Journal of Radiation Industry 9(4) : 193~198(2015)

암세포 내로의 약물 전달 증진 목적의 신규 소마토스타틴 수용체 타겟리간드 합성 및 평가

최선주[1,*] · 홍영돈[1] · 이소영[1] · 정성희[1]

[1]한국원자력연구원

Synthesis and Evaluation of a Ligand Targeting the Somatostatin Receptor for Drug Delivery to Tumor Cell

SunJu Choi[1,*], YoungDon Hong[1], SoYoung Lee[1] and SungHee Jung[1]

[1]*Radioisotope Research Division, Korea Atomic Energy Research Institute, Daedukdaero #989-111, Daejeon 34057, Korea*

Abstract - Most of targeted therapies block the action of certain enzymes, proteins, or other molecules involved in the growth and spread of cancer cells to produce its cytotoxic effect. Either small molecule drugs or monoclonal antibodies are mostly used in targeted therapies. Unfortunately, targeted therapy has a certain degree of unwanted side effect like other cytotoxicity inducing chemotherapies. To overcome and to reduce unwanted side effects during a cancer therapy, recently radiopeptide therapies has got the worlds' attraction for the tumor targeting modalities due to its beneficial effect on less side effect compared to cytotoxic chemotherapies. Among radiopeptide therapies, ^{177}Lu-DOTATATE is a major modality as an effective one invented so far in treating neuroendocrine tumor (NET) and it has been in clinical trials at least one decade. Although it does have rather effective therapeutic effect on NET, it has less effective in rather large solid tumor. There are many ways to improve or increase therapeutic effect of radiopeptide are a finding the potent small molecules to target the tumor site selectively, or a labeling with radioisotope of emitting high energy, or an improving its biological half-life by introducing different moieties to increase lipophilicity. Present study was focus to increase a biological half-life of radio somatostatin which will target the somatostatin receptor by altering the bifunctional chelator (BFCA) by introducing lipophilic moiety to the somatostatin, which would make the labeled peptide stay longer in the tumor site and thus it can intensify the therapeutic effect on tumor cell itself and around tissues.

Key words : Peptide therapy, Nuclides, Radiolabelling, Tumor, Targeting, Radiopharmaceuticals

서 론

암을 치료하는 데 있어 분자생물학적 질병의 표적치료는 매우 중요한 방법의 하나로 알려져 있다. 표적치료제는 세포사가 주 기전인 화학요법제나 호르몬 치료제에 비하여 그 부작용이 적어 각광을 받고 있다(NCI Dictionary, 2014; Rai *et al*. 2015). 현재 암 치료에 이용되고 있는 펩타이드 치료제나 면역치료제는 기존의 표적치료제보다 표적능이 우수하여 많은 연구가 진행되고 있으며 임상에 적용되고 있는

* Corresponding author: SunJu Choi, Tel. +82-42-868-8449, Fax. +82-42-868-8448, E-mail. choisj@kaeri.re.kr

추세이다(Sudhakar 2009; Claringbold *et al*. 2011). 표적치료제의 장점은 기타 다른 화학요법제나 호르몬 치료제보다 표적능이 우수하여 정상세포로의 영향을 줄일 수 있어 부작용을 현저히 줄일 수 있음에 기인한다(Zhukov and Tjulandin, 2008). 최근의 연구는 이러한 표적치료제의 암세포 치료 효능을 강화하기 위한 방법을 도입하고 있다. 그중 하나는 최근 들어 각광을 받고 있는 핵의학 치료로서 방사성동위원소를 도입하여 치료능을 높이는 데 활용되고 있는 방사성표적치료제이다(D'Huyvetter *et al*. 2014; Yeong *et al*. 2014). 방사성표적치료제는 기존의 표적치료제로 알려진 단백질 또는 생리활성물질에 방사성동위원소를 붙여 이용하는 것으로 이때 방사성동위원소는 그 에너지가 핵의학 진단제로 쓰여지는 감마선을 방출하는 방사성동위원소보다 큰 알파선이나 베타선을 방출하는 핵종을 주로 이용한다(Sofou *et al*. 2008). 이러한 암 진단 및 치료에 이용할 수 있는 방사성표적 진단 및 치료제의 개발은 핵의학적 진단 및 치료에 활용이 되고 있고 부작용이 적은 표적 진단 및 치료제로서 전 세계적으로 지대한 관심을 받고 있는 치료의 한 분야이다. 핵의학에서 사용되는 진단 및 치료용 방사성의약품은 방사성동위원소를 함유한 표적물질이 체내에 투입되어 질병이 발생된 부위에 집적되는 표적능을 발휘함으로써 체외로 치료하는 방사선치료와는 차별되고 있다(Grudzinski *et al*. 2010) 우수한 표적능 및 치료 효능을 기대할 수 있는 방사성표적제재 후보물질을 개발하기 위해서는 방사성동위원소를 표지하고, 이를 질환의 근원 부위를 표적할 수 있는 물질에 잘 결합이 되어야 하며, 치료제로서 효능이 다할 때까지는 그 결합력을 유지하는 점 등 이 모든 점들은 방사성표적제재 효능을 좌우하는 아주 중요한 부분이다(Dearling *et al*. 2011). 우선적으로 방사성동위원소를 생리활성 물질에 효율적으로 도입할 수 있는 안정화 화합물을 개발이 선행되어야 하며(Graham *et al*. 2002), 이를 활용한 생접합 및 방사성동위원소 표지 기술을 확립은 연구 개발에서 아주 중요한 부분을 차지한다.

본 연구에서는 최근 신경내분비종양 방사성표적치료제로 관심을 받고 있는 소마토스타틴(Somatostatin) 수용체와 관련된 물질에 대한 연구를 진행하였다. 소마토스타틴(Somatostatin)은 14개 또는 18개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로 그 기능은 주로 여러 가지 생리적 기능을 억제하는 것으로 알려져 있고(Gulenchyn *et al*. 2012) 특히 내분비종양 등 특정 종양세포의 성장에 필요한 물질로 알려져 이 단백질에 의존적인 질환 진단 및 치료제 개발에 주요 연구 대상이 되고 있어 본 연구에서도 소마토스타틴(Somatostatin)에 의존적인 질환 표적이 가능한 방사성표적치료 후보물질을 개발하고자 하였다. 본 연구의 중점은 내분비 종양세포에 의존적으로 존재하는 수용체로 알려진 소마토스타틴(Somatostatin)에 작용하는 유도체의 생리활성 반감기가 다분히 작음과(Li and Low 2015) 이를 표적 가능한 물질을 활용한 표적치료가 모든 크기의 암세포를 추적하여 완벽하게 치료할 수 있는 것이 아닌 점에 착안을 하였다. 이 두 가지 점을 용이하게 보완할 수 있는 방법으로 표적세포 내에서 머무르는 시간을 늘려 방사성표적치료가 가능하게 하고자 소마토스타틴(Somatostatin) 유도체에 변화를 주고자 하였다. 이와 더불어 원자로에 기반하는 방사성동위원소 중 치료용으로 가능한 베타선 방출 방사성동위원소인 ^{177}Lu과 안정하게 표지될 수 있는지의 가능성을 탐색하고, 결론적으로 새로이 합성된 표적단백체 후보물질이 종양세포 표적용 방사성 펩타이드제 후보물질로서의 그 가능성 여부를 측정하였다.

재료 및 방법

1. 도타-소마토스타틴(DOTA-Somatostatin) 유도체 합성

[DOTA]-F-(Dap)-V-K-(D-form W)-Y-D-T(cyclic Dap & D) 합성(Fig. 1) - NH_2-Thr-Trt resin을 시작물질로 하고 HBTU, HOBT, DIPEA를 이용하여 Fmoc, tBu-Threonine을 도입하였다. 계속해서 20% piperazine으로 Fmoc을 제

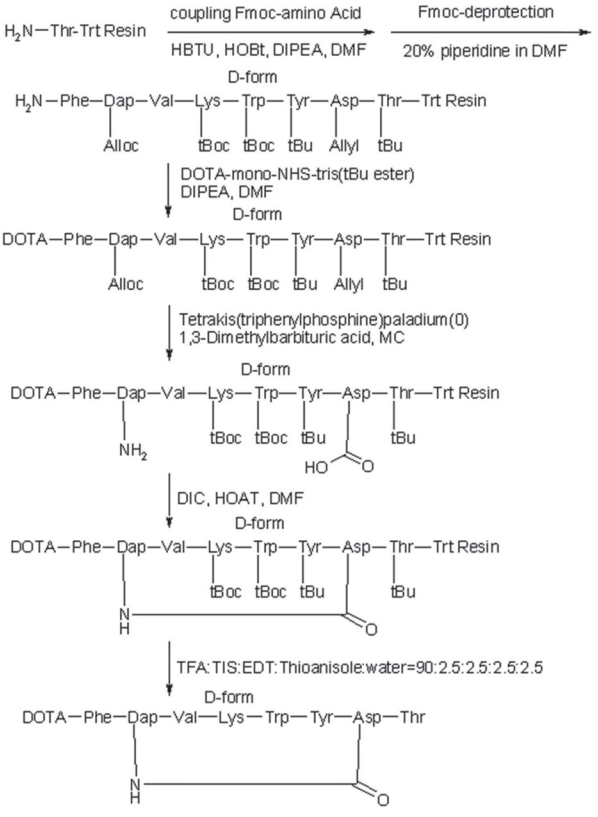


Fig. 1. Synthesis of [DOTA]-F-(Dap)-V-K-(D-form W)-Y-D-T(cyclic Dap & D).

거하였다. 이와 같은 Fmoc-Asp(Allyl)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Trp-OH, Fmoc-Tyr-OH, Fmoc-Dap(Alloc)-OH, Fmoc-Phe-OH을 이용하여 amide coupling을 진행하여 peptide를 제작한다. DOTA-mono-NHS tris (tBu ester)를 Phenylalanine 말단에 coupling 시켜 DOTA를 도입한다. Paladium, 1,3-Dimethylbarbituric acid를 이용하여 환원반응에 의한 Allyl group과 Alloc group의 제거반응을 진행한다. N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIC)를 이용하여 cyclization을 진행한다. 최종적으로 Deprotection 반응과 resin 탈착반응은 TFA : TIS : EDT : Thioanisole : Water를 이용하여 수행하였다. 반응 진행 여부는 매 단계 합성이 진행된 후 Mass를 이용하여 확인하였으며 최종물질의 분리, 정제 및 확인은 HPLC와 Mass를 이용하여 확인하였다.

2. ^{177}Lu 생산

하나로 (한국원자력연구원)에서 ^{176}Lu [^{176}Lu (n, γ) ^{177}Lu] 반응에 의해 생산되었으며 중성자 속은 1.0×10^{14} n cm^{-2}로 5일간 $^{176}Lu_2O_3$ 타겟을 조사시킨 후 48시간 동안 열을 식힌 다음 3 ml의 0.05 N HCl solution로 녹여 준비한다.

3. 도타-소마토스타틴 (DOTA-Somatostatin) 유도체와 ^{177}Lu 표지

합성된 펩타이드 100 μg과 안정제로서 ascorbic acid 50 mg과 dihydroxybenzoic acid 6 mg을 넣은 vial에 $^{177}LuCl_3$ 또는 $^{153}SmCl_3$ 1 mCi를 넣고 90°C에서 30분 동안 반응시킨 후 ITLC-SG, salin으로 전개시킨 후 표지된 방사성리간드에 대한 HPLC 분석을 위하여 C-18 reversed phase X-Terra (5 μm, 4×250 mm) column을 이용하였으며 용매 조건은 Gradient system으로 0.1% trifluoroacetic acid를 함유하고 있는 water (A)와 acetonitrile (B)을 이용하여 1 ml min^{-1} 유속으로 분석하였다.

4. ^{177}Lu-DOTA-Somatostatin 유도체의 세포 표면 결합능 평가

^{177}Lu-DOTA-Somatostatin의 세포결합능력을 확인하기 위하여 Calu6 (human 폐암세포)를 10% FBS와 1%의 Penicillin/streptomycin를 포함하는 Modified Eagle's Medium (GIBCO BRL, Paisley, UK)을 이용하여 배양 후 96 well plate에 5×10^4 Calu6 cells well^{-1}을 준비하여 24시간 동안 전 배양하였다. 배양액 제거 및 세척 후, 10, 100, 1000 nM peptide μCi^{-1}를 첨가하여 60분 동안 세포와 반응 후, unbound samples을 회수하였다. 200 μl glycine buffer (pH 2.5)를 세포에 첨가하여 세포막에 결합한 ^{177}Lu-DOTA-Somatostatin를 회수하였으며 1 N NaOH (200 μl)를 세포에 첨가하여 세포 내로 internalization된 ^{177}Lu-DOTA-Somatostatin를 회수하여 감마카운터를 이용하여 분석하였다.

5. ^{177}Lu-DOTA-Somatostatin 유도체의 동물 실험

^{177}Lu 표지된 DOTA-Somatostatin 유도체의 실험동물 체내 분포 변화를 확인하기 위하여 18~23 g의 female C57BL/6에 Calu6 세포주를 실험동물에 주입 (inoculation) 하여 암세포 이식된 동물을 만든 후 5 μCi의 ^{177}Lu-DOTA-Somatostatin 유도체를 꼬리 정맥을 통하여 주입한 후 2시간과 24시간 경과 후 혈액과 암조직에로의 축적율을 각각의 장기에 대한 방사능을 감마카운터를 이용하여 측정하였다. 이를 각 장기의 단위 무게당 섭취율 (percent injected dose g^{-1}, %ID g^{-1})로 계산하였다.

결 과

신경내분비종양의 방사성표적치료제를 개발을 목표로 하여 진행된 본 연구에서는 고체상 지지체를 이용하여 소마토스타틴 (somatostatin) 유도체를 합성하였고, 최종 합성물질의 구조는 Fig. 2와 같다. LC ms^{-1}를 이용한 확인 결과 목적 화합물의 분자량인 M+1 (1412)의 값을 얻었다 (Fig. 3). 도타-소마토스타틴 (DOTA-somatostatin)의 표지 반응은 원자로에서 생산 가능한 동위원소 ^{177}Lu을 활용하였다. 방사성동위원소 (^{177}Lu)와의 표지실험을 통해 신경내분비종양의 표적 가능한 방사성동위원소가 표지된 후보물질이 제조되었으며, 표지능의 확인한 결과 $^{177}LuCl_3$의 경우 Rf 값은 Solvent Front (0.9~1.0)에 위치하고 ^{177}Lu이 표지된 도타-소마토스타틴 (DOTA-somatostatin) 유도체의 경우에는 0~0.1 사이

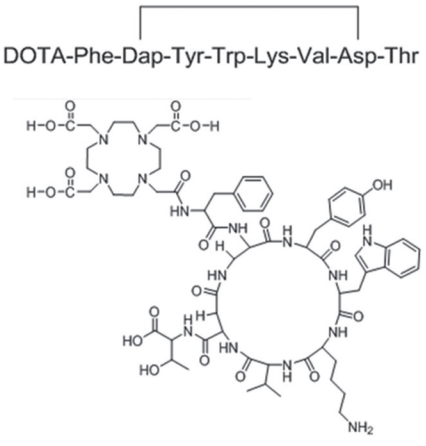
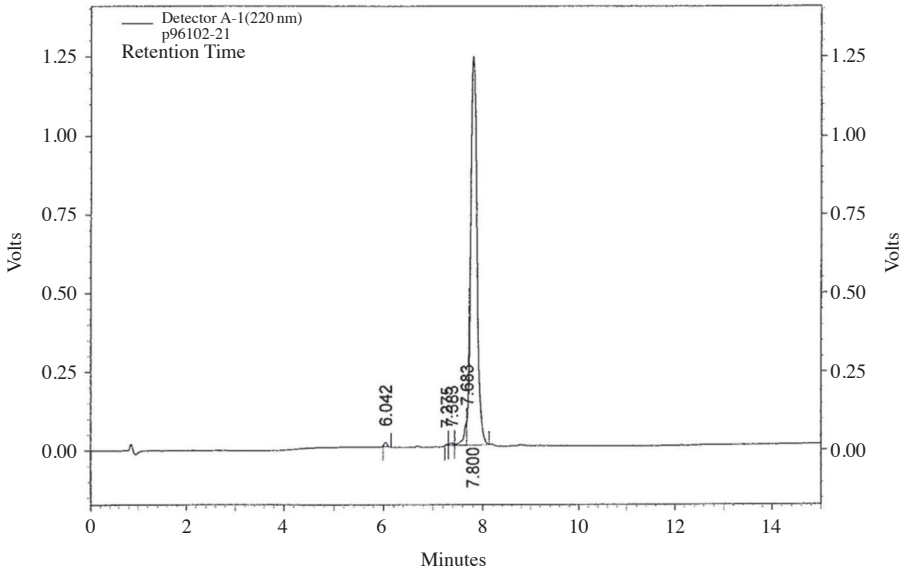


Fig. 2. Schematic figure for DOTA-somatostatin derivative.



Detector A - 1 (220nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	6.042	52804	0.473	13065	0.980
2	7.275	15951	0.143	4568	0.343
3	7.383	42691	0.382	8135	0.610
4	7.683	311114	2.784	74374	5.577
5	7.800	10751495	96.218	1233472	92.491

Fig. 3. HPLC profile for identification of DOTA-somatostatin derivative after C-18 purification (retention time: 7.80 min, yield: 92.48%).

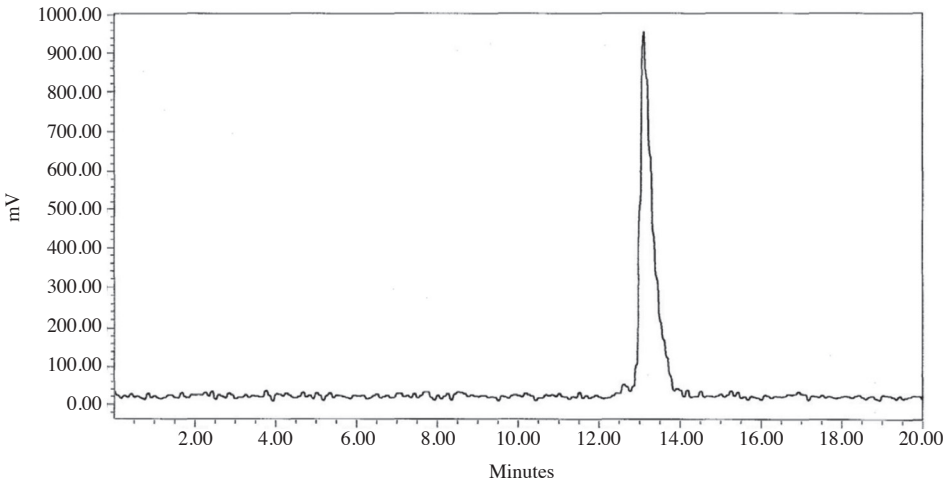


Fig. 4. HPLC profile for radiolabeling of Somatostatin derivative with ^{177}Lu.

에 위치하며 ^{177}Lu에 100% 표지됨을 확인하였다(Fig. 4). ^{177}Lu-DOTA-Somatostatin 유도체의 세포 표면 흡착능 측정 결과 본 연구에 이용된 합성된 ^{177}Lu-DOTA-Somatostatin은 Calu6 세포 배양액에 투여 시 세포 표면에 결합 정도가 시간에 따라 비례적으로 점차 증가하는 양상을 보였다(Fig. 5). 방사성동위원소가 표지된 후보물질(^{177}Lu-DOTA-Somatostatin)은 세포 및 동물실험을 통하여 표적 가능여부를 실험해 본 결과는 세포실험 평가에서 120분까지 증가하였으나 본 연구에서 집중적으로 관찰한 종양세포 내로의 시간에 따른 후보물질의 %ID g^{-1}을 측정한 결과(Table 1) 2시간 후 혈액 내 잔존량에 비하여 4.75배로 암조직 내로 축적이 되었음을 확인했으며 24시간 이후에는 3.66배로 감소한

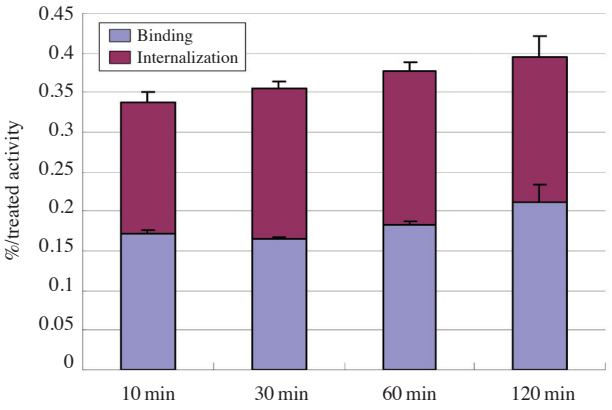


Fig. 5. Total binding and internalization of ^{177}Lu-DOTA-Somatostatin in Calu6 cells.

Table 1. Tumor cell uptake of ^{177}Lu-DOTA-Somatostatin in Calu6 bearing mice at 2 h or 24 h post injection: There was a significant decrease in the uptake of ^{177}Lu-DOTA-Somatostatin into tumor cell after 24 hrs post injection compared to blood pool, Student t-test was carried out % ID g^{-1} of blood and tumor uptake at 2 hr and 24 hrs pi, n = 3)

% ID g^{-1}	Blood	Tumor
2 hr	0.24 ± 0.10	1.18 ± 0.45
24 hr	0.38 ± 0.05	0.32 ± 0.03**

집적률이 얻어졌다.

고 찰

본 연구에서는 특히 암세포 내 표적률 및 거취율을 높이기 위하여 킬레이터로 작용할 소마토스타틴(somatostatin) 유도체의 구조 변경을 시도하였고 그 효과를 확인하고자 세포실험 및 동물실험을 수행하였다. 일반적으로, 암화 가능성이 있는 대부분의 종양은 소마토스타틴에 의존적으로 종양부위에 많이 분화되어 집적되며 고리화 된 물질(예: Cyclic tetradecapeptide somatostatin)은 성장호르몬 분비에 강력한 길항제로 작용이 됨이 알려져 있다(Miyazaki *et al*. 2004; Theodoropoulou and Stalla 2013), 기존 소마토스타틴(somatostatin)의 구조는 이중 유황기(Disulfide)의 형태의 고리화합물을 형성하고 있음에 반하여, 체내에 오랜 체류시간을 통해 ^{177}Lu에 기인한 치료율 상승을 기대하여 이중 유황기(Disulfide)를 아마이드(amide) 고리형으로 대체한 화합물이 고안되었다(Mier *et al*. 2004).

그 결과 동물실험 평가에서는 동물에 주입 후 2시간까지는 ^{177}Lu-DOTA-Somatostatin 유도체는 혈액 대비 암세포 축적율이 1 : 5로 나타났다. 당초 체내에 오래 체류되기를 기대하여 유도체가 만들어졌기에 처음 종양집적률 상태의 지속적인 유지로 24시간 경과 후에도 초기의 집적율과 비슷한 집적율이 보여지기를 기대하였으나 기대에 미치지 못하고 암세포에서 빨리 빠져나가는 것으로 결과가 얻어졌다. 즉, 유도체 합성 시 체내 체류율 나아가서 병소로 약물 전달을 증가시킬 목적으로 도입된 고리형 유도체보다 조금 더 지용성이 커지는 그룹을 도입하여 집적률을 높이는 대신 암 조직 이외의 타 장기에 집적률은 낮추며 ^{177}Lu의 암세포 치료 효과를 기대하여 보아야 한다. 문헌에 따르면 소마토스타틴에 disulfide 그룹대신 pyrazinone ring으로 치환한 경우와 소마토스타틴의 기본(Backbone) 구조에 여러 종류 화합물질 그룹을 도입하여 합성한 경우에도 기존의 소마토스타틴을 능가하는 항종양 효과가 나타났다고 보고되고 있다(Miyazaki *et al*. 2004; Reubi and Schonbrunn 2013). 다만, 일반적으로 합성물질의 지용성을 높이기 위해 도입되는 물질의 탄소 수가 많은 유도체들은 정작 신경내분비 종양에 많이 분포하는 수용체에 결합하는 능력이 감소될 수 있어 이 점 또한 고려해야 할 부분이다. 또 다른 연구에 따르면 방사성동위원소와 생리활성 물질을 결합시키는 이기능성 킬레이터에 구조적인 변화를 주어 열역학적인 안정성(Thermodynamic Stability)을 높였다 하더라도 유의성이 있는 암세포 내로의 흡수(uptake)의 차이가 나는 것과 직결되지는 않는다는 연구도 보고되어 있는 것에 미루어 보아(Jason *et al*. 2011) 이기능성 킬레이터의 지용성 증가를 위한 화학적 구조 변화에 따른 암세포 내로의 흡수율에 대한 연구 진행의 필요성이 대두된다. 이외에도 도타-소마토스타틴(DOTA-somatostatin)이 유도체가 Calu6 이외의 암조직 세포에서 그 수용체 길항제재로서 소마토스타틴 수용체 밀도와 직접적으로 관련이 있는지의 여부와 수용체 분포도에 따른 암세포 내로의 집적률 및 배출률 등의 심층적인 비교 연구가 필요하다고 사료되며(Grudzinski *et al*. 2010) 이기능성 킬레이터 이외에도 생리활성 물질의 활성부분을 제외하고 나머지의 크기를 최소화하거나 다른 아미노산(예: Threonine)으로 치환하여 암세포 내로의 흡수율 등을 변화시켜 방사성치료제의 효과를 증가시킬 수 있는 점도 향후 연구 방향으로 보여진다(Graham *et al*. 2002; Oberg 2012; D'Huyvetter *et al*. 2014).

결 론

본 연구에서 합성한 소마토스타틴 유도체는 폐암세포인 Calu6 세포에는 암세포 표적을 위한 암세포 내 흡수율 증가에 큰 영향을 미치지 않았거나 화합물의 지용성 증가로 인해 암세포 표적 선택성이 적다고 판단된다. 즉 이기능성 킬레이터의 지용성을 높여 암세포 표적 후보물질을 암세포 내로의 흡수율을 높이고 이를 통하여 방사성의약품의 치료율

을 증가시키고자 하는 가설은 본 연구 결과로 미루어 볼 때 연관성이 없음이 확인되었다. 이를 극복하기 위해서는 향후 ^{177}Lu 이외의 란타나이드 계열의 방사성동위원소인 ^{90}Y 또는 ^{188}Re 등으로 선택적 표지가 가능한 유도체가 개발이 필요하고, N_2S_2 킬레이터가 도입된 소마토스타틴 유도체 개발 등이 유효할 것으로 보여지고 이들의 세포 내 흡수율 증가와 직접 영향을 끼칠 수 있는지의 여부도 동시에 확인이 되어야 한다.

사 사

본 연구는 한국원자력연구원의 주요사업(동위원소생산 및 융합기술 개발)의 일환으로 수행되었다.

참 고 문 헌

Claringbold PG, Brayshaw PA, Price RA and Turner JH. 2011. Phase II study of radiopeptide ^{177}Lu-octreotate and capecitabine therapy of progressive disseminated neuro-endocrine tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **38**:302-311.

D'Huyvetter M, Vincke C, Xavier C, Aerts A, Impens N, Baatout S, Raeve HD, Muyldermans S, Caveliers V, Devoogdt N, Lahoutte T. 2014. Targeted Rdionuclide Therapy with A ^{177}Lu-labeled Anti-HER2 Nanobody. *Theranostics* **4**(7):708-720.

D'Huyvetter M, Xavier C, Caveliers V, Lahoutte T, Muyldermans S and Devoogdt N. 2014. Radiolabeled nanobodies as theranostic tools in targeted radionuclide therapy of cancer. *Expert Opin. Drug Deliv.* **11**:1939-1954.

Dearling JLJ, Voss SD, Dunning P, Snay E, Fahey F, Smith SV, Huston JS, Meares CF, Treves ST and Packard AB. 2011. Imaging cancer using PET - the effect of the bijunctional chelator on the biodistribution of a ^{64}Cu-labeled antibody. *Nucl. Med. Biol.* **38**:29-38.

Definition of Targeted Therapy, NCI Dictionary of cancer terms, 2014, National Cancer Institute.

Graham KAN, Wang Q, Eisenhut M, Haberkorn U and Mier W. 2002. A general method ofr functionalizing both the C- and N-terminals of Tyr3-octreotate. *Tetrahedron Lett.* **3**:5021-5024.

Grudzinski JJ, Tome W, Weichert JP and Jeraj R. 2010. The biological effectiveness of targeted radionuclide therapy based on a whole-body pharmacokinetic model. *Phys. Med. Biol.* **55**:5723-5734.

Gulenchyn KY, Yaoy X, Asa SL, Singh S and Law C. 2012. Radionuclide Therapy in euroendocrine Tumours: A Systematic Review. *Clin. Oncol.* **24**:294-308.

Li G and Low PS. 2015. Synthesis and evaluation of a ligand targeting the somatostatin-2 receptor for drug delivery to neuroendocrine cancers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**:1792-1798.

Mier W, Graham KAN, Wang Q, KrЄamer S, Hoffend J, Eisenhutb M and Haberkorn U. 2004. Synthesis of peptide conjugated chelator oligomers for endoradiotherapy and MRT imaging. *Tetrahedron Lett.* **45**:5453-5455.

Miyazaki A, Yokoi T, Tachibana Y, Enomoto R, Lee E, Bokonyi G, Keri G, Tsuda Y and Okada Y. 2004. Design and synthesis of novel type somatostatin analogs with antiproliferative activities on A431 tumor cells. *Tetrahedron Lett.* **45**:6323-6327.

Oberg KE 2012. The Management of Neuroendocrine Tumours: Current and Future Medical Therapy Options. *Clin. Oncol.* **24**:282-293.

Rai U, Thrimawithana TR, Valery C and Simon A. 2015. YoungTherapeutic uses of somatostatin and its analogues: Current view and potential applications. *Pharmacology & Therapeutics* **152**:98-110.

Reubi JC and Schonbrunn A. 2013. Illuminating somatostatin analog action at neuroendocrine tumor receptors. *Trends in Pharmacol. Sci.* **34**:678-688.

Sofou S. 2008. Radionuclide carriers for targeting of cancer. *Int. J. Nanomed.* **3**(2):181-199.

Sudhakar A. 2009. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J. Cancer Sci. Ther.* **1**(2):1-4.

Theodoropoulou M and Stalla GK. 2013. Somatostatin receptors: From signaling to clinical practice. *Frontiers in Neuroendocrinology* **34**:228-252.

Yeong CH, Cheng MH, Kwan-Hoong NG. 2014. Therapeutic radionuclides in nuclear medicine; current and future prospects. *J. of Zhejang Univ-Sci. (biomed & BIotechnol)* **15**(10):845-863.

Zhukov NV and Tjulandin SA. 2008. Targetted Therapy in the treatment of Solid Tumors; Practice Contradicts Theory. *Biochemistry (Moscow)* **72**(5):605-618.

Received: 25 November 2015
Revised: 5 December 2015
Revision accepted: 10 December 2015