

Marek Z. Wojtukiewicz^{1,2}, Paweł Szambora^{1,2}, Ewa Sierko^{1,2}

¹Klinika Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

²Białostockie Centrum Onkologii

Patofizjologiczne podstawy kojarzenia leczenia anty-EGFR z chemioterapią

Pathophysiological basis of combination of systemic chemotherapy with EGFR inhibitors

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. med. Marek Z. Wojtukiewicz
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: onkologia@umwb.edu.pl

STRESZCZENIE

Kojarzenie leczenia ukierunkowanego na zahamowanie funkcji receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR) z klasyczną chemioterapią przeciwnowotworową stanowi nową opcję terapii nowotworów złośliwych. Dotychczas nie wyjaśniono dokładnie mechanizmu interakcji tych dwóch sposobów leczenia. Wydaje się, że najistotniejszymi procesami odgrywającymi rolę podczas stosowania cytostatyków i cząsteczek blokujących funkcję EGFR są: wspólny szlak wprowadzający komórki nowotworowe na drogę apoptozy, ingerencja w mechanizmy naprawy DNA i interferencja z procesami angiogenezy.

Słowa kluczowe: receptor czynnika wzrostu naskórka, EGFR, chemioterapia, apoptoza, mechanizmy naprawy DNA, angiogeneza

ABSTRACT

Cancer patients treatment using the combination of systemic chemotherapy with EGFR inhibitors still creates multiple questions. To date the exact mechanisms of interactions between the two different therapeutic modalities have not been ultimately explained. It seems that common intercellular apoptosis pathway, inhibition of DNA repair systems, especially double strand breaks, and antiangiogenic effects play an important role in the outcome of such combined antineoplastic therapy.

Key words: epidermal growth factor receptor, EGFR, chemotherapy, apoptosis, DNA repair systems, angiogenesis

Onkol. Prak. Klin. 2010; 6, 5: 236-240

Onkologia w Praktyce Klinicznej
2010, tom 6, nr 5, 236-240
Copyright © 2010 Via Medica
ISSN 1734-3542
www.opk.viamedica.pl

Wstęp

Receptor czynnika wzrostu naskórka EGFR (*epidermal growth factor receptor*) jest białkiem przezbłonowym zbudowanym z domeny zewnętrznej wiążącej ligand oraz z domeny wewnętrznej mającej aktywność kinazy tyrozynowej. Dotychczas opracowano dwa sposoby hamowania jego funkcji biologicznej: poprzez blokowanie domeny zewnątrzkomórkowej tego białka przez swoiste przeciwciała monoklonalne i poprzez hamowanie aktywności związanej z nim kinazy tyrozynowej. Pierwszy mechanizm uniemożliwia wiązanie ligandów przez EGFR i transdukcję sygnału do wnętrza komórki, drugi

zaś uniemożliwia fosforylację tego receptora. Oba mechanizmy doprowadzają do braku wrażliwości komórki wykazującej ekspresję EGFR na proproliferacyjne czynniki środowiska komórki. Efektem zablokowania funkcji tego receptora jest między innymi zahamowanie wzrostu komórki, zmniejszenie zdolności do wejścia komórki w mitozę, większe prawdopodobieństwo pobudzenia szlaku apoptozy [1-4]. Powyższe mechanizmy są odmienne od znanych od dawna sposobów działania leków cytostatycznych, stosowanych powszechnie w leczeniu chorych na nowotwory złośliwe. Konwencjonalna chemioterapia w sposób bezpośredni doprowadza do uszkodzenia genomu komórki lub uniemożliwia napra-

wę częstych błędów pojawiających się w DNA komórek proliferujących. Akumulacja tych mutacji doprowadza do aktywacji szlaku apoptozy. Wykorzystanie obu metod leczenia systemowego — leczenia ukierunkowanego na funkcję EGFR i klasycznej chemioterapii — wiąże się z wystąpieniem powszechnie znanej w farmakologii klinicznej interakcji leków. W badaniach przedklinicznych udowodniono, że interakcja ta ma charakter co najmniej synergistyczny [5]. Leczenie to jest jednak o wiele bardziej złożone. Ponadto ingeruje ono w słabo poznane, skomplikowane mechanizmy kontrolujące funkcje życiowe komórki. Synergistyczny charakter interakcji potwierdzono w części badań klinicznych, a mianowicie między innymi podczas leczenia chorych na raka jelita grubego w zaawansowanym stadium klinicznym z wykorzystaniem cetuksumabu w skojarzeniu ze standardową chemioterapią [6, 7]. Nie zauważono jednak podobnego efektu podczas leczenia chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca w IV stadium zaawansowania choroby z wykorzystaniem gefitynibu lub erlotynibu (inhibitorów kinazy tyrozynowej) w skojarzeniu ze standardową chemioterapią dwulekową [8–11]. Dotychczasowe badania nie wyjaśniają dokładnie molekularnego mechanizmu tego zjawiska. Podkreśla się jednak rolę interakcji z wewnątrzkomórkowymi szlakami kontrolującymi apoptozę i procesy naprawy DNA. Wydaje się, że istotny wpływ na efekty skojarzonego leczenia chorych na nowotwory może mieć konstrukcja schematu biochemioterapii. Poniżej omówiono wzajemne zależności pomiędzy leczeniem chemicznym a terapią anti-EGFR, które pozostają nadal w sferze rozważań teoretycznych i wymagają dodatkowych, wnikliwych badań.

Wspólny szlak apoptozy

Komórki w warunkach patologii mają zdolność włączania mechanizmów prowadzących do autodestrukcji — apoptozy. Mechanizm tego procesu jest wieloetapowy i zależy od prawidłowego działania wielu regulatorowych białek wewnątrzkomórkowych, pro- i antyapoptotycznych, które w większości komórek pozostają w funkcjonalnej równowadze. Wyróżnia się dwie drogi aktywacji apoptozy: zewnątrzpochodną, aktywowaną poprzez przyłączenie odpowiednich ligandów do błonowych białek receptorowych, tak zwanych receptorów śmierci, między innymi FAS/APO1, RANK, DR3, DR4, receptorów dla czynnika martwicy nowotworów (TNF, *tumor necrosis factor*), oraz drogę wewnątrzpochodną, zależną od uwalniania cytochromu c z mitochondrium komórkowego. Końcową fazą aktywacji obu szlaków jest wieloetapowa, kaskadowa aktywacja układu kaspaz (w tym kaspaz 3, 6, 7), które posiadają aktywność proteo- i nukleolityczną. Efektem ich działania jest inaktywacja i destabilizacja metabolizmu komórki i jej śmierć

[12, 13]. Jednym z najlepiej poznanych mechanizmów działania cytostatyków jest proapoptotyczne działanie 5-fluorouracylu. W przypadku zastosowania tego leku dochodzi do zaburzeń funkcjonowania syntetazy tymidylowej i do wystąpienia nieprawidłowości w syntezie DNA [14–16]. Kumulacja błędów replikacyjnych prowadzi do aktywacji białka p53, które zatrzymuje cykl komórkowy w fazie S, włącza systemy naprawy DNA, a w przypadku ich niewydolności — wprowadza komórkę na drogę apoptozy. Jednym z najważniejszych sensorów uszkodzenia DNA są białka ATR i ATX z rodziny ATM (*ataxia teleangiectasia, mutated*), które mają zdolność do bezpośredniej i pośredniej (poprzez CHK1 i CHK2) aktywacji białka p53 na drodze fosforylacji [17–19]. Białko p53 inicjuje apoptozę poprzez ekspresję proapoptotycznych białek z rodziny BCL2: BAX i BAK [20]. Białka te mają zdolność do tworzenia homooligomerów, posiadających konformację dużych porów błonowych. Po ich wbudowaniu w zewnętrzną błonę mitochondriów dochodzi do uwolnienia cytochromu c z mitochondrium, a następnie aktywacji kaspaz. Białka BAX pozostają pod kontrolą innych białek z rodziny Bcl-2, Bid, mających również działanie proapoptotyczne. Dopiero po interakcji aktywnej formy Bid z BAX możliwe jest wbudowanie porów białkowych w obręb błony mitochondrialnej, jej destabilizacja i ukończenie procesu apoptozy. Z kolei aktywność białka Bid jest hamowana przez grupę białek antyapoptotycznych, również wywodzących się z rodziny Bcl-2. Są to białka Bcl-2 i Bcl-xL [14, 21–23]. Mechanizm apoptozy wywoływanej przez 5-fluorouracyl ma więc charakter wewnątrzpochodny, zależny od prawidłowo funkcjonującego białka p53 oraz od interakcji między pro- i antyapoptotycznymi białkami z rodziny Bcl-2.

Czy zatem w przypadku leków wpływających na zahamowanie funkcji EGFR drogi wprowadzania komórki w apoptozę nakładają się na siebie, wykluczają się wzajemnie czy też dochodzi do wzmocnienia sygnału proapoptotycznego? W badaniach klinicznych z udziałem chorych na raka niedrobnokomórkowego płuca w zaawansowanym stadium klinicznym choroby, leczonych inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR zauważono, że w przypadku mutacji tego receptora głównym szlakiem transdukcji sygnału do efektorów komórkowych jest szlak z udziałem białek STAT (*signal transducers and activators of transcription*). Głównym skutkiem aktywacji tej drogi przekaźnictwa jest zahamowanie apoptozy, a zastosowanie gefitynibu lub erlotynibu prowadzi do apoptozy komórek guza [24]. Aktywowane białka STAT, będące czynnikami transkrypcyjnymi, przemieszczają się do jądra komórkowego i wiążą z sekwencjami promotorynymi dla białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-xL, co wiąże się z ich ekspresją [25]. Zahamowanie syntezy tych białek prowadzi do zwiększenia aktywacji BAX poprzez białko Bid, co w efekcie doprowadza do wbudowania kompleksów destabilizujących błony mitochondriów,

uwolnienia cytochromu c, aktywacji kaspaz i apoptozy komórki. Zahamowanie funkcji receptora EGFR prowadzi więc do zniesienia protekcyjnego wpływu białek Bcl-2 i umożliwia finalizację szlaku aktywacji śmierci komórki poprzez 5-fluorouracyl. Możliwe, że ten sam mechanizm wpływa na obserwowane w badaniach klinicznych efekty kojarzenia chemioterapii z leczeniem ukierunkowanym na zahamowanie funkcji receptora EGFR.

Związek EGFR z mechanizmami naprawy DNA

W badaniach przedklinicznych z wykorzystaniem hodowli komórek raka jelita grubego DiFi, inkubowanych w obecności przeciwciała skierowanego przeciwko receptorowi EGFR — mAb 225 — zaobserwowano wpływ obecności tego przeciwciała na zmniejszenie stężenia kinazy białkowej zależnej od DNA w porównaniu z kontrolną hodowlą komórek DiFi [26]. Kinaza białkowa zależna od DNA jest głównym enzymem systemu naprawy podwójnych pęknięć DNA poprzez wiązanie końców niehomologicznych (NHEJ, *non-homologous end joining*). Jest to białko składające się z 3 podjednostek: głównej DNA-PKcs (470 kDa) oraz dwóch mniejszych, odpowiadających za wiązanie się z wolnymi końcami DNA — Ku70 (69 kDa) i Ku80 (83 kDa). Naprawa uszkodzeń katalizowana przez tę kinazę białkową odbywa się na zasadzie niehomologicznego łączenia końców DNA: 3'OH i 5'P w obecności ATP, a system naprawy jest — w przeciwieństwie do innych mechanizmów naprawy — włączony przez cały okres cyklu komórkowego [26]. W przytaczanym badaniu obserwowano aż 75-procentowe zmniejszenie aktywności kinazy białkowej zależnej od DNA w komórkach DiFi. Obniżenie wydajności tego systemu naprawy może mieć związek z proapoptotyczną odpowiedzią komórki na cystostatyki, takie jak antracykliny, irynotekan, które doprowadzają do przerwania ciągłości podwójnej helisy DNA. Być może efektem zniesienia cytoprotekcyjnego wpływu prawidłowo stymulowanego EGFR jest również zmniejszenie wydajności innych mechanizmów naprawy: poprzez wycięcie nukleotydu (NER, *nucleotide excision repair*) lub poprzez wycinanie zasady (BER, *base excision repair*). W badaniu klinicznym z udziałem chorych na raka jelita grubego w IV stopniu zaawansowania klinicznego choroby, u których występowała oporność na leczenie irynotekaniem (progresa w trakcie leczenia lub w ciągu miesiąca od jego zakończenia), zastosowano leczenie cetuksymabem w monoterapii lub ponownie włączono irynotekan, ale w skojarzeniu z cetuksymabem [7]. Obiektywne odpowiedzi na leczenie (*response rate*) zaobserwowano u 25,2% pacjentów poddanych terapii skojarzonej oraz u 14,1% w grupie leczonych cetuksymabem w monoterapii. W badaniu tym pod-

kreśla się fakt przełamania oporności na irynotekan w przypadku skojarzenia tej chemioterapii z leczeniem ukierunkowanym na zahamowanie EGFR. W dyskusji autorzy publikacji podnoszą kilka prawdopodobnych mechanizmów uczestniczących w tym zjawisku, między innymi osłabienie zdolności komórek do naprawy DNA. Mechanizm działania irynotekanu, który hamuje topoiomerazę I w momencie, gdy ta doprowadza do przerwania ciągłości DNA, może mieć istotne znaczenie w kojarzeniu leczenia tym cytostatykiem z inhibitorami funkcji EGFR, zmniejszającymi zdolność komórki do naprawy powstałego uszkodzenia.

Interakcje EGFR z procesami angiogenezy

Poza wpływem prawidłowo funkcjonującego EGFR na proliferację i dojrzewanie komórek oraz działaniem cytoprotekcyjnym interesująca jest proangiogenna funkcja tej cząsteczki. Aktywacja EGFR prowadzi bowiem do pobudzania syntezy czynników stymulujących powstawanie nowych naczyń krwionośnych, takich jak: czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF, *basal fibroblast growth factor*), transformujący czynnik wzrostu alfa (TGF- α , *transforming growth factor alpha*), interleukina 8 (IL-8, *interleukin 8*) [27, 28]. Stwierdzono również istnienie wzajemnych powiązań funkcjonalnych między receptorami z rodzin EGFR i VEGFR. Polegają one między innymi na aktywacji kinazy jednego receptora przez aktywowaną kinazę drugiego receptora lub na interakcji składników transdukcji sygnału obu receptorów (zjawisko *cross-talk*) i fosforylacji krzyżowej (*cross-phosphorylation*) [29]. Stymulacja EGFR może więc prowadzić do pobudzenia przekaźnictwa komórkowego VEGFR. Leczenie antyangiogenne powoduje zmniejszenie ciśnienia śródmiąższowego w guzie i normalizację naczyń krwionośnych, co skutkuje lepszą penetracją cytostatyków do komórek nowotworowych [30]. W tym ujęciu zasadne wydaje się kojarzenie chemioterapii z leczeniem ukierunkowanym na zahamowanie funkcji EGFR.

Okres ekspozycji na cytostatyki i inhibitory EGFR — wybór optymalnego schematu leczenia

W wielu badaniach przedklinicznych podkreśla się rolę relacji czasowych zastosowania chemioterapii w stosunku do momentu włączenia leczenia ukierunkowanego na funkcję receptora EGFR. W jednym z badań hodowlę komórek raka płaskonabłonkowego przelyku KYSE30 inkubowano w obecności różnych

cytostatyków (cisplatyny, oksaliplatyny, karboplatyny, docetakselu i paklitakselu) z trzema lekami interferującymi z funkcją receptora EGFR: gefitynibem, ZD6474 (inhibitor kinazy tyrozynowej EGFR) i cetuksymabem w różnych kombinacjach w schemacie: jeden cytostatyk z jednym inhibitorem EGFR. Komórki nowotworowe poddawano 24-godzinnej inkubacji w obecności cytostatyku, a następnie 48-godzinnej inkubacji w obecności inhibitora oraz w układzie odwrotnym: z inhibitorem, a następnie cytostatykiem. W hodowlach, w których pierwotnie stosowano chemioterapię, zaobserwowano synergistyczny wpływ takiego schematu zarówno na zahamowanie proliferacji komórek, jak i na indukcję apoptozy. Co ciekawe, w układach, w których inhibitor EGFR zastosowano przed chemioterapią, odnotowano odwrotny efekt — antagonistyczny, dotyczący zarówno proliferacji, jak i indukcji apoptozy. Chemioterapia z następczym zahamowaniem funkcji EGFR skutkowała zatem lepszymi efektami przeciwnowotworowymi i zahamowaniem pozostałej populacji komórek w fazie G2/M cyklu komórkowego, w porównaniu ze schematem, w którym inhibitor stosowano przed chemioterapią — w jego przypadku zaobserwowano zatrzymanie cyklu w fazie G0/G1 bez indukcji apoptozy. Wyniki badania porównywano z efektami inkubacji w obecności jednego leku i w stosunku do inkubacji bez ekspozycji na leki [5]. Celowość podawania leków blokujących funkcję receptorów odpowiedzialnych za proliferację po chemioterapii ma uzasadnienie również w rozważaniach teoretycznych. Zahamowanie szlaku przewodnictwa komórkowego, prowadzącego do podziału komórki, a następnie podanie cytostatyku jest sprzeczne z podstawowymi prawami chemioterapii, która wywiera wpływ jedynie na komórki ulegające podziałom. Racjonalne wydaje się zatem leczenie chemiczne z następowym podaniem leków blokujących mechanizmy proliferacyjne i cytoprotekcyjne. W takim tylko bowiem układzie prawdopodobne jest zahamowanie szlaków, które naprawiałyby uszkodzenia wywołane przez cytostatyki, umożliwiałyby apoptozę komórek poprzez inaktywację białek ochronnych oraz hamowałyby wzrost komórek pierwotnie opornych na chemioterapię.

Podsumowanie

Kojarzenie chemioterapii z leczeniem ukierunkowanym na zahamowanie funkcji receptora dla EGF jest postępowaniem podlegającym stałym modyfikacjom, jednak wciąż pełnym niewiadomych. Nie poznano dokładnego mechanizmu stosowania tych dwóch różnych form terapii jednocześnie. Obserwowane w badaniach klinicznych efekty terapeutyczne, niejednokrotnie sprzeczne, zmuszają do wnikliwej analizy i dalszych badań nad mechanizmami działania leków, które tylko

z pozoru wydają się proste. Z lektury tego artykułu wynika, że wiedza na temat molekularnych mechanizmów działania substancji stosowanych w leczeniu chorych na nowotwory jest znikoma i w większości przypadków pozostaje raczej kwestią domysłów. Prawdopodobne mechanizmy interakcji chemioterapii z inhibitorami EGFR, możliwość aktywowania wspólnego szlaku apoptozy, hamowania procesów naprawy DNA, efekt antyangiogeny powinny stać się obszarami przyszłych badań klinicznych.

Piśmiennictwo

- Salomon D.S. i wsp. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1995; 19: 183–232.
- Ciardiello F., Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 2958–2970.
- Mendelsohn J., Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 2787–2799.
- Grunwald V., Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003; 95: 851–867.
- Morelli M.P., Cascone T., Troiani T. i wsp. Sequence-dependent antiproliferative effects of cytotoxic drugs and epidermal growth factor receptor inhibitors. *Ann. Oncol.* 2005; 16: iv61–iv68.
- Humbert Y. Cetuximab: an IgG1 monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor expressing tumors. *Expert Opin. Pharmacother.* 2004; 5: 1621–1633.
- Cunningham D., Humblet Y., Siena S. i wsp. A randomized comparison of cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan on irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351:337-45.
- Giaccone G., Herbst R.S., Manegold C. i wsp. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase II trial — INTACT 1. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 777–784.
- Herbst R.S., Giaccone G., Schiller J.H. i wsp. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial — INTACT 2. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 758–794.
- Herbst R.S., Prager D., Hermann R. i wsp. A phase III trial of erlotinib HCL (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel (CP) chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *J. Clin. Oncol.* 2004; 12: 7011.
- Guatzeimer U., Plużańska A., Szcześnie A. i wsp. Results of the phase III trial of erlotinib combined with cisplatin and gemcitabine chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Clin. Oncol.* 2004; 25: 1545–1552.
- Green D., Ferguson T.A. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunds sciccors. *Cell* 2000; 102: 1–4.
- Ashkenazi A. i wsp. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factors superfamily. *Nature Rev. Cancer* 2002; 3: 420–430.
- Schilsky R.L. Antimetabolites. W: Perry M.C. (red.). *The chemotherapy source book.* Williams & Wilkins, Baltimore 1992; 301–315.
- Sampath D., Rao V.A., Plunkett W. Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene* 2003; 22: 9063–9074.
- Ingraham H.A., Tseng B.Y., Goulian M. i wsp. Nucleotide levels and incorporation of 5-fluorouracil and uracil into DNA of cell related with 5-fluorodeoxyuridine. *Mol. Pharmacol.* 1982; 21: 211–216.
- Tibbets R.S., Brumbaugh K.M., Williams J.M. i wsp. A role of ATR in DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 1999; 13: 152–157.
- Bartek J., Lukas J. Chk1 i Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell.* 2003; 3: 421–429.
- Kastan M.B., Lim D.S., Kim S.T., Xu B., Canman C. Multiple signaling pathway involving ATM. *Cold Spring Harp Symp. Quant. Biol.* 2000; 65: 521–526.

20. Adams J., Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322–1326.
21. Mauro DJ, De Riel J.K., Tallarida R.J., Sirover M.A. Mechanisms of excision of 5-fluorouracil by uracil DNA glycosylase in normal human cells. *Mol. Pharmacol.* 1993; 43: 854–857.
22. Boku N., Chin K., Hosokawa K. i wsp. Biological markers as a predictor for response and progress of unresectable gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and cis-platinum. *Clin. Cancer Res.* 1998; 4: 1469–1474.
23. Dickson I.L., Cunningham D. Systemic treatment of gastric cancer. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004; 16: 255–263.
24. Sordella R., Bell D.W., Haber D.A., Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate the anti-apoptotic pathways. *Science* 2004; 350: 1163–1167.
25. Rutkowski B. Erytropoetyna od odkrycia do zastosowań klinicznych. Makmed, Gdańsk 2001; 16–26.
26. Bandyopadhyay D., Mandal M., Adam L., Mendelsohn J., Kumar R. Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J. Biol. Chemistry* 1998; 273: 1568–1573.
27. Yoganathan T.N., Costello P., Chen X. i wsp. Integrin-linked kinase (ILK): a "hot" therapeutic target. *Biochem. Pharmacol.* 2000; 60: 1115–1119.
28. Galetic I., Andjelkovic M., Meier R., Brodbeck D., Park J., Hemmings B.A. Mechanism of protein kinase B activation by insulin/insulin-like growth factor-1 revealed by specific inhibitors of phosphoinositide 3-kinase-significance for diabetes and cancer. *Pharmacol. Ther.* 1999; 82: 409–425.
29. Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1995; 19: 183–232.
30. Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging view of anti-angiogenic therapy. *Science* 2005; 307: 58–62.