БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1159 – 1188

УДК 577.053, 616-006.04, 615.277.3

РЕЦЕПТОР ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА: КЛЮЧ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ДОСТАВКИ В КЛЕТКИ*

Обзор

© 2020 А.А. Розенкранц[1,2], Т.А. Сластникова[2]**

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия; электронная почта: aar@igb.ac.ru*

[2] *Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 15.06.2020
После доработки 23.07.2020
Принята к публикации 23.07.2020

Рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) – интегральный поверхностный белок, который обусловливает ответ клеток на ряд факторов роста. Увеличение его экспрессии и активности за счет мутаций являются одними из наиболее часто встречающихся признаков клеток многих видов рака. Разработка и клиническое применение средств блокирования активации EGFR стали ярким примером использования персонализованной таргетной медицины. Несмотря на очевидные успехи этого направления, в большинстве случаев излечение рака остается недостижимым. Причины этого, а также поиск возможных путей преодоления сложностей лечения привели к появлению огромного количества разработок новых методов лечения, опирающихся на использование сверхэкспрессии EGFR и его изменений для уничтожения раковых клеток. В обзоре рассмотрены и структурированы современные данные о строении, функционировании и внутриклеточном транспорте EGFR, его природных лигандах, а также запускаемых при активации EGFR сигнальных каскадах, особенностях экспрессии и активации EGFR при онкологических заболеваниях, а также о применяемых терапевтических подходах, направленных на блокировку сигнального пути EGFR. Подробно рассмотрены создаваемые подходы к адресной доставке внутрь раковых клеток с увеличенной экспрессией EGFR различных химиотерапевтических средств, радионуклидов, иммунотоксинов, фотосенсибилизаторов, а также перспективы генной терапии таких клеток-мишеней. Необходимо отметить, что все большее внимание уделяется разработке многофункциональных систем, как несущих несколько разных действующих агентов, так и обладающих несколькими зависящими от окружения транспортными функциями. Обсуждается потенциал систем, основанных на рецептор-опосредуемом эндоцитозе EGFR, их возможные достоинства и ограничения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рецептор эпидермального фактора роста, сверхэкспрессия, рак, эндоцитоз, направленная терапия рака, доставка лекарств.

DOI: 10.31857/S032097252009002X

ВВЕДЕНИЕ

Рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) является одним из наиболее изучаемых белков: количество научных публикаций в базе PubMed, описывающих изучение его структуры и свойств, а также функционирования в норме и патологии приближается к ста тысячам. Несмотря на это, многие аспекты его участия в регуляции процессов, протекающих в организме, остаются до сих пор недостаточно изученными, а постоянно увеличивающийся список создаваемых для воздействия на него веществ и оценка их действия требуют периодического систематического анализа, позволяющего выбрать наиболее перспективные направления исследования и разработки новых лекарственных препаратов. Являясь интегральным поверхностным рецептором, EGFR опосредует внешние сигналы целого семейства регуляторных факторов, наиболее известными из которых являются эпидермальный фактор роста (EGF) и трансформирующий фактор рос-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода, МНТ – модульные нанотранспортеры, ПЭГ – полиэтиленгликоль, ФС – фотосенсибилизатор, ЭО – электроны Оже, ЭР – эндоплазматический ретикулум, EGF – эпидермальный фактор роста, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, ErbB – гомолог B вирусного онкогена эритробластной лейкемии птиц (синоним EGFR/HER), mAb – моноклональные антитела, PLGA – сополимер молочной и гликолевой кислот, TGFα – трансформирующий фактор роста альфа, PRMT1 – аргинин-метилтрансфераза 1, ФДТ – фотодинамическая терапия.

* Статья на английском языке опубликована в режиме Open Access (открытого доступа) на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 85, вып. 9, 2020.

** Адресат для корреспонденции.

та альфа (TGFα) [1]. Взаимодействие этих внеклеточных сигнальных молекул с EGFR приводит к активации нескольких внутриклеточных сигнальных каскадов: RAS/MAPK(ERK), PI3K/AKT/mTOR и JAK/STAT, что способствует пролиферации, ингибированию апоптоза и выживаемости клеток [2, 3]. Особое внимание привлекает участие EGFR в канцерогенезе и возможность использования этого рецептора для лечения онкологических заболеваний. Активация EGFR является одним из факторов, способствующих эпителиально-мезенхимальному переходу, который приводит к появлению фенотипа раковых стволовых клеток [4]. Его мутации и увеличение экспрессии часто приводят к возникновению и прогрессии злокачественных новообразований [5]. Увеличение количества EGFR в клетке встречается при многих онкологических заболеваниях (см. раздел «Экспрессия EGFR при онкологических заболеваниях»). Поэтому естественно, что EGFR является одним из значимых объектов таргетной терапии. Такие препараты, как цетуксимаб, панитумумаб, нимотузумаб и нецитумумаб, представляющие собой моноклональные антитела к EGFR, предотвращающие активацию EGFR природными лигандами, уже широко применяются в клинике. Другим вариантом таргетной терапии, направленной на EGFR, является использование специфических ингибиторов фосфорилирования, к которым относятся гефитиниб, эрлотиниб, лапатиниб, афатиниб и ряд других (см. раздел «Успехи и ограничения направленной блокировки сигнального пути EGFR»). К сожалению, далеко не все варианты опухолей с повышенной экспрессией EGFR или его мутациями с конститутивной активацией фосфорилирования отвечают на воздействие вышеупомянутых антител и ингибиторов из-за независимой активации нижележащих звеньев сигнальных цепей (киназ семейств RAS, BRAF), прежде всего, KRAS и BRAF, что делает применяемую терапию, направленную на EGFR, неэффективной.

Вариантом преодоления неэффективности в таких случаях является использование рецептор-опосредуемого эндоцитоза EGFR для специфической таргетной доставки в раковые клетки с повышенной экспрессией этого рецептора различных терапевтических, прежде всего, цитотоксических агентов, что позволяет уничтожать раковые клетки независимо от активации нижележащих сигнальных цепей. Для этой цели создаются как конъюгаты цитотоксических веществ с лигандами EGFR (как с природными, так и с синтетическими), так и более сложные молекулярные и надмолекулярные конструкции. К ним можно отнести наночастицы как с твердым ядром, так и липосомы, мицеллы и им подобные варианты, несущие цитотоксические вещества. Еще одним возможным вариантом является использование EGFR для транспорта в раковые клетки с помощью вирусов или синтетических систем доставки, генов, кодирующих фермент, превращающий пролекарство в цитотоксический продукт. Современные направления специфичной для раковых клеток доставки цитотоксического начала внутрь клеток с повышенной экспрессией EGFR, их перспективы и ограничения являются основной темой настоящего обзора.

EGFR КАК КОМПОНЕНТ СИГНАЛЬНОЙ СЕТИ

Активация EGFR приводит к целому ряду биологических реакций, включая пролиферацию клеток, миграцию и выживание, которые в норме призваны обеспечивать сохранность и регенерацию эпителия. Именно эти свойства делают нарушение регуляции EGFR важным и часто необходимым звеном развития многих видов онкологических заболеваний. Этот рецептор принадлежит к одному из семейств тирозинкиназ (ErbB или HER), состоящему из 4-х близкородственных мембранных рецепторов: EGFR/ErbB1/HER1, Neu/ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, ErbB4/HER4. Все рецепторы ErbB (от avian erythroblastic leukemia viral oncogene B homolog – гомолог B вирусного онкогена эритробластной лейкемии птиц) человека являются крупными трансмембранными белками, содержат богатую цистеинами внеклеточную часть, единственный трансмембранный участок и внутриклеточную цитоплазматическую часть, состоящую из примембранного, тирозинкиназного и *C*-концевого доменов [6]. Внеклеточную часть EGFR, как и других ErbB, подразделяют на четыре домена, причем для связывания лиганда требуются контакты EGFR с доменами I и III. При этом происходит изменение конформации рецептора, которое обеспечивает появление выступающей «ручки» в домене II внеклеточной части рецептора. Выступающая «ручка» получает возможность взаимодействовать с соответствующей структурой другого ErbB. В обычном, не активированном, состоянии появлению этой димеризационной «ручки» препятствует взаимодействие домена II с IV доменом рецептора. Лиганд, взаимодействуя с I и III доменами рецептора, высвобождает «ручку» для взаимодействия с соседним рецептором [7]. Неактивные молекулы EGFR существуют на поверхности клеток в основном в виде мономеров не-

активных димеров и некоторой доли олигомеров, которые находятся в равновесии друг с другом [8]. Активация EGFR контролируется извне клетки соответствующими лигандами и приводит к образованию его гомодимеров и гетеродимеров с другими ErbB. Связывание активирующего лиганда приводит к сдвигу равновесия в сторону димеризации с образованием активных димеров и активации предсуществующих димеров. Это приводит к активации тирозинкиназного домена и специфическому фосфорилированию остатков тирозина цитоплазматической части рецептора-партнера в димере. К последовательностям с фосфорилированными остатками тирозина присоединяются соответствующие внутриклеточные сигнальные молекулы, что обеспечивает активацию сети взаимодействующих внутриклеточных сигнальных путей [9]. Таким образом, реализация сигнала от связывания внеклеточного регуляторного лиганда с рецептором, происходит с помощью фосфорилирования не только самого EGFR в результате гомодимеризации, но и его партнеров, в первую очередь, ErbB2, не имеющего собственного внеклеточного регуляторного лиганда [1]. В существенно меньшей степени прохождение сигнала от EGFR в клетку обеспечивается остальными рецепторами этого семейства ErbB3 [10, 11] и ErbB4 [12], которые являются тканеспецифичными и экспрессируются в основном в нервной ткани. Известно также, что, кроме родственных ErbB рецепторов, EGFR может образовывать димеры в мембране с другими рецепторными тирозинкиназами. Взаимодействие активированного EGFR с рецепторами тромбоцитарного фактора роста бета [13, 14], рецепторами фактора роста гепатоцитов/фактора мезенхимально-эпителиального перехода (mesenchymal-epithelial transition factor receptor, MET) [15] и родственного ему RON [16], а также рецептором инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R) [17] приводит к их фосфорилированию и к физиологически, и терапевтически значимым результатам в активируемых через эти рецепторы регуляторных внутриклеточных путях (рис. 1). Это означает, что ответ клетки на связывание лиганда с EGFR определяется не только наличием и количеством этого рецептора, но зависит также от набора и количества рецепторов-партнеров на клеточной поверхности. Кроме этого, ответ клетки на внешний сигнал зависит еще и от свойств связывающегося с EGFR фактора роста (см. раздел «Природные лиганды EGFR»).

Дополнительный уровень регуляции прохождения сигнала обеспечивает необходимость встречи с другим рецептором, что зависит от диффузионных свойств рецептора и его микрораспределения в плазматической мембране. Часть EGFR находится в олигомеризованном состоянии, что обеспечивает возможность фосфорилирования нескольких рецепторов в ответ на один связанный лиганд при низкой концентрации добавленного лиганда [18]. Как показывают наблюдения за единичными молекулами, подвижность EGFR сменяется несколькими разными короткоживущими состояниями: свободным, ограниченным в перемещении и неподвижным. В неподвижном состоянии EGFR имеет тенденцию олигомеризоваться в покрытых клатрином ямках, перекрестное фосфорилирование в которых дополнительно усиливает проходящий сигнал [19]. По-видимому, олигомеры могут быть сопряжены и с другими структурами, обеспечивающими эндоцитоз [20].

Фосфорилирование EGFR и его часто сверхэкспрессированного при ряде видов рака партнера ErbB2 стимулирует такие внутриклеточные регуляторные пути, как RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/TOR, Src-киназы и факторы транскрипции STAT [3]. Эти регуляторные пути можно рассматривать в качестве компонентов сложной регуляторной сети, с большим количеством положительных и отрицательных обратных связей. Сигнальная сеть, на которую оказывает влияние EGFR, насчитывает более 300 компонентов, связанных более чем двумя сотнями реакций [21]. Сигнализация EGFR тонко настраивается в клетках с помощью множества координированных механизмов, включая регуляцию фосфатазами, обратными связями нижележащих звеньев сигнальной цепи, эндоцитозом и внутриклеточным транспортом [21]. Специфичность, направление и величина клеточного ответа определяются экспрессией положительных и отрицательных регуляторов, активирующим лигандом, компонентами димеров рецепторов и набором белков, взаимодействующих с фосфорилированными тирозинами *C*-концевых доменов тирозинкиназных рецепторов.

ПРИРОДНЫЕ ЛИГАНДЫ EGFR

В нормальных клетках активация тирозинкиназной функции EGFR строго регулируется извне достаточно большим набором природных полипептидных лигандов. Эта регуляция концентрационно зависима, сродство EGF к мономерному рецептору существенно выше, чем к димеру, с которым уже связана одна молекула EGF, что может быть интерпретировано как наличие отрицательной кооперативности [22]. Наиболее известным лигандом EGFR является

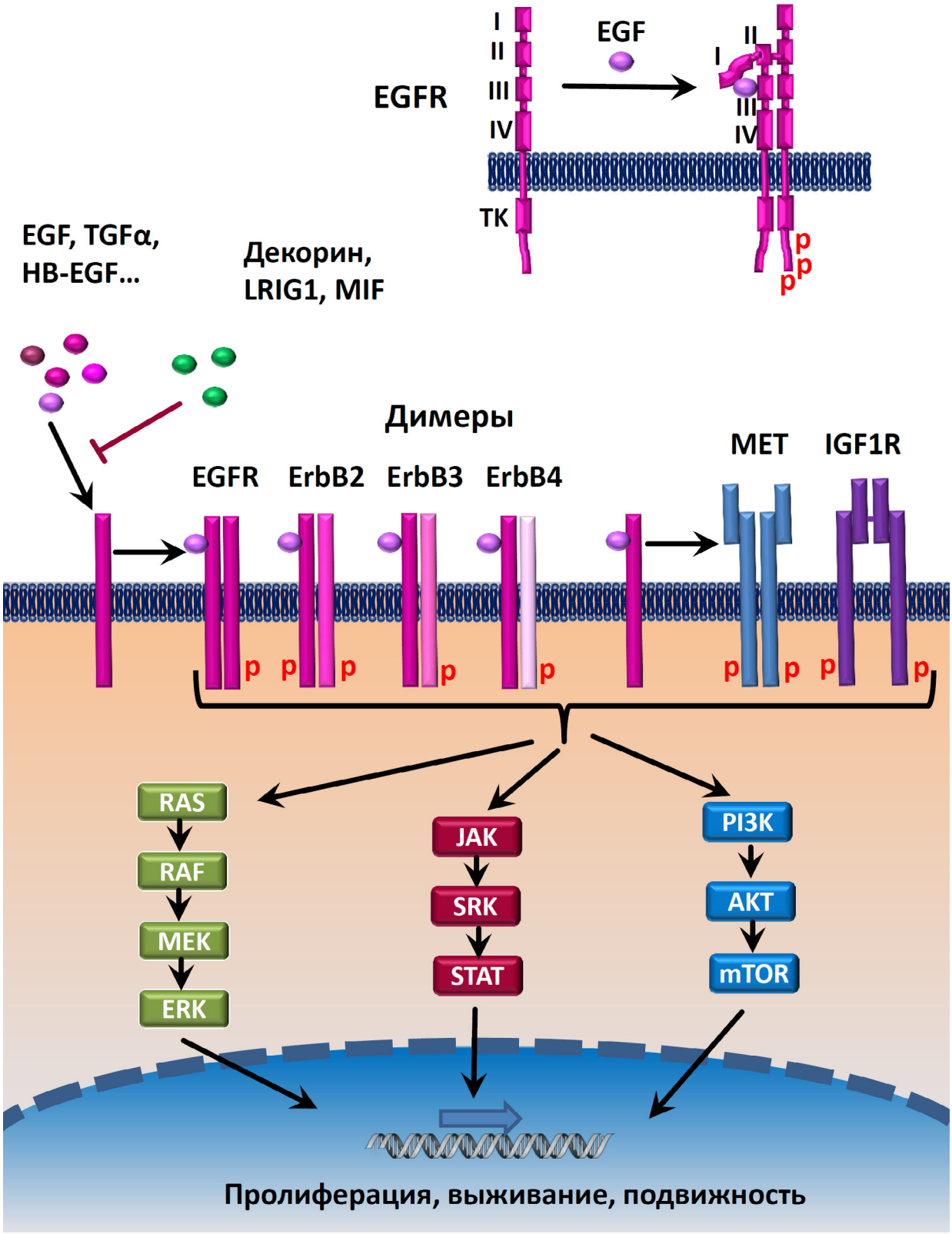

Рис. 1. Принципиальная схема основных сигнальных путей сети, активируемых EGFR. I–IV – внеклеточные домены EGFR, TK – тирозинкиназный домен, P – фосфорилированные тирозины, MET – рецептор фактора мезенхимально-эпителиального перехода, IGF1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1. (С цветными вариантами рис. 1 и 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

EGF. Другие природные лиганды подобны ему по структуре: основной особенностью этих молекул является наличие трех дисульфидных мостиков, которые определяют жесткую трехмерную структуру белка (EGF-подобный домен). Именно эта трехмерная структура в значительной мере, наряду с конкретными аминокислотными последовательностями, взаимодействующими с I и III внеклеточными доменами, по-видимому, определяет взаимодействие с центром связывания рецептора [23]. Большинство лигандов ErbB рецепторов образуется из больших трансмембранных предшественников, протеолитическое расщепление которых приводит к образованию растворимого фактора роста. В настоящее время известно уже более дюжины природных полипептидов, которые могут с разной эффективностью и результатом взаимодействовать с внеклеточной частью ERGR. EGF, TGFα, амфирегулин связываются с EGFR, тогда как бетацеллюлин, гепарин-связывающий фактор роста и эпирегулин, помимо EGFR, могут также активировать ErbB4 [9]. Недавно было показано, что EGFR активируется путем связывания с ним также одним из ключевых регуляторов ангиогенеза – ангиогенином. Ангиогенин связывается с EGFR с достаточно высоким сродством (~40 нМ) и, кроме этого, обладает также слабой РНКазной активностью, что отражает его другое название – RNase 5 [24, 25]. Два фактора роста, неурегулины 2α и 2β, основными рецепторами которых являются ErbB3 и ErbB4, могут также связываться и активировать EGFR [26, 27]. Кроме агонистов у EGFR имеются также естественные антагонисты. Протеогликан декорин связывается с EGFR с наномолярным сродством [28] и приводит к уменьшению количества рецептора на поверхности клетки за счет кавеолинового эндоцитоза и последующей деградации рецептора [29]. Гомолог декорина – отщепленный растворимый внеклеточный домен LRIG1 (Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains-1) также способен взаимодействовать с EGFR с наномолярным сродством и конкурировать с EGF за связывание [30]. Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), известный регулятор врожденного иммунитета может блокировать активацию EGFR за счет связывания с внеклеточным доменом рецептора [31].

В последнее время стало ясно, что разные природные лиганды EGFR стабилизируют различающиеся по структуре димеры рецепторов, что приводит к разным физиологическим последствиям [32]. Эпирегулин и эпиген, которые можно рассматривать как частичные агонисты EGFR, индуцируют образование менее стабильных, чем при связывании EGF и TGFα короткоживущих димеров. Тем не менее эта ослабленная димеризация рецепторов приводит к более длительной устойчивой сигнализации, вызывая дифференцировку клеток рака молочной железы и не приводя к пролиферации клеток, как это делает EGF [32]. Природные лиганды EGFR могут различаться также по способности индуцировать образование димеров семейства ErbB, что также может вызывать разные биологические эффекты при активации через EGFR разными лигандами в одной и той же клетке. Радиолигандный анализ показал, что сродство EGF и TGFα к гетеродимерам EGFR/ErbB2 выше, чем сродство к гомодимерам EGFR, в то время как бетацеллюлин и амфирегулин показали одинаковое сродство к обоим димерам. Амфирегулин проявляет свойства частичного агониста, что отражается в более низком уровне фосфорилирования рецепторов, индуцируемого им по сравнению с EGF, TGFα и бетацеллюлином [33]. В отличие от других лигандов, амфирегулин показывает двухфазную кинетику образования димеров, что позволяет предположить, что его путь активации EGFR включает связывание как с мономерами, так и с предсуществующими неактивными димерами. В отличие от него, EGF, TGFα и бетацеллюлин, по-видимому, в основном активируют рецептор через связывание с мономерами рецептора и его димеризацию [33]. Таким образом, отличия в биологическом ответе на различные лиганды EGFR могут быть результатом нескольких процессов: полного или частичного агонизма в отношении образования димеров, различий в кинетическом пути генерации димеров активированных рецепторов и доле образования гетеродимеров ErbB по сравнению с гомодимерами.

Еще один путь регуляции сродства лигандов к EGFR осуществляется путем метилирования внеклеточной части рецептора аргинин-метилтрансферазой (PRMT1), что может обеспечить трехкратное увеличение сродства лигандов к EGFR [34]. Нокдаун PRMT1 или отсутствие соответствующих аргининов (R198 и R200) уменьшают сродство к EGFR как EGF и TGFα [34], так и ангиогенина/RNase 5 [35]. Метилирование этих аргининов, дестабилизирует взаимодействие между II и IV доменами внеклеточной части EGFR, что облегчает взаимодействие лигандов с I и III доменами, вызывает изменение конформации и димеризацию рецепторов. Экзогенная экспрессия PRMT1 повышает сродство лиганда к EGFR и активирует опосредованные рецептором дальнейшие сигнальные события [34].

Имеющаяся к настоящему моменту сумма сведений о связывании факторов роста и других

природных лигандов с EGFR вряд ли в полной мере описывается в терминах изотермы адсорбции Ленгмюра с единственным значением константы диссоциации и количеством мест связывания на клетку, что является усредненной и огрубленной моделью реального процесса. Об этом свидетельствует наличие отрицательной кооперативности, образование димеров с рецепторами-партнерами, уже известные ковалентные модификации, влияющие на связывание, гетерогенность клеток, динамический процесс изменения доступных для связывания рецепторов на поверхности клетки. Более уверенно можно говорить об интервале значений констант диссоциации комплекса лиганд–рецептор, который для EGF находится в диапазоне от долей до единиц наномолей на литр, что для разных объектов может отражать как наличие отрицательной кооперативности, так и добавление влияния какого-то другого фактора. Такими факторами могут быть образование комплекса с рецепторами-партнерами (например, с ErbB2), разная степень метилированности значимых для связывания аргининов, наличие мутаций в части рецепторов. Такие варианты могут быть также описаны через наличие нескольких различающихся по сродству субпопуляций рецепторов.

ЭНДОЦИТОЗ И ДАЛЬНЕЙШИЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ

Для EGFR, как и для множества поверхностных клеточных рецепторов, опосредующих ответ на внешние регуляторные сигналы, эндоцитоз служит обычным способом снижения ответа путем отрицательной обратной связи. Дополнительная регуляция обеспечивается сортировкой интернализованного рецептора, который может быть направлен обратно на плазматическую мембрану, на деградацию в лизосомы или в другие клеточные компартменты, в которых он дополнительно регулирует клеточные процессы [36]. В отсутствие лигандов EGFR интернализуется медленно: культуры клеток, экспрессирующих умеренное количество EGFR (<200 000 рецепторов на клетку), показывают $t_{1/2}$ (время полуобновления) в диапазоне 6–10 ч, тогда как в клетках с аномально высокой экспрессией EGFR, таких как эпидермоидная карцинома человека A431 (~ 2 миллиона рецепторов на клетку), $t_{1/2}$ может достигать суток и более. Связывание лиганда и активация тирозинкиназы приводит к быстрому эндоцитозу и многократно увеличивает константу скорости эндоцитоза EGFR [37]. В цитоплазматической части EGFR находятся несколько сигналов интернализации, которые демаскируются при связывании лиганда. К ним относятся два разных мотива распознавания субъединиц адапторного белка 2 (AP2), который связывает мембранные белки с клатриновой решеткой [38]. Некоторые фосфотирозины в цитоплазматическом хвосте EGFR после фосфорилирования также обеспечивают присоединение E3 убиквитин-лигазы Cbl как напрямую [39], так и через еще один адапторный белок Grb2 [40], который связывает фосфорилированный рецептор с E3 убиквитин-лигазой Cbl. Это обеспечивает активацию сигнального каскада RAS/MAPK и эндоцитоз EGFR. Такое дублированное взаимодействие между Cbl и EGFR необходимо для стабильного привлечения Cbl и эффективного убиквитинирования рецепторов [41]. Необходимо отметить, что множественное убиквитинирование является не единственным фактором, влияющим на эндоцитоз EGFR. Даже замена 15 остатков лизина в его киназной части, приводящая к почти полному подавлению убиквитинирования, может не приводить к существенному подавлению интернализации [42]. Клатрин-зависимый эндоцитоз активированного EGFR регулируется несколькими механизмами, функционирующими избыточным и кооперативным образом, включая убиквитинирование киназного домена рецептора и *C*-концевых остатков лизина, а также адапторных белков AP-2 и Grb2 [43]. Сложности регуляции эндоцитоза EGFR добавляет наличие еще одного механизма ковалентной модификации рецептора, помимо убиквитинирования. EGFR также модифицируется убиквитин-подобной молекулой Nedd8 (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 8) [44]. Эта модификация катализируется Cbl в комплексе с Nedd8-специфической лигазой E2 (Ubc12) и облегчает присоединение остатков убиквитина с помощью Cbl и лигазы UbcH7. Такая сложность и многократное дублирование механизмов, вовлеченных в интернализацию активированного EGFR, делают этот процесс устойчивым к возмущениям (например, мутациям или изменению экспрессии компонентов механизма эндоцитоза) [38]. В частности, для того чтобы существенно подавить клатриновый эндоцитоз EGFR необходимо одновременное предотвращение (например, за счет мутирования) работы мотивов, связывающих AP2, множественного убиквитинирования и ацетилирования EGFR [43]. Возможным объяснением устойчивости процесса эндоцитоза EGFR является также существование дублирующих друг друга клатрин-зависимых и клатрин-независимых процессов. Клетки могут убирать активированный EGFR с

поверхности несколькими разными путями: при помощи клатрин-зависимого, клатрин-независимого, эндофилин-зависимого эндоцитоза и макропиноцитоза [45]. Во всех типах клеток, экспрессирующих рецептор, в ответ на добавление лиганда EGFR интернализуется с помощью быстрого клатрин-зависимого эндоцитоза при всех физиологических концентрациях EGF [36]. Заметная часть EGFR, поступающего в клетку таким путем, возвращается обратно на плазматическую мембрану [46], что может осуществляться двумя путями с разным временным интервалом [47]. Клатрин-зависимый эндоцитоз, по-видимому, является насыщаемым, что становится заметным при высокой экспрессии рецептора, и при более высоких концентрациях добавленного EGF (> 2 нМ) во многих типах клеток подключаются более медленные клатрин-независимые виды эндоцитоза [36]. Кроме того, при достаточно высоких концентрациях лиганда, превышающих в несколько раз значение константы диссоциации комплекса лиганд–рецептор, на эндоцитозе начинает сказываться и насыщение рецептора лигандом. Это делает дальнейшее увеличение концентрации лиганда малоэффективным с точки зрения его транспорта в клетку при помощи рецептор-опосредуемого эндоцитоза.

Кроме клатрин-зависимого эндоцитоза существует также быстрый эндофилин-зависимый эндоцитоз, который активен, по-видимому, на переднем крае мигрирующей клетки, и необходим для пространственно ограниченной EGF-зависимой передачи сигналов [45]. Данный вариант поглощения EGFR опосредуется CBL, адапторным белком CIN85 и зависит, как и клатрин-зависимый эндоцитоз, от наличия динамина [45, 48].

Тип эндоцитоза EGFR может также зависеть и от лиганда, связавшегося с рецептором. Так, например активация EGFR в результате связывания EGF или TGFα, приводила в клетках HeLa только к клатрин-зависимому эндоцитозу, тогда как гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF) и бетацеллюлин стимулировали как клатрин-опосредованные, так и клатрин-независимые варианты поглощения [49]. Поглощение EGFR может осуществляться и с помощью макропиноцитоза, что наблюдается в ответ на стимуляцию EGF в клетках A431 [50, 51], или через формирующиеся из дорзальных складок клеточной мембраны везикулярно-трубчатые структуры, образование которых зависит от динамина и фосфоинозитид киназы PI3, происходящих из дорсальных складок плазматической мембраны [51, 52]. Необходимо отметить, что для клатрин-независимого эндоцитоза необходимо убиквитинирование EGFR, поскольку мутации, препятствующие присоединению убиквитина, ингибируют и эндоцитоз [41]. Этот вариант эндоцитоза EGFR зависит от обогащенных холестерином доменов плазматической мембраны, но не зависит от кавеолина [36].

Независимо от пути интернализации EGFR поступает в ранние эндосомы, где происходит их сортировка для регуляции ответа на связывание лиганда с EGFR. Пути дальнейшего транспорта EGFR оказывают существенное влияние на регуляторные процессы в клетке, способствуя сбалансированности ответа на поступивший сигнал, что подробно рассмотрено в нескольких обзорах [36, 53]. Как уже было отмечено, двумя основными направлениями транспорта EGFR являются путь в лизосомы для деградации EGFR, что приводит к снижению ответа на стимуляцию рецептора, и его возвращение обратно на плазматическую мембрану для продолжения ответа на поступивший сигнал. Однако некоторая небольшая часть рецепторов через COP1-зависимый везикулярный транспорт попадает из эндосом в эндоплазматический ретикулум (ЭР) [54]. Кроме этого, известны и дополнительные варианты транспорта EGFR в ядро (обсуждается ниже) и митохондрии. Транспорт активированного EGFR в митохондрии зависит от c-Src и может приводить к фосфорилированию субъединицы COXII цитохром *c*-оксидазы в клетках рака молочной железы, что было показано при помощи добавления c-Src и EGFR к иммунопреципитатам COXII или к очищенному фрагменту COXII [55]. Такое перемещение EGFR увеличивает устойчивость клеток к апоптозу [56]. Обнаружено также, что транспорт EGFR в митохондрии клеток немелкоклеточного рака легких приводит к увеличению инвазивности и появлению метастазов [57, 58]. Однако доля рецептора, оказывающегося в митохондриях, крайне невелика, ~2% фосфорилированного EGFR оказываются в митохондриях [57].

ТРАНСПОРТ EGFR В ЯДРО

Внутриклеточная примембранная часть EGFR содержит трехчастный сигнал ядерной локализации (RRRHIVRKRTLRR), который опосредует появление небольшой доли полноразмерного рецептора в ядре клетки после активации рецептора [59]. Похожие трехчастные сигналы есть и в остальных ErbB. Транспорт EGFR от плазматической мембраны в ядро не является систематическим постоянным ответом на связывание лиганда с рецептором, но, ско-

рее, наблюдается в определенных тканях или при определенных условиях [60]. Этот транспорт происходит в результате эндоцитоза и требует импортина β1, что указывает на прохождение через ядерную пору [61]. Процесс нахождения EGFR в ядре является контролируемым, на что указывает и наличие у EGFR функционального сигнала ядерного экспорта [61]. EGFR транспортируется в ядро в комплексе с EGF [62] и обнаруживается как в нуклеоплазме, так и во внутренней ядерной мембране [63]. Лиганды EGFR по-разному влияют на возможность этого транспорта: так, добавление EGF, TGFα, HB-EGF и бетацеллюлина приводило к дозозависимому накоплению EGFR в ядрах клеток аденокарциномы печени человека, тогда как амфирегулин и эпирегулин не оказывали такого действия [64]. Механизмы, приводящие к ядерному накоплению рецептора, остаются не до конца ясными до настоящего момента, возможно, что EGFR оказывается в ядре несколькими путями [60, 63, 65, 66]. Из эндосом рецепторы могут попадать в ЭР и выходить в цитозоль при помощи ретроградного транспорта через транслокон Sec61, который обеспечивает как транспорт вновь синтезируемых белков в ЭР, так и перемещение неправильно свернутых белков обратно в цитозоль. Несколько исследований показали, что EGFR взаимодействует с Sec61β, одной из трех субъединиц транслокона [67, 68]. Однако, где происходит перемещение EGFR через этот транслокон, почему этому не мешает гликозилированность рецептора и каким образом в ядре он оказывается в комплексе с лигандом, неизвестно. Непонятно также, что обеспечивает растворимость EGFR в нуклеоплазме. Среди предлагаемых путей транспорта EGFR в ядро отмечают выход его в цитозоль из ЭР с последующим транспортом через ядерную пору и транспорт в виде интегрального белка до наружной оболочки ядра и далее через периферические каналы ядерной поры. Возможен также прямой транспорт некоторой фракции эндосом к ядру с последующим слиянием с ядерной оболочкой и транспортом через ядерную пору на внутреннюю мембрану ядра [69]. Поскольку Sec61 был обнаружен во внутренней мембране ядерной оболочки, возможно, EGFR проникает в ядро непосредственно из нее [67].

Внутри ядра EGFR может взаимодействовать с транскрипционными факторами STAT3, STAT5, E2F1, фосфорилировать ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA), обеспечивая ускорение пролиферации и репарационных процессов, и увеличивать радиорезистентность клеток. Благодаря этому ядерный EGFR участвует в пролиферации, опухолегенезе, метастазировании, репарации ДНК, а также обеспечивает устойчивость к повреждающему ДНК излучению и алкилирующим противораковым агентам [63].

ЭКСПРЕССИЯ EGFR ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Активация EGFR при малигнизации может быть вызвана повышенным содержанием рецепторов, увеличенной аутокринной или паракринной продукцией активирующего фактора роста и изменением собственной тирозинкиназной активности в результате мутаций. Часто причиной активации EGFR является сочетание сразу нескольких факторов, что усложняет поиск лечения.

Одной из наиболее частых причин активации EGFR является увеличение его экспрессии. Причиной этого может быть не только амплификация гена, но и усиление его транскрипции, трансляции, уменьшение деградации рецептора и изменение в экспрессии некодирующих РНК [70–72]. Приводимые в разных работах оценки экспрессии EGFR для разных онкологических заболеваний сильно варьируют, что зависит от стадии заболевания, использованной ранее терапии, популяции, метода исследования (определение мРНК, иммуногистохимия), оцениваемого параметра, используемых антител, времени хранения препаратов. В некоторых случаях было обнаружено достаточно большое увеличение экспрессии EGFR. Так, при раке головы и шеи содержание мРНК EGFR увеличивается в среднем в 69 раз по сравнению с нормальной тканью [73]. Прямого однозначного соответствия между мРНК и экспрессией белка исследования не выявляют, а иммуногистохимическое выявление экспрессии не является строго количественным, и кроме того, подвержено влиянию многих не всегда учитываемых факторов [74]. В тех случаях, когда в исследованиях использовали несколько методов, иммуногистохимическое окрашивание показывает меньшую частоту встречаемости сверхэкспрессии EGFR по сравнению с увеличением уровня мРНК. Так, выявляемая сверхэкспрессия, по данным иммуногистохимических исследований, при колоректальном раке составляла 61%, по анализу мРНК – 79% и при выявлении одним из двух способов – 82% [75]. В одном и том же исследовании образцов немелкоклеточного рака легкого в зависимости от выбранных коммерческих антител сверхэкспрессия EGFR варьировала в диапазоне 5–56% [76]. Тем не ме-

нее именно этот вариант оценки экспрессии EGFR позволяет получить данные по содержанию рецептора, суммирующие изменения транскрипции, трансляции и деградации белка. Чаще всего при этом в зависимости от интенсивности окраски препараты распределяют по нескольким группам (обычно четырем), относя к повышенной экспрессии одну или две группы с наиболее выраженной экспрессией рецептора. Анализ большого числа проведенных исследований позволяет выявить те онкологические заболевания, при которых увеличение экспрессии EGFR является существенным (табл. 1). Все экспериментальные работы, цитированные в таблице, были проведены с использованием иммуногистохимии, для полноты картины приведены данные из предыдущих обзоров, в части которых цитированы работы как проведенные с использованием иммуногистохимии, так и с использованием других методов. Необходимо также отметить, что эти данные трудно соотносимы с получаемыми при работе на клеточных культурах величинами количества рецепторов на клетку и соответствуют изменениям относительно содержания рецептора в той же нормальной ткани. В ряде случаев (рак мочевого пузыря, глиомы, рак головы и шеи, рак легкого) это дает основания для разработки местных таргетных методов терапии с использованием радионуклидов, фотосенсибилизаторов, нано-

Таблица 1. Частота увеличенной экспрессии EGFR при онкологических заболеваниях

Заболевание	Процент опухолей со сверхэкспрессией EGFR	Источник
Рак головы и шеи	80–100	обзор [79]
	38–92	обзор [80]
	46, 68, 56–85, 49, 68	[81], [82], [83], [84], [85]
Рак шейки матки	70–90	обзор [86]
	30–98	обзор [87]
	18–87	обзор [88][а]
	76–79	[89]
Мезотелиома	44–97	обзор [70]
Рак толстой кишки	25–77	обзор [79]
	61, 53, 39, 62	[75], [90], [91], [92]
Рак поджелудочной железы	30–89	обзор [93]
	30–95	обзор [94]
	40–70	обзор [95]
	42–64	[96]
Немелкоклеточный рак легкого	40–80	обзор [79]
	32–100	обзор [76][б]
	56	[76][в]
Рак молочной железы	14–91	обзор [79]
	2–60	обзор [97][г]
Рак яичников	35–70	обзор [79]
	9–62	обзор [98]
	46–64, 57	[99], [100]
Глиома	40–63	обзор [79]
	68, 65	[101], [102]
Рак мочевого пузыря	31–48	обзор [79]
	27, 74, 71	[103], [104], [105]
Нейроэндокринные опухоли	42–100	обзор [106][д]
	28–57, 87	[107], [108]

[а] – Средневзвешенное – 48,5% по 20 работам с использованием иммуногистохимии и 1823 пациентам; [б] – средневзвешенное – 49,8% по 15 исследованиям и 2399 пациентам с одинаковыми mAb; [в] – 71% – плоскоклеточный рак, 48% – аденокарцинома; [г] – средневзвешенное 21,4% по 36 иммуногистохимическим исследованиям и 12 066 пациентам; [д] – тимома, средневзвешенное – 70,5%, по 8 иммуногистохимическим исследованиям и 227 пациентам.

частиц, реагирующих на различные типы излучения.

В целом, повышенная экспрессия EGFR является одним из наиболее частых событий, регистрируемых при онкологических заболеваниях. Так, при анализе опухолей с неизвестным первичным происхождением экспрессия EGFR была обнаружена в 55% случаев, причем амплификация его гена (17%) оказалась наиболее частым событием среди всех проанализированных маркеров [77].

Гетерогенность тех изменений, которые приводят к онкологическим заболеваниям, приводит к тому, что при одной и той же локализации опухоли возникают принципиально разные варианты заболеваний. При подробной генетической характеристике выявляются подтипы рака в рамках одной локализации, в которых с очень высокой вероятностью наблюдаются одни и те же изменения в ключевых регуляторных белках, к которым относится и EGFR. Так, например сверхэкспрессия EGFR выявляется в 97% случаев «классической» формы мультиформной глиобластомы [78].

УСПЕХИ И ОГРАНИЧЕНИЯ НАПРАВЛЕННОЙ БЛОКИРОВКИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ EGFR

Контролируя один из наиболее часто работающих «входов» сигнальной сети, опосредующей регуляцию деления клеток, EGFR является значимым маркером малигнизации. Более важно, что во многих случаях состояние или экспрессия этого рецептора является одним из необходимых звеньев злокачественного перерождения клеток. Нарушение активации EGFR часто дает постоянный пролиферативный сигнал, без прерывания которого деление клеток становится постоянным. Нужно отметить, что повышенная экспрессия EGFR в солидных опухолях часто ассоциируется с увеличенной продукцией соответствующих лигандов, что приводит к хронической активации рецептора. Естественным решением этой проблемы является прерывание активации EGFR, что может быть достигнуто как блокированием связывания активирующего лиганда, так и ингибированием тирозинкиназной активности. Первый вариант эффективен при повышенной экспрессии EGFR, второй – при перманентной активации рецептора за счет мутаций, в особенности, при подборе специфичного при данной мутации ингибитора.

Моноклональные антитела к EGFR. На востребованность прерывания взаимодействия между лигандами и EGFR указывает большое количество разнообразных искусственных полипептидов, способных к связыванию с внеклеточными доменами EGFR: к настоящему времени их насчитывается ~40 [109]. Они включают в себя химерные антитела, фрагменты антител, однодоменные антитела, антителомимиетики, сконструированные на основе различных каркасных белков: DARPin на основе анкириновых повторов, аффибоди на основе Z-домена белка A, аднектинов на основе 10-го домена фибронектина III типа. Вариантами, успешно дошедшими до широкого терапевтического применения, являются такие моноклональные антитела, как цетуксимаб (Эрбитукс), панитумумаб (Вектибикс), нимотузумаб (Тералок), нецитумумаб (Портразза) (табл. 2). Эти антитела связываются с доменом III внеклеточной части EGFR, не позволяя природным лигандам – факторам роста – активировать рецептор. Цетуксимаб является производным высокоаффинного моноклонального мышиного антитела C225, слитого с константной частью IgG1 человека [110]. Изотип IgG1 обусловливает также способность цетуксимаба вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность, в отличие от панитумумаба, привлекая NK-клетки для уничтожения раковых клеток [111]. К преимуществам панитумумаба, относится то, что он полностью основан на IgG человека, и поэтому его применение менее подвержено появлению аллергических реакций и анафилаксии [112]. Эти два первых терапевтических моноклональных антитела начали широко применяться в клинической практике начиная с середины 2000-х гг. В 2015 г. к ним добавилось еще одно моноклональное человеческое антитело – нецитимумаб [113], которое применяют для лечения плоскоклеточной немелкоклеточной карциномы легких. Его отличает существенно большее, чем у цетуксимаба и панитумумаба, время полувыведения (~ 2 недели). Еще одно терапевтическое моноклональное антитело – нимотузумаб, представляющее собой гуманизированное мышиное антитело, отличают менее выраженные, чем при применении остальных терапевтических антител, побочные эффекты [114]. Это объясняют оптимальным для лечения сродством к EGFR, что позволяет оказывать эффект в основном на клетки со средней и большой экспрессией рецептора и мало затрагивает клетки с небольшим количеством EGFR [115, 116]. Еще ряд моноклональных антител, ингибирующих EGFR, прошел несколько стадий клинических испытаний, но не получил разрешения для широкого клинического применения в силу отсутствия выраженного улучшения от лечения по сравнению с уже применяемыми вариантами терапии. К ним отно-

Таблица 2. Антитела к EGFR, применяемые в клинической практике

Название	K_d	Тип	Тип рака
Цетуксимаб	0,1 нМ	химерное, C225 мыши и IgG1 человека	колоректальный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого
Панитумумаб	0,05 нМ	IgG2 человека	колоректальный рак, рак молочной железы
Нимотузумаб	1 нМ	IgG1, гуманизированное	плоскоклеточный рак головы и шеи, назофарингеальная карцинома, глиома, рак поджелудочной железы
Нецитумумаб	0,3 нМ	IgG1 человека	немелкоклеточный рак легкого

сятся гуманизированные IgG1 матузумаб и имгатузумаб, человеческие залутумумаб и долиготузумаб, который взаимодействует и с EGFR, и с ErbB3 [109].

Большая часть применяемых в настоящее время и разрабатываемых блокаторов связывания EGFR обладает двумя механизмами действия: ингибированием пролиферативного сигнального пути и антителозависимой цитотоксичностью. Однако цитотоксический компонент действия этих антител не способен обеспечить достаточный противоопухолевый эффект. Появление же активирующих мутаций в расположенных ниже по сигнальной цепи звеньях, как правило, сводит на нет блокирование сигнала, поступающего от рецептора. Наиболее известным примером таких мутаций являются активирующие мутации KRAS. Опухоли, в которых детектируется дикий тип KRAS, чувствительны к блокированию антителами, тогда как, например, мутации в кодонах 12 и 13 экзона 2 гена *KRAS* приводят к стабилизации функционально активного комплекса RAS-GTP и непрерывной передаче сигнала по MAPK-пути, и действие антител на опухоли с таким измененным *KRAS* не проявляется. Такие мутации встречаются в 40–45% случаев колоректального рака и в 15–30% случаев немелкоклеточного рака легких [117]. Активирующие мутации не ограничиваются *KRAS,* причиной устойчивости опухолей к блокирующей EGFR терапии могут быть также изменения в генах *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *PTEN* и других [118], а также экспрессия некодирующих РНК [119]. Кроме того, после первоначального ответа на лечение антителами к EGFR неизменно возникает вторичная резистентность, причиной которой могут быть как мутации *KRAS* [120], так и других генов [121].

Ингибиторы тирозинкиназной активности EGFR. После раскрытия деталей активации EGFR в результате связывания факторов роста огромные усилия были приложены для разработки и испытания ингибиторов фосфорилирования EGFR. В практику лечения ряда онкологических заболеваний (табл. 3) вошли такие ингибиторы, как гефитиниб (Иресса), эрлотиниб (Тарцева), лапатиниб (Тайверб), афатиниб (Товок), осимертиниб (Тагриссо), бригатиниб (Алунбриг) и дакомитиниб (Визимпро) [122], а также икотиниб (Конмана) [123]. Применение пероральных ингибиторов первого поколения (гефитиниб и эрлотиниб) при немелкоколеточном раке легкого (плоскоклеточный рак и аденокарцинома) показало значительно большую эффективность лечения по сравнению с традиционной химиотерапией [124]. Наиболее распространенными мутациями EGFR являются делеции 746–750 в экзоне 19 или точечная мутация с заменой лейцина на аргинин L858R [125]. Пациенты с активирующими мутациями EGFR оказались достаточно чувствительны к обратимым ингибиторам первого поколения, которые имеют во много раз большее сродство к этим мутантным формам рецептора по сравнению с нормальным EGFR. Несмотря на то, что эти ингибиторы оказались эффективными в качестве начальной терапии, они не действуют на сочетание вышеупомянутых мутаций, а также на ряд других, прежде всего, T790M [126]. Это стимулировало продвижение в практику необратимых ингибиторов второго поколения с более широким воздействием на другие рецепторы семейства ErbB, таких как афатиниб и дакомитиниб, призванных преодолеть нечувствительность EGFR с мутацией T790M к эрлотинибу и гефитинибу. Такой вариант оказался не более успешным, чем ингибиторы первого поколения, из-за невозможности достичь достаточной величины терапевтического воздействия в силу их токсичности для нормальных тканей [127]. Значительно успешнее в лечении немелкоклеточного рака легкого оказался более селективный осимертиниб [128, 129]. Несмотря на заметное увеличение продолжительности периода без прогресса

Таблица 3. Ингибиторы тирозинкинзы EGFR, применяемые в медицинской практике

Название	Мишень	Тип	Заболевание
Гефитиниб	EGFR, del 746–750, L858R	обратимый	немелкоклеточный рак легких
Эрлотиниб	EGFR, del 746–750, L858R	обратимый	немелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы
Икотиниб	EGFR, del 746–750, L858R	обратимый	немелкоклеточный рак легких
Бригатиниб	EGFR, C797S, ALK*	обратимый	немелкоклеточный рак легких
Лапатиниб	EGFR, ErbB2	необратимый	рак молочной железы
Афатиниб	EGFR, ErbB2	необратимый	немелкоклеточный рак легких
Осимертиниб	EGFR, del 746–750, L858R, T970M, ins 20	необратимый	немелкоклеточный рак легких
Дакомитиниб	EGFR, del 19, L858R, HER2, EGFR, HER4, AKT, ERK	необратимый	немелкоклеточный рак легких

* ALK – киназа анапластической лимфомы.

заболевания, постепенное развитие резистентности к лечению требует как применения сочетания разных ингибиторов, так и поиска дальнейших более эффективных средств воздействия. Возникающие мутации в локусе C797, по которому осимертиниб присоединяется к EGFR, приводят к появлению устойчивых вариантов опухолей [130].

В основном успехи в применении ингибиторов тирозинкиназной активности EGFR относятся к немелкоклеточному раку легкого. Для данного варианта рака легких характерна как сверхэкспрессия EGFR (примерно в половине случаев), так и мутации, приводящие к перманентной активации рецептора [127]. Подбор комбинаций ингибиторов тирозинкиназ на основании разной чувствительности мутантных форм EGFR к разным ингибиторам [131, 132] с добавлением блокирующих антител могут, по-видимому, улучшать результаты терапии [127]. Таким образом, разработка панели ингибиторов EGFR стала ярким примером персонализованного подхода к лечению рака, опирающегося на данные о строении и мутациях одного из ключевых звеньев развития злокачественного процесса.

Общими ограничениями направленной на блокирование EGFR терапии являются необходимость перманентного применения терапевтических средств и недостаточная эрадикация раковых клеток. Длительность применения ингибиторов и наличие большого количества опухолевых клеток приводят к появлению резистентных к терапии вариантов и последующей клональной селекции наиболее устойчивых из них [127]. Снятия ингибирования апоптоза в результате перманентной активации Ras/Raf/MEK/ERK через EGFR [133] оказывается недостаточно для радикального уничтожения опухолей. Возникающая резистентность опухолей обусловлена, помимо мутаций в гене *EGFR*, также другими нарушениями в сигнальной сети, регулирующей пролиферацию. Такие нарушения включают в себя активирующие мутации KRAS, BRAF, каталитической субъединицы фосфатидилинозитол-4-5-бифосфат киназы (PIK3CA), слияние генов, затрагивающее активацию *RET*, *FGFR3* и *BRAF*, амплификацию *MET*, *FGFR*, *ErbB2* и другие [134–139], а также экспрессию длинных некодирующих РНК, например UCA1 (urothelial cancer-associated 1) [140]. В ряде случаев лечение ингибиторами приводит к изменению типа заболевания, переходу от немелкоклеточного к мелкоклеточному раку легкого [141].

Таким образом, направленная или таргетная терапия, достаточно хорошо развитым примером которой являются подходы, направленные на EGFR, сталкивается с той же проблемой появления устойчивости опухоли, что и традиционная химиотерапия. Как уже было описано выше, одним из решений этой проблемы может служить подбор набора ингибиторов активированного сигнального пути, включающий не только ингибиторы EGFR, но и ингибиторы нижележащих звеньев – KRAS, BRAF и других. Быстрое развитие методов жидкостной биопсии [142] и современных методов секвенирования – NGS (new generation sequencing) [143] делают эту проблему технически решаемой. Тем не менее высокая гетерогенность, генетическая нестабильность и клональная эволюция опухолей [144–146] не позволяют рассчитывать на безус-

ловный успех такого подхода. Блокировка пролиферативного сигнала замедляет рост опухоли, но не приводит к ее исчезновению. Добавление к лечению токсических химиотерапевтических средств далеко не во всех случаях способно привести к излечению. Поэтому во многих лабораториях большое внимание уделяется развитию другого решения проблемы устойчивости онкологических заболеваний к терапии – использованию направленного подхода не для ингибирования патологически измененных звеньев нормальных регуляторных процессов, а для селективного уничтожения раковых клеток. Многочисленные варианты различных онкологических заболеваний с повышенной экспрессией EGFR являются перспективными кандидатами на разработку такого подхода.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ EGFR В КАЧЕСТВЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ

Традиционно для терапии онкологических заболеваний чаще всего применяется химиотерапия, действующая в первую очередь на быстро делящиеся клетки, и радиотерапия, которая в большей мере воздействует на ДНК и также сильнее воздействует на делящиеся клетки. И то, и другое воздействие не являются селективными по отношению к собственно раковым клеткам, что приводит к появлению тяжелых побочных эффектов, делающих затруднительным излечение. Кроме этих основных методов для противораковой терапии разрабатываются и в некоторых случаях используются также фотодинамическая терапия (ФДТ) и генотерапия. Все эти варианты терапевтических воздействий могут быть соединены с таргетной терапией не только в виде сочетания одновременного или последовательного применения, но и для направленной доставки соответствующего терапевтического начала (токсического химиотерапевтического вещества, источника ионизирующего излучения, фотосенсибилизатора (ФС) или необходимого гена) в опухолевые клетки-мишени. EGFR в силу прямой вовлеченности в активацию деления клеток, эндоцитируемости и частой повышенной экспрессией при многих онкологических заболеваниях представляется одним из самых привлекательных объектов для создания направленной противоопухолевой терапии.

Как уже было отмечено в разделе «Эндоцитоз и дальнейший внутриклеточный транспорт», стимуляция внеклеточными сигнальными лигандами увеличивает скорость интернализации EGFR на порядки. Этот процесс зависит от димеризации рецептора и его автофосфорилирования. Антитела к EGFR блокируют этот процесс, однако по крайней мере некоторые из них способны относительно эффективно поступать в клетки. Так, mAb 225, вариабельная часть которого обеспечивает функциональность цетуксимаба, эндоцитируется со скоростью в 6–7 раз меньшей скорости эндоцитоза EGF [147], что тем не менее существенно превышает поступление EGFR без лиганда в клетку. Как показывают эксперименты, проведенные на клетках аденокарциномы легкого A549 с умеренной экспрессией EGFR (~10^5 рецепторов на клетку), больше половины поглощенного mAb и EGFR в течение первого часа возвращаются обратно на поверхность, в отличие от рецептора в комплексе с EGF, более 70% которого остается внутри клетки и деградирует в лизосомах. Интересно, что цетуксимаб способен обеспечивать транспорт некоторой части EGFR в ЭР, где он обнаруживается в комплексе с Sec61, и далее в ядро клетки [148]. Такой транспорт зависит от связывания антител в сайте связывания лигандов и поливалентности связывания антитела, поскольку он не был обнаружен для блокирующего антитела к другому участку рецептора и Fab′-фрагментов цетуксимаба [148]. Для эндоцитоза как цетуксимаба, так и наночастиц, покрытых им, требуется кластеризация комплексов лиганд–рецептор на клеточной поверхности в гликосфинголипидных доменах, после чего следует кавеолин- и динамин-2-зависимый эндоцитоз [149]. Кластеризация цетуксимаб-рецепторных комплексов в качестве промежуточного шага в процессе инициирования эндоцитоза была также обнаружена при помощи анализа движения единичных частиц на поверхности клетки [150]. Вышеизложенное объясняет большой интерес к цетуксимабу в качестве лиганда для доставки цитотоксических агентов в раковые клетки-мишени. Перспективным вариантом лигандов считаются искусственные антителоподобные каркасные белки, позволяющие позиционировать в пространстве набор остатков, обеспечивающих взаимодействие с целевой молекулой. К ним относятся аффибоди, создаваемые на основе белка A, которые отличаются небольшим размером [151]. Несколько аффибоди эффективно взаимодействуют с EGFR, но скорость их эндоцитоза также невелика [152]. Существует также используемый для создания различных систем доставки противораковых средств короткий пептид GE11, способный связываться с EGFR, обеспечивающий интернализацию модифицированных им наночастиц [153]. Среди искусственных лигандов, способных связываться с EGFR, помимо антител и пептидов, есть и аптамеры. РНК-аптамер E07 оказался способным

связываться с EGFR с наномолярным сродством, и около четверти связанного с поверхностью аптамера было способно интернализоваться клетками за 30 минут [154].

Наночастицы. Наночастицы представляют собой крайне гетерогенный по свойствам класс объектов, размер которых позволяет присоединять к ним (или нагружать в них) большое количество низкомолекулярных противоопухолевых агентов, например традиционных химиотерапевтических средств. Уже только такое объединение может существенно изменять распределение и фармакокинетику веществ. В отношении онкологических заболеваний присоединение противоопухолевых агентов к наночастицам производится в расчете на эффект повышенной проницаемости и удержания (enhanced permeability and retention, EPR) [155]. На использование этого эффекта, причиной которого является наличие значительного числа больших пор в местах быстрого и хаотичного роста сосудов в опухоли, возлагали большие надежды в использовании наночастиц для противоопухолевой терапии. Однако клинические исследования показали, что, в отличие от экспериментальных опухолей у мышей, в опухолях человека EPR менее выражен и может сильно различаться не только между опухолями одного типа у разных пациентов, но и между разными метастазами одного пациента [156]. Среди вариантов преодоления нестабильности эффекта наночастиц рассматривается и придание им функционального адреса, в частности присоединение лиганда к EGFR [157, 158].

Типичным вариантом реализации такого подхода и единственным дошедшим пока до стадии клинической проверки являются иммунолипосомы, нагруженные одним из наиболее распространенных противораковых лекарств – доксорубицином. С целью обеспечения устойчивости в крови такие липосомы несут остатки полиэтиленгликоля (ПЭГ), а для придания специфичности по отношению к раковым клеткам со сверхэкспрессией EGFR – Fab′-фрагмент цетуксимаба [159]. Такие липосомы, названные авторами anti-EGFR ILs-dox, содержат в среднем по 4000 молекул доксорубицина, лучше переносятся пациентами, чем те же дозы свободного доксорубицина и не показывают побочных эффектов, связанных с блокированием EGFR. В настоящее время этот вариант направленной доставки доксорубицина в клетки с повышенной экспрессией EGFR при лечении трижды негативного рака молочной железы находится на второй стадии клинических испытаний. В экспериментах на животных введение такого рода липосом с Fab′-фрагментами цетуксимаба способно в 6 раз увеличивать накопление лекарства в ксенографтах рака молочной железы MDA-MB-468 [160].

Целый ряд похожих систем доставки, использующих химиотерапевтические средства, упакованные в липосомы, которые модифицируют лигандами к EGFR, находится на стадии доклинических исследований (рис. 2). К ним относятся иммунолипосомы с доксорубицином и цетуксимабом, присоединенным через фолат-связывающий белок [161], с бор-содержащим анионом для нейтрон-захватной терапии, а также с холестерин-цетуксимабом [162], цисплатином и нимотузумабом [163], 5-фторурацилом и цетуксимабом [164], липосомы с ФС фталоцианином цинка и однодоменными антителами к EGFR EGa1 [165], липосомы с оксалиплатином и EGF [166], цисплатином и mAb к EGFR [167], липосомы с гемцитабином с присоединенными ПЭГ и mAb к EGFR [168]. Необходимо отметить, что такие подходы с направленной доставкой противораковых средств показали возможность преодоления множественной лекарственной устойчивости, что часто является проблемой при терапии рака [160].

Все перечисленные варианты могут оказаться полезными для клиники, однако поиск оптимального лекарства, лиганда и способа присоединения продолжает интенсивно развиваться. Так, для получения однородного присоединения к липосомам использовали сортазу, соединяющую пептидные цепи по специфической последовательности LPETG на *C*-конце с пентаглицином на *N*-конце [169]. Другим направлением совершенствования противораковых средств является применение нескольких цитотоксических агентов, загруженных в иммунолипосомы. Для реализации этого подхода были исследованы иммунолипосомы с доксорубицином и винорелбином с новыми однодоменными scFv EGFR-s10 [170]. Еще одним вариантом использования сочетанного воздействия являются иммунолипосомы с цетуксимабом, несущие доксорубицин и β-излучатель ^{188}Re в качестве потенциального тераностического средства [171]. Общим направлением поиска лучших противораковых лекарств является разработка многофункциональных систем доставки лекарственных средств. В применении липосомных вариантов доставки это реализуется, в частности в виде так называемых функционализованных липосом. Одним из вариантов подхода являются термочувствительные липосомы с доксорубицином и пептидом GE11 [172]. Эти липосомы, стабильные при температуре тела, при повышении температуры становятся неустойчивыми и высвобождают лекарство при 40 °C, что при необхо-

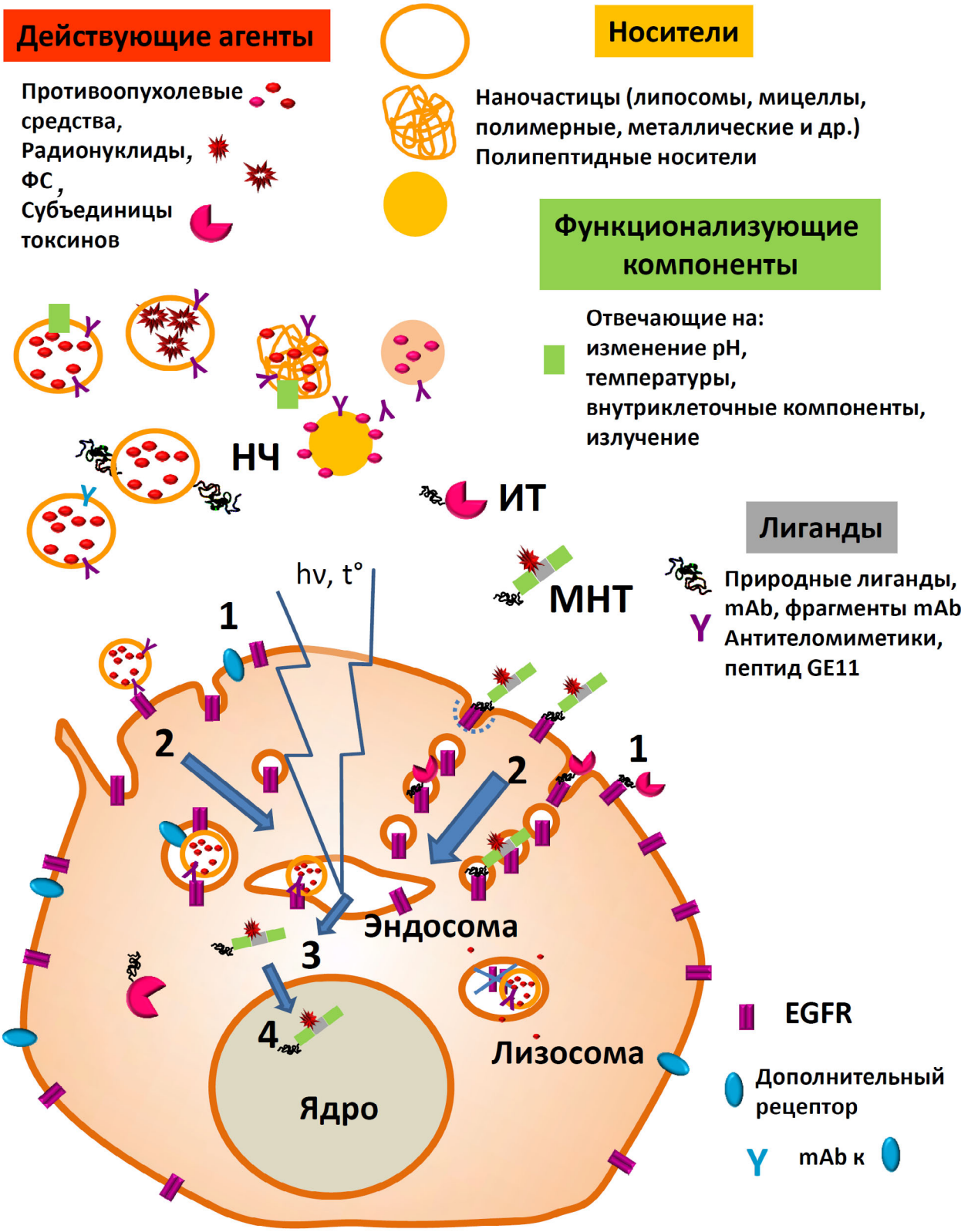

Рис. 2. Схема основных разрабатываемых подходов для направленной доставки терапевтических агентов в клетки через EGFR. 1 – Связывание с рецептором, 2 – эндоцитоз: макропиноцитоз, фагоцитоз, кавеолиновый, быстрые клатрин-зависимый, эндофилин-зависимый варианты эндоцитоза, 3 – выход из эндосом, 4 – транспорт в ядро. Сокращения: ФС – фотосенсибилизаторы, НК – нуклеиновые кислоты, НЧ – наночастицы, ИТ – иммунотоксины, МНТ – модульные нанотранспортеры

димости может обеспечить дополнительную селективность воздействия за счет локального нагрева. Чувствительность к pH окружения является другим вариантом реализации дополнительных функций: иммунолипосомы с mAb к EGFR начинают высвобождать гемцитабин при понижении pH [173], что может быть реализовано как в эндосомах, так и в закисленной части внеклеточного пространства ряда опухолей.

Еще одним вариантом наночастиц для направленной доставки противораковых лекарств в клетки с использованием EGFR являются мицеллы. Мицеллы на основе сополимеров гидроксипропилметакриламида и лактата с ПЭГ с доксорубицином присоединенным через pH-чувствительный линкер были модифицированы наноантителом EGa1 для взаимодействия с EGFR. Полученные мицеллы обладали как способностью тормозить рост ксенографтов клеток рака головы и шеи за счет блокирования EGFR, так и токсичностью за счет доставки доксорубицина в клетки [174]. Подобная мицеллярная конструкция, несущая паклитаксел, была создана на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA) и ПЭГ с присоединенным цетуксимабом [175]. Следующий вариант наночастиц с паклитакселом и квантовыми точками для тераностики содержит фосфолипид с присоединенным ПЭГ и лиганд к EGFR в виде цетуксимаба или аптамера. Мицеллы с лигандами к EGFR достоверно сильнее тормозили рост ксенотрансплантата рака поджелудочной железы, чем исходные варианты наночастиц [176]. Создаются также мицеллярные конструкции, доставляющие в клетки несколько терапевтических агентов. Примером такой конструкции могут служить катионные мицеллы с цетуксимабом, доставляющие цитотоксический гемцитабин и миРНК miR-205, сниженный уровень которой ассоциирован с опухолевыми стволовыми клетками. Такой подход, предназначенный для лечения прогрессирующего рака поджелудочной железы, привел к повышению эффективности терапии ксенографтов по сравнению с каждым из агентов, доставляемых мицеллами по отдельности [177]. Еще один вариант мицелл – токоферил-ПЭГ с присоединенным цетуксимабом был успешно использован для терапии ксенографтов трижды негативного рака молочной железы для доставки паклитаксела [178].

Ряд работ по направленной доставке цитотоксических средств используют лиганды к нескольким рецепторам раковых клеток. Особенно интересными представляются подходы с одновременной нацеленностью на EGFR, как рецептор, вызывающий эпителиально-мезенхимальный переход [4], и маркеры стволовых раковых клеток. Перспективным вариантом являются наночастицы из сополимеров PLGA с двойной специфичностью, обусловленной аптамерами к EGFR и CD133, нагруженные салиномицином, антибиотиком, наиболее активно действующим на стволовые клетки опухолей [179]. Подобной направленностью обладают наночастицы на основе гиалуроновой кислоты с двойной специфичностью – EGFR (пептид GE11) и CD44 за счет связывания с ней гиалуроновой кислоты. В качестве цитотоксического агента эти частицы несли сериновую протеазу гранзим Б [180].

К настоящему времени создано и проверено на модельных опухолях лабораторных животных большое количество сочетаний взаимодействующих с EGFR наночастиц и загружаемых в них терапевтических агентов. Так, гибридные липид-PLGA наночастицы с присоединенным ПЭГ и Fab′-фрагментами антител к EGFR, загруженные адрианомицином, тормозили рост ксенографтов гепатоцеллюлярной карциномы [181]. Несущие паклитаксел самособирающиеся липидные наночастицы, стабилизированные плюроником и ПЭГ, с присоединенными mAb к EGFR также показали увеличенную эффективность по отношению к клеткам рака яичника *in vitro* и *in vivo* [182]. Вариант с пролекарством паклитаксел-ацетатом, загруженным в наночастицы PLGA с присоединенным цетуксимабом, был исследован при терапии ксенографтов рака легкого A549 и не показал улучшения накопления в опухоли. Тем не менее иммунонаночастицы с цетуксимабом показали лучший терапевтический эффект по сравнению с исходными наночастицами [183]. Доставку паклитаксела в клетки рака желудка *in vitro* и *in vivo* обеспечивали наночастицы на основе полиглутамата и хитозана с присоединенным цетуксимабом [184]. Наночастицы PLGA с использованием цетуксимаба и паклитаксела показали также увеличение эффективности терапии ксенографтов рака легкого [185]. Наночастицы из двуокиси кремния с доксорубицином, модифицированные цетуксимабом, улучшали терапию ксенографтов гепатоцеллюлярной карциномы [186].

Многие перспективные варианты лекарственных средств используют вещества, о применении которых в медицинской практике нет достаточной информации. В таких случаях путь от результатов, полученных на культурах клеток и на животных, до клинического применения требует значительного времени и больших затрат. Примером попытки создания варианта с максимальным количеством уже разрешенных для лечения компонентов служат модифициро-

ванные ПЭГ липидные наночастицы на основе лецитина с присоединенным EGF, несущие гемцитабин [187].

Собственные свойства материала наночастиц также могут быть использованы при направленной доставке с помощью EGFR. Так, наночастицы оксида железа с присоединенным цетуксимабом могут быть использованы не только для магнитно-резонансной диагностики, но и для усиления эффекта радиотерапии. Попадая в клетки, такие частицы вызывают при облучении увеличение продукции активных форм кислорода (АФК), что увеличивает эффект радиотерапии ксенографтов глиомы [188].

Дополнительное покрытие гемцитабином золотых наночастиц с присоединенным цетуксимабом оказывало терапевтический эффект при лечении ксенографтов аденокарциномы поджелудочной железы [189]. Нельзя не упомянуть и о возможности использования золотых наночастиц, покрытых антителами к EGFR для фототермального уничтожения клеток опухоли [190]. В этом случае специфическое поглощение наночастиц является причиной долговременного удерживания наночастиц в опухоли.

Приведенные примеры показывают широкое поле деятельности для совершенствования традиционных химиотерапевтических средств лечения рака с помощью их направленной доставки и добавления фармакокинетических, собственных транспортных и цитотоксических свойств. Общим для этих подходов является необходимость включения в состав конструкций элементов, предотвращающих поглощение частиц мононуклеарно-макрофагальной системой, в качестве которых чаще всего используют ПЭГ.

Радионуклидная терапия. В качестве цитотоксического начала в направленной радионуклидной терапии используются изотопы, испускающие α-, β-частицы, γ-излучение и электроны Оже (ЭО). Для β-частиц нахождение внутри клетки не имеет значения с точки зрения повреждения раковой клетки, эндоцитоз может только улучшить удержание в опухоли присоединенного к лекарственному средству β-излучателя. Действие α-частиц существенно более выражено при излучении внутри ядра, для проявления эффекта ЭО, как правило, необходима ядерная локализация. Часто радионуклиды, используемые для терапии и диагностики, испускают несколько видов излучения. С точки зрения доставки в клетки-мишени, наибольший интерес представляют ЭО, испускаемые в результате электронного захвата или внутренней конверсии. Они характеризуются очень малым пробегом в тканях (типично – в нанометровом диапазоне) и высокой линейной передачей энергии (9–26 кэВ/мкм). При распаде в непосредственной близости от ядерной ДНК эмиттеры ЭО являются перспективными агентами для избирательного уничтожения целевых клеток с минимальным повреждением окружающих [191]. Учитывая характерную для многих типов рака сверхэкспрессию EGFR на поверхности опухолевых клеток, а также способность EGFR импортироваться в ядро, были разработаны и разрабатываются различные варианты систем EGFR-направленной доставки эмиттеров ЭО разной степени сложности. Внутривенное введение меченных [^{125}I] мышиных mAb 425 приводило к существенному увеличению (с 7 до 16 месяцев) продолжительности жизни пациентов с тяжелыми формами глиобластомы при монотерапии [192]. Эти антитела являются отчасти интернализуемыми, как показали эксперименты с глиомными клеточными линиями от 20 до 40% антител, связанных с поверхностью клеток, могут интернализоваться [193]. Среди наиболее простых и хорошо изученных вариантов таких систем доставки находится EGF с присоединенным к нему хелатирующим агентом DTPA для связывания одного из перспективных для клинического применения эмиттеров ЭО – ^{111}In. Первые исследования эффективности [^{111}In]-DTPA-EGF были опубликованы 20 лет назад [191]. В них было показано, что [^{111}In]-DTPA-EGF проникал в экспрессирующие EGFR клетки рака молочной железы, при этом 15% интернализованной радиоактивности достигало клеточного ядра. Инкубация с [^{111}In]-DTPA-EGF значительно замедляла рост клеток-мишеней. В последующих работах была показана эффективность и безопасность подобного подхода *in vivo* на мышиной модели рака молочной железы [194], а также оценена потенциальная возможность замены EGF на связывающийся с EGFR, но не активирующий его, урезанный вариант EGF [195]. Первая фаза клинических исследований показала отсутствие высокой токсичности и иммуногенности [^{111}In]-DTPA-EGF после однократного введения [196]. Эффективность подобного подхода может быть улучшена путем введения в состав узнающих EGFR конструкций дополнительного сигнала ядерной локализации, позволяющего увеличить импорт в ядро. Так, добавление сигнала ядерной локализации в состав доставляющей ^{111}In конструкции на основе нимотузумаба (антитела к EGFR) значительно увеличило накопление радиоактивности в ядрах клеток рака молочной железы со сверхэкспрессией EGFR, тем самым придав конструкции большую цитотоксичность по сравнению с контрольной без сигнала ядерной локализации. Сигнал ядерной локализации был

успешно задействован и в более сложной системе двойной адресной доставки ^{111}In, где входящий в конструкцию EGF отвечал за узнавание клеток-мишеней, а антитело к γ-H2AX позволяло осуществить доставку радионуклида к маркеру ранней репарации ДНК гистону γ-H2AX [197]. Взаимодействие с опосредующими импорт в ядро факторами происходит в цитозоле, при этом после связывания с EGFR нацеленная на него конструкция претерпевает интернализацию и оказывается в замкнутых внутриклеточных везикулах. Собственный транспорт поверхностных рецепторов, в том числе для EGFR, в ядро невелик (см. раздел «Транспорт EGFR в ядро») и направлен в основном в лизосомы и на поверхность клетки. В то же время клетки обладают развитой системой транспорта между органеллами, которую можно использовать для изменения транспорта создаваемых лекарственных средств [198]. Для того чтобы доставить цитотоксические агенты в ядра клеток мишеней Sobolev et al. были разработаны рекомбинантные модульные конструкции, названные модульными нанотранспортерами (МНТ) [199-201]. Такие МНТ включают в себя следующие модули: EGF, связывание которого с EGFR на поверхности клеток-мишеней обеспечивает избирательность и запускает процесс интернализации; транслокационный домен дифтерийного токсина (ДТокс), обеспечивающего выход транспортеров в цитозоль; сигнал ядерной локализации – большого Т-антигена вируса SV-40; а также бактериальный гемоглобиноподобный белок (HMP) – носитель [199]. Было показано сохранение функциональной активности каждого модуля, входящего в состав МНТ [202], способность МНТ достигать ядер EGFR-экспрессирующих раковых клеток *in vitro* [202] и *in vivo* [203]. Первые данные о перспективности использования МНТ для доставки эмиттеров ЭО в ядра раковых EGFR-экспрессирующих клеток были получены *in vitro* с использованием двух различных радионуклидов: ^{125}I [204] и ^{67}Ga [205]. В обоих случаях 55–60% интернализованных радионуклидов, доставляемых МНТ, достигало ядер целевых клеток, и наблюдалось многократное усиление их цитотоксичности по сравнению с контролями. Для осуществления эффективной доставки ^{111}In с использованием МНТ был сначала разработан метод присоединения данного эмиттера ЭО к белкам (в частности, МНТ), позволяющий получить меченый продукт с очень высокой удельной радиоактивностью [206]. В итоге эффективность повреждающего действия ^{111}In после присоединения к МНТ значительно увеличивалась как на EGFR-экспрессирующих раковых клетках в культуре [206–208], так и *in vivo* на животной модели после однократного местного введения в EGFR-экспрессирующую опухоль, что приводило к дозозависимому терапевтическому эффекту, вплоть до исчезновения опухолей у 40% животных в группе с наибольшей дозой препарата [207].

Вариантом использования радионуклидной терапии, основанной на использовании повышенной экспрессии EGFR, являются липосомы с присоединенным ^{186}Re (излучающий β-частицы и ЭО) или ^{188}Re (только β-частицы), которые вводили постоперационно в резекционную полость крыс с ортотопическими опухолями рака молочной железы человека. Такой подход призван улучшить существующие химиотерапевтические и радиотерапевтические варианты терапии, используемые в клинике [209].

Высокая линейная передача энергии (50–230 кэВ/мкм) и относительно небольшой пробег (50–100 мкм) α-частиц делают испускающие их радионуклиды более цитотоксичными в случае их распада внутри клетки [200]. Адресная доставка эмиттеров α-частиц внутрь раковых клеток, экспрессирующих EGFR, была успешно осуществлена в ряде исследований. В основном в качестве нацеливающей на EGFR молекулы используют давно применяемое в клинике моноклональное антитело к EGFR, цетуксимаб. Так, α-эмиттер ^{213}Bi, присоединенный к цетуксимабу, показал высокую цитотоксичность *in vitro* на клетках трижды негативного рака молочной железы, экспрессирующих EGFR [210]. *In vivo* ^{213}Bi, доставляемый анти-EGFR антителом матузумабом, показал высокую эффективность на ортотопической мышиной модели рака мочевого пузыря человека, значительно увеличив продолжительность жизни животных по сравнению с контрольными группами [211, 212]. Пилотное исследование эффективности местного применения ^{213}Bi, доставляемого цетуксимабом, для лечения рака мочевого пузыря на стадии *in situ* продемонстрировало потенциальную перспективность такого подхода: у 3 из 12 пациентов наблюдалась полная ремиссия после одно- или двукратной инстилляции данного радиофармпрепарата [213].

На мышиной модели диссеминированных внутрибрюшинных опухолей LS-174T (рак кишечника человека) была показана эффективность противоопухолевого действия другого α-эмиттера, ^{212}Pb, доставляемого цетуксимабом: медианная продолжительность жизни животных увеличилась до 84 дней по сравнению с 34 днями в группе животных, которым вводили ^{212}Pb, доставляемый неспецифическим антителом [214]. Эффективность терапии ^{212}Pb–цетук-

симабом можно было еще увеличить как предварительным введением гемцитабина, так и комбинацией ^{212}Pb–трастузумабом, антителом к HER-2.

Доставка радионуклидов, испускающих α-частицы в ядра клеток-мишеней, позволяет увеличить как повреждающее действие на клетку самой α-частицы, так и задействовать цитотоксический потенциал ядер отдачи, образующихся при α-распаде [215]. Так, при доставке ^{211}At, присоединенного к МНТ, было показано специфичное увеличение цитотоксичности данного α-эмиттера до 18 раз на нескольких линиях раковых клеток со сверхэкспрессией EGFR [216].

Иммунотоксины. Использование в качестве токсического начала каталитических субъединиц бактериальных токсинов представляет собой еще один из возможных вариантов противоопухолевых средств. Такие вещества включают в себя токсин, в котором лигандная часть, обеспечивающая связывание с клетками, заменена на антитело, его фрагмент или другой лиганд к выбранному интернализуемому рецептору. Общепринятое название – иммунотоксины – не совсем удачно, поскольку к этому типу противораковых агентов относят и фрагменты токсинов, химически соединенные или генно-инженерно слитые с природными лигандами. К настоящему времени было создано и исследовано более полутора десятков конструкций с лигандами к EGFR и частями различных токсинов, главным образом псевдомонадного экзотоксина, дифтерийного токсина и сапорина [217–219]. Природные токсины помимо собственно токсической активности обладают также собственным механизмом проникновения в цитозоль клетки. Например, дифтерийный токсин за счет транслокационного домена в слабокислой среде способен к встраиванию в мембрану эндосомы и переносу каталитической субъединицы в цитозоль, псевдомонадный экзотоксин по системе везикулярного транспорта через аппарат Гольджи попадает в ЭР и оттуда путем ретроградного транспорта в цитозоль. АДФ-рибозилирующие субъединицы этих токсинов обладают крайне высокой цитотоксичностью, что часто ставит вопрос о достаточности для терапевтического применения ширины терапевтического диапазона иммунотоксинов [220]. Тем не менее три иммунотоксина уже получили одобрение для клинического применения при лечении нескольких гематологических онкологий: на основе IL-2 и части дифтерийного токсина (Онтак) для лечения Т-клеточной лимфомы; анти-CD22 с частью псевдомонадного экзотоксина (Лумоситиі) для лечения волосатоклеточного лейкоза и на основе IL-3 с частью дифтерийного токсина (Элзонрис) для лечения злокачественных бластных плазмоцитоидных дендритных клеток [220].

Создание лекарственного средства, использующего такой принцип для лечения солидных опухолей, представляет собой более сложную задачу. Тем не менее одно из таких соединений, ТП-38, представляющее собой лиганд к EGFR, TGFα, слитый с частью псевдомонадного экзотоксина с делецией, оставляющей токсическую АДФ-рибозилирующую активность, но неспособной связываться с клетками, показало обещающие результаты в доклинических исследованиях. Этот иммунотоксин был применен для проверки возможности лечения глиобластомы при местном введении в головной мозг при помощи конвекционно-усиленной доставки. Для глиобластом характерна частая сверхэкспрессия EGFR (см. раздел «Экспрессия EGFR при онкологических заболеваниях»). Исследования показали, что такой метод интрапаренхимальной доставки лекарственных средств привел к полному ответу на лечение у нескольких пациентов [221]. Аналогичный иммунотоксин (D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL) [222] был создан с использованием вариабельного фрагмента антитела, способного связываться как с диким типом EGFR, так и с EGFRvIII (постоянно активированным мутантом, делеционным по части внеклеточного домена рецептора) [223], который особенно часто встречается при глиобластомах. Данная конструкция показала значительное увеличение продолжительности жизни животных при терапии ортотопических опухолей глиом человека у иммунодефицитных мышей [224]. Сочетание терапии D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL ортотопических опухолей головного мозга у мышей с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа αCTLA-4/αPD-1/αPD-L1 позволило элиминировать экспериментальные глиомы у части животных [225].

Доставка фотосенсибилизаторов. ФДТ представляет собой достаточно интересный и перспективный подход к лечению ряда заболеваний, в первую очередь онкологических [226]. Данный вид терапии основан на избирательном накоплении в опухоли ФС и последующем ее облучении светом с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения ФС. При этом происходит запуск фотодинамических реакций, приводящих к образованию АФК, обладающих сильным повреждающим действием. Пробег наиболее реакционноспособных АФК (синглетный кислород, гидроксильный радикал) ограничен несколькими десятками нанометров, что делает их наиболее эффективными в случае попадания в ядро целевой клетки [227, 228]. Для

доставки ФС в ядра раковых клеток-мишеней были исследованы МНТ, в том числе нацеленные на EGFR. Было показано сохранение способности ФС, присоединенных к МНТ, генерировать АФК при облучении [202]. ФС, присоединенный к МНТ, обладал на три порядка увеличенной фотоцитотоксичностью на культурах раковых клеток со сверхэкспрессией EGFR по сравнению со свободным ФС [229, 202]. Значительное увеличение эффективности фотодинамического действия ФС, присоединенного к МНТ, по сравнению со свободным было показано *in vivo* на бестимусных мышах с привитой эпидермоидной карциномой человека A431, характеризующейся сверхэкспрессией EGFR. Так, эффективность проводимой ФДТ привела к 75% выживших животных, при лечении ФС, доставляемым МНТ, при 20% выживших животных при лечении в идентичных условиях свободным ФС [203].

Среди наиболее продвинутых к использованию средств необходимо отметить RM-1929, представляющее собой иммуноконъюгат ФС dyeIRDye700DX с цетуксимабом, антителом к EGFR, в настоящее время проходящий клинические испытания для лечения рецидивирующего рака головы и шеи методом ФДТ [230]. Целый ряд иммуноконъюгатов ФС mAb или их фрагментами находится на стадии доклинических исследований [231].

Генотерапевтические подходы. Несколько комбинированных подходов было предложено для транспорта через EGFR генетического материала, генов и миРНК. Для этого использовали, например перенацеливание аденовирусной трансфекции на клетки, сверхэкспрессирующие EGFR с помощью химерного белка, состоящего из EGFR и внеклеточного домена рецептора аденовируса hCAR (human coxsackie B and adenovirus receptor) [232]. Модифицированный аденовирус, доставляющий ген тимидинкиназы вируса простого герпеса человека, обеспечивал уничтожение клеток опухоли яичников, что замедляло рост ксенографтов [232]. Другим вариантом комбинированного подхода является доставка гена натрий-иодидного транспортера, который способен накачивать в клетки иодид. Наночастицы на основе полиэтиленимина и GE11 доставляли этот ген в ксенографты рака толстой кишки, что обеспечивало как визуализацию опухолей, так и торможение их роста [233]. Липосомы с миРНК для инактивации сурвивина с двумя лигандами – пептид GE11 к EGFR и гиалуроновая кислота к CD44 – тормозили рост ксенографтов гепатоцеллюлярной карциномы [234]. Нельзя не отметить, что EGFR, в особенности его мутантный вариант EGFRvIII, образующий уникальный эпитоп, интенсивно исследуются, в том числе, в нескольких клинических испытаниях на возможность использования в CAR-T терапии [235].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Анализ тенденций исследования EGFR, его участия в онкологических заболеваниях и разработке методов использования для лечения показывает, что, как и прежде, большое внимание уделяется способам блокирования EGFR-опосредованной сигнализации. Однако все больший интерес вызывают подходы, интегрирующие использование сверхэкспрессии и изменения в EGFR с дополнительными воздействием, прежде всего, поражающим, на раковые клетки [93, 236, 237]. Помимо традиционных широко применяемых комбинаторных подходов с одновременным использованием нескольких лекарств, создаются многофункциональные системы, сочетающие доставку с несколькими одновременно или последовательно применяемыми адресами с уничтожающим измененную клетку воздействием. Наряду с направленным цитотоксическим воздействием рецептор-опосредуемая доставка в клетку-мишень может быть использована и для вмешательства во внутриклеточную регуляцию, например путем доставки блокирующих регуляторные процессы антител или транскрипционных факторов [238–240]. EGFR, как один из наиболее изученных входов в сигнальную систему, регулирующую извне пролиферацию клетки, является часто используемым вариантом для обкатки новых систем доставки в клетку-мишень. Сложности на пути практического использования таких подходов добавляет необходимость учета возможностей организма по нейтрализации чужеродных веществ и частиц, однако эти препятствия не выглядят непреодолимыми в обозримой перспективе.

Финансирование. Работа была выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-14-50385\19).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W., and Burgess, A. W. (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling, *Exp. Cell Res.*, **284**, 31-53, doi: 10.1016/s0014-4827(02)00098-8.
2. Yarden, Y., and Pines, G. (2012) The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology, *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 553-563, doi: 10.1038/nrc3309.
3. Roskoski, R., Jr. (2014) The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer, *Pharmacol. Res.*, **79**, 34-74, doi: 10.1016/j.phrs.2013.11.002.
4. Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 178-196, doi: 10.1038/nrm3758.
5. Sigismund, S., Avanzato, D., and Lanzetti, L. (2018) Emerging functions of the EGFR in cancer, *Mol. Oncol.*, **12**, 3-20, doi: 10.1002/1878-0261.12155.
6. Lemmon, M. A., Schlessinger, J., and Ferguson, K. M. (2014) The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6**, a020768, doi: 10.1101/cshperspect.a020768.
7. Arkhipov, A., Shan, Y., Das, R., Endres, N. F., Eastwood, M. P., Wemmer, D. E., Kuriyan, J., and Shaw, D. E. (2013) Architecture and membrane interactions of the EGF receptor, *Cell*, **152**, 557-569, doi: 10.1016/j.cell.2012.12.030.
8. Purba, E. R., Saita, E. I., and Maruyama, I. N. (2017) Activation of the EGF receptor by ligand binding and oncogenic mutations: the “rotation model”, *Cells*, **6**, 13, doi: 10.3390/cells6020013.
9. Holbro, T., and Hynes, N. E. (2004) ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 195-217, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440.
10. Frolov, A., Schuller, K., Tzeng, C. W., Cannon, E. E., Ku, B. C., Howard, J. H., Vickers, S. M., Heslin, M. J., Buchsbaum, D. J., and Arnoletti, J. P. (2007) ErbB3 expression and dimerization with EGFR influence pancreatic cancer cell sensitivity to erlotinib, *Cancer Biol. Ther.*, **6**, 548-554, doi: 10.4161/cbt.6.4.3849.
11. Zhu, S., Belkhiri, A., and El-Rifai, W. (2011) DARPP-32 increases interactions between epidermal growth factor receptor and ERBB3 to promote tumor resistance to gefitinib, *Gastroenterology*, **141**, 1738-1748, doi: 10.1053/j.gastro.2011.06.070.
12. Huang, Z., Wang, Y., Nayak, P. S., Dammann, C. E., and Sanchez-Esteban, J. (2012) Stretch-induced fetal type II cell differentiation is mediated via ErbB1-ErbB4 interactions, *J. Biol. Chem.*, **287**, 18091-18102, doi: 10.1074/jbc.M111.313163.
13. Saito, Y., Haendeler, J., Hojo, Y., Yamamoto, K., and Berk, B. C. (2001) Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 6387-6394, doi: 10.1128/mcb.21.19.6387-6394.2001.
14. Black, P. C., Brown, G. A., Dinney, C. P., Kassouf, W., Inamoto, T., Arora, A., Gallagher, D., Munsell, M. F., Bar-Eli, M., McConkey, D. J., and Adam, L. (2011) Receptor heterodimerization: a new mechanism for platelet-derived growth factor induced resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy for bladder cancer, *J. Urol.*, **185**, 693-700, doi: 10.1016/j.juro.2010.09.082.
15. Tanizaki, J., Okamoto, I., Sakai, K., and Nakagawa, K. (2011) Differential roles of trans-phosphorylated EGFR, HER2, HER3, and RET as heterodimerisation partners of MET in lung cancer with MET amplification, *Br. J. Cancer*, **105**, 807-813, doi: 10.1038/bjc.2011.322.
16. Peace, B. E., Hill, K. J., Degen, S. J., and Waltz, S. E. (2003) Cross-talk between the receptor tyrosine kinases Ron and epidermal growth factor receptor, *Exp. Cell Res.*, **289**, 317-325, doi: 10.1016/s0014-4827(03)00280-5.
17. Morgillo, F., Woo, J. K., Kim, E. S., Hong, W. K., and Lee, H. Y. (2006) Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib, *Cancer Res.*, **66**, 10100-10111, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1684.
18. Needham, S. R., Roberts, S. K., Arkhipov, A., Mysore, V. P., Tynan, C. J., Zanetti-Domingues, L. C., Kim, E. T., Losasso, V., Korovesis, D., Hirsch, M., Rolfe, D. J., Clarke, D. T., Winn, M. D., Lajevardipour, A., Clayton, A. H., Pike, L. J., Perani, M., Parker, P. J., Shan, Y., Shaw, D. E., and Martin-Fernandez, M. L. (2016) EGFR oligomerization organizes kinase-active dimers into competent signalling platforms, *Nat. Commun.*, **7**, 13307, doi: 10.1038/ncomms13307.
19. Ibach, J., Radon, Y., Gelleri, M., Sonntag, M. H., Brunsveld, L., Bastiaens, P. I., and Verveer, P. J. (2015) Single particle tracking reveals that EGFR signaling activity is amplified in clathrin-coated pits, *PLoS One*, **10**, e0143162, doi: 10.1371/journal.pone.0143162.
20. Clarke, D. T., and Martin-Fernandez, M. L. (2019) A brief history of single-particle tracking of the epidermal growth factor receptor, *Methods Protoc.*, **2**, 12, doi: 10.3390/mps2010012.
21. Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell*, **141**, 1117-1134, doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
22. Macdonald, J. L., and Pike, L. J. (2008) Heterogeneity in EGF-binding affinities arises from negative cooperativity in an aggregating system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 112-117, doi: 10.1073/pnas.0707080105.
23. Riese, D. J., and Stern, D. F. (1998) Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network, *Bioessays*, **20**, 41-48, doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199801)20:1<41::AID-BIES7>3.0.CO;2-V.
24. Wang, Y. N., Lee, H. H., Chou, C. K., Yang, W. H., Wei, Y., Chen, C. T., Yao, J., Hsu, J. L., Zhu, C., Ying, H., Ye, Y., Wang, W. J., Lim, S. O., Xia, W., Ko, H. W., Liu, X., Liu, C. G., Wu, X., Wang, H., Li, D., Prakash, L. R., Katz, M. H., Kang, Y., Kim, M., Fleming, J. B., Fogelman, D., Javle, M., Maitra, A., and Hung, M. C. (2018) Angiogenin/ribonuclease 5 is an EGFR ligand and a serum biomarker for erlotinib sensitivity in pancreatic cancer, *Cancer Cell*, **33**, 752-769, doi: 10.1016/j.ccell.2018.02.012.
25. Wang, Y. N., Lee, H. H., and Hung, M. C. (2018) A novel ligand-receptor relationship between families of ribonucleases and receptor tyrosine kinases, *J. Biomed. Sci.*, **25**, 83, doi: 10.1186/s12929-018-0484-7.
26. Pinkas-Kramarski, R., Shelly, M., Guarino, B. C., Wang, L. M., Lyass, L., Alroy, I., Alimandi, M., Kuo, A., Moyer, J. D., Lavi, S., Eisenstein, M., Ratzkin, B. J., Seger, R., Bacus, S. S., Pierce, J. H., Andrews, G. C., and Yarden, Y. (1998) ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network, *Mol. Cell Biol.*, **18**, 6090-6101, doi: 10.1128/mcb.18.10.6090.
27. Gilmore, J. L., Gallo, R. M., and Riese, D. J. (2006) The epidermal growth factor receptor (EGFR)-S442F mutant displays increased affinity for neuregulin-2beta and agonist-independent coupling with downstream sig-

nalling events, *Biochem. J.*, **396**, 79-88, doi: 10.1042/BJ20051687.
28. Santra, M., Reed, C. C., and Iozzo, R. V. (2002) Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope, *J. Biol. Chem.*, **277**, 35671-35681, doi: 10.1074/jbc.M205317200.
29. Zhu, J. X., Goldoni, S., Bix, G., Owens, R. T., McQuillan, D. J., Reed, C. C., and Iozzo, R. V. (2005) Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis, *J. Biol. Chem.*, **280**, 32468-32479, doi: 10.1074/jbc.M503833200.
30. Goldoni, S., Iozzo, R. A., Kay, P., Campbell, S., McQuillan, A., Agnew, C., Zhu, J. X., Keene, D. R., Reed, C. C., and Iozzo, R. V. (2007) A soluble ectodomain of LRIG1 inhibits cancer cell growth by attenuating basal and ligand-dependent EGFR activity, *Oncogene*, **26**, 368-381, doi: 10.1038/sj.onc.1209803.
31. Zheng, Y., Li, X., Qian, X., Wang, Y., Lee, J. H., Xia, Y., Hawke, D. H., Zhang, G., Lyu, J., and Lu, Z. (2015) Secreted and O-GlcNAcylated MIF binds to the human EGF receptor and inhibits its activation, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 1348-1355, doi: 10.1038/ncb3222.
32. Freed, D. M., Bessman, N. J., Kiyatkin, A., Salazar-Cavazos, E., Byrne, P. O., Moore, J. O., Valley, C. C., Ferguson, K. M., Leahy, D. J., Lidke, D. S., and Lemmon, M. A. (2017) EGFR ligands differentially stabilize receptor dimers to specify signaling kinetics, *Cell*, **171**, 683-695, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.017.
33. Macdonald-Obermann, J. L., and Pike, L. J. (2014) Different epidermal growth factor (EGF) receptor ligands show distinct kinetics and biased or partial agonism for homodimer and heterodimer formation, *J. Biol. Chem.*, **289**, 26178-26188, doi: 10.1074/jbc.M114.586826.
34. Liao, H. W., Hsu, J. M., Xia, W., Wang, H. L., Wang, Y. N., Chang, W. C., Arold, S. T., Chou, C. K., Tsou, P. H., Yamaguchi, H., Fang, Y. F., Lee, H. J., Lee, H. H., Tai, S. K., Yang, M. H., Morelli, M. P., Sen, M., Ladbury, J. E., Chen, C. H., Grandis, J. R., Kopetz, S., and Hung, M. C. (2015) PRMT1-mediated methylation of the EGF receptor regulates signaling and cetuximab response, *J. Clin. Invest.*, **125**, 4529-4543, doi: 10.1172/JCI82826.
35. Wang, W. J., Hsu, J. M., Wang, Y. N., Lee, H. H., Yamaguchi, H., Liao, H. W., and Hung, M. C. (2019) An essential role of PRMT1-mediated EGFR methylation in EGFR activation by ribonuclease 5, *Am. J. Cancer Res.*, **9**, 180-185.
36. Caldieri, G., Malabarba, M. G., Di Fiore, P. P., and Sigismund, S. (2018) EGFR trafficking in physiology and cancer, *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, **57**, 235-272, doi: 10.1007/978-3-319-96704-2_9.
37. Sorkin, A., and Goh, L. K. (2008) Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs, *Exp. Cell Res.*, **315**, 683-696, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.07.029.
38. Goh, L. K., and Sorkin, A. (2013) Endocytosis of receptor tyrosine kinases, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a017459, doi: 10.1101/cshperspect.a017459.
39. Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., and Yarden, Y. (1999) The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor, *J. Biol. Chem.*, **274**, 22151-22154, doi: 10.1074/jbc.274.32.22151.
40. Jiang, X., Huang, F., Marusyk, A., and Sorkin, A. (2003) Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits, *Mol. Biol. Cell*, **14**, 858-870, doi: 10.1091/mbc.e02-08-0532.
41. Sigismund, S., Algisi, V., Nappo, G., Conte, A., Pascolutti, R., Cuomo, A., Bonaldi, T., Argenzio, E., Verhoef, L. G., Maspero, E., Bianchi, F., Capuani, F., Ciliberto, A., Polo, S., and Di Fiore, P. P. (2013) Threshold-controlled ubiquitination of the EGFR directs receptor fate, *EMBO J.*, **32**, 2140-2157, doi: 10.1038/emboj.2013.149.
42. Huang, F., Goh, L. K., and Sorkin, A. (2007) EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **104**, 16904-16909.
43. Goh, L. K., Huang, F., Kim, W., Gygi, S., and Sorkin, A. (2010) Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor, *J. Cell Biol.*, **189**, 871-883, doi: 10.1083/jcb.201001008.
44. Oved, S., Mosesson, Y., Zwang, Y., Santonico, E., Shtiegman, K., Marmor, M. D., Kochupurakkal, B. S., Katz, M., Lavi, S., Cesareni, G., and Yarden, Y. (2006) Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases, *J. Biol. Chem.*, **281**, 21640-21651, doi: 10.1074/jbc.M513034200.
45. Boucrot, E., Ferreira, A. P., Almeida-Souza, L., Debard, S., Vallis, Y., Howard, G., Bertot, L., Sauvonnet, N., and McMahon, H. T. (2015) Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway, *Nature*, **517**, 460-465, doi: 10.1038/nature14067.
46. Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S., and Di Fiore, P. P. (2008) Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation, *Dev. Cell*, **15**, 209-219, doi: 10.1016/j.devcel.2008.06.012.
47. Sorkin, A., Krolenko, S., Kudrjavtceva, N., Lazebnik, J., Teslenko, L., Soderquist, A. M., and Nikolsky, N. (1991) Recycling of epidermal growth factor-receptor complexes in A431 cells: identification of dual pathways, *J. Cell Biol.*, **112**, 55-63, doi: 10.1083/jcb.112.1.55.
48. Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y., and Dikic, I. (2002) Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors, *Nature*, **416**, 183-187, doi: 10.1038/416183a.
49. Henriksen, L., Grandal, M. V., Knudsen, S. L. J., van Deurs, B., and Grovdal, L. M. (2013) Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands, *PLoS One*, **8**, e58148, doi: 10.1371/journal.pone.0058148.
50. West, M. A., Bretscher, M. S., and Watts, C. (1989) Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells, *J. Cell Biol.*, **109**, 2731-2739, doi: 10.1083/jcb.109.6.2731.
51. Yamazaki, T., Zaal, K., Hailey, D., Presley, J., Lippincott-Schwartz, J., and Samelson, L. E. (2002) Role of Grb2 in EGF-stimulated EGFR internalization, *J. Cell Sci.*, **115**, 1791-1802.
52. Orth, J. D., Krueger, E. W., Weller, S. G., and McNiven, M. A. (2006) A novel endocytic mechanism of epidermal growth factor receptor sequestration and internalization, *Cancer Res.*, **66**, 3603-3610, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2916.
53. Tomas, A., Futter, C. E., and Eden, E. R. (2014) EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer, *Trends Cell Biol.*, **24**, 26-34.
54. Wang, Y. N., Wang, H., Yamaguchi, H., Lee, H. J., Lee, H. H., and Hung, M. C. (2010) COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **399**, 498-504, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.096.
55. Demory, M. L., Boerner, J. L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Huttemann, M., Douglas, R., Haddad, G., and Parsons, S. J. (2009) Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect, *J. Biol. Chem.*, **284**, 36592-36604, doi: 10.1074/jbc.M109.000760.
56. Cao, X., Zhu, H., Ali-Osman, F., and Lo, H. W. (2011) EGFR and EGFRvIII undergo stress- and EGFR kinase

inhibitor-induced mitochondrial translocalization: a potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis, *Mol. Cancer*, **10**, 26, doi: 10.1186/1476-4598-10-26.

57. Wang, T. H., Lin, Y. H., Yang, S. C., Chang, P. C., Wang, T. C., and Chen, C. Y. (2017) Tid1-S regulates the mitochondrial localization of EGFR in non-small cell lung carcinoma, *Oncogenesis*, **6**, e361, doi: 10.1038/oncsis.2017.62.
58. Che, T. F., Lin, C. W., Wu, Y. Y., Chen, Y. J., Han, C. L., Chang, Y. L., Wu, C. T., Hsiao, T. H., Hong, T. M., and Yang, P. C. (2015) Mitochondrial translocation of EGFR regulates mitochondria dynamics and promotes metastasis in NSCLC, *Oncotarget*, **6**, 37349-37366, doi: 10.18632/oncotarget.5736.
59. Hsu, S. C., and Hung, M. C. (2007) Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family, *J. Biol. Chem.*, **282**, 10432-10440, doi: 10.1074/jbc.M610014200.
60. Shah, P., Chaumet, A., Royle, S. J., and Bard, F. A. (2019) The NAE pathway: autobahn to the nucleus for cell surface receptors, *Cells*, **8**, doi: 10.3390/cells8080915.
61. Lo, H. W., Ali-Seyed, M., Wu, Y., Bartholomeusz, G., Hsu, S. C., and Hung, M. C. (2006) Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1, *J. Cell Biochem.*, **98**, 1570-1583, doi: 10.1002/jcb.20876.
62. De Angelis Campos, A. C., Rodrigues, M. A., de Andrade, C., de Goes, A. M., Nathanson, M. H., and Gomes, D. A. (2011) Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **412**, 341-346, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.100.
63. Lo, H. W. (2010) Nuclear mode of the EGFR signaling network: biology, prognostic value, and therapeutic implications, *Discov. Med.*, **10**, 44-51.
64. Faria, J. A. Q. A., de Andrade, C., Goes, A. M., Rodrigues, M. A., and Gomes, D. A. (2016) Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **478**, 39-45, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.097.
65. Han, W., and Lo, H. W. (2012) Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations, *Cancer Lett.*, **318**, 124-134, doi: 10.1016/j.canlet.2012.01.011.
66. Wang, Y. N., Yamaguchi, H., Hsu, J. M., and Hung, M. C. (2010) Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins, *Oncogene*, **29**, 3997-4006, doi: 10.1038/onc.2010.157.
67. Wang, Y. N., Yamaguchi, H., Huo, L., Du, Y., Lee, H. J., Lee, H. H., Wang, H., Hsu, J. M., and Hung, M. C. (2010) The translocon Sec61beta localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus, *J. Biol. Chem.*, **285**, 38720-38729, doi: 10.1074/jbc.M110.158659.
68. Liao, H. J., and Carpenter, G. (2007) Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression, *Mol. Biol. Cell*, **18**, 1064-1072, doi: 10.1091/mbc.e06-09-0802.
69. Chaumet, A., Wright, G. D., Seet, S. H., Tham, K. M., Gounko, N. V., and Bard, F. (2015) Nuclear envelope-associated endosomes deliver surface proteins to the nucleus, *Nat. Commun.*, **6**, 8218, doi: 10.1038/ncomms9218.
70. Chia, P. L., Scott, A. M., and John, T. (2019) Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapies in mesothelioma, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **16**, 441-451, doi: 10.1080/17425247.2019.1598374.
71. Franovic, A., Gunaratnam, L., Smith, K., Robert, I., Patten, D., and Lee, S. (2007) Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13092-13097, doi: 10.1073/pnas.0702387104.
72. Liu, X., Wang, P., Zhang, C., and Ma, Z. (2017) Epidermal growth factor receptor (EGFR): a rising star in the era of precision medicine of lung cancer, *Oncotarget*, **8**, 50209-50220, doi: 10.18632/oncotarget.16854.
73. Grandis, J. R., and Tweardy, D. J. (1993) Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer, *Cancer Res.*, **53**, 3579-3584.
74. Atkins, D., Reiffen, K. A., Tegtmeier, C. L., Winther, H., Bonato, M. S., and Storkel, S. (2004) Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections, *J. Histochem. Cytochem.*, **52**, 893-901, doi: 10.1369/jhc.3A6195.2004.
75. Yen, L. C., Uen, Y. H., Wu, D. C., Lu, C. Y., Yu, F. J., Wu, I. C., Lin, S. R., and Wang, J. Y. (2010) Activating KRAS mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab, *Ann. Surg.*, **251**, 254-260, doi: 10.1097/SLA.0b013e3181bc9d96.
76. Lee, H. J., Xu, X., Choe, G., Chung, D. H., Seo, J. W., Lee, J. H., Lee, C. T., Jheon, S., Sung, S. W., and Chung, J. H. (2010) Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas: comparison of four commercially available antibodies by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization study, *Lung Cancer*, **68**, 375-382, doi: 10.1016/j.lungcan.2009.07.014.
77. Gatalica, Z., Millis, S. Z., Vranic, S., Bender, R., Basu, G. D., Voss, A., and Von Hoff, D. D. (2014) Comprehensive tumor profiling identifies numerous biomarkers of drug response in cancers of unknown primary site: analysis of 1806 cases, *Oncotarget*, **5**, 12440-12447, doi: 10.18632/oncotarget.2574.
78. Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., et al. (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1, *Cancer Cell*, **17**, 98-110.
79. Herbst, R. S., and Shin, D. M. (2002) Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy, *Cancer*, **94**, 1593-1611, doi: 10.1002/cncr.10372.
80. Kalyankrishna, S., and Grandis, J. R. (2006) Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer, *J. Clin. Oncol.*, **24**, 2666-2672, doi: 10.1200/JCO.2005.04.8306.
81. Chua, D. T., Nicholls, J. M., Sham, J. S., and Au, G. K. (2004) Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in patients with advanced stage nasopharyngeal carcinoma treated with induction chemotherapy and radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **59**, 11-20, doi: 10.1016/j.ijrobp.2003.10.038.
82. Wei, Q., Chen, L., Sheng, L., Nordgren, H., Wester, K., and Carlsson, J. (2007) EGFR, HER2 and HER3 expression in esophageal primary tumours and corresponding metastases, *Int. J. Oncol.*, **31**, 493-499.
83. Grobe, A., Eichhorn, W., Fraederich, M., Kluwe, L., Vashist, Y., Wikner, J., Smeets, R., Simon, R., Sauter, G., Heiland, M., and Blessmann, M. (2014) Immunohistochemical and FISH analysis of EGFR and its prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma, *J. Oral. Pathol. Med.*, **43**, 205-210, doi: 10.1111/jop.12111.

84. Wang, X., Niu, H., Fan, Q., Lu, P., Ma, C., Liu, W., Liu, Y., Li, W., Hu, S., Ling, Y., Guo, L., Ying, J., and Huang, J. (2016) Predictive value of EGFR overexpression and gene amplification on icotinib efficacy in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma, *Oncotarget*, **7**, 24744-24751, doi: 10.18632/oncotarget.8271.
85. Politi, A., Tsiambas, E., Mastronikolis, N. S., Peschos, D., Asproudis, I., Kyrodimos, E., Armata, I. E., Chrysovergis, A., Asimakopoulos, A., Papanikolaou, V. S., Batistatou, A., and Ragos, V. (2019) Combined EGFR/ALK expression analysis in laryngeal squamous cell carcinoma, *In Vivo*, **33**, 815-819, doi: 10.21873/invivo.11544.
86. Schrevel, M., Gorter, A., Kolkman-Uljee, S. M., Trimbos, J. B., Fleuren, G. J., and Jordanova, E. S. (2011) Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with cervical cancer, *Mod. Pathol.*, **24**, 720-728, doi: 10.1038/modpathol.2010.239.
87. Gui, T., and Shen, K. (2012) The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in epithelial ovarian cancer, *Cancer Epidemiol.*, **36**, 490-496, doi: 10.1016/j.canep.2012.06.005.
88. Tian, W. J., Huang, M. L., Qin, Q. F., Chen, Q., Fang, K., and Wang, P. L. (2016) Prognostic impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with cervical cancer: a meta-analysis, *PLoS One*, **11**, e0158787, doi: 10.1371/journal.pone.0158787.
89. Li, Q., Tang, Y., Cheng, X., Ji, J., Zhang, J., and Zhou, X. (2014) EGFR protein expression and gene amplification in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the cervix, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **7**, 733-741.
90. Rokita, M., Stec, R., Bodnar, L., Charkiewicz, R., Korniluk, J., Smoter, M., Cichowicz, M., Chyczewski, L., Niklinski, J., Kozlowski, W., and Szczylik, C. (2013) Overexpression of epidermal growth factor receptor as a prognostic factor in colorectal cancer on the basis of the Allred scoring system, *Onco. Targets Ther.*, **6**, 967-976, doi: 10.2147/OTT.S42446.
91. Yun, S., Kwak, Y., Nam, S. K., Seo, A. N., Oh, H. K., Kim, D. W., Kang, S. B., and Lee, H. S. (2018) Ligand-independent epidermal growth factor receptor overexpression correlates with poor prognosis in colorectal cancer, *Cancer Res. Treat.*, **50**, 1351-1361, doi: 10.4143/crt.2017.487.
92. Huang, C. W., Chen, Y. T., Tsai, H. L., Yeh, Y. S., Su, W. C., Ma, C. J., Tsai, T. N., and Wang, J. Y. (2017) EGFR expression in patients with stage III colorectal cancer after adjuvant chemotherapy and on cancer cell function, *Oncotarget*, **8**, 114663-114676, doi: 10.18632/oncotarget.23072.
93. Grapa, C. M., Mocan, T., Gonciar, D., Zdrehus, C., Mosteanu, O., Pop, T., and Mocan, L. (2019) Epidermal growth factor receptor and its role in pancreatic cancer treatment mediated by nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine*, **14**, 9693-9706, doi: 10.2147/IJN.S226628.
94. Cook, N., Frese, K. K., and Moore, M. (2014) Assessing the role of the EGF receptor in the development and progression of pancreatic cancer, *Gastrointest Cancer*, **4**, 23-37.
95. Karandish, F., and Mallik, S. (2016) Biomarkers and targeted therapy in pancreatic cancer, *Biomarkers Cancer*, **8**, BIC-S34414.
96. Park, S. J., Gu, M. J., Lee, D. S., Yun, S. S., Kim, H. J., and Choi, J. H. (2015) EGFR expression in pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **8**, 8298-8304.
97. Gonzalez-Conchas, G. A., Rodriguez-Romo, L., Hernandez-Barajas, D., Gonzalez-Guerrero, J. F., Rodriguez-Fernandez, I. A., Verdines-Perez, A., Templeton, A. J., Ocana, A., Seruga, B., Tannock, I. F., Amir, E., and Vera-Badillo, F. E. (2018) Epidermal growth factor receptor overexpression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and a meta-analysis, *Cancer Treat. Rev.*, **62**, 1-8, doi: 10.1016/j.ctrv.2017.10.008.
98. Sheng, Q., and Liu, J. (2011) The therapeutic potential of targeting the EGFR family in epithelial ovarian cancer, *Br. J. Cancer*, **104**, 1241-1245, doi: 10.1038/bjc.2011.62.
99. Wang, K., Li, D., and Sun, L. (2016) High levels of EGFR expression in tumor stroma are associated with aggressive clinical features in epithelial ovarian cancer, *Onco Targets Ther.*, **9**, 377-386, doi: 10.2147/OTT.S96309.
100. Perren, T. J. (2016) Mucinous epithelial ovarian carcinoma, *Ann. Oncol.*, **27** Suppl. 1, i53-i57, doi: 10.1093/annonc/mdw087.
101. Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J., Oka, K., Ishimaru, Y., and Ushio, Y. (2003) Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme, *Cancer Res.*, **63**, 6962-6970.
102. Zhao, L. L., Xu, K. L., Wang, S. W., Hu, B. L., and Chen, L. R. (2012) Pathological significance of epidermal growth factor receptor expression and amplification in human gliomas, *Histopathology*, **61**, 726-736, doi: 10.1111/j.1365-2559.2012.04354.x.
103. Wang, X., Zhang, S., MacLennan, G. T., Eble, J. N., Lopez-Beltran, A., Yang, X. J., Pan, C. X., Zhou, H., Montironi, R., and Cheng, L. (2007) Epidermal growth factor receptor protein expression and gene amplification in small cell carcinoma of the urinary bladder, *Clin. Cancer Res.*, **13**, 953-957, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2167.
104. Chaux, A., Cohen, J. S., Schultz, L., Albadine, R., Jadallah, S., Murphy, K. M., Sharma, R., Schoenberg, M. P., and Netto, G. J. (2012) High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutations in exons 19 and 21: a study using formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues, *Hum. Pathol.*, **43**, 1590-1595, doi: 10.1016/j.humpath.2011.11.016.
105. Carlsson, J., Wester, K., De La Torre, M., Malmstrom, P. U., and Gardmark, T. (2015) EGFR-expression in primary urinary bladder cancer and corresponding metastases and the relation to HER2-expression. On the possibility to target these receptors with radionuclides, *Radiol. Oncol.*, **49**, 50-58, doi: 10.2478/raon-2014-0015.
106. Girard, N. (2010) Thymic tumors: relevant molecular data in the clinic, *J. Thorac. Oncol.*, **5**, S291-S295, doi: 10.1097/JTO.0b013e3181f209b9.
107. Rusch, V. W., Klimstra, D. S., and Venkatraman, E. S. (1996) Molecular markers help characterize neuroendocrine lung tumors, *Ann. Thorac. Surg.*, **62**, 798-809, doi: 10.1016/s0003-4975(96)00435-3.
108. Srirajaskanthan, R., Shah, T., Watkins, J., Marelli, L., Khan, K., and Caplin, M. E. (2010) Expression of the HER-1-4 family of receptor tyrosine kinases in neuroendocrine tumours, *Oncol. Rep.*, **23**, 909-915, doi: 10.3892/or_00000714.
109. London, M., and Gallo, E. (2020) Epidermal growth factor receptor (EGFR) involvement in epithelial-derived cancers and its current antibody-based immunotherapies, *Cell Biol. Int.*, **44**, 1267-1282, doi: 10.1002/cbin.11340.
110. Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I., and Van Cutsem, E. (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.*, **351**, 337-345, doi: 10.1056/NEJMoa033025.
111. Trivedi, S., Srivastava, R. M., Concha-Benavente, F., Ferrone, S., Garcia-Bates, T. M., Li, J., and Ferris, R. L.

(2016) Anti-EGFR targeted monoclonal antibody isotype influences antitumor cellular immunity in head and neck cancer patients, *Clin. Cancer Res.*, **22**, 5229-5237, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2971.

112. Cohenuram, M., and Saif, M. W. (2007) Panitumumab the first fully human monoclonal antibody: from the bench to the clinic, *Anticancer Drugs*, **18**, 7-15, doi: 10.1097/CAD.0b013e32800feecb.
113. Thatcher, N., Hirsch, F. R., Luft, A. V., Szczesna, A., Ciuleanu, T. E., Dediu, M., Ramlau, R., Galiulin, R. K., Balint, B., Losonczy, G., Kazarnowicz, A., Park, K., Schumann, C., Reck, M., Depenbrock, H., Nanda, S., Kruljac-Letunic, A., Kurek, R., Paz-Ares, L., and Socinski, M. A. (2015) Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial, *Lancet Oncol.*, **16**, 763-774, doi: 10.1016/S1470-2045(15)00021-2.
114. Li, J., and Yan, H. (2018) Skin toxicity with anti-EGFR monoclonal antibody in cancer patients: a meta-analysis of 65 randomized controlled trials, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **82**, 571-583, doi: 10.1007/s00280-018-3644-2.
115. Boland, W. K., and Bebb, G. (2009) Nimotuzumab: a novel anti-EGFR monoclonal antibody that retains anti-EGFR activity while minimizing skin toxicity, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **9**, 1199-1206, doi: 10.1517/14712590903110709.
116. Garrido, G., Tikhomirov, I. A., Rabasa, A., Yang, E., Gracia, E., Iznaga, N., Fernandez, L. E., Crombet, T., Kerbel, R. S., and Perez, R. (2011) Bivalent binding by intermediate affinity of nimotuzumab: a contribution to explain antibody clinical profile, *Cancer Biol. Ther.*, **11**, 373-382, doi: 10.4161/cbt.11.4.14097.
117. Ciardiello, F., and Tortora, G. (2008) EGFR antagonists in cancer treatment, *N. Engl. J. Med.*, **358**, 1160-1174, doi: 10.1056/NEJMra0707704.
118. Therkildsen, C., Bergmann, T. K., Henrichsen-Schnack, T., Ladelund, S., and Nilbert, M. (2014) The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis, *Acta Oncol.*, **53**, 852-864, doi: 10.3109/0284186X.2014.895036.
119. Lu, Y., Zhao, X., Liu, Q., Li, C., Graves-Deal, R., Cao, Z., Singh, B., Franklin, J. L., Wang, J., Hu, H., Wei, T., Yang, M., Yeatman, T. J., Lee, E., Saito-Diaz, K., Hinger, S., Patton, J. G., Chung, C. H., Emmrich, S., Klusmann, J. H., Fan, D., and Coffey, R. J. (2017) lncRNA MIR100HG-derived miR-100 and miR-125b mediate cetuximab resistance via Wnt/beta-catenin signaling, *Nat. Med.*, **23**, 1331-1341, doi: 10.1038/nm.4424.
120. Misale, S., Yaeger, R., Hobor, S., Scala, E., Janakiraman, M., et al. (2012) Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer, *Nature*, **486**, 532-536, doi: 10.1038/nature11156.
121. Siravegna, G., Mussolin, B., Buscarino, M., Corti, G., Cassingena, A., et al. (2015) Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients, *Nat. Med.*, **21**, 795-801, doi: 10.1038/nm.3870.
122. Roskoski, R., Jr. (2020) Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update, *Pharmacol. Res.*, **152**, 104609, doi: 10.1016/j.phrs.2019.104609.
123. Yang, J. J., Zhou, C., Huang, Y., Feng, J., Lu, S., Song, Y., Huang, C., Wu, G., Zhang, L., Cheng, Y., Hu, C., Chen, G., Zhang, L., Liu, X., Yan, H. H., Tan, F. L., Zhong, W., and Wu, Y. L. (2017) Icotinib versus whole-brain irradiation in patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer and multiple brain metastases (BRAIN): a multicentre, phase 3, open-label, parallel, randomised controlled trial, *Lancet Respir. Med.*, **5**, 707-716, doi: 10.1016/S2213-2600(17)30262-X.
124. Mok, T. S., Wu, Y. L., Thongprasert, S., Yang, C. H., Chu, D. T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., Nishiwaki, Y., Ohe, Y., Yang, J. J., Chewaskulyong, B., Jiang, H., Duffield, E. L., Watkins, C. L., Armour, A. A., and Fukuoka, M. (2009) Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma, *N. Engl. J. Med.*, **361**, 947-957, doi: 10.1056/NEJMoa0810699.
125. Sequist, L. V., Waltman, B. A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A. B., Fidias, P., Bergethon, K., Shaw, A. T., Gettinger, S., Cosper, A. K., Akhavanfard, S., Heist, R. S., Temel, J., Christensen, J. G., Wain, J. C., Lynch, T. J., Vernovsky, K., Mark, E. J., Lanuti, M., Iafrate, A. J., Mino-Kenudson, M., and Engelman, J. A. (2011) Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors, *Sci. Transl. Med.*, **3**, 75ra26, doi: 10.1126/scitranslmed.3002003.
126. Pao, W., Miller, V. A., Politi, K. A., Riely, G. J., Somwar, R., Zakowski, M. F., Kris, M. G., and Varmus, H. (2005) Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain, *PLoS Med.*, **2**, e73, doi: 10.1371/journal.pmed.0020073.
127. Murtuza, A., Bulbul, A., Shen, J. P., Keshavarzian, P., Woodward, B. D., Lopez-Diaz, F. J., Lippman, S. M., and Husain, H. (2019) Novel third-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors and strategies to overcome therapeutic resistance in lung cancer, *Cancer Res.*, **79**, 689-698, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1281.
128. Soria, J. C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K. H., Dechaphunkul, A., Imamura, F., Nogami, N., Kurata, T., Okamoto, I., Zhou, C., Cho, B. C., Cheng, Y., Cho, E. K., Voon, P. J., Planchard, D., Su, W. C., Gray, J. E., Lee, S. M., Hodge, R., Marotti, M., Rukazenkov, Y., and Ramalingam, S. S. (2018) Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer, *N. Engl. J. Med.*, **378**, 113-125, doi: 10.1056/NEJMoa1713137.
129. Ramalingam, S. S., Vansteenkiste, J., Planchard, D., Cho, B. C., Gray, J. E., Ohe, Y., Zhou, C., Reungwetwattana, T., Cheng, Y., Chewaskulyong, B., Shah, R., Cobo, M., Lee, K. H., Cheema, P., Tiseo, M., John, T., Lin, M.C., Imamura, F., Kurata, T., Todd, A., Hodge, R., Saggese, M., Rukazenkov, Y., and Soria, J. C. (2020) Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC, *N. Engl. J. Med.*, **382**, 41-50, doi: 10.1056/NEJMoa1913662.
130. Nagano, T., Tachihara, M., and Nishimura, Y. (2018) Mechanism of resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors and a potential treatment strategy, *Cells*, **7**, doi: 10.3390/cells7110212.
131. Li, R., Zhou, X., Yao, H., and Li, L. (2020) Four generations of EGFR TKIs associated with different pathogenic mutations in non-small cell lung carcinoma, *J. Drug Target*, 1-12, doi: 10.1080/1061186X.2020.1737934.
132. Vyse, S., and Huang, P. H. (2019) Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer, *Signal. Transduct. Target Ther.*, **4**, 5, doi: 10.1038/s41392-019-0038-9.
133. Sordella, R., Bell, D. W., Haber, D. A., and Settleman, J. (2004) Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways, *Science*, **305**, 1163-1167, doi: 10.1126/science.1101637.
134. Oxnard, G. R., Hu, Y., Mileham, K. F., Husain, H., Costa, D. B., Tracy, P., Feeney, N., Sholl, L. M., Dahlberg, S. E., Redig, A. J., Kwiatkowski, D. J., Rabin, M. S., Paweletz, C. P., Thress, K. S., and Janne, P. A. (2018) Assessment of resistance mechanisms and clinical implications in patients

with EGFR T790M-positive lung cancer and acquired resistance to osimertinib, *JAMA Oncol.*, **4**, 1527-1534, doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2969.
135. Piotrowska, Z., Isozaki, H., Lennerz, J. K., Gainor, J. F., Lennes, I. T., Zhu, V. W., Marcoux, N., Banwait, M. K., Digumarthy, S. R., Su, W., Yoda, S., Riley, A. K., Nangia, V., Lin, J. J., Nagy, R. J., Lanman, R. B., Dias-Santagata, D., Mino-Kenudson, M., Iafrate, A. J., Heist, R. S., Shaw, A. T., Evans, E. K., Clifford, C., Ou, S. I., Wolf, B., Hata, A. N., and Sequist, L. V. (2018) Landscape of acquired resistance to osimertinib in EGFR-mutant NSCLC and clinical validation of combined EGFR and RET inhibition with osimertinib and BLU-667 for acquired RET fusion, *Cancer Discov.*, **8**, 1529-1539, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1022.
136. Wang, Q., Yang, S., Wang, K., and Sun, S. Y. (2019) MET inhibitors for targeted therapy of EGFR TKI-resistant lung cancer, *J. Hematol. Oncol.*, **12**, 63, doi: 10.1186/s13045-019-0759-9.
137. Terai, H., Soejima, K., Yasuda, H., Nakayama, S., Hamamoto, J., Arai, D., Ishioka, K., Ohgino, K., Ikemura, S., Sato, T., Yoda, S., Satomi, R., Naoki, K., and Betsuyaku, T. (2013) Activation of the FGF2-FGFR1 autocrine pathway: a novel mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC, *Mol. Cancer Res.*, **11**, 759-767, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0652.
138. Schoenfeld, A. J., Chan, J. M., Kubota, D., Sato, H., Rizvi, H., Daneshbod, Y., Chang, J. C., Paik, P. K., Offin, M., Arcila, M. E., Davare, M. A., Shinde, U., Pe'er, D., Rekhtman, N., Kris, M. G., Somwar, R., Riely, G. J., Ladanyi, M., and Yu, H. A. (2020) Tumor analyses reveal squamous transformation and off-target alterations as early resistance mechanisms to first-line osimertinib in EGFR-mutant lung cancer, *Clin. Cancer Res.*, **26**, 2654-2663, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3563.
139. Zhu, V. W., Klempner, S. J., and Ou, S. I. (2019) Receptor tyrosine kinase fusions as an actionable resistance mechanism to EGFR TKIs in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer, *Trends Cancer*, **5**, 677-692, doi: 10.1016/j.trecan.2019.09.008.
140. Cheng, N., Cai, W., Ren, S., Li, X., Wang, Q., Pan, H., Zhao, M., Li, J., Zhang, Y., Zhao, C., Chen, X., Fei, K., Zhou, C., and Hirsch, F. R. (2015) Long non-coding RNA UCA1 induces non-T790M acquired resistance to EGFR-TKIs by activating the AKT/mTOR pathway in EGFR-mutant non-small cell lung cancer, *Oncotarget*, **6**, 23582-23593, doi: 10.18632/oncotarget.4361.
141. Lee, J. K., Lee, J., Kim, S., Kim, S., Youk, J., Park, S., An, Y., Keam, B., Kim, D. W., Heo, D. S., Kim, Y. T., Kim, J. S., Kim, S. H., Lee, J. S., Lee, S. H., Park, K., Ku, J. L., Jeon, Y. K., Chung, D. H., Park, P. J., Kim, J., Kim, T. M., and Ju, Y. S. (2017) Clonal history and genetic predictors of transformation into small-cell carcinomas from lung adenocarcinomas, *J. Clin. Oncol.*, **35**, 3065-3074, doi: 10.1200/JCO.2016.71.9096.
142. Heitzer, E., Ulz, P., and Geigl, J. B. (2015) Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer, *Clin. Chem.*, **61**, 112-123, doi: 10.1373/clinchem.2014.222679.
143. Yohe, S., and Thyagarajan, B. (2017) Review of clinical next-generation sequencing, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **141**, 1544-1557, doi: 10.5858/arpa.2016-0501-RA.
144. Greaves, M., and Maley, C. C. (2012) Clonal evolution in cancer, *Nature*, **481**, 306-313, doi: 10.1038/nature10762.
145. McGranahan, N., and Swanton, C. (2017) Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future, *Cell*, **168**, 613-628, doi: 10.1016/j.cell.2017.01.018.
146. Negrini, S., Gorgoulis, V. G., and Halazonetis, T. D. (2010) Genomic instability – an evolving hallmark of cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 220-228, doi: 10.1038/nrm2858.
147. Jaramillo, M. L., Leon, Z., Grothe, S., Paul-Roc, B., Abulrob, A., and O'Connor, M. M. (2006) Effect of the anti-receptor ligand-blocking 225 monoclonal antibody on EGF receptor endocytosis and sorting, *Exp. Cell Res.*, **312**, 2778-2790, doi: 10.1016/j.yexcr.2006.05.008.
148. Liao, H. J., and Carpenter, G. (2009) Cetuximab/C225-induced intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor, *Cancer Res.*, **69**, 6179-6183, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0049.
149. Bhattacharyya, S., Singh, R. D., Pagano, R., Robertson, J. D., Bhattacharya, R., and Mukherjee, P. (2012) Switching the targeting pathways of a therapeutic antibody by nanodesign, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 1563-1567, doi: 10.1002/anie.201105432.
150. Kim, D. H., Kim, D. K., Zhou, K., Park, S., Kwon, Y., Jeong, M. G., Lee, N. K., and Ryu, S. H. (2017) Single particle tracking-based reaction progress kinetic analysis reveals a series of molecular mechanisms of cetuximab-induced EGFR processes in a single living cell, *Chem. Sci.*, **8**, 4823-4832, doi: 10.1039/c7sc01159h.
151. Tolmachev, V., and Orlova, A. (2020) Affibody molecules as targeting vectors for PET imaging, *Cancers (Basel)*, **12**, doi: 10.3390/cancers12030651.
152. Gцstring, L., Chew, M. T., Orlova, A., Hoiden-Guthenberg, I., Wennborg, A., Carlsson, J., and Frejd, F. Y. (2010) Quantification of internalization of EGFR-binding Affibody molecules: methodological aspects, *Int. J. Oncol.*, **36**, 757-763, doi: 10.3892/ijo_00000551.
153. Genta, I., Chiesa, E., Colzani, B., Modena, T., Conti, B., and Dorati, R. (2017) GE11 peptide as an active targeting agent in antitumor therapy: a minireview, *Pharmaceutics*, **10**, doi: 10.3390/pharmaceutics10010002.
154. Li, N., Nguyen, H. H., Byrom, M., and Ellington, A. D. (2011) Inhibition of cell proliferation by an anti-EGFR aptamer, *PLoS One*, **6**, e20299, doi: 10.1371/journal.pone.0020299.
155. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., and Hori, K. (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J. Control. Release*, **65**, 271-284, doi: 10.1016/s0168-3659(99)00248-5.
156. Danhier, F. (2016) To exploit the tumor microenvironment: since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J. Control. Release*, **244**, 108-121, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.11.015.
157. Golombek, S. K., May, J. N., Theek, B., Appold, L., Drude, N., Kiessling, F., and Lammers, T. (2018) Tumor targeting via EPR: strategies to enhance patient responses, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **130**, 17-38, doi: 10.1016/j.addr.2018.07.007.
158. Park, J., Choi, Y., Chang, H., Um, W., Ryu, J. H., and Kwon, I. C. (2019) Alliance with EPR effect: combined strategies to improve the EPR effect in the tumor microenvironment, *Theranostics*, **9**, 8073-8090, doi: 10.7150/thno.37198.
159. Mamot, C., Ritschard, R., Wicki, A., Stehle, G., Dieterle, T., Bubendorf, L., Hilker, C., Deuster, S., Herrmann, R., and Rochlitz, C. (2012) Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study, *Lancet Oncol.*, **13**, 1234-1241, doi: 10.1016/S1470-2045(12)70476-X.
160. Mamot, C., Drummond, D. C., Noble, C. O., Kallab, V., Guo, Z., Hong, K., Kirpotin, D. B., and Park, J. W. (2005) Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs *in vivo*, *Cancer Res.*, **65**, 11631-11638, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1093.
161. Pan, X., and Lee, R. J. (2007) Construction of anti-EGFR immunoliposomes via folate-folate binding protein affinity,

Int. J. Pharm., **336**, 276-283, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.12.007.
162. Pan, X., Wu, G., Yang, W., Barth, R. F., Tjarks, W., and Lee, R. J. (2007) Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via a cholesterol-based membrane anchor for targeting of EGFR, *Bioconjug. Chem.*, **18**, 101-108, doi: 10.1021/bc060174r.
163. Vazquez-Becerra, H., Perez-Cardenas, E., Muniz-Hernandez, S., Izquierdo-Sanchez, V., and Medina, L. A. (2017) Characterization and in vitro evaluation of nimotuzumab conjugated with cisplatin-loaded liposomes, *J. Liposome Res.*, **27**, 274-282, doi: 10.1080/08982104.2016.1207665.
164. Petrilli, R., Eloy, J. O., Saggioro, F. P., Chesca, D. L., de Souza, M. C., Dias, M. V. S., daSilva, L. L. P., Lee, R. J., and Lopez, R. F. V. (2018) Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection, *J. Control. Release*, **283**, 151-162, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.05.038.
165. Broekgaarden, M., van Vught, R., Oliveira, S., Roovers, R. C., van Bergen en Henegouwen, P. M. P., Pieters, R. J., Van Gulik, T. M., Breukink, E., and Heger, M. (2016) Site-specific conjugation of single domain antibodies to liposomes enhances photosensitizer uptake and photodynamic therapy efficacy, *Nanoscale*, **8**, 6490-6494, doi: 10.1039/c6nr00014b.
166. Zalba, S., Contreras, A. M., Merino, M., Navarro, I., de Ilarduya, C. T., Troconiz, I. F., Koning, G., and Garrido, M. J. (2016) EGF-liposomes promote efficient EGFR targeting in xenograft colocarcinoma model, *Nanomedicine (Lond.)*, **11**, 465-477, doi: 10.2217/nnm.15.208.
167. Jung, J., Jeong, S. Y., Park, S. S., Shin, S. H., Ju, E. J., Choi, J., Park, J., Lee, J. H., Kim, I., Suh, Y. A., Hwang, J. J., Kuroda, S., Lee, J. S., Song, S. Y., and Choi, E. K. (2015) A cisplatin-incorporated liposome that targets the epidermal growth factor receptor enhances radiotherapeutic efficacy without nephrotoxicity, *Int. J. Oncol.*, **46**, 1268-1274, doi: 10.3892/ijo.2014.2806.
168. Aggarwal, S., Gupta, S., Pabla, D., and Murthy, R. S. (2013) Gemcitabine-loaded PLGA-PEG immunonanoparticles for targeted chemotherapy of pancreatic cancer, *Cancer Nanotechnol.*, **4**, 145-157, doi: 10.1007/s12645-013-0046-3.
169. Wöll, S., Bachran, C., Schiller, S., Schröder, M., Conrad, L., Swee, L. K., and Scherliess, R. (2018) Sortaggable liposomes: evaluation of reaction conditions for single-domain antibody conjugation by Sortase-A and targeting of CD11b(+) myeloid cells, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **133**, 138-150, doi: 10.1016/j.ejpb.2018.09.017.
170. Wang, Y. P., Liu, I. J., Chung, M. J., and Wu, H. C. (2020) Novel anti-EGFR scFv human antibody-conjugated immunoliposomes enhance chemotherapeutic efficacy in squamous cell carcinoma of head and neck, *Oral Oncol.*, **106**, 104689, doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104689.
171. Hsu, W. C., Cheng, C. N., Lee, T. W., and Hwang, J. J. (2015) Cytotoxic effects of PEGylated anti-EGFR immunoliposomes combined with doxorubicin and Rhenium-188 against cancer cells, *Anticancer Res.*, **35**, 4777-4788.
172. Haeri, A., Zalba, S., Ten Hagen, T. L., Dadashzadeh, S., and Koning, G. A. (2016) EGFR targeted thermosensitive liposomes: a novel multifunctional platform for simultaneous tumor targeted and stimulus responsive drug delivery, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **146**, 657-669, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.06.012.
173. Kim, I. Y., Kang, Y. S., Lee, D. S., Park, H. J., Choi, E. K., Oh, Y. K., Son, H. J., and Kim, J. S. (2009) Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice, *J. Control. Release*, **140**, 55-60, doi: 10.1016/j.jconrel.2009.07.005.
174. Talelli, M., Oliveira, S., Rijcken, C. J., Pieters, E. H., Etrych, T., Ulbrich, K., van Nostrum, R. C., Storm, G., Hennink, W. E., and Lammers, T. (2013) Intrinsically active nanobody-modified polymeric micelles for tumor-targeted combination therapy, *Biomaterials*, **34**, 1255-1260, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.064.
175. Gener, P., Gouveia, L. P., Sabat, G. R., de Sousa Rafael, D. F., Fort, N. B., Arranja, A., Fernandez, Y., Prieto, R. M., Ortega, J. S., Arango, D., Abasolo, I., Videira, M., and Schwartz, S., Jr. (2015) Fluorescent CSC models evidence that targeted nanomedicines improve treatment sensitivity of breast and colon cancer stem cells, *Nanomedicine*, **11**, 1883-1892.
176. Kang, S. J., Jeong, H. Y., Kim, M. W., Jeong, I. H., Choi, M. J., You, Y. M., Im, C. S., Song, I. H., Lee, T. S., and Park, Y. S. (2018) Anti-EGFR lipid micellar nanoparticles co-encapsulating quantum dots and paclitaxel for tumor-targeted theranosis, *Nanoscale*, **10**, 19338-19350, doi: 10.1039/c8nr05099f.
177. Mondal, G., Almawash, S., Chaudhary, A. K., and Mahato, R. I. (2017) EGFR-targeted cationic polymeric mixed micelles for codelivery of gemcitabine and miR-205 for treating advanced pancreatic cancer, *Mol. Pharm.*, **14**, 3121-3133, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00355.
178. Kutty, R. V., Chia, S. L., Setyawati, M. I., Muthu, M. S., Feng, S. S., and Leong, D. T. (2015) *In vivo* and *ex vivo* proofs of concept that cetuximab conjugated vitamin E TPGS micelles increases efficacy of delivered docetaxel against triple negative breast cancer, *Biomaterials*, **63**, 58-69, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.06.005.
179. Jiang, J., Chen, H., Yu, C., Zhang, Y., Chen, M., Tian, S., and Sun, C. (2015) The promotion of salinomycin delivery to hepatocellular carcinoma cells through EGFR and CD133 aptamers conjugation by PLGA nanoparticles, *Nanomedicine (Lond.)*, **10**, 1863-1879, doi: 10.2217/nnm.15.43.
180. Chen, J., Ouyang, J., Chen, Q., Deng, C., Meng, F., Zhang, J., Cheng, R., Lan, Q., and Zhong, Z. (2017) EGFR and CD44 dual-targeted multifunctional hyaluronic acid Nanogels boost protein delivery to ovarian and breast cancers *in vitro* and *in vivo*, *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, **9**, 24140-24147, doi: 10.1021/acsami.7b06879.
181. Gao, J., Xia, Y., Chen, H., Yu, Y., Song, J., Li, W., Qian, W., Wang, H., Dai, J., and Guo, Y. (2014) Polymer-lipid hybrid nanoparticles conjugated with anti-EGF receptor antibody for targeted drug delivery to hepatocellular carcinoma, *Nanomedicine (Lond.)*, **9**, 279-293, doi: 10.2217/nnm.13.20.
182. Zhai, J., Luwor, R. B., Ahmed, N., Escalona, R., Tan, F. H., Fong, C., Ratcliffe, J., Scoble, J. A., Drummond, C. J., and Tran, N. (2018) Paclitaxel-loaded self-assembled lipid nanoparticles as targeted drug delivery systems for the treatment of aggressive ovarian cancer, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **10**, 25174-25185, doi: 10.1021/acsami.8b08125.
183. Karra, N., Nassar, T., Ripin, A. N., Schwob, O., Borlak, J., and Benita, S. (2013) Antibody conjugated PLGA nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel palmitate: efficacy and biofate in a lung cancer mouse model, *Small*, **9**, 4221-4236, doi: 10.1002/smll.201301417.
184. Sreeranganathan, M., Uthaman, S., Sarmento, B., Mohan, C. G., Park, I. K., and Jayakumar, R. (2017) *In vivo* evaluation of cetuximab-conjugated poly(gamma-glutamic acid)-docetaxel nanomedicines in EGFR-overexpressing gastric cancer xenografts, *Int. J. Nanomedicine*, **12**, 7165-7182, doi: 10.2147/IJN.S143529.

185. Patel, J., Amrutiya, J., Bhatt, P., Javia, A., Jain, M., and Misra, A. (2018) Targeted delivery of monoclonal antibody conjugated docetaxel loaded PLGA nanoparticles into EGFR overexpressed lung tumour cells, *J. Microencapsul.*, **35**, 204-217, doi: 10.1080/02652048.2018.1453560.
186. Wang, J. K., Zhou, Y. Y., Guo, S. J., Wang, Y. Y., Nie, C. J., Wang, H. L., Wang, J. L., Zhao, Y., Li, X. Y., and Chen, X. J. (2017) Cetuximab conjugated and doxorubicin loaded silica nanoparticles for tumor-targeting and tumor microenvironment responsive binary drug delivery of liver cancer therapy, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, **76**, 944-950, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.131.
187. Sandoval, M. A., Sloat, B. R., Lansakara, P., Kumar, A., Rodriguez, B. L., Kiguchi, K., Digiovanni, J., and Cui, Z. (2012) EGFR-targeted stearoyl gemcitabine nanoparticles show enhanced anti-tumor activity, *J. Control. Release*, **157**, 287-296, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.08.015.
188. Bouras, A., Kaluzova, M., and Hadjipanayis, C. G. (2015) Radiosensitivity enhancement of radioresistant glioblastoma by epidermal growth factor receptor antibody-conjugated iron-oxide nanoparticles, *J. Neurooncol.*, **124**, 13-22, doi: 10.1007/s11060-015-1807-0.
189. Chen, C. H., Wu, Y. J., and Chen, J. J. (2016) Photo-thermal therapy of bladder cancer with Anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles, *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **21**, 1211-1221, doi: 10.2741/4451.
190. El-Sayed, I. H., Huang, X., and El-Sayed, M. A. (2006) Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles, *Cancer Lett.*, **239**, 129-135, doi: 10.1016/j.canlet.2005.07.035.
191. Rosenkranz, A. A., Slastnikova, T. A., Georgiev, G. P., Zalutsky, M. R., and Sobolev, A. S. (2020) Delivery systems exploiting natural cell transport processes of macromolecules for intracellular targeting of Auger electron emitters, *Nucl. Med. Biol.*, **80-81**, 45-56, doi: 10.1016/j.nucmedbio.2019.11.005.
192. Li, L., Quang, T. S., Gracely, E. J., Kim, J. H., Emrich, J. G., Yaeger, T. E., Jenrette, J. M., Cohen, S. C., Black, P., and Brady, L. W. (2010) A Phase II study of anti-epidermal growth factor receptor radioimmunotherapy in the treatment of glioblastoma multiforme, *J. Neurosurg.*, **113**, 192-198, doi: 10.3171/2010.2.JNS091211.
193. Emrich, J. G., Bender, H., Class, R., Eshleman, J., Miyamoto, C., and Brady, L. W. (1996) In vitro evaluation of iodine-125-labeled monoclonal antibody (MAb 425) in human high-grade glioma cells, *Am. J. Clin. Oncol.*, **19**, 601-608, doi: 10.1097/00000421-199612000-00015.
194. Reilly, R. M., Chen, P., Wang, J., Scollard, D., Cameron, R., and Vallis, K. A. (2006) Preclinical pharmacokinetic, biodistribution, toxicology, and dosimetry studies of 111In-DTPA-human epidermal growth factor: an Auger electron-emitting radiotherapeutic agent for epidermal growth factor receptor-positive breast cancer, *J. Nucl. Med.*, **47**, 1023-1031.
195. Panosa, C., Fonge, H., Ferrer-Batalle, M., Menendez, J. A., Massaguer, A., De Llorens, R., and Reilly, R. M. (2015) A comparison of non-biologically active truncated EGF (EGFt) and full-length hEGF for delivery of Auger electron-emitting 111In to EGFR-positive breast cancer cells and tumor xenografts in athymic mice, *Nucl. Med. Biol.*, **42**, 931-938, doi: 10.1016/j.nucmedbio.2015.08.003.
196. Vallis, K. A., Reilly, R. M., Scollard, D., Merante, P., Brade, A., Velauthapillai, S., Caldwell, C., Chan, I., Freeman, M., Lockwood, G., Miller, N. A., Cornelissen, B., Petronis, J., and Sabate, K. (2014) Phase I trial to evaluate the tumor and normal tissue uptake, radiation dosimetry and safety of (111)In-DTPA-human epidermal growth factor in patients with metastatic EGFR-positive breast cancer, *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **4**, 181-192.
197. Cornelissen, B., Waller, A., Able, S., and Vallis, K. A. (2013) Molecular radiotherapy using cleavable radioimmunoconjugates that target EGFR and gammaH2AX, *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 2472-2482, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0369.
198. Rosenkranz, A. A., Ulasov, A. V., Slastnikova, T. A., Khramtsov, Y. V., and Sobolev, A. S. (2014) Use of intracellular transport processes for targeted drug delivery into a specified cellular compartment, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 928-946, doi: 10.1134/S0006297914090090.
199. Sobolev, A. S. (2009) Modular nanotransporters of anticancer drugs conferring cell specificity and higher efficiency, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1567-1574, doi: 10.1134/s0006297909130094.
200. Sobolev, A. S., Aliev, R. A., and Kalmykov, S. N. (2016) Radionuclides emitting short-range particles and modular nanotransporters for their delivery to target cancer cells, *Rus. Chem. Rev.*, **85**, 1011-1032.
201. Sobolev, A. S. (2018) Modular nanotransporters for nuclear-targeted delivery of Auger electron emitters, *Front. Pharmacol.*, **9**, 952, doi: 10.3389/fphar.2018.00952.
202. Gilyazova, D. G., Rosenkranz, A. A., Gulak, P. V., Lunin, V. G., Sergienko, O. V., Khramtsov, Y. V., Timofeyev, K. N., Grin, M. A., Mironov, A. F., Rubin, A. B., Georgiev, G. P., and Sobolev, A. S. (2006) Targeting cancer cells by novel engineered modular transporters, *Cancer Res.*, **66**, 10534-10540, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2393.
203. Slastnikova, T. A., Rosenkranz, A. A., Gulak, P. V., Schiffelers, R. M., Lupanova, T. N., Khramtsov, Y. V., Zalutsky, M. R., and Sobolev, A. S. (2012) Modular nanotransporters: a multipurpose *in vivo* working platform for targeted drug delivery, *Int. J. Nanomed.*, **7**, 467-482, doi: 10.2147/IJN.S28249.
204. Slastnikova, T. A., Koumarianou, E., Rosenkranz, A. A., Vaidyanathan, G., Lupanova, T. N., Sobolev, A. S., and Zalutsky, M. R. (2012) Modular nanotransporters: a versatile approach for enhancing nuclear delivery and cytotoxicity of Auger electron-emitting 125I, *EJNMMI Res.*, **2**, 59, doi: 10.1186/2191-219X-2-59.
205. Koumarianou, E., Slastnikova, T. A., Pruszynski, M., Rosenkranz, A. A., Vaidyanathan, G., Sobolev, A. S., and Zalutsky, M. R. (2014) Radiolabeling and *in vitro* evaluation of (67)Ga-NOTA-modular nanotransporter – a potential Auger electron emitting EGFR-targeted radiotherapeutic, *Nucl. Med. Biol.*, **41**, 441-449, doi: 10.1016/j.nucmedbio.2014.03.026.
206. Slastnikova, T. A., Rosenkranz, A. A., Morozova, N. B., Vorontsova, M. S., Petriev, V. M., Lupanova, T. N., Ulasov, A. V., Zalutsky, M. R., Yakubovskaya, R. I., and Sobolev, A. S. (2017) Preparation, cytotoxicity, and *in vivo* antitumor efficacy of (111)In-labeled modular nanotransporters, *Int. J. Nanomed.*, **12**, 395-410, doi: 10.2147/IJN.S125359.
207. Rosenkranz, A. A., Slastnikova, T. A., Karmakova, T. A., Vorontsova, M. S., Morozova, N. B., Petriev, V. M., Abrosimov, A. S., Khramtsov, Y. V., Lupanova, T. N., Ulasov, A. V., Yakubovskaya, R. I., Georgiev, G. P., and Sobolev, A. S. (2018) Antitumor activity of Auger electron emitter ^{111}In delivered by modular nanotransporter for treatment of bladder cancer with EGFR overexpression, *Front. Pharmacol.*, **9**, 1331, doi: 10.3389/fphar.2018.01331.
208. Karyagina, T. S., Ulasov, A. V., Slastnikova, T. A., Rosenkranz, A. A., Lupanova, T. N., Khramtsov, Y. V., Georgiev, G. P., and Sobolev, A. S. (2020) Targeted delivery of ^{111}In into the nuclei of EGFR overexpressing cells via modular nanotransporters with anti-EGFR affibody, *Front. Pharmacol.*, **11**, 176, doi: 10.3389/fphar.2020.00176.

209. Li, S., Goins, B., Hrycushko, B. A., Phillips, W. T., and Bao, A. (2012) Feasibility of eradication of breast cancer cells remaining in postlumpectomy cavity and draining lymph nodes following intracavitary injection of radioactive immunoliposomes, *Mol. Pharm.*, **9**, 2513-2522, doi: 10.1021/mp300132f.
210. Song, H., Hedayati, M., Hobbs, R. F., Shao, C., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Deweese, T. L., and Sgouros, G. (2013) Targeting aberrant DNA double-strand break repair in triple-negative breast cancer with alpha-particle emitter radiolabeled anti-EGFR antibody, *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 2043-2054, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0108.
211. Pfost, B., Seidl, C., Autenrieth, M., Saur, D., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Schwaiger, M., and Senekowitsch-Schmidtke, R. (2009) Intravesical alpha-radioimmunotherapy with 213Bi-anti-EGFR-mAb defeats human bladder carcinoma in xenografted nude mice, *J. Nucl. Med.*, **50**, 1700-1708, doi: 10.2967/jnumed.109.065961.
212. Fazel, J., Rotzer, S., Seidl, C., Feuerecker, B., Autenrieth, M., Weirich, G., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., and Senekowitsch-Schmidtke, R. (2015) Fractionated intravesical radioimmunotherapy with ^{213}Bi-anti-EGFR-MAb is effective without toxic side-effects in a nude mouse model of advanced human bladder carcinoma, *Cancer Biol. Ther.*, **16**, 1526-1534, doi: 10.1080/15384047.2015.1071735.
213. Autenrieth, M. E., Seidl, C., Bruchertseifer, F., Horn, T., Kurtz, F., Feuerecker, B., D'Alessandria, C., Pfob, C., Nekolla, S., Apostolidis, C., Mirzadeh, S., Gschwend, J. E., Schwaiger, M., Scheidhauer, K., and Morgenstern, A. (2018) Treatment of carcinoma in situ of the urinary bladder with an alpha-emitter immunoconjugate targeting the epidermal growth factor receptor: a pilot study, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **45**, 1364-1371, doi: 10.1007/s00259-018-4003-6.
214. Milenic, D. E., Baidoo, K. E., Kim, Y. S., and Brechbiel, M. W. (2015) Evaluation of cetuximab as a candidate for targeted alpha-particle radiation therapy of HER1-positive disseminated intraperitoneal disease, *MAbs*, **7**, 255-264, doi: 10.4161/19420862.2014.985160.
215. Zidenberg-Cherr, S., Parks, N. J., and Keen, C. L. (1987) Tissue and subcellular distribution of bismuth radiotracer in the rat: considerations of cytotoxicity and microdosimetry for bismuth radiopharmaceuticals, *Radiat. Res.*, **111**, 119-129.
216. Rosenkranz, A. A., Vaidyanathan, G., Pozzi, O. R., Lunin, V. G., Zalutsky, M. R., and Sobolev, A. S. (2008) Engineered modular recombinant transporters: application of new platform for targeted radiotherapeutic agents to alpha-particle emitting 211 At, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **72**, 193-200, doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.05.055.
217. Simon, N., and FitzGerald, D. (2016) Immunotoxin therapies for the treatment of epidermal growth factor receptor-dependent cancers, *Toxins (Basel)*, **8**, doi: 10.3390/toxins8050137.
218. Yang, Y., Tian, Z., Ding, Y., Li, X., Zhang, Z., Yang, L., Zhao, F., Ren, F., and Guo, R. (2018) EGFR-targeted immunotoxin exerts antitumor effects on esophageal cancers by increasing ROS accumulation and inducing apoptosis via inhibition of the Nrf2-Keap1 pathway, *J. Immunol. Res.*, **2018**, 1090287, doi: 10.1155/2018/1090287.
219. Deng, C., Xiong, J., Gu, X., Chen, X., Wu, S., Wang, Z., Wang, D., Tu, J., and Xie, J. (2017) Novel recombinant immunotoxin of EGFR specific nanobody fused with cucurmosin, construction and antitumor efficiency *in vitro*, *Oncotarget*, **8**, 38568-38580, doi: 10.18632/oncotarget.16930.
220. Kim, J. S., Jun, S. Y., and Kim, Y. S. (2020) Critical issues in the development of immunotoxins for anticancer therapy, *J. Pharm. Sci.*, **109**, 104-115, doi: 10.1016/j.xphs.2019.10.037.
221. Sampson, J. H., Akabani, G., Archer, G. E., Berger, M. S., Coleman, R. E., Friedman, A. H., Friedman, H. S., Greer, K., Herndon, J. E., Kunwar, S., McLendon, R. E., Paolino, A., Petry, N. A., Provenzale, J. M., Reardon, D. A., Wong, T. Z., Zalutsky, M. R., Pastan, I., and Bigner, D. D. (2008) Intracerebral infusion of an EGFR-targeted toxin in recurrent malignant brain tumors, *Neuro Oncol.*, **10**, 320-329, doi: 10.1215/15228517-2008-012.
222. Chandramohan, V., Pegram, C. N., Piao, H., Szafranski, S. E., Kuan, C. T., Pastan, I. H., and Bigner, D. D. (2017) Production and quality control assessment of a GLP-grade immunotoxin, D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL, for a phase I/II clinical trial, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 2747-2766, doi: 10.1007/s00253-016-8063-x.
223. Zalutsky, M. R., Boskovitz, A., Kuan, C. T., Pegram, C. N., Ayriss, J., Wikstrand, C. J., Buckley, A. F., Lipp, E. S., Herndon, J. E., McLendon, R. E., and Bigner, D. D. (2012) Radioimmunotargeting of malignant glioma by monoclonal antibody D2C7 reactive against both wild-type and variant III mutant epidermal growth factor receptors, *Nucl. Med. Biol.*, **39**, 23-34, doi: 10.1016/j.nucmedbio.2011.06.005.
224. Chandramohan, V., Bao, X., Keir, S. T., Pegram, C. N., Szafranski, S. E., Piao, H., Wikstrand, C. J., McLendon, R. E., Kuan, C. T., Pastan, I. H., and Bigner, D. D. (2013) Construction of an immunotoxin, D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL, targeting EGFRwt and EGFRvIII for brain tumor therapy, *Clin. Cancer Res.*, **19**, 4717-4727, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3891.
225. Chandramohan, V., Bao, X., Yu, X., Parker, S., McDowall, C., Yu, Y. R., Healy, P., Desjardins, A., Gunn, M. D., Gromeier, M., Nair, S. K., Pastan, I. H., and Bigner, D. D. (2019) Improved efficacy against malignant brain tumors with EGFRwt/EGFRvIII targeting immunotoxin and checkpoint inhibitor combinations, *J. Immunother. Cancer*, **7**, 142, doi: 10.1186/s40425-019-0614-0.
226. Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., and Golab, J. (2011) Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA Cancer J. Clin.*, **61**, 250-281, doi: 10.3322/caac.20114.
227. Liang, H., Shin, D. S., Lee, Y. E., Nguyen, D. C., Trang, T. C., Pan, A. H., Huang, S. L., Chong, D. H., and Berns, M. W. (1998) Subcellular phototoxicity of 5-aminolaevulinic acid (ALA), *Lasers Surg. Med.*, **22**, 14-24, doi: 10.1002/(sici)1096-9101(1998)22:1<14::aid-lsm6>3.0.co;2-#.
228. Rosenkranz, A. A., Jans, D. A., and Sobolev, A. S. (2000) Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency, *Immunol. Cell. Biol.*, **78**, 452-464, doi: 10.1046/j.1440-1711.2000.00925.x.
229. Gilyazova, D. G., Rosenkranz, A. A., Gulak, P. V., Lunin, V. G., Sergienko, O. V., Grin, M. A., Mironov, A. F., Rubin, A. B., and Sobolev, A. S. (2006) Recombinant modular transporters on the basis of epidermal growth factor for targeted intracellular delivery of photosensitizers, *Curr. Res. Laser Use Oncol.: 2000-2004*, **5973**, 59730E, doi: 10.1117/12.640049.
230. Gillenwater, A. M., Johnson, J. M., Curry, J. M., Kochuparambil, S. T., McDonald, D., Fidler, M., Stenson, K. M., Vasan, N. R., Razaq, M. A., and Campana, J. (2020) Survival following photoimmunotherapy in patients (Pts) with recurrent head and neck squamous cell carcinoma (rHNSCC), *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **106**, 1180-1180.
231. Fernandes, S. R. G., Fernandes, R., Sarmento, B., Pereira, P. M. R., and Tome, J. P. C. (2019) Photoimmunocon-

jugates: novel synthetic strategies to target and treat cancer by photodynamic therapy, *Org. Biomol. Chem.*, **17**, 2579-2593, doi: 10.1039/c8ob02902d.
232. Harvey, T. J., Burdon, D., Steele, L., Ingram, N., Hall, G. D., Selby, P. J., Vile, R. G., Cooper, P. A., Shnyder, S. D., and Chester, J. D. (2010) Retargeted adenoviral cancer gene therapy for tumour cells overexpressing epidermal growth factor receptor or urokinase-type plasminogen activator receptor, *Gene Ther.*, **17**, 1000-1010, doi: 10.1038/gt.2010.45.
233. Urnauer, S., Muller, A. M., Schug, C., Schmohl, K. A., Tutter, M., Schwenk, N., Rodl, W., Morys, S., Ingrisch, M., Bertram, J., Bartenstein, P., Clevert, D. A., Wagner, E., and Spitzweg, C. (2017) EGFR-targeted nonviral NIS gene transfer for bioimaging and therapy of disseminated colon cancer metastases, *Oncotarget*, **8**, 92195-92208, doi: 10.18632/oncotarget.21028.
234. Liang, Y., Peng, J., Li, N., Yu-Wai-Man, C., Wang, Q., Xu, Y., Wang, H., Tagalakis, A. D., and Du, Z. (2019) Smart nanoparticles assembled by endogenous molecules for siRNA delivery and cancer therapy via CD44 and EGFR dual-targeting, *Nanomedicine*, **15**, 208-217, doi: 10.1016/j.nano.2018.09.018.
235. Bagley, S. J., and O'Rourke, D. M. (2020) Clinical investigation of CAR T cells for solid tumors: lessons learned and future directions, *Pharmacol. Ther.*, **205**, 107419, doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107419.
236. Westphal, M., Maire, C. L., and Lamszus, K. (2017) EGFR as a target for glioblastoma treatment: an unfulfilled promise, *CNS Drugs*, **31**, 723-735, doi: 10.1007/s40263-017-0456-6.
237. Xu, M. J., Johnson, D. E., and Grandis, J. R. (2017) EGFR-targeted therapies in the post-genomic era, *Cancer Metastasis Rev.*, **36**, 463-473, doi: 10.1007/s10555-017-9687-8.
238. Slastnikova, T. A., Ulasov, A. V., Rosenkranz, A. A., and Sobolev, A. S. (2018) Targeted intracellular delivery of antibodies: the state of the Art, *Front. Pharmacol.*, **9**, 1208, doi: 10.3389/fphar.2018.01208.
239. Ulasov, A. V., Rosenkranz, A. A., and Sobolev, A. S. (2018) Transcription factors: time to deliver, *J. Control. Release*, **269**, 24-35, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.11.004.
240. Jin, J. O., Kim, G., Hwang, J., Han, K. H., Kwak, M., and Lee, P. C. W. (2020) Nucleic acid nanotechnology for cancer treatment, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1874**, 188377, doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188377.

EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR: KEY TO SELECTIVE INTRACELLULAR DELIVERY*

Review

A. A. Rosenkranz[1,2] and T. A. Slastnikova[2]**

[1] *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia; E-mail: aar@igb.ac.ru*

[2] *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

Received June 15, 2020
Revised July 23, 2020
Accepted July 23, 2020

Epidermal growth factor receptor (EGFR) is an integral surface protein mediating cellular response to a number of growth factors. Its overexpression and increased activation due to mutations is one of the most common traits of many types of cancer. Development and clinical use of the agents, which block EGFR activation, became a prime example of the personalized targeted medicine. However, despite the obvious success in this area, cancer cure remains unattainable in most cases. Because of that, as well as the result of the search for possible ways to overcome the difficulties of treatment, a huge number of new treatment methods relying on the use of EGFR overexpression and its changes to destroy cancer cells. Modern data on the structure, functioning, and intracellular transport of EGFR, its natural ligands, as well as signaling cascades triggered by the EGFR activation, peculiarities of the EGFR expression and activation in oncological disorders, as well as applied therapeutic approaches aimed at blocking EGFR signaling pathway are summarized and analyzed in this review. Approaches to the targeted delivery of various chemotherapeutic agents, radionuclides, immunotoxins, photosensitizers, as well as the prospects for gene therapy aimed at cancer cells with EGFR overexpression are reviewed in detail. It should be noted that increasing attention is being paid nowadays to the development of multifunctional systems, either carrying several different active agents, or possessing several environment-dependent transport functions. Potentials of the systems based on receptor-mediated endocytosis of EGFR and their possible advantages and limitations are discussed.

Keywords: epidermal growth factor receptor, overexpression, endocytosis, cancer, targeted cancer therapy, drug delivery