

Ewa Sierko^{1,2}, Marek Wojtukiewicz^{1,2}
¹Klinika Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

²Białostockie Centrum Onkologii

Interferowanie z funkcją EGFR — nowe możliwości leczenia chorych na glejaki mózgu?

Interfering the EGFR activity — new options of therapy for patients with glial neoplasms?

Adres do korespondencji:

Dr med. Ewa Sierko
 Klinika Onkologii, Uniwersytet Medyczny
 w Białymstoku
 Białostockie Centrum Onkologii
 ul. Ogrodowa 12, 15-027 Białystok
 Tel.: +48 (85) 664 67 34,
 faks: +48 (85) 664 67 83
 e-mail: ewa.sierko@iq.pl,
 mzwojtukiewicz@gmail.com

STRESZCZENIE

Najczęstszymi nowotworami mózgu u dorosłych są glejaki, głównie gwiaździki G IV według WHO. Amplifikację genu odpowiedzialnego za syntezę EGFR lub nadmierną ekspresję tego białka stwierdza się w 40–60% przypadków glejaków wielopostaciowych, natomiast zaburzenia te rzadko spotykane są w glejakach o niższym stopniu złośliwości. W około 40% przypadków glejaków charakteryzujących się amplifikacją *EGFR* stwierdza się również występowanie mutacji tego genu (*EGFRvIII*), której produkt występuje w komórkach najczęściej wraz z niezmienioną formą tego receptora (*wild type* EGFR) i wykazuje większą onkogenność od prawidłowej formy EGFR. Jedną w głównych metod leczenia chorych na glejaki jest radioterapia, która prowadzi do powstawania uszkodzeń DNA, zaś EGFR odgrywa ważną rolę w procesie naprawy tych uszkodzeń (szczególnie uszkodzeń podwójnej nici DNA — DSBs), co prowadzi do radiooporności nowotworów. Zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko EGFR lub drobnocząsteczkowych inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR może zwiększać wrażliwość komórek nowotworowych na działanie promieniowania jonizującego. Najczęściej testowanymi lekami w terapii celowanej chorych na glejaki wielopostaciowe są drobnocząsteczkowe inhibitory kinazy tyrozynowej — erlotynib (hamuje aktywność zarówno EGFR, jak i EGFRvIII) i gefitynib (inhibitor jedynie EGFR). Pomimo zachęcających wyników badań I fazy wyniki badań II fazy nie są zbyt optymistyczne. Z kolei przeciwciała przeciwko EGFR i/lub EGFRvIII (np. cetuksymab i nimotuzumab) charakteryzują się dużą masą cząsteczkową, stąd też mogą być nieefektywne ze względu na istnienie bariery krew–mózg. Prowadzi się próby użycia antysensownych RNA, rybozymów i interferencji z RNA. Przyszłe badania nad hamowaniem aktywności szlaków wewnątrzkomórkowych w glejakach powinny koncentrować się na lepszym poznaniu tak zwanego „podpisu genetycznego” poszczególnych podtypów glejaków wielopostaciowych i kojarzeniu metod leczenia celowanego i konwencjonalnego.

Słowa kluczowe: EGFR, EGFRvIII, receptor czynnika wzrostu naskórka, glejaki mózgu, leczenie celowane

ABSTRACT

Glial neoplasms (mainly — astrocytomas GIV acc. to WHO classification) are the most often diagnosed malignant brain tumors in adults. *EGFR* amplification or overexpression of the protein is observed in 40–60% of glioblastoma multiforme, while such abnormalities are rarely detected in glial neoplasms of lower degree of malignancy. In approx. 40% of cases of glial tumors with *EGFR* amplification, *EGFR* mutation variant III (*EGFRvIII*) is also detected. EGFRvIII is usually coexpressed with wild type EGFR. EGFRvIII is more oncogenic than EGFR. One of the main methods of treatment of glioblastoma multiforme patients is radiotherapy, which leads to DNA damage. EGFR activity exerts an important role in DNA repair (particularly in double strand breaks — DSBs), which results in radioresistance. Administration of antibodies directed to EGFR or tyrosine kinase inhibitors leads to increased radiosensitivity. Erlotinib (inhibiting the

activity of both EGFR and EGFRvIII) as well as gefitinib (counteracting exclusively EGFR activity) are the most often tested novel, EGFR-directed options of targeted therapy in patients suffering from glioblastoma multiforme. Despite encouraging data obtained from phase I studies, results of phase II studies are not so optimistic. In turn, monoclonal antibodies directed to EGFR and/or EGFRvIII (eg. cetuximab, nimotuzumab) are characterized by large molecular weight, therefore their administration in glial neoplasm patients may be ineffective due to blood-brain barrier. Preclinical studies testing antisense RNA, ribozymes and RNA interference are ongoing. Future experimental directions should focus on better understanding of genetic signature of different types of glial neoplasms as well as possibilities of combining molecularly directed therapy with conventional anticancer treatment.

Key words: EGFR, EGFRvIII, epidermal growth factor receptor, glial neoplasms, targeted therapy

Onkol. Prak. Klin. 2011; 7, 4: 215–223

Wstęp

Najczęstszymi nowotworami mózgu u dorosłych są glejaki, zaś spośród nich — glejaki wielopostaciowe klasyfikowane jako gwiazdki G IV według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organisation*) [1]. W leczeniu radykalnym stosuje się leczenie chirurgiczne, uzupełnione radioterapią frakcjonowaną, skojarzoną z jednocześnie i sekwencyjnie podawanym temozolomidem [1]. Jednak wyniki leczenia w tej grupie chorych są wysoce niezadowolające, gdyż mediana przeżycia wynosi zaledwie 14, 6 miesiąca [2].

Od wielu lat trwają intensywne badania nad biologią receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR, *epidermal growth factor receptor*). Dzieje się tak z kilku powodów. Mianowicie odgrywa on istotną rolę w patogenezie nowotworów złośliwych, przyczynia się do oporności na leczenie przeciwnowotworowe oraz jest atrakcyjnym punktem uchwytu terapii ukierunkowanej na cele molekularne. Aktywacja tego receptora prowadzi do pobudzenia proliferacji i wywiera efekt troficzny na szereg komórek [3].

Klinicznie i cytogenetycznie wyróżnia się dwa typy glejaków wielopostaciowych — rozwijające się *de novo* (pierwotne) lub tak zwane wtórne, powstające z powoli wzrastających (ok. 4–5 lat) glejaków o niższym stopniu złośliwości histopatologicznej. Te ostatnie zazwyczaj stwierdza się u młodszych osób (ok. 45. roku życia), a komórki tych guzów charakteryzują się między innymi występowaniem aberracji genów kodujących receptor czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGFR, *platelet derived growth factor receptor*) i TP53 [4]. Natomiast genom pierwotnych glejaków wielopostaciowych, które rozwijają się szybko (objawy kliniczne pojawiają się ok. 6 miesięcy przed rozpoznaniem) i dotyczą ludzi starszych (ok. 60 rż.), zawiera mutacje w genach kodujących EGFR, inhibitor 2A kinaz zależnych od cyklin (CDKN2A, *cyklin-dependent kinase inhibitor 2A*) i charakteryzuje się utratą heterozygotyczności (LOH, *loss of heterozygosity*) na chromosomie 10q25,

na którym znajdują się geny *PTEN (phosphatase and tensin homolog)* [5].

Amplifikację genu odpowiedzialnego za syntezę EGFR lub nadmierną ekspresję tego białka stwierdza się w 40–60% przypadków glejaków wielopostaciowych, natomiast w ok. 40% przypadków tych nowotworów charakteryzujących się amplifikacją *EGFR* stwierdza się również występowanie mutacji tego genu [6]. Jedynie w 5% glejaków wielopostaciowych występuje ekspresja EGFR bez współistniejącej amplifikacji genu kodującego syntezę tego receptora, jednak we wszystkich tych przypadkach forma zmutowana receptora współistnieje z prawidłową jego wersją [7]. Co ciekawe, amplifikacja i nadmierna ekspresja EGFR często charakteryzują komórki glejaków wielopostaciowych, natomiast są rzadkie w glejakach o niższym stopniu złośliwości [8, 9]. Najczęściej występującą mutacją genu odpowiedzialnego za syntezę EGFR jest mutacja typu III (*EGFRvIII, EGFR-vIII*) [8, 9]. Ta forma EGFR powstaje wskutek delecji eksonów 2.–7. genu kodującego syntezę EGFR, co skutkuje brakiem 267 aminokwasów domeny zewnątrzkomórkowej receptora [3, 8, 10]. Traci on wówczas zdolność wiązania fizjologicznych ligandów i jest stale aktywny, prowadząc do ciągłej aktywacji szlaków odpowiedzialnych za wzrost (RAS/RAF/MAPK) i przeżycie komórek (PI3K) [6]. Co ważne, w komórkach glejaków wielopostaciowych EGFRvIII występuje najczęściej wraz z niezmienną formą tego receptora (*wild type EGFR*) [8, 10]. W komórkach około 55% tych nowotworów występuje niezmienną formą EGFR, podczas gdy w około 30% istnieją obie jego formy (niezmienną i zmutowaną) [11]. Zaobserwowano również współwystępowanie EGFR i ligandów wiążących się z tym receptorem, co wskazuje na autokrynne i parakrynne szlaki aktywacji EGFR sprzyjające progresji nowotworu [8–10, 12–14]. Wyniki licznych badań wskazują, że zmutowana postać EGFR (tj. EGFRvIII) jest bardziej onkogeniczna niż niezmienną formą tego receptora (EGFR) [15–18]. Aktywność EGFRvIII może wpływać na przeżycie komórek, ich proliferację, mobilność i inwazyjność, jak też na oporność na zastosowane leczenie przeciwnowotworowe [17, 19–22].

Istnieje kilka podtypów histologicznych glejaków wielopostaciowych: pleomorficzny (*pleomorphic cell GMF*), gemistocytarny (*gemistocytic GMF*), z komponentem *oligodendroglioma* (*GMF with oligodendroglioma component*), drobnokomórkowy (*small cell GMF*), glejakomięsak (*gliosarcoma*), wielkokomórkowy (*giant cell GMF*) oraz wariant mieszany tego nowotworu [23]. Okazuje się, że poszczególne podtypy histologiczne glejaka wielopostaciowego różnią się między sobą stanem EGFR. W glejakach drobnokomórkowych amplifikacja genu kodującego EGFR jest stosunkowo częsta (69% przypadków), zaś w wielkokomórkowych — rzadka (6% przypadków) lub nie występuje wcale, jak to ma miejsce w glejakomięsakach [24–27]. Podobnie ekspresja EGFR i EGFRvIII jest częstsza w drobnokomórkowych glejakach wielopostaciowych niż w innych typach tego nowotworu (odpowiednio 83% i 35% vs. 50% i 21%) [25]. Co ciekawe, w niektórych glejakach wielopostaciowych prawie wszystkie komórki nowotworu charakteryzują się obecnością amplifikacji genu kodującego EGFR, zaś w innych — tylko część z nich (10–60%), zlokalizowanych w różnych okolicach nowotworu, zazwyczaj na jego obrzeżach [28, 29].

EGFR a rokowanie

Wykazano, że w glejakach wielopostaciowych (glejaki G IV) obecność EGFRvIII nie ma wpływu na rokowanie [7]. Z kolei w glejakach anaplastycznych (G III), choć występowanie EGFRvIII jest zdecydowanie rzadsze niż w glejakach G IV (6% vs. 31%), koreluje ono z zachowaniem nowotworu podobnym do glejaków wielopostaciowych [7, 25]. Stąd też uważa się, że taka sytuacja kliniczna przedstawia raczej błędne rozpoznanie wynikające ze zbadania zbyt skąpego materiału histopatologicznego i niedoszacowania złośliwości nowotworu. Amplifikacje genu kodującego EGFR w komórkach glejaków uznaje się za cechę patognomiczną glejaka wielopostaciowego, co może stać się przydatnym narzędziem w neurodiagnostyce. W ogólnej populacji chorych na glejaka wielopostaciowego obecność amplifikacji *EGFR* czy nadmiernej ekspresji EGFR nie ma wartości rokowniczej. Natomiast w grupie młodszych chorych amplifikacja *EGFR* wiąże się z gorszym rokowaniem, zaś u osób starszych — z lepszym [28, 30–33].

Przekazywanie sygnału wewnątrzkomórkowego w glejakach

Większą onkogenność EGFRvIII w stosunku do EGFR przypisuje się zmienionej kinetyce przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych. O ile EGFRvIII nie posiada pełnej domeny zewnątrzłonowej wiążącej

ligand, a więc nie ma zdolności jego wiązania, to domeny wewnętrzne obu form receptorów są identyczne. W przypadku niezmutowanej formy EGFR przyłączenie ligandu do domeny zewnętrznej receptora skutkuje szybką jego internalizacją, a następnie defosforylacją i degradacją lub recyklingiem receptora na powierzchni błony komórkowej [34]. Mutacja typu III EGFR prowadzi do stałej fosforylacji kinaz tyrozynowych domeny wewnątrzkomórkowej receptora. Ponieważ EGFRvIII nie wiąże się z ligandem, jego internalizacja przebiega powoli, co sprzyja stałemu, choć słabemu wzbudzeniu przewodnictwa wewnątrzkomórkowego na poziomie błony komórkowej [35]. Przewlekłe utrzymywanie się aktywności receptorów błonowych jest silnie mitogenne [36]. Nie jest wykluczone, że odmienna kinetyka aktywacji EGFRvIII wynika z pobudzania innych niż w przypadku EGFR szlaków wewnątrzkomórkowych. Wykazano między innymi stałą aktywację szlaku PI3K/Akt w komórkach charakteryzujących się ekspresją EGFRvIII, prowadzącą do zmniejszenia stężenia białka p27 w komórce [37–39]. Ponadto raportowano zależną od EGFRvIII aktywację Ras i ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) [40, 41]. Co ciekawe, zaobserwowano, że SHP2 poprzez działanie kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) aktywuje jedynie EGFRvIII, a nie EGFR [42]. W komórkach hodowli komórkowej U87MG aktywność EGFRvIII wiąże się ze zwiększeniem Bcl-X₁ i oporności na wywołaną chemioterapią apoptozę komórek [43]. Istnieją również doniesienia o istotnej roli aktywacji kinazy fosforylującej N-terminalną część białka Jun (JNK, *cJun N-terminal kinases*) w odpowiedzi na pobudzenia wywołane EGFRvIII [44].

Receptor EGFR aktywuje również powyższe szlaki sygnałowe we wnętrzu komórki, jednak mimo że często stwierdza się jego nadmierną ekspresję, to sygnał generowany przez ten receptor jest wyhamowywany bardziej efektywnie, ponieważ łączenie się receptora z ligandem jest ważnym elementem internalizacji receptora i zakończenia jego działania [45]. Co ciekawe jednak, zaobserwowano, że nadmierna ekspresja EGFR na powierzchni komórki prowadzi do przezwyciężenia mechanizmów prowadzących do internalizacji, defosforylacji i degradacji, co prowadzi do stałej aktywności niezmutowanej formy EGFR [46, 47]. W hodowlach glejaków wykazano obecność obu form EGFR (niezmutowanej i EGFRvIII) [21]. Indukowanie ekspresji EGFR w komórkach glejaków prowadziło do zwiększonej ekspresji licznych (aż 93) genów odpowiedzialnych nie tylko za proliferację, ale też za zahamowanie wzrostu, immunomodulację, metabolizm i transkrypcję, co sugeruje, że ta forma receptora również może być stale aktywna [21]. Dodanie EGF do hodowli komórkowej glejaków, charakteryzującej się wysoką ekspresją EGFR, prowadzi do pobudzenia transkrypcji kolejnych

genów (w sumie 159) [21]. Aktywacja transkrypcji przez niezmutowany receptor EGFR jest znacznie silniejsza w porównaniu z przewlekłą i słabą transkrypcją w przypadku EGFRvIII. Często obserwowana współekspresja EGFR i EGFRvIII nasuwa pytanie o występowanie interakcji pomiędzy tymi dwiema formami receptora EGFR w komórkach glejaków. Okazuje się, że te dwie formy receptora mogą łączyć się (heterodimeryzacja), zaś współekspresja obu tych form skutkuje większym nasileniem proliferacji komórkowej i przeżyciem [48]. Ponadto EGFRvIII indukuje ekspresję EGF wiążącego heparynę (HB-EGF, *heparin-binding EGF-like growth factor*) i czynnik wzrostu guza alfa ($TGF\alpha$, *tumor growth factor alpha*), które są ligandami dla niezmutowanego EGFR, co sugeruje, że EGFRvIII, wykorzystując EGFR, autokrynnie i parakrynnie stymuluje komórki glejaków [21]. Powyższe mechanizmy mogą sprzyjać osiągnięciu autonomii przez komórki glejaków [49], tym bardziej, że wykazano współwystępowanie zarówno EGFR i $TGF\alpha$, oraz EGFR i EGF w glejakach charakteryzujących się amplifikacją EGFR [13, 14]. Ponadto, o ile ekspresja wyłącznie EGFR wiąże się ze średnio nasiloną transformacją komórek glejaków, to współwystępowanie tego receptora i jego liganda — $TGF\alpha$ powoduje bardzo nasiloną transformację komórek [50]. Co więcej, postępowanie mające na celu neutralizowanie liganda — $TGF\alpha$ prowadzi do zahamowania wzrostu guza, w których zaobserwowano istnienie takich auto- i parakrynnych zależności [13, 51]. Z kolei eksperymentalne potwierdzenie istnienia autokrynnych oddziaływań w odniesieniu do EGFRvIII pochodzi z badań wykazujących, że zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko HB-EGF (ale nie $TGF\alpha$) skutkowało zahamowaniem zależnej od EGFRvIII proliferacji komórek glejaków [21]. Stwierdzono również współekspresję HB-EGF i EGFRvIII w komórkach tych nowotworów [21]. Warto nadmienić, że obecność EGFRvIII w komórkach glejaków wiąże się również z występowaniem receptora A_2 dla EPH ($EphA_2$, *ephrin type A receptor 2*), interleukiny-8, MAP4K4, FOSL1 (*Fos-related antigen 1*), EMP1 (*epithelial membrane protein 1*) oraz DUSP6 (*dual specificity phosphatase 6*), które są składowymi wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za onkogenezę [21].

EGFRvIII a naprawa uszkodzeń DNA w glejakach

Jedną w głównych metod leczenia chorych na glijaka jest radioterapia, która prowadzi do powstawania uszkodzeń DNA. Badania przeprowadzone w ostatnim czasie wskazują, że EGFR odgrywa ważną rolę w procesie naprawy tych uszkodzeń (szczególnie uszkodzeń podwójnej nici DNA (DSBs, *double strand breaks*), co

proceedzi do radiooporności nowotworów [52]. Zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko EGFR lub drobnocząsteczkowych inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR może zwiększać wrażliwość komórek nowotworowych na działanie promieniowania jonizującego [22, 53–55]. Zastosowanie radioterapii prowadzi do szybkiej i przejściowej fosforylacji EGFR [56–59], a także indukuje translokację zaktywowanego receptora do jądra komórkowego [60]. W jądrze EGFR łączy się z DNA-PKcs (podjednostka katalityczna kinazy białkowej 5 zależnej od DNA), co prowadzi do aktywacji tej ostatniej [61]. DNA-PKcs jest kluczowym enzymem naprawy pęknięć podwójnej nici DNA polegającej na niehomologicznym łączeniu końców (NHEJ, *nonhomologous end joining*) [62]. Przeciwciała skierowane przeciwko EGFR — cetuksymab — hamuje translokację receptora do jądra komórkowego i jego interakcję z DNA-PKcs, co zwiększa radiowrażliwość nowotworu [63]. Zwraca się również uwagę na wpływ elementów szlaków sygnałowych PI3K/Akt i MAPK na aktywność DNA-PK, kwestionując jednocześnie wagę bezpośredniej interakcji EGFR z DNA-PK [22, 54, 55, 64–68]. W komórkach raka płuca obecność mutacji w domenie kinazy tyrozynowej wiąże się z zahamowaniem DSBs, między innymi poprzez zahamowaną translokację EGFR do jądra komórkowego [54, 55]. Jednak w komórkach glejaków wielopostaciowych najczęstszą mutacją jest EGFRvIII [69]. Podobnie do niezmutowanego EGFR ta forma receptora również ulega fosforylacji pod wpływem promieniowania jonizującego, przy czym aktywacja EGFRvIII jest znacznie silniejsza niż EGFR [70]. Wykazano, że EGFRvIII sprzyja radiooporności glejaków wielopostaciowych poprzez zwiększoną aktywację DNA-PKcs [22]. Co ciekawe, w ludzkich komórkach glejaków lub guzach mózgu wzrastających w modelach zwierzęcych nie zaobserwowano translokacji EGFR pod wpływem promieniowania jonizującego [22]. W związku z tym w przypadku glejaków pobudzenie EGFRvIII pod wpływem promieniowania jonizującego prawdopodobnie prowadzi do aktywacji pewnych szlaków sygnałowych, których elementy wpływają na skuteczną naprawę DSBs. Mimo że przyłączenie liganda do EGFR powoduje aktywację szlaków zarówno RAS-RAF-MAPK, jak i PI3K-Akt [69], to aktywność EGFRvIII prowadzi głównie do pobudzenia przekaźnictwa w szlaku PI3K-Akt [70]. Uważa się więc, że radiooporność wywołana aktywnością EGFRvIII jest wynikiem aktywności szlaku zależnego od PI3K [23]. Aktywne białko Akt zapobiega apoptozie komórek poprzez hamowanie proapoptotycznego białka BAD (*BCL2 antagonist of cell death*) i prokaspazy-9, a także stymuluje proliferację komórek poprzez aktywację mTOR (*mammalian target of rapamycin*) [71, 72]. Również aktywnemu białku Akt przypisuje się udział w naprawie DNA. Napromienienie komórek prowadzi do fosforylacji białka Akt w miejscach: treoniny w pozycji

308 i seryny w pozycji 473 łańcucha polipeptydowego [56, 73]. Zahamowanie aktywności szlaku PI3K-Akt poprzez zastosowanie drobnocząsteczkowych inhibitorów upośledza naprawę DSBs w glejakach wielopostaciowych i zwiększa promieniowrażliwość [66]. Ponadto nadmierna aktywność powyższego szlaku sygnałowego wywołana delecją genu odpowiedzialnego za syntezę PTEN także sprzyja naprawie DSBs i radiooporności [66]. Inhibitor PI3K — LY294002 — znosi naprawę DSBs wywołaną nadmierną ekspresją EGFRvIII [22]. Ponadto w astrocytach ekspresja stale aktywnego Akt naśladuje efekt stymulacji naprawy DSBs wywołanej przez aktywność EGFRvIII [22]. Co ciekawe, ostatnio donoszono, że Akt pod wpływem promieniowania jonizującego przedostaje się do jądra komórkowego i łączy się z DNA-PK w miejscach naprawy uszkodzeń popromiennych DSNA [74–76]. Aktywacja DNA-PKcs wymaga fosforylacji reszt serynowo-treoninowych [61, 62]. Ponieważ białko Akt jest kinazą serynowo-treoninową, nie jest wykluczone, że nadmierna aktywność DNA-PKcs wywołana stałą aktywnością EGFRvIII w rzeczywistości zależy od działania Akt [23]. Problem ten jednak wymaga jeszcze dogłębnych badań.

Próby klinicznego zastosowania leków interferujących z aktywnością EGFR w leczeniu chorych na glejaki wielopostaciowe

Inhibitory kinazy tyrozynowej

Najczęściej testowanymi lekami w leczeniu chorych na glejaki wielopostaciowe są drobnocząsteczkowe inhibitory kinazy tyrozynowej: erlotynib i gefitynib. Należy podkreślić, że podczas gdy gefitynib blokuje aktywność jedynie niezmutowanej formy EGFR, to erlotynib hamuje zarówno EGFR, jak i EGFRvIII [77]. Erlotynib zmniejsza ekspresję EGFRvIII w transformowanych komórkach glejaków i hamuje indukowanie wielu genów kodujących białka stymulujące inwazję nowotworu [78]. W badaniach eksperymentalnych zaobserwowano, że gefitynib wywiera mniejszy niż erlotynib wpływ na inwazyjność komórek wywodzących się z glejaków wielopostaciowych [79–82]. Warto pamiętać, że gefitynib jest najskuteczniejszy w przypadku obecności mutacji punktowej w eksonach 19. i 21. genu kodującego syntezę EGFR, zaś w glejakach wyjątkowo rzadko obserwuje się występowanie powyższych mutacji [80–82]. Oba inhibitory kinazy tyrozynowej charakteryzowały się korzystnym profilem bezpieczeństwa w badaniach I fazy przeprowadzonych u chorych na glejaki wielopostaciowe [80, 83]. Warto jednak zaznaczyć, że zaobserwowano, iż leki przeciwdrgawkowe, takie jak fenytoina czy karbamazepina, zwiększały metabolizm gefitynibu i erlotynibu. Implikuje

to konieczność stosowania leków przeciwdrgawkowych trzeciej generacji lub zwiększania dawki inhibitorów kinazy tyrozynowej u pacjentów otrzymujących leki przeciwdrgawkowe stymulujące enzymy wątrobowe [84]. Pierwsze badanie nad skutecznością erlotynibu u chorych na nawrotowego glejaka wielopostaciowego było zachęcające, ponieważ u 25% chorych uzyskano częściową odpowiedź (PR, *partial response*) lub stabilizację choroby (SD, *stable disease*) [85]. W dotychczas jedynym randomizowanym, kontrolowanym badaniu II fazy wykazano, że tylko u 11,4% pacjentów leczonych erlotynibem z powodu nawrotu glejaka wielopostaciowego uzyskano 6-miesięczny okres wolny od progresji choroby (PFS, *progression-free survival*), podczas gdy u chorych leczonych temozolomidem lub karmustyną (BCNU) odsetek ten wynosił 24,1% [86]. Ponadto nie wykazano istotnych różnic w zakresie przeżycia całkowitego w obu badanych grupach (7,7 miesiąca u leczonych erlotynibem vs. 7,3 miesiąca u pacjentów poddanych terapii temozolomidem lub BCNU) [86]. Natomiast u chorych leczonych gefitynibem PFS powyżej 6 miesięcy stwierdzono u 13% pacjentów [87], lecz nie zaobserwowano obiektywnych odpowiedzi, ani istotnej poprawy w przeżyciu całkowitym lub PFS w porównaniu z wynikami badań historycznych [88]. W innym badaniu, realizowanym w Ameryce Północnej, wykazano, że podanie gefitynibu w chorobie nawrotowej (po uprzednio zastosowanej radioterapii) skutkowało częściową odpowiedzią u 13% chorych na glejaka wielopostaciowego i 12% chorych na glejaka anaplastycznego [89]. Co ciekawe, nie uwidoczniło się zależności pomiędzy odpowiedzią kliniczną na leczenie erlotynibem czy gefitynibem, a amplifikacją genu kodującego EGFR, czy obecnością mutacji EGFRvIII [85–87, 90].

Pomimo zachęcających wyników badań I fazy wyniki badań II fazy nie są specjalnie optymistyczne. Biorąc pod uwagę małe wymiary cząsteczek inhibitorów kinaz tyrozynowych, spodziewano się dobrej penetracji tych leków przez barierę krew–mózg. Jednak masa cząsteczkowa obu inhibitorów przekracza 400 kD i w związku z tym osiąga górną granicę przenikalności cząsteczek przez tę barierę. Ponadto erlotynib i gefitynib są związkami spolaryzowanymi. Dotychczasowe dane dotyczące przechodzenia cząsteczek tych inhibitorów do centralnego układu nerwowego są skąpe. U 8-letniego chłopca leczonego erlotynibem w dawce 75 mg dziennie w płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdzono 7-procentowe stężenie tego leku oraz 9-procentowe stężenie metabolitów erlotynibu [91]. U chorych poddanych leczeniu erlotynibem w dawce 150 mg dziennie w ciągu tygodnia przed zabiegiem operacyjnym z powodu glejaka wielopostaciowego odnotowano stałe stężenie erlotynibu i demetylowanego erlotynibu (OSI-420) w tkankach nowotworu [92]. Stężenie erlotynibu i OSI-420 w masie guza stanowiło odpowiednio 6–8% i 5–11% w porówna-

niu ze stężeniem tego leku w osoczu krwi tych chorych [92]. Powyższe obserwacje sugerują więc, że suboptymalne wyniki leczenia chorych na glejaka wielopostaciowego przy wykorzystaniu erlotynibu lub gefitynibu mogą zależeć od zbyt małego stężenia leku w tkance nowotworu.

Poprawy wyników leczenia polegającego na interferowaniu z funkcją EGFR można oczekiwać poprzez skojarzenie go z innym postępowaniem ukierunkowanym molekularnie lub z leczeniem konwencjonalnym. Otóż w badaniach I fazy u chorych z nawrotem glejaka wielopostaciowego stosując skojarzenie erlotynibu i syrolimusu (inhibitora mTOR), doprowadzające do blokowania szlaku przewodnictwa wewnątrzkomórkowego na różnych poziomach, uzyskano stabilizację choroby u 13/34 (38%) pacjentów, zaś u 2/34 (6%) odnotowano częściową odpowiedź [93]. Potrzebne są jednak dalsze badania, których celem będzie zidentyfikowanie głównych elementów tego szlaku, najbardziej istotnych w poszczególnych podgrupach glejaków wielopostaciowych oraz poznanie pełnego spektrum aktywności przeciwnowotworowej i interakcji poszczególnych leków ukierunkowanych molekularnie.

Przeciwciała monoklonalne

Innym sposobem hamowania aktywności EGFR jest uniemożliwienie wiązania fizjologicznego liganda poprzez zastosowanie przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko domenie zewnątrzkomórkowej EGFR. Jednak przeciwciała charakteryzują się dużą masą cząsteczkową i pomimo zwiększonej przepuszczalności w obrębie guzów nowotworowych ich zastosowanie może być nieefektywne z uwagi na istnienie bariery krew–mózg [94]. W badaniach przedklinicznych zastosowanie cetuksymabu w zwierzęcych modelach glejaków wielopostaciowych wzrastających jako wewnątrz- i pozaczaskowe przeszczepy ksenigraficzne prowadziło do zahamowania proliferacji komórek nowotworu i nasilonej apoptozy tych komórek, aczkolwiek efekt był bardziej widoczny w guzach wzrastających pozaczaskowo [95, 96]. Aktualnie trwa badanie I–II fazy oceniające skuteczność skojarzenia radioterapii, temozolomidu i cetuksymabu w leczeniu chorych na pierwotnego glejaka wielopostaciowego [97]. Z kolei zastosowanie nimotuzumabu (humanizowanego przeciwciała przeciwko EGFR) w połączeniu z radioterapią u chorych z *de novo* rozpoznany glejakiem wielopostaciowym (badanie I–II fazy) prowadziło do uzyskania całkowitej remisji guza u 16/24 pacjentów, częściowej regresji u 21%, zaś u 46% chorych obserwowano stabilizację choroby [98]. Aktualnie trwa badanie III fazy porównujące efektywność radioterapii skojarzonej z temozolomidem (podawanym jednocześnie z radioterapią, a następnie w monoterapii jako leczenie uzupełniające) w porównaniu ze skutecznością wyżej wymienionego postępowania, ale

w połączeniu z nimotuzumabem. Podejmuje się również próby łączenia toksyn lub radioizotopów z przeciwciałami skierowanymi przeciwko EGFR. Między innymi zastosowanie ¹²⁵J-Mab 425 z radioterapią prowadziło do istotnego wydłużenia przeżyć u chorych na glejaka wielopostaciowego w porównaniu z wyłączną radioterapią [99]. Koniugaty toksyn (*Pseudomonas endotoxin A*) z przeciwciałem wiążącym się z EGFR charakteryzowały się korzystnym profilem stabilności i działaniem przeciwnowotworowym [100]. Jeszcze innym kierunkiem poszukiwań skutecznego leczenia przeciwnowotworowego jest wykorzystanie ligandów EGFR połączonych z toksynami. Jednym z takich przykładów jest koniugat składający się z ligandu (TGF- α) i zmutowanej toksyny (*Pseudomonas endotoxin*) o nazwie PE-38 [101]. Konstruowane są również koniugaty ukierunkowane na EGFRvIII, takie jak Mab 806 czy 3C10 [102, 103].

Niedostateczne przenikanie leków wielkocząsteczkowych do ośrodkowego układu nerwowego przez barierę krew–mózg, prowadzące do niewystarczającego stężenia leku w tym obszarze, stwarza duży problem w tego typu terapii chorych na glejaki wielopostaciowe. Stąd też opracowywane są metody zwiększenia efektywności tych leków w obrębie mózgowia, np. zastosowanie podwyższonego ciśnienia, którego celem jest zwiększenie przestrzennej dystrybucji leku, czy chirurgiczne założenie cewników w obręb glejaków mózgu [104].

Inne sposoby interferowania z aktywnością EGFR

Inne metody hamowania aktywności EGFR w obrębie glejaków wielopostaciowych obejmują zastosowanie antysensownych RNA, rybozymów i interferencję RNA. Antysensowne RNA ulegają hybrydyzacji z sensownymi mRNA, hamując translację informacji genetycznej i syntezy białka. W badaniach przedklinicznych testowano zastosowanie antysensownych RNA skierowanych przeciw mRNA kodujących syntezę EGFR poprzez podanie leków bezpośrednio w obrębie glejaków (podczas zabiegu chirurgicznego) i dożylnie [102]. Prowadziło to do zahamowania syntezy EGFR i w konsekwencji zahamowania wzrostu nowotworu [103]. Podobnie iniekcje w obręb glejaków wektorów wirusowych lub plazmidowych wykazujących ekspresję antysensownych mRNA dla EGFRvIII prowadziły do zmniejszenia objętości nowotworów wzrastających w warunkach eksperymentalnych [104]. Natomiast interferencja z RNA polega na tym, że podwójnoniciowe RNA poddawane są lizie na małe interferujące fragmenty (siRNAs, *small interfering RNAs*), które powodują supresję genów homologicznych i indukują degradację mRNA zależną od sekwencji. W badaniach eksperymentalnych zastosowanie siRNAs ukierunkowanych na zahamowanie syntezy domeny wewnątrzkomórkowej EGFR w ludzkich glejakach

U251 prowadziło do 90-procentowego zahamowania aktywności szlaku przekazywania wewnątrzkomórkowego zależnego od EGFR [105]. Z kolei rybozomy stanowią podtyp małych cząsteczek RNA (m.in. rybozomy *hammerhead* i *hairpin*), które katalitycznie trawią substraty RNA, dając efekt podobny do antysensownych RNA. Dostarczane są one do guza przy udziale wektorów wirusowych lub plazmidów. W badaniach przedklinicznych rybozomy skierowane przeciwko EGFRvIII działały hamująco w stosunku do aktywności komórek glejaków wielopostaciowych [106].

Podsumowanie

Istnieje wiele danych wskazujących na fakt udziału EGFR i EGFRvIII w biologii glejaków mózgu. Z tego powodu wydaje się, że terapie ukierunkowane na blokowanie szlaku przekazywania wewnątrzkomórkowego zależnego od tego receptora mogą być obiecującą opcją postępowania terapeutycznego u chorych na glejaki (szczególnie glejaki wielopostaciowe). Dotychczas najwięcej doświadczeń klinicznych zdobyto w odniesieniu do erlotynibu czy gefitynibu w tej grupie chorych. Jednak, mimo zachęcających przesłanek teoretycznych i wyników badań przedklinicznych, wyniki pierwszych prób klinicznych nie są w pełni zadawalające. Trwają też badania oceniające skuteczność zastosowania przeciwciał skierowanych przeciwko domenie zewnątrzkomórkowej EGFR oraz rozmaitych sposobów molekularnego interferowania z aktywnością EGFR i EGFRvIII. Przyszłe badania nad hamowaniem aktywności szlaków wewnątrzkomórkowych w glejakach powinny obejmować lepsze poznanie „podpisu genetycznego” poszczególnych podtypów glejaków wielopostaciowych i kojarzenie metod leczenia celowanego i konwencjonalnego.

Piśmiennictwo

- Stupp R., Hottinger A.F., van den Bent M.J. i wsp. Frequently asked questions in the medical management of high-grade glioma: a short guide with practical answers. *Ann. Oncol.* 2008; 19 (supl. 7): vii 209–216.
- Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J. i wsp. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Eng. J. Med.* 2005; 352: 987–996.
- Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Szambora P. Patofizjologiczne podstawy terapii ukierunkowanej na zahamowanie funkcji receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR). *Onkol. Prakt. Klin.* 2010; 6: 217–227.
- Parsons D.W., Jones S., Zhang X. i wsp. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008; 321: 1807–1812.
- Rasheed B.K., McLendon R.E., Friedman H.S. i wsp. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 1995; 10: 2243–2246.
- Frederick L., Wang X.Y., Eley G. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastoma. *Cancer Res.* 2000; 60: 1383–1387.
- Aldape K.D., Ballman K., Furth A. i wsp. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004; 63: 700–707.
- Ekstrand A.J., James C.D., Cavenee W.K. i wsp. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor α , and epidermal growth factor and their expression in human gliomas *in vivo*. *Cancer Res.* 1991; 51: 2164–2172.
- Wong A.J., Ruppert J.M., Bigner S.H. i wsp. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 2965–2969.
- Biernat W., Huang H., Yokoo H. i wsp. Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain* 2004; 14: 131–136.
- Heimberger A.B., Hlatky R., Suki D. i wsp. Prognostic effect of epidermal growth factor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 1462–1466.
- Aaronson S.A. Growth factors and cancer. *Science* 1991; 254: 1146–1153.
- Tang P., Steck P.A., Yung W.K. The autocrine loop of TGF- α /EGFR and brain tumors. *J. Neurooncol.* 1997; 35: 303–314.
- Mishima K., Higashiyama S., Asai A. i wsp. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor stimulates mitogenic signaling and is highly expressed in human malignant gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1998; 96: 322–328.
- Batra S.K., Castelino-Probu S., Wikstrand C.J. i wsp. Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ.* 1995; 6: 1251–1259.
- Moscato D.K., Montgomery R.B., Sundareshan P. i wsp. Transformational and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor. *Oncogene* 1996; 13: 85–96.
- Nagane M., Coufal F., Lin H. i wsp. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res.* 1996; 56: 5079–5086.
- Nishikawa R., Ji X.D., Harmon R.C. i wsp. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 7727–7731.
- Lal A., Glazer C.A., Martinson H.M. i wsp. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res.* 2002; 62: 3335–3339.
- Boockvar J.A., Kapitonov D., Kapoor G. i wsp. Constitutive EGFR signaling confers a motile phenotype to neural stem cells. *Mol. Cell Neurosci.* 2003; 24: 1116–1130.
- Ramnarain D.B., Park S., Lee D.Y. i wsp. Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer Res.* 2006; 66: 867–874.
- Mukherjee B., McEllin B., Camacho C.V. i wsp. EGFR-vIII and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma. *Cancer Res.* 2009; 69: 4252–4259.
- Hatanpaa K.J., Burma S., Zhao D., Habib A.A. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia* 2010; 12: 675–684.
- Burger P.C., Pearl D.K., Aldape K. i wsp. Small cell architecture — a histological equivalent of EGFR amplification in glioblastoma multiforme? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2001; 60: 1099–1104.
- Perry A., Aldape K.D., George D.H., Burger P.C. Small cell astrocytoma: an aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma. *Cancer* 2004; 101: 2318–2326.
- Reis R.M., Konu-Lebleblicioglu D., Lopes J.M. i wsp. Genetic profile of gliosarcomas. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 425–432.
- Peraud A., Watanabe K., Schwachheimer K. i wsp. Genetic profile of giant cell glioblastoma. *Lab. Invest.* 1999; 79: 123–129.
- Kleinschmidt-DeMasters B.K., Lillehei K.O., Varella-Garcia M. Glioblastomas in the older old. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2005; 129: 624–631.
- Okada Y., Hurwitz E.E., Esposito J.M. i wsp. Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence of epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer Res.* 2003; 63: 413–416.
- Simmons M.L., Lamborn K.R., Takahashi M. i wsp. Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res.* 2001; 61: 1122–1128.
- Smith J.S., Tachibana I., Passe S.M. i wsp. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic

- astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J. Natl. Cancer Int.* 2001; 93: 1246–1256.
32. Shinjima N., Tada K., Shiraishi S. i wsp. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 2003; 63: 6962–6970.
 33. Batchelor T.T., Betensky R.A., Esposito J.M. i wsp. Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 228–233.
 34. Wiley H.S. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp. Cancer Res.* 2003; 284: 78–88.
 35. Huang H.S., Nagane M., Klingbeil C.K. i wsp. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 2927–2935.
 36. Di Fiore P.P., Gill G.N. Endocytosis and mitogenic signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999; 11: 483–488.
 37. Choe G., Horvath S., Cloughesy T.F. i wsp. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling in glioblastoma patients *in vivo*. *Cancer Res.* 2003; 63: 2742–2746.
 38. Moscatello D.K., Holgado-Madruga M., Emler D.R. i wsp. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a mutually occurring mutant epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 200–206.
 39. Narita Y., Nagane M., Mishima K. i wsp. Mutant epidermal growth factor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res.* 2002; 62: 6764–6769.
 40. Prigent S.A., Nagane M., Lin H. i wsp. Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 25639–25645.
 41. Lorimer I.A., Lavictoire S.J. Activation of extracellular-regulated kinases by normal and mutant EGF receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 2001; 1538: 1–9.
 42. Zhan Y., O'Rourke D.M. SHP-2-dependent mitogen-activated protein kinase activation regulates EGFRvIII but not wild-type epidermal growth factor receptor phosphorylation and glioblastoma cell survival. *Cancer* 2004; 64: 8292–8298.
 43. Naganme M., Levitzki A., Gazit A. i wsp. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 5724–5729.
 44. Antonyak M.A., Kenyon L.C., Godwin A.K. i wsp. Elevated JNK activation contributes to the pathogenesis of human brain tumors. *Oncogene* 2002; 21: 5038–5046.
 45. Waterman H., Yarden Y. Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett.* 2001; 490: 142–152.
 46. Wiley H.S. Anomalous binding of epidermal growth factor to A431 cells is due to the effect of high receptor densities and a saturable endocytic system. *J. Cell Biol.* 1988; 107: 801–810.
 47. Luind K.A., Opreko L.K., Starbuck C. i wsp. Quantitative analysis of the endocytic system involved in hormone-induced receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 15713–15723.
 48. Luvor R.B., Zhu H.J., Walker F. i wsp. The tumor-specific de2–7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR. *Oncogene* 2004; 23: 6095–6104.
 49. Sporn M.B., Todaro G.J. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N. Engl. J. Med.* 1980; 303: 878–880.
 50. Di Marco E., Pierce J.H., Fleming T.P. i wsp. Autocrine interaction between TGF α and the EGF-receptor: quantitative requirements for induction of the malignant phenotype. *Oncogene* 1989; 4: 831–838.
 51. Filmus J., Shi W., Spencer T. Role of transforming growth factor α (TGF- α) in the transformation of non *ras*-transfected rat intestinal epithelial cells. *Oncogene* 1993; 1017–1022.
 52. Nyati M.K., Morgan M.A., Feng F.Y., Lawrence T.S. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6: 876–885.
 53. Balaban N., Moni J., Shannon M. i wsp. The effect of ionizing radiation on signal transduction: antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 1314: 147–156.
 54. Das A.K., Chen B.P., Story M.D. i wsp. Somatic mutations in the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor (EGFR) abrogate EGFR-mediated radioprotection in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 2006; 66: 9601–9608.
 55. Das A.K., Sato M., Story M.D. i wsp. Non-small-cell lung cancers with kinase domain mutations in the epidermal growth factor receptor are sensitive to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2006; 66: 9601–9608.
 56. Contessa J.N., Hampton J., Lammering G. i wsp. Ionizing radiation activates ErbB receptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. *Oncogene* 2002; 21: 4032–4041.
 57. Dent P., Reardon D.B., Park J.S. i wsp. Radiation-induced release of transforming growth factor α activates the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway in carcinoma cells, leading to increased proliferation, protection from radiation-induced cell death. *Mol. Biol. Cell.* 1999; 10: 2493–2506.
 58. Schmidt-Ullrich R.K., Mikkelsen R.B., Dent P. i wsp. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 1997; 15: 1191–1197.
 59. Schmidt-Ullrich R.K., Valerie K., Fogleman P.B., Walters J. Radiation-induced autophosphorylation of epidermal growth factor receptor in human malignant mammary and squamous epithelial cells. *Radiat. Res.* 1996; 145: 81–85.
 60. Dittmann K., Mayer C., Fehrenbachen B. i wsp. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 31182–31189.
 61. Burma S., Chen D.J. Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair* 2005; 3: 909–918.
 62. Burma S., Chen B.P., Chen D.J. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Anst.)* 2006; 5: 909–918.
 63. Dittmann K., Mayer C., Rodemann H.P. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiation. Oncol.* 2005; 76: 157–161.
 64. Akimoto T., Hunter N.R., Buchmiller L. i wsp. Inverse relationship between epidermal growth factor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 2884–2890.
 65. Golding S.E., Morgan R.N., Adams B.R. i wsp. Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in glioma cells. *Cancer Biol. Ther.* 2009; 8: 730–738.
 66. Kao G.D., Jing Z., Fernandez A.M. i wsp. Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH-kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 21206–21212.
 67. Rodemann H.P., Dittmann K., Toulany M. Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair. *Int. J. Radiat. Biol.* 2007; 83: 781–791.
 68. Toulany M., Kehlbach R., Florczak U. i wsp. Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol. Cancer Ther.* 2008; 7: 1772–1781.
 69. McLendon R.E., Turner K., Perkinson K., Rich J. Second messenger systems in human gliomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2007; 131: 1585–1590.
 70. Lammering G., Hewit T.H., Valerie K. i wsp. EGFRvIII-mediated radioresistance through a strong cytoprotective response. *Oncogene* 2003; 22: 5545–5553.
 71. Friedmann B.J., Caplin M., Savic B. i wsp. Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5: 209–218.
 72. Altomare D.A., Tesa J.R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 2005; 24: 7455–7464.
 73. Edwards E., Geng L., Tan J., Onishko H. i wsp. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2002; 62: 4671–4677.
 74. Bozulic L., Surucu B., Hynx D., Hemmings B.A. PKB α /Akt acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol. Cell* 2008; 30: 203–213.
 75. Lees-Miller S.P. PIKK-ing a new partner: a new role for PKB in the DNA damage response. *Cancer Cell* 2008; 13: 379–380.
 76. Boehme K.A., Kulikov R., Blattner C. p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105: 7785–7790.
 77. Nicholas M.K., Lukas R.V., Jafri N.F. i wsp. Epidermal growth factor receptor-mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 7261–7270.

78. Lal A., Glazer C., Martinson H. i wsp. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res.* 2002; 62: 3335–3339.
79. Halatsch M-E., Gehrke E., Vougioukas V. i wsp. Inverse correlation of epidermal growth factor receptor messenger RNA induction and suppression of anchor-age-independent growth by OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in glioblastoma multiforme cell lines. *J. Neurosurg.* 2004; 100: 523–533.
80. Paez J.G., Janne P.A., Lee J.C. i wsp. EGFR mutation in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497–1500.
81. Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R. i wsp. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 2129–2139.
82. Marie Y., Carpentier A., Omuro A. i wsp. EGFR tyrosine kinase domain mutations in human gliomas. *Neurology* 2005; 64: 1444–1445.
83. Prados M.D., Lamborn K.R., Chang S. i wsp. Phase I study of erlotinib HCl alone and combined with temozolomide in patients with stable or recurrent malignant glioma. *Neuro-oncol.* 2006; 8: 67–78.
84. Stupp R., Hegi M., van den Bent M.J. i wsp. Changing paradigms — an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *Oncologist* 2006; 11: 165–180.
85. Vogelbaum M.A., Peereboom D., Stevens G. i wsp. Phase II trial of the EGFR tyrosine kinase inhibitor erlotinib for single agent therapy of recurrent glioblastoma multiforme: interim results. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 1558.
86. Van den Bent M., Brandes A., Rampling R. i wsp. Randomized phase II trial of erlotinib (E) versus temozolomide (TMZ) or BCNU in recurrent glioblastoma multiforme (GBM): EORTC 26034. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 185 (abstract 2005).
87. Rich J.N., Reardon D.A., Peery T. i wsp. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 133–142.
88. Wong E.T., Hess K.R., Gleason M.J. i wsp. Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17: 2572–2578.
89. Lieberman F.S., Cloughesy T., Fine H. i wsp. NABTC phase I/II trial of ZD-1839 for recurrent malignant gliomas and unresectable meningiomas. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 1510.
90. Uhm J.H., Ballman K.V., Giannini C. Phase II study of ZD1839 in patients with newly diagnosed grade 4 astrocytoma. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 1505.
91. Broniscer A., Panetta J., O'Shunghnessy M. i wsp. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of erlotinib and its active metabolite OSI-420. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 1511–1515.
92. Lassman A.B., Rossi M.R., Razier J.J. i wsp. Molecular study of malignant gliomas treated with epidermal growth factor receptor inhibitors: tissue analysis from north american brain tumor consortium trials 01-03 and 00-01. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 7841–7850.
93. Reardon D.A., Quinn J.A., Vredenburgh J.J. i wsp. Phase I trial of gefitinib plus sirolimus in adults with recurrent malignant glioma. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 860–868.
94. Pardridge W.M. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRX* 2005; 2: 3–14.
95. Eller J.L., Longo S.L., Hicklin D.J., Canute G.W. Activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 against glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 2002; 51: 1005–1013.
96. Eller J.L., Longo S.L., Kyle M.M. i wsp. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab augments radiation effects in glioblastoma multiforme *in vitro* and *in vivo*. *Neurosurgery* 2005; 567: 155–162.
97. Combs S.E., Heeger S., Haselmann R. i wsp. Treatment of primary glioblastoma multiforme with cetuximab, radiotherapy, and temozolomide (GERT) — phase I/II trial study protocol. *BMC Cancer* 2006; 6: 133.
98. Ramos T.C., Figueredo J., Catala M. i wsp. Treatment of high-grade glioma patients with humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3: report from a phase I/II trial. *Cancer Biol. Ther.* 2006; 5: 375–379.
99. Quang T.S., Brady L.W. Radioimmunotherapy as a novel treatment regimen: ¹²⁵I-labeled monoclonal antibody 425 in the treatment of high-grade brain gliomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2004; 58: 972–975.
100. Lorimer I.A., Keppler-Hafkemeyer A., Beers R.A. i wsp. Recombinant immunotoxins specific for a mutant epidermal growth factor receptor: targeting with a single chain antibody variable domain isolated by phage display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 14815–14820.
101. Liu T.F., Hall P.D., Cohen K.A. i wsp. Interstitial diphtheria toxin-epidermal growth factor fusion protein therapy produces regressions of subcutaneous human glioblastoma multiforme tumors in athymic nude mice. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 329–334.
102. Takasu S., Takahashi T., Okamoto S. Radioimmunoscyntigraphy of intracranial glioma xenograft with a technetium-99m-labeled mouse monoclonal antibody specifically recognizing type III mutant epidermal growth factor receptor. *J. Neurooncol.* 2003; 63: 247–256.
103. Johns T.G., Stockert E., Ritter G. Novel monoclonal antibody specific for the de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) that also recognizes the EGFR expressed in cells containing amplification of the EGFR gene. *Int. J. Cancer* 2002; 98: 398–408.
104. Hall W.A., Rustamzadeh E., Asher A.L. Convection-enhanced delivery in clinical trials. *Neurosurg. Focus* 2003; 14: e2.
105. Zhang Y., Zhu C., Pardridge W. Antisense gene therapy of brain cancer with an artificial virus gene delivery system. *Mol. Ther.* 2002; 6: 67–72.
106. Shir A., Levitzki A. Inhibition of glioma growth by tumor-specific activation of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Nat. Biotechnol.* 2002; 20: 895–900.
107. Kang C.S., Zhang Z.Y., Jia Z.F. i wsp. Suppression of EGFR expression by antisense or small interference RNA inhibits U251 glioma cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Ther.* 2006; 13: 530–538.
108. Halatsch M.E., Schmidt U., Boetfuehr I. i wsp. Marked inhibition of glioblastoma target cell tumorigenicity *in vitro* by retrovirus-mediated transfer of a hairpin ribozyme against deletion-mutant epidermal growth factor receptor messenger RNA. *J. Neurosurg.* 2000; 92: 297–305.