcja sygnałów

Kolejnym ogniwem łańcucha reakcji kierujących czynnościami komórki jest transdukcja sygnału. W pewnym uproszczeniu to kaskada kolejno aktywujących się i wzajemnie regulujących białek, które przenoszą sygnał z pobudzonego, obecnego na powierzchni komórki receptora do jej wnętrza, w tym do jądra komórkowego. Na Ryc. 2 przedstawiono schemat kaskady wybranych białek pobudzanych przez heterodimer HER-2/HER-3. Zainteresowanie tą grupą białek, jako potencjalnymi punktami uderzenia dla terapii celowanej, wzrosło, gdy okazało się, że leki blokujące receptory są niewystarczające do tego, by skutecznie zatrzymać podziały komórkowe. I choć trudno umniejszyć znaczenie przeciwciał czy inhibitorów kinazy tyrozynowej w onkologii, to warto dodać, że np. wśród kobiet z rozpoznaniem rakiem piersi w stadium uogólnienia i nadekspresją HER-2, tylko 35% osiąga klinicznie istotną odpowiedź na leczenie trastuzumabem [44]. Może to być spowodowane nadekspresją białka mTOR (Ryc. 2), które niwelowałoby wzrost ilości białka P27 (inhibitora cyklu komórkowego), wywołaną działaniem trastuzumabu i w sposób bezpośredni aktywowało cykliny D₁ i E, pobudzając podziały komórkowe. Jeśli dalsze badania to potwierdzą, być może skuteczność leczenia trastuzumabem uda się zwiększyć poprzez dodatkowe podawanie pochodnych rapamycyny – inhibitora białka mTOR. Inną przyczyną wspomnianej „oporności” na trastuzumab może być przejęcie zadań aktywacji białek przekazu sygnału przez inny typ receptora. Dlatego wysunięto hipotezę, by oprócz leków blokujących receptory zastoso-

wać środki hamujące aktywność białek transdukcji, poprzez które receptory przekazują sygnał do wnętrza komórki.

Szczególnie interesujące wydają się być składowe dwóch szlaków przekąźnikowych: RAS-RAF-MAPK oraz PI3K-PDK1-PKB/AKT [45, 46]. Pierwszy z tych szlaków poprzez kaskadę enzymatyczną pobudza białka jądrowe (m.in. cykliny D₁), wpływając tym samym na cykl komórkowy (proliferaację). Aktywacja białek RAS zależy od modyfikacji potranslacyjnych, zwłaszcza tzw. prenylacji. Reakcja ta prowadzona jest przez enzym transferazę farnesylową (FTaza) i pozwala białku RAS na włączenie się do struktur błonowych, by tam funkcjonować jako aktywny element łańcucha transdukcji [47, 48]. Zablockowanie FTazy inhibitorem może być skutecznym punktem uchwytu dla terapii celowanej. Takim blokerem jest związek R115777 (Zarnestra), będący obecnie w trakcie III fazy badań klinicznych.

Kolejnym celem w tym szlaku jest kinaza serynowo-treoninowa RAF, aktywująca kinazę MAP (*mitogen activated protein*). Inhibitorem tego enzymu jest preparat – BAY 43-9006 (aktualnie w trakcie badań I/II fazy) [31].

Drugi ze szlaków (PI3K-PDK1-AKT) ma silne działanie antyapoptotyczne. Kinaza PI3 aktywuje białko AKT, co prowadzi z jednej strony do obniżenia poziomu białka P27 (czynnika hamującego proliferację), a z drugiej strony do zahamowania apoptozy, poprzez blokadę białka BAD. Dalsze badania wykazały, iż nie tylko nadekspresja receptora HER-3 prowadzi do zahamowania procesu apoptozy, ale i mutacja lub delecja inhibitora kinaz PI3 i AKT – białka PTEN. W związku z tym rozpoczęto badania nad zastosowaniem analogów białka PTEN jako leków przeciwnowotworowych. Obecnie najszerzej zakrojone badania dotyczą RAD001 [31, 49]. Pomimo, że wyniki dotychczasowych badań nad inhibitorami procesów przekazywania sygnału są zachęcające, to już w pierwszych badaniach klinicznych zauważono, że to wciąż za mało, by uzyskać znamienne poprawę wyników leczenia nowotworów.

2.3. Terapia antysensowa

Blokowanie aktywności określonych białek powoduje wzrost ich produkcji w komórce, co stanowi skuteczny mechanizm oporności na taki rodzaj leczenia. Dlatego, w poszukiwaniu skutecznych metod terapii celowanej, podjęto próby zablokowania niektórych białek uczestniczących w transformacji nowotworowej, na „najwyższym” poziomie ich powstawania. Rozumiemy przez to etap syntezy matrycowej nici RNA (mRNA), zawierającego informację o budowie „niebezpiecznych” białek (produktów onkogenów, czy białek szlaku transdukcji).

Metoda ta polega na zablokowaniu nici mRNA, niosącej informację o interesującym nas białku, zsyntetyzowanym *in vitro*, a następnie podanym dożylnie – komplementarnym do sekwencji tego RNA – oligonukleotydem antysensowym [50, 51]. Tak powstały podwójny łańcuch (mRNA + oligonukleotyd antysensowy) ulega następnie degradacji enzymatycznej przez obecną w komórce

RNAzę H. Próby z tym rodzajem terapii prowadzone są na oligonukleotydach komplementarnych do mRNA kodującego białka takie jak: BCL-2 (inhibitor apoptozy), RAS czy RAF (białka transdukcji sygnału). G3139 to oligonukleotydy blokujące produkcję BCL-2. Preparaty ISIS 2503 i ISIS 5132 zapobiegają produkcji odpowiednio RAS i RAF [50, 52, 53]. Podjęto już zaawansowane próby kliniczne III fazy kojarzenia tej metody leczenia ze standardową chemioterapią (docetaksel, mitoksantron, irinotekan, dakarbazyna) [51-57]. W badaniach nad zastosowaniem tego typu terapii uczestniczą także polscy naukowcy [58, 59].

2.4. Białka kontrolne cyklu komórkowego

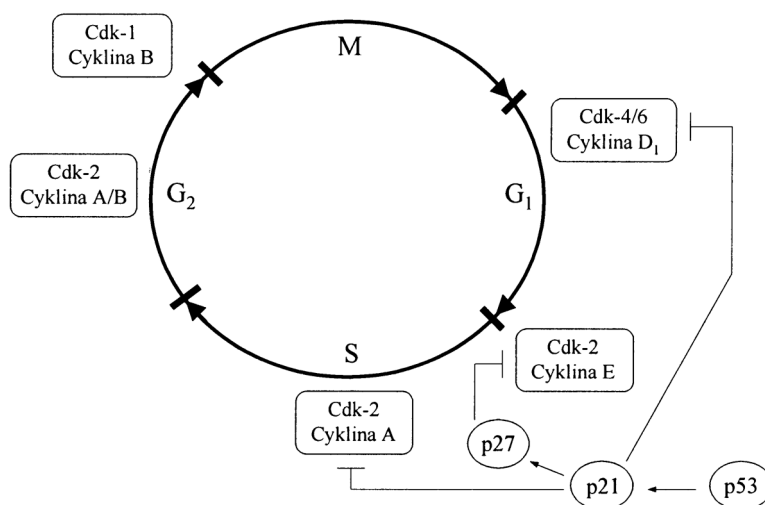
Cykl komórkowy składa się ze stosunkowo krótkiej fazy podziału komórki (mitoza, faza M) oraz dłuższego okresu międzypodziałowego (Ryc. 3). Okres ten dzieli się na trzy fazy: G₁ (przygotowanie do syntezy DNA), S (replikacja materiału genetycznego) oraz G₂ (przygotowanie do mitozy). Klasyczna chemioterapia może działać na każdy etap podziału komórki, poszczególne grupy leków na ogół wykazują najskuteczniejsze działanie wobec komórek znajdujących się w określonej fazie cyklu podziału. Stosowane związki wykazują aktywność poprzez oddziaływanie z istotnymi dla prawidłowego funkcjonowania i podziałów komórki elementami (DNA, enzymy replikacyjne, wrzeciono podziałowe), w sposób niespecyficzny, doprowadzając do ich uszkodzenia lub zablokowania. Leki chemiczne mogą być aktywne wobec komórek znajdujących się w określonej fazie cyklu komórkowego (fazowo specyficzne), lub blokować proliferację niezależnie od tego, w której fazie znajdują się komórki guza (fazowo niespecyficzne) [60].

Na straży prawidłowości przebiegu poszczególnych faz podziału komórki stoją tzw. białka cyklu komórkowego. Na granicy poszczególnych faz (lub w ich trakcie)

sprawdzają, czy komórka prawidłowo przeprowadziła określony etap i właściwie przygotowała się do kolejnego. W każdym z tak zwanych punktów kontrolnych (G₁/S, S/G₂ czy G₂/M) następuje sprawdzenie poprawności i spójności DNA. W przypadku stwierdzenia jego nieciągłości lub innych zaburzeń syntezy materiału genetycznego, w ogromnej większości przypadków przejście do następnej fazy zostaje zablokowane. Kluczową rolę odgrywają tu białka – cykliny oraz cyklinozależne kinazy CDK (*cycline dependent kinases*). Cykliny aktywują CDK poprzez fosforylację. Jej brak oznacza zwykle tzw. areszt komórkowy (zahamowanie cyklu).

Nowa strategia leczenia nowotworów wiąże się z inaktywacją CDK. Wiadomo na przykład, że białka z rodziny KIP i INK są naturalnymi inhibitorami kinaz aktywowanych przez cykliny [61]. Brak lub niedostateczna ilość w komórce niektórych białek z tych rodzin może powodować zaburzenia cyklu komórkowego. Wykazano, iż podanie adenowirusa produkującego białko z rodziny INK do komórek niedrobnokomórkowego raka płuca i prostaty, które nie wykazywały ekspresji tego białka, powodowało zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₁ oraz regresję guza [62, 63].

Stosuje się także syntetyczne inhibitory CDK. Leki pierwszej generacji to pochodne związków występujących w roślinach i bakteriach. Działanie ich polega na bezpośrednim blokowaniu CDK poprzez niekompetycyjne połączenie z miejscem wiążącym ATP. W badaniach klinicznych (rak piersi, niedrobnokomórkowy rak płuc, białaczki) znajduje się obecnie UCN-01 oraz flawopirydol (inhibitory CDK 1 i 2) [62]. Nową grupą związków w leczeniu nowotworów są paulony. Związki te należą do grupy benzazepinonów. To silne kompetycyjne w stosunku do ATP inhibitory cyklu komórkowego, wykazujące działanie hamujące w stosunku do różnych CDK [64].



Ryc. 3. Białka kontrolne cyklu komórkowego
(→ – aktywacja, ⊥ – hamowanie)

Figure 3. Proteins controlling the cellular cycle
(→ – activation, ⊥ – inhibition)

2.5. Białka szoku termicznego (HSP)

Białka szoku cieplnego (*heat shock proteins*, HSP) to duża grupa zróżnicowanych protein. Ich ekspresja wzrasta po poddaniu komórki stresowi: cieplnemu, oksydacyjnemu, czy też pod wpływem niewystarczającej ilości substancji odżywczych w jej środowisku. Rolą HSP jest: wiązanie i ochrona innych białek komórkowych w czasie stresu komórkowego (zapobieganie degradacji), wewnątrzkomórkowy transport białek, reperowanie polipeptydów uszkodzonych bądź źle uformowanych po translacji (tzw. *foldng*), wreszcie kierowanie do degradacji białek zbyt uszkodzonych by poddać je naprawie [65, 66].

Białka HSP często zapobiegają degradacji określonych czynników promitotycznych. Z tego właśnie względu stały się celem terapii antynowotworowej. Jednym z przedstawicieli tej rodziny jest HSP90. Chroni ono i odpowiada za naprawę wielu ważnych białek w komórce: kinaz (RAF-1, CDK-4, AKT), receptorów (progesteronowych, estrogenowych, EGFR/HER-1, HER-2) czy białek protoonkogennych (P53, P210^{BCR-ABL}). HSP90 wiąże się także z białkami szkieletowymi, zaangażowanymi w procesie mitozy: aktyną, tubuliną, białkami centromerowymi. Terapia skierowana przeciwko HSP90 powinna zmieniać bądź hamować jego funkcję, a przez to zaburzać aktywność zależnych od niego elementów (Ryc. 2). Efekt taki uzyskujemy po zastosowaniu geldanamycyny i jej analogu 17-AAG (17-allyloamino-17-demetoksygeldanamycyna). Skutkiem połączenia 17-AAG do HSP90 jest rozpad białek wchodzących w skład kompleksu białka szoku cieplnego. Należy zaznaczyć, że zaburzenie działania białek z rodziny HSP zwiększa prawdopodobieństwo ubikwitynacji (łączenia z białkami odpowiedzialnymi za kierowanie do wewnątrzkomórkowych kompleksów degradujących), a następnie degradacji wielu naraz czynników związanych z przekazaniem w komórce sygnału do podziału [67]. Wykazano, że geldanamycyna zmniejsza powinowactwo HSP90 do wiązanych przez niego białek oraz nasila ich degradację [68, 69]. Jednak badania na zwierzętach ujawniły znaczną toksyczność związku, szczególnie wobec wątroby [70]. Synteza analogu geldanamycyny pozwoliła znacznie zmniejszyć toksyczność tego leku przy niezmienionym mechanizmie działania na HSP90. Badania kliniczne z wykorzystaniem 17-AAG prowadzone są obecnie w USA i w Wielkiej Brytanii. Wczesne wyniki wykazały aktywne działanie 17-AAG na skupiska komórek raka piersi, jajnika czy żołądka. W toku kolejnych prób okazało się, że 17-AAG może być także skuteczną w leczeniu raka okrężnicy – dane przedkliniczne sugerują jego zdolność do indukcji w komórkach tego nowotworu apoptozy [71]. Wykazano także zmniejszenie ilości białek RAS i AKT po zastosowaniu 17-AAG. Udało się też wykazać, że badany związek może wywołać areszt komórkowy w fazie G2/M [72].

2.6. Blokery aktywności proteosomów

Komórki prawidłowe produkują wiele różnych białek. Teoretycznie komórki nowotworowe, z uwagi na liczne

zaburzenia budowy i regulacji ekspresji materiału genetycznego, wytwarzają ich więcej, często nieprawidłowych (produkty onkogenów). W badaniach przedklinicznych zauważono, że zablokowanie aktywności organelli odpowiedzialnych za degradację produktów białkowych doprowadza do tzw. stanu „*choking cell*”, czyli dławienia, duszenia się komórki wyprodukowanymi przez nią białkami, co w efekcie doprowadza do jej śmierci w mechanizmie apoptozy. Najszerzej badanym w onkologii inhibitorem aktywności proteosomów jest związek PS-341 (bortezomib, Velcade[™]); obecnie w trakcie badań klinicznych II i III fazy (czerniak, rak piersi, rak prostaty, rak jajnika, wybrane typy chłoniaków) [73, 74].

3. Podsumowanie

Obecnie znanych jest ponad 300 biologicznych celów molekularnych. Jedne z nich już są, inne być może staną się w przyszłości punktem uchwytu dla nowoczesnego leczenia przeciwnowotworowego. Z oczywistych względów omówiliśmy tylko niektóre. Naszą intencją było przedstawienie w sposób uporządkowany i możliwie przejrzysty podstaw teoretycznych i zastosowania praktycznego wybranych elementów terapii celowanej w onkologii. Mamy nadzieję, iż przynajmniej częściowo udało nam się zrealizować zamierzone cele. Zdajemy sobie sprawę, iż nie wyczerpaliśmy wszystkich zagadnień związanych z molekularną terapią celowaną. Ograniczyliśmy się do wybranych zagadnień związanych wyłącznie z przedstawionym na Rycinie 1 ogólnym schematem kierowania szeroko rozumianymi procesami metabolicznymi w komórce.

Aktualnie za największe osiągnięcie w zakresie terapii celowanej nowotworów należy uznać imatinib. Wiąże się to z faktem, że zarówno przewlekła białaczka szpikowa jak i guzy stromalne przewodu pokarmowego w ogromnej większości są najprawdopodobniej następstwem pojedynczej mutacji genów (odpowiednio *BCR-ABL* i *C-KIT*). W przypadku innych nowotworów istotnych jest co najmniej kilka mutacji.

Złożoność mutacji nowotworów litych jest problemem, którego aktualnie nie potrafimy rozwiązać. Mimo, że nowotwory złośliwe mogą początkowo powstawać na podłożu pojedynczej mutacji, uważa się, że ze wzrostem guza pojawiają się liczne zmiany molekularne odpowiedzialne za ich proliferację. Nie wystarczy zatem lek działający na jedną mutację. Muszą zostać opracowane dziesiątki leków o swoistym działaniu na poszczególne cele w komórce nowotworowej. Najpierw jednak należy dobrze poznać te cele, a następnie wyprodukować leki złożone, dopasowane swoim składem do charakterystyki genomu komórki nowotworowej [75]. Droga do osiągnięcia wymiernych sukcesów molekularnej terapii celowanej nowotworów jest jeszcze daleka.

Prof. dr hab. med. Janusz Pawłęga
Katedra i Klinika Onkologii
Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
ul. Kopernika 19, 31-501 Kraków
e-mail: klonk@cm-uj.krakow.pl

Piśmiennictwo

1. Pawlicki M, Wiczyńska B. New anticancer drugs-future directions. *Nowotwory J Oncol* 2001; 51: 507-14.
2. Syrigos KN, Harrington KJ (eds). *Targeted Therapy for Cancer*. Ed. 1. New York: Oxford University Press; 2003.
3. Yarden Y, Śliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 127-37.
4. Dowsett M, Cooke T, Ellis I et al. Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? *Eur J Cancer* 2000; 36: 170-6.
5. Arteaga C. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol* 2002; 29: 3-9.
6. Salomon D, Gullick W. The erbB family of receptors and their ligands: multiple targets for therapy. *Signal* 2001; 2: 4-11.
7. Wisecarver JL. HER-2/neu testing comes of age. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 299-301.
8. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74: 49-139.
9. Fedi P, Pierce JH, Di Fiore PP et al. Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase but not phospholipase C or GTPase-activating protein distinguishes erb B-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 492-500.
10. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER-2 action in breast cancer. *Oncogene* 2000; 19: 6102-14.
11. Oved S, Yarden Y. Signal transduction: molecular ticket to enter cells. *Nature* 2002; 416:133-136.
12. Clayton F. Pathologic correlates of survival in 378 lymph node- negative infiltrating ductal breast cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1150-5.
13. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis on breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-77.
14. Fitzgibbons PL, Page D et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 966-78.
15. Jassem J, Krzakowski M, Olszewski W et al. Diagnosis and treatment of breast cancer. Recommendations of the Polish Union of Oncology. *Nowotwory J Oncol* 2003; 53: 300-24.
16. Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H et al. Diversification of new differentiation factor and epidermal growth factor signalling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 1996; 15: 2452-67.
17. Sridhar BS, Seymour L, Shepherd FA. Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2003; 4: 397-406.
18. Weinstein EJ, Leder P. The extracellular region of heregulin is sufficient to promote mammary gland proliferation and tumorigenesis but not apoptosis. *Cancer Res* 2000; 60: 3856-61.
19. Krane JM, Leder P. NDF/hergulin induces persistence of terminal end buds and adenocarcinomas in the mammary glands of transgenic mice. *Oncogene* 1996; 12: 1781-8.
20. Mincione G, Blanco C, Kannan S et al. Enhanced expression of heregulin in c-erbB 2 and c-H ras transformed mouse and human mammary epithelial cells. *J Cell Biochem* 1996; 60: 437-46.
21. Mendelson J. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor for Cancer Therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1-13.
22. Mazumdar A, Adam L, Boyd D et al. Heregulin regulation of urokinase plasminogen activator and its receptor: human breast epithelial cell invasion. *Cancer Res* 2001; 61: 400-5.
23. Amdreassen PA, Kjoller L, Christensen L et al. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997; 72: 1-22.
24. Stephenson J. Study indicates utility for breast cancer prognostic marker. *JAMA* 2001; 285: 3077-78.
25. Ganesh S, Sier CMF, Heerding MH et al. Urokinase receptor and colorectal cancer survival. *Lancet* 1994; 344: 401-2.
26. Dugan C, Maguire T, McDermott E et al. Use plasminogen activator and urokinase plasminogen receptor in breast cancer. *Int J Cancer* 1995; 61: 597-600.
27. Grondahl-Hansen J, Peters HA, Van Putten WLJ et al. Prognostic significance of the receptor for urokinase plasminogen activator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1079-87.
28. Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2787-99.
29. Langer CJ, Stephenson P, Thor A et al. Trastuzumab in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: is there a role? Focus on Eastern Cooperative Oncology Group Study 2598. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1180-87.
30. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ et al. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that express the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1201-8.
31. Boulay A, Zumstein-Mecker S, Stephan C et al. Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Res* 2004; 64: 252-261.
32. Scholl S, Beuzebec P, Pouillart P. Targeting HER2 in other tumour types. *Ann Oncol* 2001; 12: 81-7.
33. Heinemann V. Present and future treatment of pancreatic cancer. *Semin Oncol* 2002; 29: 23-32.
34. Baselga J. The science of EGFR inhibition: a roadmap to improved outcomes? *Signal* 2004; 5: 4-8.
35. McKeage K, Perry CM. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs* 2002; 62: 209-43.
36. Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG et al. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *J Clin Oncol* 2004; 22: 330-353.
37. Clark SS, McLaughlin J, Crist WM et al. Unique forms of the abl-bcr tyrosine kinase distinguish Ph1-positive CML from Ph1-positive ALL. *Science* 1987; 235: 85-8.
38. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987; 6: 3341-51.
39. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the bcr-abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1031-7.
40. Apperley JF, Gardembas M, Melo JV et al. Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of platelet-derived growth factor receptor beta. *N Engl J Med* 2002; 347: 481-7.
41. Ruka W, Rutkowski P, Szawlowski A et al. Current management of patients with gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Nowotwory J Oncol* 2003; 53: 537-42.
42. Druker BJ. STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine* 2002; 8: 49-52.
43. Soria JC, Johnson BE, Chevalier TL. Imatinib in small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 41: 49-53.
44. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 719-726.
45. Levitzki A. EGF receptor as therapeutic target. *Lung Cancer* 2003; 41: 9-14.
46. Hirsh FR, Scagliotti V, Langer CJ et al. Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer* 2003; 41: 29-42.
47. Rowinsky EK, Jolene JW, Von Hoff DD. Ras protein farnesyltransferase: A strategic for anti-cancer therapeutic development. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3631-52.
48. Ma BBY, Bristow RG, Kim J et al. Combined-modality treatment of solid tumors using radiotherapy and molecular targeted agents. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2760-76.
49. Huang S, Houghton PJ. Inhibitors of mammalian target of rapamycin as novel antitumor agents: from bench to clinic. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3: 295-304.
50. Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. Antisense oligonucleotides for cancer therapy – an overview. *Lung Cancer* 2003; 41: 81-8.
51. Tamm I, Dörken B, Hartmann G. Anti-sense therapy in oncology: new hope for an old idea. *Lancet* 2001; 358: 489-97.
52. Gordon MS, Sandler AB, Holmlund JT et al. A phase I trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, administered by 24-hour weekly infusion to patients with advanced cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; 604.
53. Stevenson JP, Yao KS, Gallagher M et al. Phase I clinical/pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of the c-raf-1 antisense oligonucleotide ISIS 5132 (CGP 69846A). *J Clin Oncol* 1999; 17: 2227-36.
54. Chen HX, Marshall JL, Trocky N et al. A phase I study of bcl-2 antisense G3139 (GENTA) and weekly docetaxel in patients with advanced breast cancer and other solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000; 19: 178 (a).
55. Chi KN, Gleave ME, Klasa R et al. A phase I trial of antisense oligonucleotide to bcl-2 (G3139, GENTA) and mitoxantrone in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000; 19: 330 (a).
56. Jansen B, Wacheck V, Heere-Rees E et al. Chemosensitisation of malignant melanoma by bcl-2 antisense therapy. *Lancet* 2000; 356: 1728-33.
57. Flaherty KT, Stevenson JP, O'Dwyer J. Antisense therapeutics: lessons from the early clinical trials. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 499-505.

58. Szczylik C, Skorski T, Nicolaidis NC et al. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligonucleotides. *Science* 1991; 253: 562-5.
59. Gewirtz AM, Sokol DL, Ratajczak MZ. Nucleotide acid therapeutic: state of the art. And future prospects. *Blood* 1998; 92: 712-36.
60. Tannoch VJ, Hinds PW, Tsai LH. Cell cycle control. *Adv Exp Med Biol* 2000; 465: 127-40.
61. Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 2000; 247: 1-15.
62. Senderowicz AM, Sausville EA. Preclinical and clinical development of cyclin- dependent kinase modulators. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 376-87.
63. Chen JT, Chen YC, Chen CY et al. Loss of p16 and/or pRb protein expression in NSCLC. An immunohistochemical and prognostic study. *Lung Cancer* 2001; 31: 163-70.
64. Kunick C, Schultz C, Lemcke T et al. 2-Substituted paullones: CDK1/ cyclin B-inhibiting property and in vitro antiproliferative activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2000; 10: 567-9.
65. Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN. The heat-shock response: regulation and function of heat shock proteins and molecular chaperones. *Essay Biochem* 1997: 17-29.
66. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002; 295: 1852-8.
67. Goetz MP, Toft DO, Ames MM et al. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol* 2003; 14: 1169-76.
68. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B et al. Inhibition of heat shock protein 90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8324-8.
69. Ochel HJ, Schulte TW, Ngujen P et al. The benzoquinone ansamycin geldanamycin stimulates proteolytic degradation of local adhesion kinase. *Mol Genet Metab* 1999; 66: 24-30.
70. Supko JG, Hickman RL, Grever MR et al. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995; 36: 305-15.
71. Hostein I, Robertson D, DiStefano F et al. Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17- allylamino- 17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis. *Cancer Res* 2001; 61: 4003-9.
72. Srethapakdi M., Liu F, Tavorath R et al. Inhibition of Hsp90 function by ansamycin causes retinoblastoma gene product-dependent G1 arrest. *Cancer Res* 2000; 60: 3940-6.
73. Adams J, Palombella UJ, Elliott PJ. Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. *Invest New Drugs* 2000; 18: 109-21.
74. Adams J. Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine* 2002; 8: 49-52.
75. Brown H. Does hope match the type for targeted drugs? *Lancet Oncol* 2003; 4: 452-.

Otrzymano: 7 czerwca 2004 r.

Przyjęto do druku: 14 lutego 2005 r.