

## VEGF-A – CELEM ANTYANGIOGENNEJ TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ\*

### VEGF-A – TARGET OF ANTIANGIOGENIC CANCER THERAPY

Arkadiusz GRUCHLIK<sup>1</sup>, Ewa CHODUREK<sup>1</sup>,  
Dorota DOMAL-KWIATKOWSKA<sup>2</sup>, Zofia DZIERŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biofarmacji oraz <sup>2</sup>Katedra i Zakład Biochemii  
Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

**Streszczenie:** VEGF-A jest glikoproteiną należącą do rodziny czynników wzrostu śródbłónka. Ludzki gen VEGF-A, zlokalizowany jest na chromosomie 6p21.3 i zawiera 8 egzonów przedzielonych 7 intronami. W wyniku alternatywnego składowania może powstawać 10 izoform VEGF-A określanych jako: 121, 138, 145, 148, 162, 162b, 165, 183, 189 i 206 różniących się budową, występowaniem i funkcją. VEGF-A wiąże się z receptorami błonowymi o aktywności kinazy tyrozynowej Flt-1 i Flk-1, czego efektem jest aktywacja białek adaptorowych Shc, Grb2, Nic, Nck, Crk, fosfatazy tyrozynowej SHP-1 i SHP-2 oraz białek docelowych, takich jak: kinaza białkowa B Akt/PKB, fosfolipaza białkowa Cγ (PLCγ), kinaza FAK czy p85 PI-3K. Do najsilniejszych induktorów ekspresji VEGF-A należy stan hipoksji. W obrębie promotora genu wykryto sekwencję zależną od hipoksji, z którą wiąże się czynnik transkrypcyjny HIF-1. VEGF-A jest białkiem o szerokim spektrum działania. Pełni wiele różnych funkcji w organizmie, z których najważniejszą jest rola w procesie angiogenezy. Poznanie mechanizmów angiogenezy zaowocowało nową strategią leczenia chorób nowotworowych (terapia antyangiogenna), stanów patologicznych przebiegających z niedotlenieniem i niedokrwieniem (angiogeneza terapeutyczna), np. choroby naczyń wieńcowych, ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego, niedokrwienia mózgu oraz kończyn.

**Słowa kluczowe:** czynnik wzrostu śródbłónka naczyń – VEGF-A, receptory Flt-1 i Flk-1, czynnik transkrypcyjny HIF-1, mechanizm transdukcji sygnału, terapia antyangiogenna.

**Summary:** VEGF-A is a glycoprotein, which belongs to the vascular endothelial growth factor family. The human VEGF-A gene is composed of 8 exons, separated by 7 introns and is localized in chromosome 6p21.3. Alternative exon splicing of a single VEGF gene results in the generation of the ten different isoforms known as 121, 138, 145, 148, 162, 162b, 165, 183, 189 and 206. VEGF-A binds to two tyrosine kinase receptors Flt-1 and Flk-1. Activation of the receptors leads to a rapid recruitment of the adaptor proteins Shc, Grb2, Nic, Nck, Crk, protein tyrosine phosphatases SHP-1 i SHP-2 as well as Akt/PKB serine/threonine kinase, phospholipase Cγ (PLCγ), focal adhesion kinase FAK and PI-3 kinase. Oxygen

\*Dofinansowanie z badań statutowych Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach nr NN-1-039/2007.

tension is a key regulator of VEGF gene expression. Hypoxia-inducible transcription of VEGF is mediated, at least in part, by the binding of hypoxia-inducible factor 1 HIF-1 to an HIF-1 binding site located in the VEGF promoter. VEGF-A plays very important roles in the organism of which angiogenesis is the most significant. The understanding of the mechanisms of angiogenesis can create the basis of new methods of treatment of some diseases with accompanying angiogenesis disturbances, such as antiangiogenic cancer therapy, and therapeutic angiogenesis in case of cardiac, brain and limb ischemia.

*Key words:* vascular endothelial growth factor – VEGF-A, Flt-1 and Flk-1 receptors, HIF-1 transcription factor, signal transduction, antiangiogenic therapy.

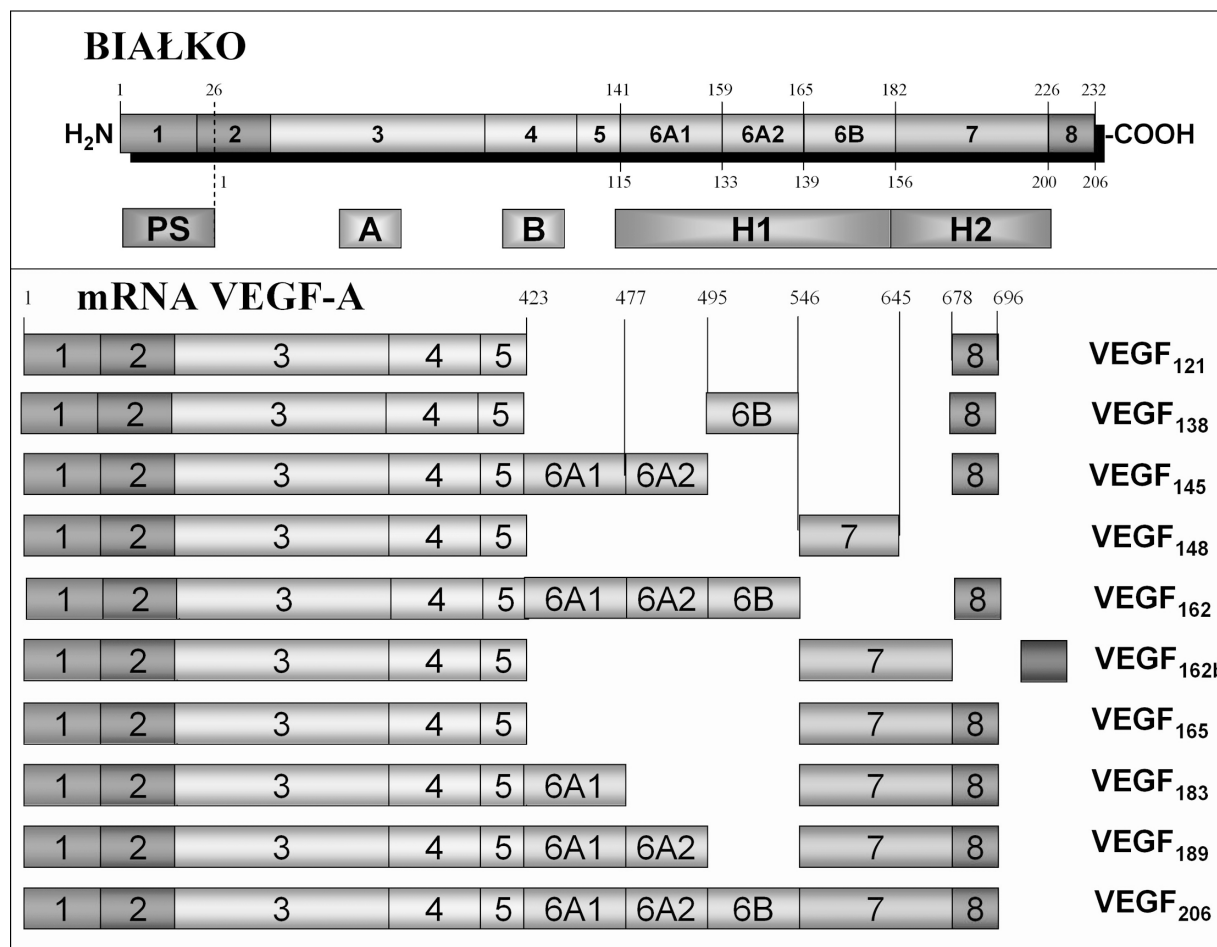
## BUDOWA GENU, ŹRÓDŁO I WŁAŚCIWOŚCI BIAŁKA VEGF-A

Historia czynnika wzrostu śródbłónka naczyń VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) sięga początku lat osiemdziesiątych, kiedy to intensywnie trwały badania nad procesami nowotworzenia. Senger i wsp. [51] w 1983 badając proces angiogenezy w obrębie guza nowotworowego opisali czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń krwionośnych – VPF (ang. *vascular permeability factor*). Kilka lat później odkryto białko wykazujące silne właściwości mitogenne w stosunku do komórek śródbłónka i nazwano je VEGF lub waskulotropiną [12]. Po sklonowaniu w 1989 r. VPF [23] i VEGF [27] okazało się, że oba białka są tożsame. O ważnej roli VEGF w procesach fizjologicznych świadczy fakt, że mysie zarodki, pozbawione tylko jednego allelu genu VEGF, ginęły jeszcze przed urodzeniem [12].

Do rodziny VEGF należą VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E oraz łożyskowy czynnik wzrostu PIGF (ang. *placenta growth factor*) [12]. Ludzki gen VEGF-A jest zlokalizowany na chromosomie 6p21.3 i zawiera 8 egzonów przedzielonych 7 intronami. Region kodujący obejmuje w przybliżeniu 14 kbp [60]. W obrębie regionu promotora odkryto między innymi sekwencje wiążące czynniki transkrypcyjne: HIF-1, AP-1, AP-2, NFκB, GATA-6 [17, 36]. W wyniku alternatywnego składowania może powstawać 10 izoform mRNA VEGF-A: VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>138</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>148</sub>, VEGF-A<sub>162</sub>, VEGF-A<sub>162b</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>183</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> oraz VEGF-A<sub>206</sub> (ryc. 1).

Ekgzony od 1 do 5 kodują N-końcowy fragment peptydu, w którym zlokalizowane są domeny PS, A i B. PS jest peptydem sygnałowym, który jest odcinany przy sekrecji cząsteczki, natomiast domeny A i B są odpowiedzialne za wiązanie się z receptorami. Domena A zawiera ujemnie naładowane aminokwasy Asp<sup>63</sup>, Glu<sup>64</sup>, Glu<sup>67</sup>, niezbędne do wiązania się z receptorem Flt-1, natomiast domena B zawiera dodatnio naładowane aminokwasy, takie jak: Asn<sup>82</sup>, Lys<sup>84</sup>, His<sup>86</sup>, niezbędne do wiązania się z receptorem Flk-1 [38]. Egzony 6 i 7 kodują dwie niezależne domeny w obrębie części C-terminalnej H1 i H2. Są one odpowiedzialne za transport peptydu, transdukcję sygnału do wnętrza komórki, powinowactwo do heparyny, interakcje z innymi czynnikami wzrostowymi, aktywność mitogenną oraz za wiązanie z koreceptorem Flk-1, tj. neuropiliną 1 (NRP-1) (ang. *neuropilin receptor 1*) [20].

VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>183</sub> i VEGF-A<sub>189</sub> występują w większości tkanek. Ilościowo dominują izoformy 121, 165, w mniejszym stopniu 189 [37].



RYCINA 1. Wynik alternatywnego składania mRNA VEGF-A w organizmie ludzkim: PS – peptyd sygnałowy (pierwsze 26 aminokwasów), A – domena odpowiedzialna za wiązanie z receptorem Flt-1, B – domena odpowiedzialna za wiązanie z receptorem Flk-1, H1 i H2 – domeny odpowiedzialne za aktywność mitogenną. W obrębie egzonu 6 wykryto miejsca odpowiedzialne za alternatywne składanie, dlatego można go umownie podzielić na części: 6A1, 6A2 i 6B ([13, 37, 20] w modyfikacji własnej)

VEGF-A<sub>206</sub> wyizolowano z ludzkiej wątroby płodowej [20], VEGF-A<sub>145</sub> z niektórych linii komórek nowotworowych oraz z narządów rozrodczych kobiety [43], VEGF-A<sub>148</sub> z kłębuszków nerkowych [62], natomiast VEGF-A<sub>162</sub> z ludzkich komórek raka jajnika A431 [26]. VEGF-A jest syntetyzowany przez różne typy komórek: mastocyty, komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych VSMC (ang. *vascular smooth muscle cell*), makrofagi, fibroblasty, komórki nowotworowe, komórki śródbłónka [40], monocyty, keratynocyty, eozynofile, limfocyty T. Jest również produkowany i magazynowany w ziarnistościach  $\alpha$  płytek krwi [25]. W obrębie siatkówki oka znaleziono go między innymi w astrocytach, komórkach Müllera, komórkach nerwowych, komórkach śródbłónka i w nabłonku barwnikowym [20].

Krótsze izoformy, takie jak VEGF-A<sub>121</sub> i VEGF-A<sub>138</sub>, znajdują się w macierzy pozakomórkowej, podczas gdy dłuższe (VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>189</sub>, VEGF-A<sub>206</sub>) wiążą się z proteoglikanami siarczanu heparanu na powierzchni komórki, co stanowi swoisty zewnątrzkomórkowy magazyn VEGF-A. Z proteoglikanami siarczanu heparanu wiążą się także inne peptydy, między innymi zasadowy czynnik wzrostu bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*). Wzajemna konkurencja między VEGF-A i bFGF o miejsce wiązania częściowo tłumaczy ich synergizm w indukcji angiogenezy. VEGF-A<sub>165</sub> ze względu na swoją budowę jest zlokalizowane w macierzy, jak i zakotwiczone w błonie komórkowej. W wyniku działania enzymów proteolitycznych, np. plazminy, z cząsteczek związanych na powierzchni komórki zostaje uwalniany aktywny, rozpuszczalny fragment peptydowy (110 aminokwasów) zwany VEGF-A<sub>110</sub> [37].

## CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA EKSPRESJĘ GENU VEGF-A

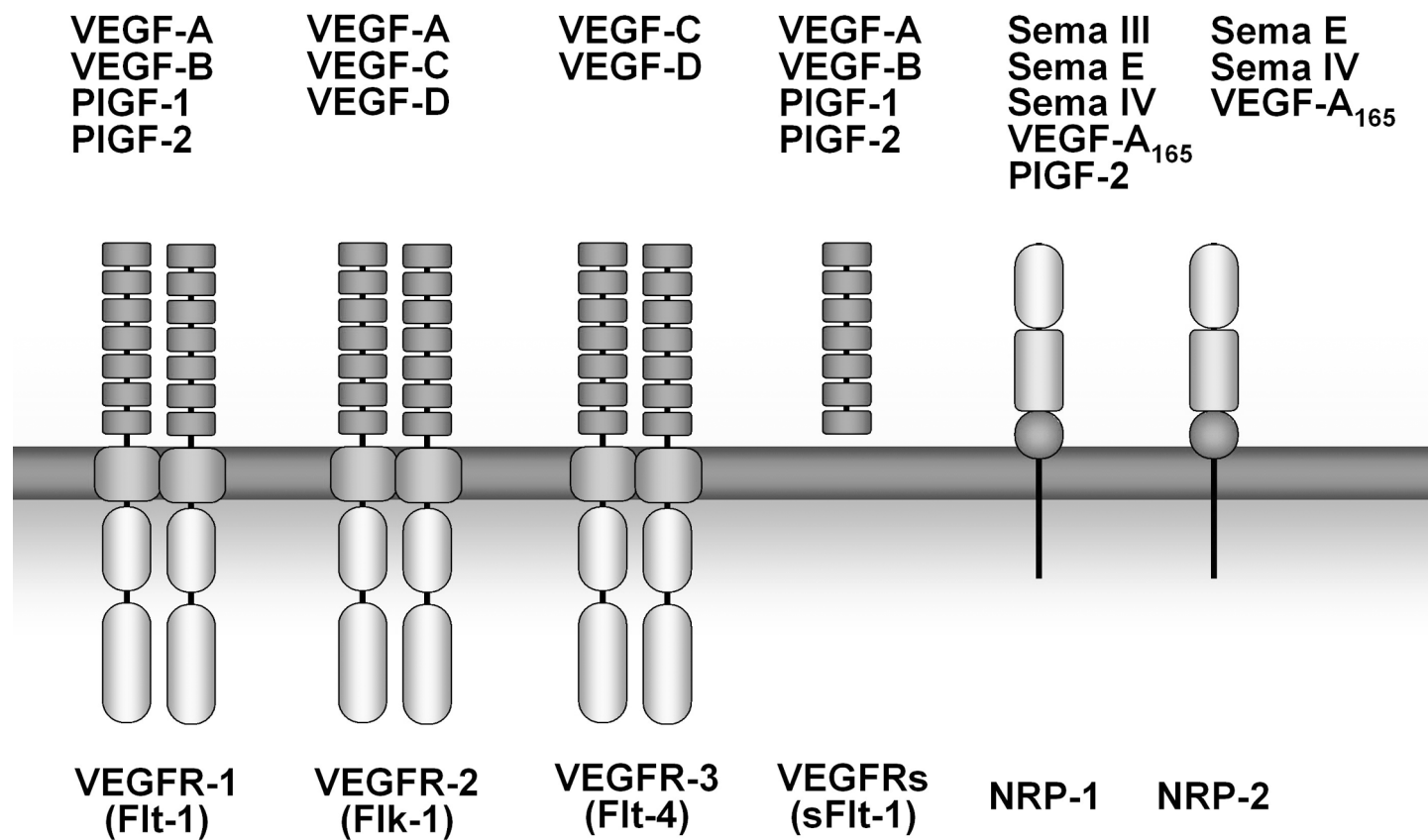
Niewątpliwie do najsilniejszych induktorów ekspresji VEGF-A należy stan hipoksji. Poziom ekspresji mRNA VEGF jest odwrotnie proporcjonalny do ciśnienia pO<sub>2</sub> na zewnątrz komórki [13]. Zauważono duże podobieństwo mechanizmu ekspresji genu VEGF-A do genu erytropoetyny. W obu przypadkach sekwencje regulatorowe zawierają zależny od hipoksji element o konserwatywnym rdzeniu 5'-CGTG-3', tzw. HRE (ang. *hypoxia response element*), z którą wiąże się czynnik transkrypcyjny HIF-1 (ang. *hypoxia inducible factor 1*) [5]. HIF-1 składa się z dwóch podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ . Do rodziny białek HIF-1 $\alpha$  należą również białka HIF-2 $\alpha$  oraz HIF-3 $\alpha$ . Podjednostki  $\alpha$  należą do podrodziny czynników transkrypcyjnych bHLH-PAS zawierających motyw heliks-pętla-heliks bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*) oraz domenę PAS (ang. *per-arnt-sim*). Motyw bHLH oraz domena PAS, zlokalizowane na N-końcu łańcucha polipeptydowego, są odpowiedzialne za dimeryzację podjednostek i wiązanie się z DNA. HIF-1 $\alpha$ , jak większość czynników transkrypcyjnych, ma sygnał lokalizacji jądrowej NLS (ang. *nucleus localization signal*), który jest niezbędny do przemieszczenia się białka z cytoplazmy do jądra komórkowego. Białko HIF-1 $\beta$ , synonim ARNT (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein*) występuje w jądrze komórkowym większości komórek, a jego ekspresja, w przeciwieństwie do HIF-1 $\alpha$ , nie zależy od pO<sub>2</sub> [30].

W warunkach normoksji białko HIF-1 $\alpha$  w cytoplazmie prawie w ogóle nie występuje ponieważ ulega szybkiej proteolitycznej degradacji przez E3 ligazę ubikwitynową. Ligaza ta zawiera białko pVHL (ang. *von Hippel-Lindau protein*), które jest odpowiedzialne za przyłączenie ubikwityny do HIF-1 $\alpha$ , czego efektem jest rozpoczęcie proteolizy. Interakcja pomiędzy pVHL a specyficzną domeną HIF-1 $\alpha$  jest regulowana przez zależną od propylo-4-hydroksylazy hydroksylację proliny (Pro<sup>564</sup> w HIF-1 $\alpha$ ), która do swej aktywności potrzebuje tlenu cząsteczkowego i jonów żelaza. Hipoksja hamuje również zależną od poziomu O<sub>2</sub> hydroksylację asparaginy (Asn<sup>803</sup>) w domenie transaktywacyjnej białka HIF-1 $\alpha$ , co umożliwia przyłączenie specyficznego koaktywatora transkrypcji białka p300/CBP (ang. *CREB binding protein*). p300/CBP wiąże białko CREB-1 (ang. *cAMP response element-binding protein*) należące do rodziny czynników wiążących miejsca na DNA zależne od poziomu cAMP zwane CRE (ang. *cAMP responsible element*). Efektem tego jest powstanie kompleksu CREB-1/HIF-1 i zwiększenie aktywności transkrypcyjnej czynnika HIF-1 [56]. HIF-1 $\alpha$  wchodzi również w interakcję z białkiem Jab1 (ang. *jun-activation domain-binding protein-1*), które jest koaktywatorem czynnika transkrypcyjnego AP-1. Jab1 podobnie jak białko p300 zwiększa aktywność transkrypcyjną czynnika HIF-1 [2]. Nie tylko HIF-1 czy CREB-1, ale także inne czynniki transkrypcyjne: AP-1, AP-2, SP1, NF $\kappa$ B, p53 czy czynnik transkrypcyjny ATF-1 mogą indukować ekspresję genu *VEGF* [28]. Należy podkreślić, że transkrypcja genu *VEGF* zależy głównie od stabilności białka HIF-1 $\alpha$ , nie mniej odkryto również mechanizmy prowadzące do zwiększenia trwałości samego transkryptu mRNA, w warunkach hipoksji, szczególnie jego końców 5' i 3' nieulegających translacji. Istotną rolę pełnią tu białka HuR, białko wiążące regiony bogate w AU oraz białko PAIP2 (ang. *polyadenylated-binding protein-interacting protein 2*). Dodatkowo koniec 5' ma dwie niezależne wewnętrzne sekwencje przyłączania rybosomów IRES (ang. *internal ribosome entry sites*), co umożliwia rozpoczęcie transkrypcji nawet podczas stanu hipoksji [56]. Ze względu na rolę, jaką pełni w zachowaniu homeostazy całego organizmu, VEGF ma precyzyjny i skomplikowany mechanizm regulujący jego ekspresję i sekrecję. Do induktorów można zaliczyć cytokiny (np. IL-1 $\beta$ , IL-6), czynniki wzrostowe (np. EGF, TGF- $\alpha$  i - $\beta$ , IGF-1, PDGF), prostaglandyny (PGE<sub>2</sub>) oraz hormony (np. ACTH, LH, estrogeny) [18, 6], endotelinę 1, cAMP, Ca<sup>2+</sup>, jony metali ciężkich [21], trombinę, angiotensynę II [47], endotoksyny [33], a także mutacje w onkogenach: src, raf, ras czy erbB oraz w genach supresorowych, np. w genie p53 [13, 38, 50].

## RECEPTORY DLA VEGF

Receptory dla VEGF są błonowymi glikoproteinami. Składają się z trzech części: domeny zewnątrzkomórkowej, transmembranowej i domeny wewnątrzkomórkowej o aktywności kinazy tyrozynowej (ryc. 2). Do rodziny receptorów VEGF należą:

- VEGFR-1 (ang. *vascular endothelial growth factor receptor 1*) – receptor czynnika wzrostu śródbłonna, zwany również Flt-1 (ang. *fms-like tyrosine kinase 1*); masa 180 kDa;



RYCINA 2. Receptory dla VEGF ([22] w modyfikacji własnej)

- VEGFR-2 zwany również KDR (ang. *kinase domain region*) – mysi homolog Flk-1 (ang. *foetal liver kinase 1*) wykazuje 85% podobieństwo z ludzkim receptorem KDR, masa 230 kDa;
- VEGFR-3 zwany również Flt-4 (ang. *fms-like tyrosine kinase 4*); masa ok. 120 kDa;
- VEGFRs (sFlt-1) – rozpuszczalna forma receptora Flt-1 (ang. *soluble fms-like tyrosine kinase 1*) – zawiera tylko część zewnątrzkomórkową (6 domen immunoglobulinopodobnych), natomiast nie zawiera fragmentu transmembranowego oraz domeny cytoplazmatycznej [22].

Ekspresja VEGFR-1 zachodzi głównie w komórkach śródbłónka naczyń krwionośnych, ponadto w monocytach, makrofagach, w trofoblaście łożyska i w komórkach mezangialnych nerki. Ekspresja VEGFR-2 występuje przede wszystkim w komórkach śródbłónka naczyń krwionośnych, ale także w megakariocytach, płytkach krwi oraz w krwiotwórczych komórkach macierzystych i komórkach macierzystych siatkówki [13]. Receptor Flt-4, dla którego ligandami są VEGF-C i VEGF-D pośredniczy w przekazywaniu sygnałów limfangiogennych. Obszerniejsze informacje na temat tego receptora wykraczające poza zakres niniejszej publikacji można znaleźć w odpowiednich pracach przeglądowych [13, 22, 50]. Receptor sFlt-1, który powstaje w wyniku alternatywnego składania receptora Flt-1, wiąże się z VEGF-A i B. Jak dotąd nie jest znana rola fizjologiczna tego typu receptora. Prawdopodobnie może on wiązać VEGF we krwi i w ten sposób zapobiegać stymulacji śródbłónka.

W obrębie promotora genu Flt-1, podobnie jak w przypadku VEGF-A, stwierdzono zależną od hipoksji sekwencję HRE, której nie ma promotor genu Flk-1. Wydaje się zatem, że ekspresja genu Flk-1 jest niezależna od hipoksji [13]. Oba receptory są niezbędne dla prawidłowego przebiegu angiogenezy, różnią się mechanizmami transdukcji sygnału. Po pobudzeniu receptora Flk-1 zachodzi silna, zależna od ligandu autofosforylacja tyrozyny w obrębie domeny kinazy tyrozynowej, podczas gdy pobudzenie receptora Flt-1 wykazuje bardzo słabą odpowiedź. Aktywacja receptora Flk-1, który prawdopodobnie odpowiedzialny jest za pełne spektrum działania VEGF-A, prowadzi do zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych, proliferacji i zahamowania apoptozy komórek śródbłónka oraz angiogenezy [50], a w życiu płodowym jest nie tylko wczesnym markerem dla komórek progenitorowych naczyń i komórek hematopoetycznych, ale jest również niezbędny dla ich prawidłowego rozwoju. Embryony nie mające genu Flk-1 umierały w 9 dniu rozwoju z powodu braku waskulogenezy [52].

Flt-1 jest odpowiedzialny za regulację syntezy metaloproteaz w komórkach mięśni gładkich [53], migrację monocytów/makrofagów i limfocytów oraz wpływa na reorganizację cytoszkieletu.

Receptory Flk-1 i Flt-1 wykazują interakcję z neuropiliną 1 i 2 (NRP-1,2) (ang. *neuropilin receptor 1,2*), które należą do rodziny białek kollapsyny/semaforyny (Sema) biorących udział w kierowaniu komórek nerwowych podczas tworzenia się układu nerwowego. Neuropilina 1 wiąże Sema-IIIa, Sema-E, Sema-IV, VEGF-A<sub>165</sub>, PlGF-2 i VEGF-B, natomiast neuropilina 2 wiąże Sema-E, Sema-IV, VEGF-A<sub>165</sub> [41, 50], VEGF-A<sub>145</sub> [15] oraz VEGF-E [50].

## MECHANIZM TRANSDUKCJI SYGNAŁU DO KOMÓRKI Z UDZIAŁEM RECEPTORA FLK-1

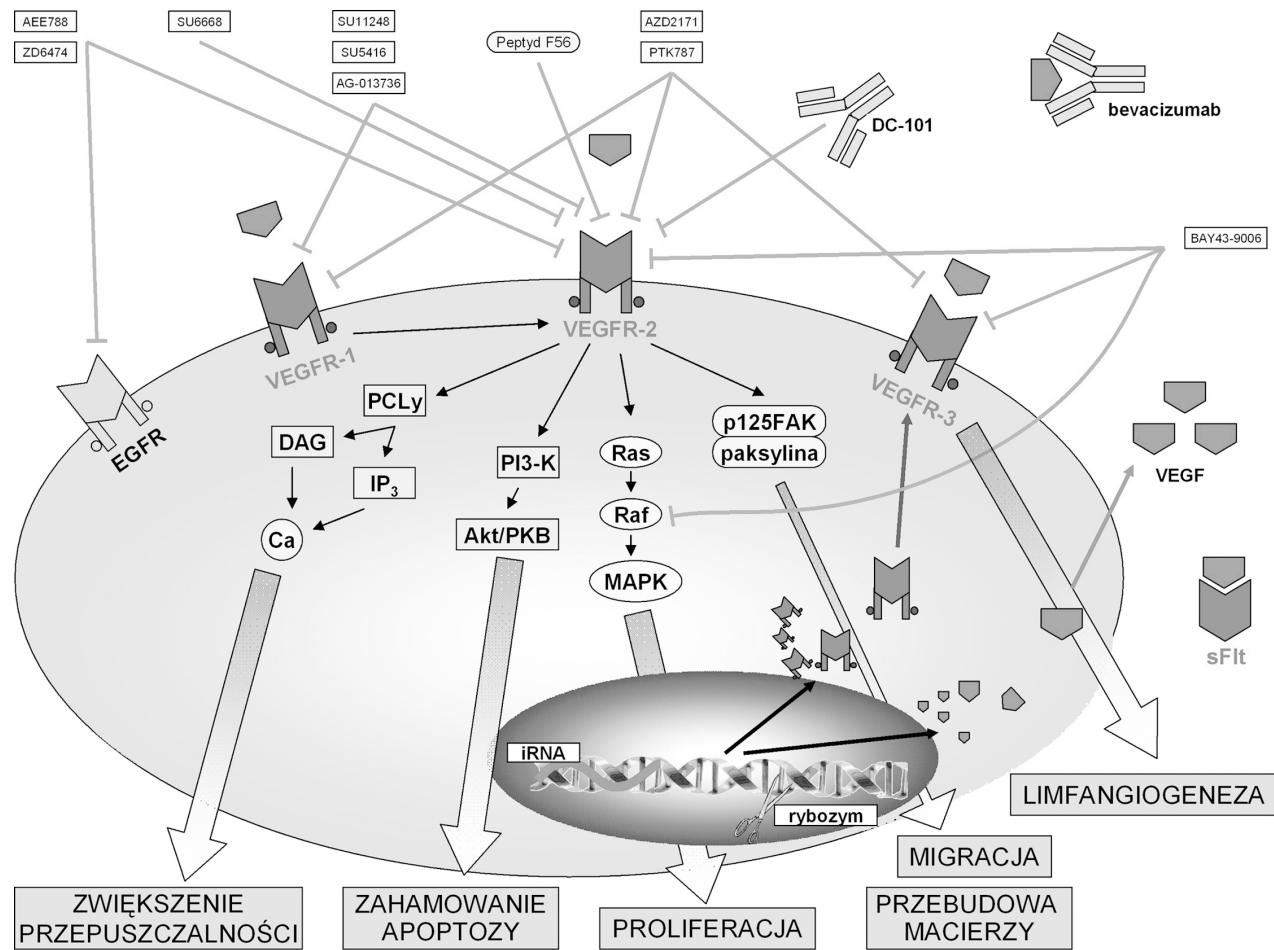
Aby mogło dojść do transdukcji sygnału do komórki, zarówno ligand (VEGF), jak i receptor (Flk-1) muszą ulec dimeryzacji. Po połączeniu się ligandu z zewnątrz-komórkową domeną receptora Flk-1 zachodzi silna, zależna od ligandu autofosforylacja tyrozyn w obrębie domeny kinazy tyrozynowej. Ufosforylowane tyrozyny wiążą białka mające domeny SH2 i SH3 (ang. *sarcoma homology*). Należą do nich białka adaptorowe: Shc, Grb2, Nic, Nck, Crk, białka fosfatazy tyrozynowej SHP-1 i SHP-2 oraz białka docelowe, takie jak: kinaza białkowa B Akt/PKB (ang. *protein kinase B*), fosfolipaza białkowa C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) (ang. *phospholipase C*), kinaza FAK (ang. *focal adhesion kinase*) oraz białko p85 – podjednostka kinazy PI-3K [24]. Aktywacja kinazy FAK (p125) prowadzi do zależnej od paksyliny reorganizacji cytoszkieletu, efektem czego jest zwiększenie migracji komórek [32], natomiast aktywacja białka adaptorowego Grb2 uruchamia szlak Ras/MAPK, co prowadzi do zwiększenia aktywności proliferacyjnej komórek. Fosfolipaza C poprzez inozytolo-1,4,5-trifosforan (IP<sub>3</sub>) oraz diacyloglicerol (DAG) zwiększa stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> w cytoplazmie. Aktywacja kinazy Akt, która inaktywuje kaspazę-9, oraz dodatkowo zwiększenie ekspresji białek antyapoptycznych Bcl-2 i inhibitorów kaspazy 3 (surwiwiny) chroni komórki przed apoptozą (ryc. 3) Obszerniejsze informacje na temat tych mechanizmów można znaleźć w odpowiednich pracach przeglądowych [13, 22, 50].

## TERAPIA ANTYANGIOGENNA

Rozwój biologii molekularnej przyczynił się do poznania mechanizmów hamowania oraz indukcji angiogenezy. Stworzyło to nowe możliwości leczenia stanów niedokrwiennych, np. zawału mięśnia sercowego (angiogeneza terapeutyczna), jak i związanych z nadmierną angiogenezą, która towarzyszy np. rozwojowi guzów nowotworowych (terapia antyangiogenna). Największe sukcesy odnosi obecnie terapia antyangiogenna, w której wykorzystuje się przeciwciała anti-VEGFR-2, peptydy hamujące aktywność receptora VEGFR-2, niskocząsteczkowe inhibitory kinaz tyrozynowych receptorów VEGFR, immunoterapię, oligonukleotydy hamujące ekspresję genu VEGFR oraz tzw. terapię przeciwnaczyniową (ryc. 3).

### Przeciwciała anti-VEGFR-2 i anti-VEGF

W terapii antyangiogennej można zastosować przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko receptorowi VEGFR-2 oraz przeciwko białku VEGF. Przeciwciała anti-VEGFR-2 o symbolu DC-101 (uzyskane przez firmę ImClone Inc.) w istotny sposób hamowało u myszy rozwój guzów pierwotnych, takich jak: rak płuca (*Lewis lung*), piersi (4T1), okrężnicy (CT-26), czerniaka (B16), a także powstrzymywało rozwój przerzutów w raku płuc. Skuteczność jego działania badano również w połączeniu



RYCINA 3. Mechanizm aktywacji receptorów VEGFR. Punkty uchwytu terapii antyangiogennej

z chemioterapią u myszy bezgrasiczych zaszczerpionych ludzkimi guzami, m.in. glejakiem, rakiem płaskonabłonkowym, gruczolakorakiem kory nadnerczy, rakiem trzustki, u których w 75–92% zaobserwowano zahamowanie wzrostu guzów [45]. Innym przeciwciałem anti-VEGFR-2 jest chimeryczne przeciwciało IgG1 o nazwie IMC-1C11. Podczas I fazy badań zastosowano go u 14 pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami uzyskując zadowalające wyniki leczenia. Jednak z powodu pojawienia się u dwóch pacjentów przeciwciał anti-IMC-1C11 wstrzymano dalsze prace nad tym lekiem [44].

Lepsze efekty otrzymano stosując przeciwciała anti-VEGF, takie jak bevacizumab i ranibizumab. Bevacizumab jest mysim humanizowanym przeciwciałem anti-VEGF klasy IgG1, które zostało wprowadzone na rynek pod nazwą Avastin (Genentech). W badaniach przedklinicznych pacjenci wykazywali dobrą tolerancję bevacizumabu. Z głównych działań niepożądanych odnotowano wzrost ryzyka nadciśnienia tętniczego i krwawień oraz proteinurię. Właściwości kliniczne Avastinu oceniano w randomizowanych badaniach klinicznych II fazy, z podwójną ślepą próbą, u pacjentów z rakiem nerki z przerzutami. Podczas tych badań porównywano odpowiedź kliniczną pacjentów, którym podawano bevacizumab w dawce 3 mg/kg masy ciała ( $n = 37$ ) oraz w dawce 10 mg/kg masy ciała ( $n = 39$ ), co 2 tygodnie, z odpowiedzią grupy przyjmującej placebo ( $n = 40$ ). Prawdopodobieństwo uzyskania przez pacjentów, którym podawano większe i mniejsze dawki Avastinu oraz placebo, całkowitego czasu do progresji choroby PFS równego 4 mies. (ang. *progression free survival*) wynosiło, odpowiednio 64%, 39% i 20%, a przy 8 mies. – 30%, 14% i 5%. [68]. W innych badaniach III fazy jako pierwszą linię terapii u 813 pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami zastosowano bevacizumab w dawce 5 mg/kg masy ciała, co 2 tygodnie, w połączeniu z irinotekaniem, 5-fluorouracylem i kwasem folinowym. Połączenie bevacizumabu z kwasem folinowym w porównaniu z samym kwasem folinowym istotnie zwiększało całkowity czas przeżycia pacjentów OC (ang. *overall survival*) (20,3 versus 15,6 miesiąca;  $p = 0,00003$ ), całkowity czas do progresji PFS (10,6 versus 6,2 miesiąca;  $p < 0,00001$ ), poziom odpowiedzi klinicznej (44,8% versus 34,8%;  $p = 0,004$ ) oraz wydłużało czas tej odpowiedzi (10,4 versus 7,1 miesiąca;  $p = 0,001$ ). U pacjentów, którym podawano bevacizumab, zaobserwowano zmniejszenie perfuzji, objętości naczyń oraz gęstości mikronaczyń w obrębie guza nowotworowego [65]. Bevacizumab jest pierwszym związkiem antyangiogennym, który w lutym 2004 roku został zarejestrowany przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Żywienia FDA (ang. *American Food and Drug Administration*) jako lek pierwszego rzutu w zaawansowanym raku jelita grubego z przerzutami [71].

Drugim dużym osiągnięciem terapii antyangiogennej było wprowadzenie na rynek preparatu Lucentis, czyli ranibizumabu (*Novartis Europharm*) w leczeniu wysiękowej postaci zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem AMD (ang. *age-related macular degeneration*). W czerwcu 2006 roku lek został zarejestrowany w USA przez FDA, a w styczniu 2007 przez Europejską Agencję Oceny Produktów Medycznych – EMEA (ang. *European Medicines Agency*) na terenie Unii Europejskiej. AMD powoduje utratę u pacjentów widzenia „na wprost”, która spowodowana

jest tworzeniem się nieprawidłowych naczyń krwionośnych pod plamką żółtą, które mogą przepuszczać płyn i powodować krwawienia prowadzące do utraty wzroku. Uważa się, że główną przyczyną takiego obrazu klinicznego jest zależna od VEGF-A aktywacja receptora VEGFR-2. Ranibizumab jest fragmentem rekombinowanego huma-nizowanego przeciwciała monoklonalnego klasy IgG1 $\kappa$ , skierowanym przeciwko VEGF-A. Z dużym powinowactwem wiąże się z izoformami VEGF-A głównie VEGF-A<sub>110</sub>, VEGF-A<sub>121</sub> i VEGF-A<sub>165</sub>. Bezpieczeństwo stosowania i skuteczność Lucentisu oceniano w trzech randomizowanych badaniach z podwójną ślepą próbą, tj. MARINA (FVF2598g) (n = 716), ANCHOR (FVF2587g) (n = 423) oraz PIER (FVF3192g) (n = 184). W badaniu MARINA pacjenci otrzymywali 0,3 mg (n = 238) lub 0,5 mg (n = 240) Lucentisu w postaci iniekcji do ciała szklanego, co miesiąc, przez okres 2 lat. W badaniu ANCHOR Lucentis porównywano z leczeniem fotodynamicznym PDT (ang. *photodynamic therapy*) z zastosowaniem werteporfiny. Głównym kryterium oceny skuteczności leku była zmiana wzroku w oku objętym procesem chorobowym po roku leczenia, przy użyciu standardowej tablicy do badania oczu. W obu opisywanych badaniach, pierwszorzędnym punktem końcowym był odsetek pacjentów, którzy zachowali zdolność widzenia, określony jako utrata mniej niż 15 liter w badaniu ostrości wzroku po 12 miesiącach w porównaniu ze stanem wyjściowym. Lepsze efekty otrzymano przy dawce 0,5 mg. Niemal wszyscy pacjenci z grupy produktu Lucentis (około 95%) zachowali ostrość wzroku. U 34–40% pacjentów leczonych produktem Lucentis wystąpiła klinicznie istotna poprawa widzenia. Na podstawie farmakokinetyki populacji i eliminacji ranibizumabu z surowicy pacjentów leczonych dawką 0,5 mg oceniono, że średni okres półtrwania ranibizumabu w ciele szklanym wynosi około 10 dni, a stężenia maksymalne ( $C_{\max}$ ) były zasadniczo mniejsze od stężeń niezbędnych dla zahamowania biologicznej aktywności VEGF o 50% (11–27 ng/ml, mierzone metodą proliferacji komórek *in vitro*). Do najczęstszych działań niepożądanych podczas leczenia preparatem Lucentis należą: przekrwienie i ból oka, tzw. męty w ciele szklanym, wylewy w obrębie siatkówki, zwiększenie ciśnienia w oku, zapalenie wnętrza gałki oraz ciała szklanego, zaćma, włóknienie podsiatkówkowe, a także ból głowy oraz zwiększenie ogólnoustrojowego ciśnienia krwi [48, 72].

### Peptydy hamujące aktywność VEGFR-2

W ostatnich latach przeszukując peptydowe biblioteki fagowe odkryto kilka białek, które są zdolne do regulacji zależnej od VEGF angiogenezy (tab. 1). Peptydy te mogą współzawodniczyć z VEGF o miejsce wiązania z receptorem VEGFR lub tworzyć nieaktywne kompleksy strukturalne z VEGF. Do pierwszej grupy można zaliczyć peptyd V114, który hamuje proliferację komórek endotelialnych linii HUVEC (ang. *human umbilical vein endothelial cells*) [10], a do drugiej – peptyd V1, który silnie hamuje angiogenezę w rogówce królika, któremu do komory oka implantowano komórki nowotworowe [4]. Hetian i wsp. [16] przeszukując 12-aminokwasowe biblioteki peptydowe odkryli dwa peptydy K237 i F56, które wiążą się z zewnątrzkomórkową domeną VEGFR-2, a nie indukują sygnału

TABELA 1. Peptydy modulujące zależną od szlaku VEGF/VEGFR angiogenezę [7]

Nazwa	Sekwencja aminokwasowa	Źródło pochodzenia	Punkt uchwytu
Antagoniści			
V114	VEPNCDIHVMWEWECFERL-amid	biblioteka fagowa	VEGF
KDR 247–261	RTELNVGIDFNWEYP	analiza sekwencyjna	VEGF
peptyd AR	RRKRRR	biblioteka białkowa	VEGF
V1	ATWLPPR	biblioteka fagowa	KDR
VEGF 125–136	QKRKRKKSRYKS	analiza sekwencyjna	KDR/Flt-1
K237	HTMYHHYQHHL	biblioteka fagowa	KDR
Ciclo-VEGI	Cyklo(®QIMRIKPHQGQHIGE)	syntetyczny peptyd	KDR/Flt-1
SPV5.2	NGYEIEWYSWVTHGMY	biblioteka fagowa	Flt-1
F56	HSDMEWYLLG	biblioteka fagowa	Flt-1
Agoniści			
HIV AT 46–60	SYGRKKRRQRRRAPQ	analiza sekwencyjna	KDR/Flt-1
QK	Ac-KLTWQELYQLKYKGI-amid	syntetyczny peptyd	KDR/Flt-1

angiogenne. Peptyd K237 w 90% hamował podziały komórek HUVEC w badaniach *in vitro* oraz w 70% rozwój ludzkiego raka piersi u myszy zaszczepionych tym nowotworem [16]. Efekt blokowania receptora VEGFR-2 jest uzależniony również od struktury samego peptydu. Zilberberg i wsp. [70] zsyntetyzowali cykliczny peptyd Ciclo-VEGI, który silnie hamował wzrost wewnątrzczaszkowego glejaka u myszy (78% zahamowania wzrostu guza) oraz istotnie wydłużał czas przeżycia myszy w porównaniu z grupą kontrolną. Niektóre z odkrytych peptydów wykazywały działanie angiogenne. Albini i wsp. stwierdzili, że białko HIV-1 TAT aktywuje receptor VEGFR-2. Prawdopodobnie tym można tłumaczyć intensywnie zachodzącą angiogenezę w mięsaku Kaposiego [1].

Jednym z najbardziej obiecujących leków o charakterze peptydowym jest Macugen. Macugen jest nazwą handlową pegaptanibu sodu, który znalazł zastosowanie w leczeniu pacjentów cierpiących na wysiękową postać zwyrodnienia płamki żółtej związanego z wiekiem – AMD. Pegaptanib jest pegylowaną pochodną oligonukleotydową, która specyficznie wiąże izoformę VEGF-A<sub>165</sub>. Powstały kompleks nie jest zdolny do związania się z receptorem VEGFR-1 i 2 oraz NRP-1. Efektem tego jest blokowanie zależnego od VEGF rozwoju nowych naczyń krwionośnych, zmniejszenie ich przepuszczalności i powstawania obrzęków. W obrębie struktury pegaptanibu:



wyróżnia się następujące grupy funkcjonalne:

- [40 kD] – dwa łańcuchy glikolu polietylenowego PEG o masie 20 kD;
- [HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>O] – łącznik wiążący PEG z oligonukleotydem za pomocą wiązania fosfodiesterowego;
- p – reprezentuje ujemnie naładowaną grupę fosfodiesterową zubożoną jonami Na<sup>+</sup>;

- $G_m$ ,  $A_m$ ,  $C_f$ ,  $U_f$  oraz  $A_r$  – oznaczają 2-metoksy, 2-fluoro lub 2-hidroksy pochodne puryn czy pirymidyn.

W badaniach *in vitro* wykazano, że pegaptanib nie wiąże się z izoformą VEGF- $A_{121}$  oraz VEGF-B, VEGF-C i PlGF. Oprócz VEGF- $A_{165}$  wiąże się także z mysią VEGF- $A_{188}$ . Bezpieczeństwo stosowania Macugenu oceniano podczas badań klinicznych rozpoczętych w 1999 roku (badanie NX109-01) ( $n = 15$ ), a następnie kontynuowanych w 2000 (badania EOP1000 i EOP1001) ( $n = 21$ ), 2001 (badania EOP1003 i EOP1004) ( $n = 1190$ ) i 2003 roku (badanie EOP1006) ( $n = 147$ ). Macugen podawany był w trzech dawkach 0,3 mg, 1 mg i 3 mg w formie iniekcji do gałki ocznej, co 6 tygodni przez okres 13 miesięcy. Okazało się, że zwiększanie dawki nie miało istotnego wpływu na efekt terapeutyczny. Podstawą oceny skuteczności leku był odsetek pacjentów, u których zaobserwowano utratę mniej niż 15 liter w badaniu ostrości wzroku. W badaniach EOP1003 dla dawki 0,3 mg uzyskano 73% w porównaniu z 59% dla grupy przyjmującej placebo ( $p = 0,0105$ ). Podobne wyniki dla tej samej dawki otrzymano w badaniu EOP1004, tj. 67% w porównaniu z 52% dla grupy przyjmującej placebo ( $p = 0,0031$ ). Do najważniejszych działań niepożądanych, w grupie pacjentów przyjmujących Macugen, należały bóle oka, męty w ciele szklistym, punktikowate zapalenie rogówki, zaćma, zmniejszenie ostrości widzenia, a także krwawienia, odklejanie się siatkówki i utarta wzroku. 31 stycznia 2006 EMEA przyznała firmie Pfizer pozwolenie na dopuszczenie pegaptanibu sodu do obrotu [73].

#### Niskocząsteczkowe inhibitory kinaz tyrozynowych receptorów VEGFR

Od wielu lat prowadzone są również badania nad swoistymi niskocząsteczkowymi inhibitorami kinaz tyrozynowych – TKIs (ang. *small molecule tyrosine kinase inhibitors*), które blokują transdukcję sygnału mitogennego indukowanego przez VEGF (tab. 2). Jednym z pierwszych syntetycznych TKIs był związek o symbolu PTK787 (ZK222584), o nazwie handlowej vatalanib (Novartis/Schering). Inhibitor ten charakteryzuje się wysokim powinowactwem do ludzkiego VEGFR-2, natomiast w niewielkim stopniu hamuje aktywność VEGFR-1. Tylko w bardzo wysokich w porównaniu z dawkami dla VEGFR-2 dawkach PTK787 hamuje także aktywność innych kinaz klasy III (m.in. PDGFR- $\beta$ , c-Kit, c-Fms). Kinazy tyrozynowe innych klas (m.in. EGFR, c-Abl, c-Src, Cdc2, PKC- $\alpha$ ) są niewrażliwe na działanie tego inhibitora. PTK787 przetestowano między innymi w raku naskórka, nowotworach okrężnicy, prostaty i tarczycy [66]. Bezpieczeństwo jego stosowania, parametry farmakokinetyczne i farmakodynamiczne oraz biodostępność oceniano podczas I fazy badań klinicznych w zaawansowanych nowotworach charakteryzujących się nadekspresją VEGF i jego receptorów: raku jelita grubego, nerki, prostaty piersi oraz w glejaku wielopostaciowym [34]. Po podaniu doustnie jednorazowej dawki 1000 mg vatalanib szybko się wchłaniał z przewodu pokarmowego, stężenie maksymalne odnotowano po 1,5 h, a  $t_{0,5}$  wahało się w granicach 3–6 h [8]. Obiecujące efekty kliniczne zaobserwowano u pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami MCRC (ang. *metastatic colorectal cancer*), u których podawany był raz dziennie w terapii

TABELA 2. Wyniki leczenia, działania niepożądane oraz faza badań klinicznych inhibitorów kinaz tyrozynowych

Schemat leczenia	Faza	Nowotwór	Droga podania i liczba pacjent.	Wyniki leczenia	Działania niepożądane
FOLFOX-4± vatalanib	III	CRC (1. linia terapii)	p.o. 1168	12% redukcja ryzyka progresji choroby (p = 0,118)	nadciśnienie, neutropenia, biegunki, wymioty, neuropatie, zakrzepica żył, zawroty głowy, zator płucny
5-FU/FA ± semaxanib	III	CRC (1. linia terapii)	i.v. 737	negatywny wynik leczenia. W przypadku leczenia semaksanibem OS wynosił 54 tyg., a w grupie kontrol. 73 tyg. (p = 0,24)	biegunki, wymioty, odwodnienie, sepsa
Sunitinib	II	RCC (2. linia terapii)	p.o. 63	RR, 40% (95% CI, 28–53%)	zmęczenie, nudności, biegunki, zapalenie w obrębie jamy ustnej
Sunitinib	III	GIST (2. linia terapii)	p.o. 312	dłuższy PFS (HR, 0,335; p = 0,00001) i OS (HR, 0,491; p = 0,00674)	zmęczenie, biegunka, opryszczkowe zapalenie jamy ustnej, odbarwienia skóry, nadciśnienie
Sorafenib	III	RCC (2. linia terapii)	p.o. 769	dłuższy PFS (24 tvs. 12 tyg. p <0,00001)	pokrzywka, zmęczenie, nadciśnienie
Docetaxel ± ZD6474	II	NSCLC (2. linia terapii)	p.o. 127	dłuższy TTP przy zastosowaniu dawki 100 mg ZD6474 (HR, 0,635; p = 0,074)	pokrzywka, zmęczenie, nadciśnienie, wydłużenie odcinka QT
AZD2171	I	AST	p.o.	badania trwają	biegunka, zmęczenie, wymioty
AEE788	I	AST, glejaki	p.o.	badania trwają	
SU6668	I	AST	p.o.	badania wstrzymano	zmęczenie, biegunka, nudności, anoreksja
AG-013736	I	AST	p.o.	zaproponowano dawkowanie 5 mg, dwa razy dziennie	nadciśnienie, zmęczenie, biegunka, wymioty, bóle głowy, zapalenie błony śluzowej jamy ustnej, rumień

5-FU – 5-fluorouracyl; CI (*confidence interval*) – przedział ufności; CRC (*colorectal cancer*) – rak jelita grubego; FA (*folinic acid; leucovorin*) – leukoworyna; FOLFOX-4 – schemat leczenia oksaliplatyna, 5-fluorouracyl i leukoworyna; GIST (*gastrointestinal stromal tumor*) – nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego; AST (*advanced solid tumors*) – zaawansowane guzy nowotworowe; HR (*hazard ratio*) – względny współczynnik ryzyka; NSCLC (*non-small cell lung cancer*) – rak niedrobnokomórkowy płuc; OS (*overall survival*) – całkowity czas przeżycia pacjentów; PFS (*progression-free survival*) – całkowity czas do progresji choroby nowotworowej; RCC (*renal cell carcinoma*) – rak nerek; RR (*response rate*) – odsetek odpowiedzi klinicznych; TTP (*time to progression*) – czas do wystąpienia progresji; p – prawdopodobieństwo [34]

kombinowanej z oksaliplatyną, 5-fluorouracylem i kwasem folinowym (schemat FOLFOX-4) lub z irinotekanem, 5-fluorouracylem i kwasem folinowym (schemat FOLFIRI). Dla przykładu w pierwszym badaniu odsetek odpowiedzi klinicznych wynosił 54% (n = 28), gdzie całkowity czas przeżycia OC (ang. *overall survival*) wynosił 16,6 miesiąca (CI95%; 12,9–21 miesięcy), natomiast całkowity czas do progresji choroby PFS (ang. *progression free survival*) 11 miesięcy (CI95%; 6,8–12 miesięcy). Niedawno rozpoczęły się dwa duże, randomizowane badania kliniczne III fazy o nazwie CONFIRM-1 i -2 (ang. *colorectal oral novel therapy or the inhibition of angiogenesis and retarding of metastases*) porównujące skuteczność połączenia vatalanibu + FOLFOX-4 do samego schematu FOLFOX-4 [34].

#### Semaksanib (Semaxanib; SU5416)

Semaksanib jest niskocząsteczkowym lipofilnym związkiem hamującym receptor VEGFR-1 i -2 oraz w niewielkim stopniu PDGF (ang. *platelet derived growth factor*). Nie wpływa na aktywność innych kinaz tyrozynowych (m.in. c-Src, receptora FGF, Met i Abl) oraz serynowo-treoninowych. W badaniach przedklinicznych semaksanib hamował zależną od VEGF proliferację komórek śródbłonna *in vitro* i *in vivo* oraz zwiększał wrażliwość komórek czerniaka mysiej linii B16 oraz komórek glejaka mysiej linii GL261 na promieniowanie [14]. Semaksanib podawany był we wlewie dożylnym w dawce 145 mg/tydzień. W kilku przeprowadzonych badaniach klinicznych II fazy, u pacjentów z mięsakiem, rakiem nerki z przerzutami, czerniakiem oraz z hormonoopornym rakiem prostaty, semaksanib nie wykazywał znaczącego działania przeciwnowotworowego. Obiecujący 31,6% (n = 28) odsetek odpowiedzi klinicznych zaobserwowano u 28 pacjentów w terapii skojarzonej z 5-fluorouracylem i leukoworyną u pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami. Jednak badania III fazy, przeprowadzone na większej grupie osób (n = 737) z powodu licznych działań niepożądanych oraz brakiem wpływu na czas OS, zakończyły się niepowodzeniem (tab. 2) [34].

#### Sunitinib (SU11248, Sutent)

Sunitinib jest nowym związkiem wykazującym działanie antyproliferacyjne oraz antyangiogenne, który hamuje receptory VEGFR, PDGFR i c-Kit. W pierwszej fazie badań klinicznych zastosowano go u pacjentów z rakiem nerek. Podawano go doustnie raz dziennie przez okres 4 tygodni. Taki schemat powtarzano 6 razy z dwutygodniowymi przerwami. Sunitinib dobrze się wchłaniał z przewodu pokarmowego, a jego  $t_{0,5}$  wynosił poniżej 40 godzin [11]. Obiecujące wyniki zaowocowały badaniami II fazy u pacjentów z nowotworami nerek z przerzutami leczonych wcześniej cytokinami, u których nastąpiła dalsza progresja (tab. 2). U 25 (40%) z 63 pacjentów leczonych sunitinibem osiągnięto częściową odpowiedź kliniczną. Mediana czasu do wystąpienia progresji TTP (ang. *median time to progression*) wynosiła 8,7 mies. (95% CI, 5,5–10,7), podczas gdy całkowity czas przeżycia OC 16,4 mies. (95% CI, 10,8 – jeszcze nie ustalono) [35]. Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego, które charakteryzują się nad-

ekspresją receptora VEGFR i c-Kit wydają się być dobrymi kandydatami do leczenia tym lekiem. W styczniu 2006 roku FDA dopuściła sunitinib do leczenia pacjentów z zaawansowanym rakiem nerki i nowotworami podścieliskowymi przewodu pokarmowego, u których terapia cytokinami nie przyniosła efektu oraz u pacjentów z nietolerancją na metanosulfonian imatinibu (Glivec®) [34].

#### Sorafenib (BAY 43-9006)

Sorafenib, pochodna dwuarylowa mocznika, jest nowym specyficznym inhibitorem kinazy raf, ale niektóre badania wskazują, że przy tych samych stężeniach sorafenib hamuje również receptor VEGFR-2 [34]. W badaniach na zwierzętach z przeszczepionym rakiem jelita grubego, piersi oraz niedrobnokomórkowym płuc, którym podawano sorafenib, zaobserwowano znaczące zahamowanie agniogenezy w obrębie guza nowotworowego [64]. W dużych randomizowanych badaniach II fazy sorafenib podawano doustnie w dawce 400 mg dziennie pacjentom z zaawansowanym rakiem nerki ( $n = 202$ ). Po 12 tygodniach leczenia w grupie pacjentów przyjmujących sorafenib ( $n = 32$ ) zaobserwowano 24-tygodniowy PFS w porównaniu z grupą kontrolną przyjmującą placebo ( $n = 33$ ), gdzie czas do progresji PFS wynosił tylko 6 tygodni ( $p = 0,0087$ ) [46]. Z powodu niewielu działań niepożądanych sorafenib zakwalifikowano do III fazy badań nad zaawansowanym rakiem nerki opornym na leczenie cytokinami. Podczas tych badań PFS był dwa razy dłuższy w porównaniu z kontrolą i wynosił 24 tygodnie ( $p < 0,00001$ ) [9] (tab. 2). Sorafenib próbuje się stosować także w innych typach nowotworów, tj. w raku wątrobowokomórkowym, czerniaku z przerzutami czy raku niedrobnokomórkowym płuc oraz w terapii skojarzonej z irinotekanem, dekarbazyną czy gefitinibem [34].

#### ZD6474

ZD6474 jest pochodną chinazoliny, która silnie hamuje domeny kinazy tyrozynowej receptorów VEGFR-2, EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) oraz kinazy RET. W pierwszej fazie badań klinicznych ZD6474 charakteryzował się dobrą tolerancją i dużą biodostępnością. Podawano go pacjentom z zaawansowanymi guzami nowotworowymi w dawce 100–300 mg raz dziennie. Dwa duże randomizowane badania II fazy oceniały aktywność przeciwnowotworową ZD6474 w połączeniu z innymi chemioterapeutykami. W pierwszym badaniu pacjenci otrzymywali ZD6474 w dawce od 100–300 mg dziennie lub placebo oraz docetaksel (75 mg/m<sup>2</sup> co 3 tygodnie). Mediana czasu do wystąpienia progresji TTP w grupie przyjmującej 100 lub 300 mg ZD6474 i docetaksel była podobna i wynosiła odpowiednio 18,7 i 17 tygodni, natomiast w grupie przyjmującej sam docetaksel – 12 tygodni. W drugim badaniu ZD6474 stosowano wraz z karboplatiną (AUC 6 mg/ml×min) i paklitaksem (200 mg/m<sup>2</sup>) u pacjentów z rakiem niedrobnokomórkowym płuc. Obiektywną odpowiedź kliniczną zaobserwowano u 7 z 18 pacjentów. Działania niepożądane typu pokrzywka, ogólne zmęczenie, biegunka oraz wydłużenie odcinka QT obserwowano raczej przy dawkach większych niż 500 mg dziennie [34].

### Inne inhibitory kinazy tyrozynowej

Postęp w badaniach nad mechanizmami transdukcji sygnału w komórce przyczynia się do odkrywania coraz to nowych inhibitorów kinaz tyrozynowych. Większość z nich testuje się jeszcze na modelach zwierzęcych, ale są i takie, które wkroczyły w etap I fazy badań klinicznych. Należą do nich SU6668 [67], który jest inhibitorem receptorów VEGFR-2, bFGFR i PDGFR oraz AEE788 i AZD2171 (tab. 2). SU6668 stosowano w leczeniu guzów nowotworowych opornych na konwencjonalne leczenie, jednak z powodu licznych działań niepożądanych dalsze badania zostały wstrzymane, natomiast badania nad AEE788 i AZD2171 dalej trwają [34]. Innym związkiem jest AG-013736, który jest potencjalnym inhibitorem receptorów VEGFR, PDGFR i c-Kit. W I fazie badań klinicznych podawano go pacjentom w dawce 5 mg dwa razy dziennie. Działanie niepożądane obserwowano głównie przy podawaniu większych dawek. Zadowalające wyniki terapii pozwoliły na zakwalifikowanie go do II fazy badań (tab. 2) [49].

## IMMUNOTERAPIA

To oryginalne rozwiązanie terapeutyczne polega na swoistym niszczeniu naczyń okołonowotworowych przez limfocyty T (CD8<sup>+</sup>). Wykorzystuje się tu gen kodujący VEGFR-2 jako swoisty antygen, który dostarczany jest do organizmu biorcy w formie doustnej szczepionki bakteryjnej. Szczepionkę tworzą atenuowane bakterie *Salmonella typhimurium* transformowane ekspresyjnym plazmidem zawierającym gen VEGFR-2. W organizmie biorcy, w makrofagach i komórkach dendrytycznych, dochodzi do ekspresji genu i syntezy swoistych peptydów, które są następnie prezentowane z udziałem cząsteczek klasy MHC I limfocytom T cytotoksycznych (CD8<sup>+</sup>). Oprócz odpowiedzi komórkowej, aktywacji ulega również odpowiedź humoralna (aktywacja limfocytów Th2 CD4<sup>+</sup>). Zastosowanie takiej szczepionki prowadziło do eliminacji proliferujących komórek śródbłonkowych naczyń, które mają na swojej powierzchni receptor VEGF-2. Efektem badań przedklinicznych na mysich nowotworach: czerniaku czy raku okrężnicy było zahamowanie rozwoju tych guzów, przy czym szczepionka nie miała wpływu na płodność czy hematopoezę, upośledzała jedynie proces gojenia się ran u badanych zwierząt [39].

## OLIGONUKLEOTYDY HAMUJĄCE EKSPRESJĘ GENU VEGFR

W terapii antyangiogennej próbowano również wykorzystać oligonukleotydy hamujące ekspresję kluczowych genów biorących udział w angiogenezie. Wykorzystano do tego celu dwa rodzaje oligonukleotydów: oligonukleotydy antysensowne oraz rybozomy. Antysensy to oligonukleotydy o długości 20–30 pz, których sekwencja jest komplementarna do mRNA lub sekwencji kodujących gen. Hybrydując z mRNA oligonukleotydy blokują dostęp do rybosomów, zaburzają składanie

pre-mRNA lub inicjują jego degradację. Jednymi z najintensywniej badanych oligonukleotydów są małe cząsteczki RNA o długości 20–25 nukleotydów, nazywane siRNA (ang. *small interfering RNA*). Po wnikięciu do komórki jedna z nici siRNA aktywuje rybonukleinoproteinowy kompleks zwany RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), który rozpoznaje komplementarną sekwencję w obrębie docelowego mRNA. W wyniku endonukleolitycznej degradacji mRNA przez kompleks RISC translacja mRNA zostaje zablokowana [19].

Do drugiej opisywanej grupy oligonukleotydów należą rybozymy. Są to katalityczne cząsteczki RNA zdolne do specyficznego rozpoznawania i fragmentacji docelowego mRNA. Oligonukleotydy antysensowne, siRNA i rybozymy znalazły zastosowanie w wyciszaniu ekspresji genów kodujących receptory VEGFR-1 i -2 w terapii antyangiogennej nowotworów. U myszy leczonych antysensownymi oligonukleotydami, skierowanymi przeciwko mRNA VEGFR-1 oraz VEGFR-2, zaobserwowano zahamowanie rozwoju unaczynienia [31]. Zadowalające efekty badań na zwierzętach pozwoliły rozpocząć badania kliniczne I/II fazy ( $n = 28$ ), podczas których rybozym podawany był podskórnie. Terapia z użyciem rybozymów znacznie ograniczyła powstawanie unaczynienia, hamowała rozwój guza oraz redukowałą liczbę tworzonych przerzutów [61].

## TERAPIA PRZECIWNACZYNIOWA

Terapia przeciwnaczyniowa wykorzystuje fakt, że komórki śródbłonkowe naczyń okołonowotworowych w porównaniu z komórkami śródbłonkowymi naczyń prawidłowych charakteryzują się zwiększoną ilością receptora VEGFR-2. Stwarza to duże możliwości celowanego hamowania angiogenezy zależnej od receptora VEGFR-2. W terapii tej wykorzystuje się tzw. leki dwudomenowe (białka fuzyjne). Jedna z domen, tzw. kognitywna, swoiście rozpoznaje komórki docelowe, np. VEGFR, a druga, tzw. efektorowa, to najczęściej fragment toksyny, która indukuje w komórkach docelowych apoptozę. Warunkiem prawidłowego działania leku jest jego internalizacja przez komórki docelowe [19]. Do chwili obecnej, w badaniach przedklinicznych wykazano przeciwnaczyniowe właściwości kilku tego typu połączeń, w których domeną kognitywną był VEGF-A<sub>121</sub>, a efektorową toksyna dyferytu [63], geloniny [58] czy granzym B [29]. Białko VEGF-A<sub>121</sub> sprzęgnięte z toksyną dyferytu charakteryzowało się wysoką toksycznością zarówno dla proliferujących komórek śródbłonkowych, jak i dla komórek nowotworowych mięsaka Kaposiego [63]. Konstrukcja z gleoniną VEGF-A<sub>121</sub>/rGel wykazywał zahamowanie wzrostu guzów raka prostaty i czerniaka [58]. Co ciekawe uszkodzenie naczyń okołonowotworowych u myszy z ludzkim rakiem prostaty (PC-3) obserwowano już po 48 godz. od momentu podania VEGF-A<sub>121</sub>/rGel, przy czym nie zaobserwowano zmian morfologicznych w innych narządach myszy. Białko fuzyjne VEGF-A<sub>121</sub>/Granzym B indukowało apoptozę przez zwiększenie uwalniania cytochromu c z mitochondrium do cytoplazmy, aktywację kaspaz 3 i 8 oraz

fragmentację polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP) (ang. *poly ADP-ribose polymerase*) naprawiającej uszkodzenia DNA [29].

#### Inne związki hamujące szlak VEGF/VEGFR

Badania nad mechanizmami angiogenezy oraz efekty terapeutyczne związane z jej hamowaniem stały się punktem wyjścia do poszukiwania coraz to nowych substancji wykazujących właściwości antyangiogenne. Można zaliczyć tu substancje pochodzenia zwierzęcego (alpidyna, squalamina), roślinnego (TNP-470) czy nawet niektóre leki, które w ostatnich latach „wracają do łask”, np. talidomid.

##### Aplidyna

Aplidyna jest cyklodepsyptydem wyizolowanym z osłonic (*Tunicata*), który zmniejsza ekspresję receptora VEGFR-1 oraz hamuje sekrecję VEGF-A, zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G<sub>1</sub>. Aplidyna charakteryzowała się pozytywnym indeksem terapeutycznym w I fazie badań klinicznych. Obecnie trwają badania II fazy [55].

##### Neovastat (AE-941)

Neovastat hamuje zależną od VEGFR angiogenezę oraz aktywność metaloproteinaz MMP-2, 9 i 12. Zwiększa również aktywność tkankowego aktywatora plazminogenu. Neovastat indukuje apoptozę w komórkach śródbłonna. Przeciwnowotworowe działanie Neovastatu badano *in vivo* na różnych modelach zwierzęcych. Podany doustnie hamował, zależnie od podanej dawki, wzrost mysich komórek gruczolakoraka linii DA3. W II fazie badań klinicznych Neovastat podawano grupie 144 pacjentów z różnymi typami nowotworów, dwa razy dziennie w dawkach 60 lub 240 mg dziennie. Zadowalającą odpowiedź kliniczną zaobserwowano u pacjentów z rakiem nerki. Obecnie trwają badania III fazy nad tym nowotworem [3].

##### Squalamina (MSI-1256F)

Squalamina jest naturalnym steroidem, otrzymywanym z wątroby rekina, o aktywności antyangiogennej. Zmniejsza wzrost guzów nowotworowych, poprzez hamowanie aktywacji kinazy MAPK zależnej od VEGF-A. Najlepsze efekty otrzymano stosując squalaminę razem z innymi chemioterapeutykami, tj. cisplatyną, paklitakselem, cyklofosfamidem czy genisteiną, a także w połączeniu z radioterapią. Związek ten charakteryzuje się małą toksycznością i jest dobrze tolerowany przez pacjentów. Obecnie trwają badania I i II fazy [42].

##### Talidomid (*thalidomide*)

Talidomid jako pochodna kwasu glutaminowego został odkryty w 1954 roku i wprowadzony na rynek jako lek uspokajający. Szybko jednak został wycofany z obrotu z powodu działania teratogennego oraz licznych doniesień o fkomelii. Później został zarejestrowany przez FDA jako lek przeciwtrądowy, a obecnie trwają badania nad przeciwnowotworowym działaniem talidomidu w szpiczaku mnogim, raku nerki, prostaty i gruczolaku wątrobowokomórkowym. Mechanizm działania przeciwnowotworowego nie jest do końca poznany. Prawdopodobnie

związany jest z zahamowaniem aktywności cytokin (między innymi IL-6, TNF, IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-8 oraz GM-CSF) oraz hamowaniem angiogenezy zależnej od FGF-2 i VEGF-A [57].

#### TNP-470

TNP-470 jest syntetycznym analogiem fumagiliny pochodzącej z *Aspergillus fumigatus*. Jest mniej toksyczna od samej fumagiliny. Hamuje angiogenezę *in vitro* oraz *in vivo*. Mechanizm działania polega prawdopodobnie na hamowaniu fosforylacji aminopeptydazy metioninowej 2, a także hamowaniu nadekspresji zależnej od cykliny 2 kinazy (CDK2) (ang. *cyclin-dependent kinase 2*), VEGF-A i VEGFR-1 i -2. Związek ten charakteryzował się wysoką skutecznością w hamowaniu tworzenia mikroprzerzutów. Niestety zastosowanie TNP-470 jest ograniczone z powodu jego właściwości neurotoksycznych [54, 59].

#### VEGF Trap

VEGF Trap jest białkiem fuzyjnym zbudowanym z zewnątrzkomórkowej domeny ludzkiego receptora VEGFR-1 i VEGFR-2 oraz z fragmentu Fc ludzkiej immunoglobuliny IgG1. Wykazuje duże powinowactwo do VEGF-A, 100 razy większe niż monoklonalne przeciwciała anti-VEGF-A. W pierwszej fazie badań klinicznych białko to podawano podskórną w dawkach 25, 50, 100 i 200 mg/kg masy ciała, 14 pacjentom z guzami nowotworami lub z białaczką, oporną na leczenie. VEGF Trap charakteryzował się długim czasem  $t_{0,5}$  wynoszącym 17 dni. Nie odnotowano żadnych istotnych działań niepożądanych, ani też nie wykryto we krwi przeciwciał anti-VEGF Trap. Z najważniejszych działań niepożądanych zanotowano jedynie proteinurię, zmęczenie i zaparcia, które ustępowały po odstawieniu leku. Stabilizację choroby zaobserwowano u pacjentów z rakiem nerki oraz jelita grubego [54].

## PODSUMOWANIE

U osób dorosłych w stanach fizjologicznych rzadko dochodzi do powstawania nowych naczyń krwionośnych. Aktywacja angiogenezy jest w większości przypadków efektem toczących się procesów chorobowych, do których można zaliczyć tworzenie się naczynek, malformacji tętniczo-żylnych czy blaszki miażdżycowej. Towarzyszy również chorobom oczu (retinopatie proliferacyjne, jaskra naczyniowa), chorobom stawów, takim jak reumatoidalne zapalenie stawów, chorobom skóry, np. łuszczycy i również procesowi nowotworowemu. Tylko w niewielu przypadkach angiogeneza jest procesem pożądanym, tj. związanym z poprawą stanu zdrowia pacjenta. Mówimy wtedy o tzw. fizjologicznej angiogenezie, którą obserwujemy podczas gojenia się ran, w cyklu włosowym, w przeroście mięśni u sportowców oraz w cyklu płciowym kobiety (tworzenie się ciała żółtego, doczesnej czy łożyska) [69].

W ciągu ostatnich kilkunastu lat przedmiotem badań klinicznych stało się wiele grup związków hamujących proces angiogenezy na różnych poziomach. Ich efektem była rejestracja bevacizumabu jako leku pierwszego rzutu w zaawansowanym raku jelita grubego z przerzutami, ranibizumabu oraz Macugenu w leczeniu wysiękowej

postaci zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem – AMD czy sunitinibu w leczeniu pacjentów z zaawansowanym rakiem nerki i nowotworami podścieliskowymi przewodu pokarmowego. Należy jednak pamiętać, że ingerencja w procesy angiogenezy niesie ze sobą wiele niebezpieczeństw. Efektem zahamowania angiogenezy jest np. zaburzenie procesu gojenia się ran, cyklu włosowego oraz tworzenia się ciała żółtego, doczesnej i łożyska. Można mieć nadzieję, że dalsza kontynuacja badań pozwoli na pełne poznanie roli białek regulujących proces angiogenezy, a to pozwoli na opracowanie bardziej skutecznej i bezpiecznej terapii antyangiogennej.

## LITERATURA

- [1] ALBINI A, SOLDI R, GIUNCIUGLIO D, GIRAUDO E, BENELLI R, PRIMO L, NOONAN D, SALIO M, CAMUSSI G, ROCKL W, BUSSOLINO F. The angiogenesis induced by HIV-1 TAT protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med* 1996; **2**: 1371–1375.
- [2] BAE MK, AHN MY, JEONG JW, BAE MH, LEE YM, BAE SK, PARK JW, KIM KR, KIM KW. Jab1 interacts directly with HIF-1 $\alpha$  and regulates its stability. *J Biol Chem* 2002; **277**: 9–12.
- [3] BATIST G, PATENAUE F, CHAMPAGNE P, CROTEAU D, LEVINTON C, HARITON C, ESCUDIER B, DUPONT E. Neovastat (AE-941) in refractory renal cell carcinoma patients: report of a phase II trial with two dose levels. *Ann Oncol* 2002; **13**: 1259–1263.
- [4] BINETRUY-TOURNAIRE R, DEMANGEL C, MALAUAUD B, VASSY R, ROUYRE S, KRAEMER M, PLOUET J, DERBIN C, PERRET G, MAZIE JC. Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO* 2000; **19**: 1525–1533.
- [5] BLANCHER C, HARRIS AL. The signaling basis of hypoxia response pathway: Tumor hypoxia as a therapy target. *Cancer Metastasis Rev* 1998; **17**: 187–194.
- [6] CLAFFEY KP, ABRAMS K, SHIH SC, BROWN LF, MULLEN A, KEOUGH M. Fibroblast growth factor 2 activation of stromal cell vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Lab Invest* 2001; **81**: 61–75.
- [7] D'ANDREA LD, DEL GATTO A, PEDONE C, BENEDETTI E. Peptide-based molecules in angiogenesis. *Chem Biol Drug Des* 2006; **67**: 115–126.
- [8] DREVS J, ZIRRGIEBEL U, SCHMIDT-GERSBACH CI, MROSS K, MEDINGER M, LEE L, PINHEIRO J, WOOD J, THOMAS AL, UNGER C, HENRY A, STEWARD WP, LAURENT D, LEBWOHL D, DUGAN M, MARME D. Soluble markers for the assessment of biological activity with PTK787/ZK 222584 (PTK/ZK), a vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced colorectal cancer from two phase I trials. *Ann Oncol* 2005; **16**: 558–565.
- [9] ESCUDIER B, EISEN T, STADLER WM, SZCZYLIK C, OUDARD S, SIEBELS M, NEGRIER S, CHEVREAU C, SOLSKA E, DESAI AA, ROLLAND F, DEMKOW T, HUTSON TE, GORE M, FREEMAN S, SCHWARTZ B, SHAN M, SIMANTOV R, BUKOWSKI RM. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; **356**: 125–134.
- [10] FAIRBROTHER WJ, CHRISTINGER HW, COCHRAN AG, FUH G, KEENAN CJ, QUAN C, SHRIVER SK, TOM JY, WELLS JA, CUNNINGHAM BC. Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site. *Biochemistry* 1998; **37**: 17754–17764.
- [11] FAIVRE S, DELBALDO C, VERA K, ROBERT C, LOZAHIC S, LASSAU N, BELLO C, DEPRIMO S, BREGA N, MASSIMINI G, ARMAND JP, SCIGALLA P, RAYMOND E. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 25–35.
- [12] FERRARA N, HENZEL WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **161**: 851–858.
- [13] FERRARA N. Molecular and biological properties of Vascular Endothelial Growth Factor. *J Mol Med* 1999; **77**: 527–543.

- [14] FONG TA, SHAWVER LK, SUN L, TANG C, APP H, POWELL TJ, KIM YH, SCHRECK R, WANG X, RISAU W, ULLRICH A, HIRTH KP, MCMAHON G. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 1999; **59**: 99–106.
- [15] GLUZMAN-POLTORAK Z, COHEN T, SHIBUYA M, NEUFELD G. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Neuropilin-2 Form Complexes. *J Biol Chem* 2001; **276**: 18688–18694.
- [16] HETIAN L, PING A, SHUMEI S, XIAOYING L, LUOWEN H, JIAN W, LIN M, MEISHENG L, JUNSHAN Y, CHENGCHAO S. A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor. *J Biol Chem* 2002; **277**: 43137–43142.
- [17] HIDERO K, WEISZ A, KURASHIMA Y, HASHIMOTO K, OGURA T, D'ACQUISTO F, ADDEO R, MAKUUCHI M, ESUMI H. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediated transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 2000; **95**: 189–197.
- [18] HUANG SP, WU MS, SHUN CT, WANG HP, LIN MT, KUO ML, LIN JT. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci* 2004; **11**: 517–527.
- [19] HUCZ J, SZALA S. Receptor VEGFR-2 – cel terapii kierowanej w chorobach nowotworowych. *Współczesna Onkologia* 2006; **10**: 506–514.
- [20] JINGJING L, XUE Y, AGARWAL N, ROQUE RS. Human Muller cells express VEGF 183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; **40**: 752–759.
- [21] JOŠKO J, GWÓZDŹ B, JĘDRZEJOWSKA-SZYPULKA H, HENDRYK S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* 2000; **6**: 1047–1052.
- [22] KARKKAINEN MJ, PETROVA TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 2000; **19**: 5598–5603.
- [23] KECK PJ, HAUSER SD, KRIVI G, SANZO K, WARREN T, FEDER J, CONNOLLY DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; **246**: 1309–1312.
- [24] KNIGHT LE, WARNER JA, MAXWELL A, PRIGENT AS. Chimeric VEGFRs are activated by a small-molecule dimerizer and mediate downstream signaling cascades in endothelial cells. *Oncogene* 2000; **19**: 5398–5405.
- [25] KOEHNE P, WILLAM C, STRAUSS E, SCHINDLER R, KAI-UWE ECKARDT, BÜHRER C. Lack of hypoxic stimulation of VEGF secretion from neutrophils and platelets. *Am J Physiol* 2000; **279**: H817–H824.
- [26] LANGE T, GUTTMANN-RAVIV N, BARUCH L, MACHLUF M, NEUFELD G. VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J Biol Chem* 2003; **278**: 17164–17169.
- [27] LEUNG DW, CACHIANES G, KUANG WJ, GOEDEL DV, FERRARA N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; **246**: 1306–1309.
- [28] LEVY AP, LEVY NS, WEGNER S, GOLDBERG MA. Transcriptional Regulation of the Rat Vascular Endothelial Growth Factor Gene by Hypoxia. *JBC* 1995; **270**: 13333–13340.
- [29] LIU Y, CHEUNG LH, THORPE P, ROSENBLUM MG. Mechanistic studies of a novel human fusion toxin composed of vascular endothelial growth factor (VEGF)<sub>121</sub> and the serine protease granzyme B: directed apoptotic events in vascular endothelial cells. *Mol Cancer Ther* 2003; **2**: 949–959.
- [30] LUO JC, SHIBUYA M. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factor (1a, 2a, 3a). *Oncogene* 2001; **20**: 1435–1444.
- [31] MARCHAND GS, NOISEUX N, TANGUAY JF, SIROIS MG. Blockade of *in vivo* VEGF-mediated angiogenesis by antisense gene therapy: role of Flk-1 and Flt-1 receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **282**: H194–204.
- [32] MAYO LD, KESSLER KM, PINCHEIRA R, WARREN RS, DONNER DB. Vascular Endothelial Cell Growth Factor Activates CRE-binding Protein by Signaling through the KDR Receptor Tyrosine Kinase. *J Biol Chem* 2001; **276**: 25184–25189.
- [33] MITTERMAYER F, PLEINER J, SCHALLER G, WELTERMANN A, KAPIOTIS S, JILMA B, WOLZT M. Marked increase in vascular endothelial growth factor concentrations during *Escherichia coli* endotoxin-induced acute inflammation in humans. *Eur J Clin Invest* 2003; **33**: 758–761.
- [34] MORABITO A, DE MAIO E, DI MAIO M, NORMANNO N, PERRONE F. Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. *Oncologist* 2006; **11**: 753–764.
- [35] MOTZER RJ, MICHAELSON MD, REDMAN BG, HUDES GR, WILDING G, FIGLIN RA, GINSBERG MS, KIM ST, BAUM CM, DEPRIMO SE, LI JZ, BELLO CL, THEUER CP, GEORGE DJ, RINI BI. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 16–24.

- [36] MUELLER MD, VIGNE JEAN-LOUIS, MINCHENK A, LEBOVIC DI, LEITMAN DC, TAYLOR RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 10972–10977.
- [37] NAKAMURA M, ABE Y, TOKUNAGA T. Pathological significance of vascular endothelial growth factor A isoform expression in human cancer. *Pathol Int* 2002; **52**: 331–339.
- [38] NEUFELD G, COHEN T, GENGRINOVITCH S, POLTORAK Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor. *FASEB J* 1999; **13**: 9–22.
- [39] NIETHAMMER AG, XIANG R, BECKER JC, WODRICH H, PERTL U, KARSTEN G, ELICEIRI BP, REISFELD RA. A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nat Med* 2002; **8**: 1369–1375.
- [40] NÖR JE, CHRISTENSEN J, MOONEY DJ, POLVERINI PJ. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Mediated Angiogenesis Is Associated with Enhanced Endothelial Cell Survival and Induction of Bcl-2 Expression. *Am J Pathol* 1999; **154**: 375–384.
- [41] PETROVA VT, MAKINEN T, ALITALO K. Signaling via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Exp Cell Res* 1999; **253**: 117–130.
- [42] PIETRAS RJ, WEINBERG OK. Antiangiogenic Steroids in Human Cancer Therapy. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005; **2**: 49–57.
- [43] POLTORAK Z, COHEN T, SIVAN R, KANDELIS Y, SPIRA G, VLODAVSKY I, KESHET EI, NEUFELD G. VEGF<sub>145</sub>, a secreted Vascular Endothelial Growth Factor signals that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997; **272**: 7151–7158.
- [44] POSEY JA, NG TC, YANG B, KHAZAEI MB, CARPENTER MD, FOX F, NEEDLE M, WAKSAL H, LOBUGLIO AF. A phase I study of anti-kinase insert domain-containing receptor antibody, IMC-1C11, in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 1323–1332.
- [45] PREWETT M, HUBER, LI Y, SANTIAGO A, O'CONNOR W, KING K, OVERHOLSER J, HOOPER A, PYTOWSKI B, WITTE L, BOHLEN P, HICKLIN DJ. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res* 1999; **59**: 5209–5218.
- [46] RATAIN MJ, EISEN T, STADLER WM, FLAHERTY KT, KAYE SB, ROSNER GL, GORE M, DESAI AA, PATNAIK A, XIONG HQ, ROWINSKY E, ABBRUZZESE JL, XIA C, SIMANTOV R, SCHWARTZ B, O'DWYER PJ. Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 2505–2512.
- [47] RICHARD DE, VOURET-CRAVIARI V, POUYSSÉGUR J. Angiogenesis and G-protein-coupled receptors : signals that bridge the gap. *Oncogene* 2001; **20**: 1556–1562.
- [48] ROSENFELD PJ, BROWN DM, HEIER JS, BOYER DS, KAISER PK, CHUNG CY, KIM RY. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1419–1431.
- [49] RUGO HS, HERBST RS, LIU G, PARK JW, KIES MS, STEINFELDT HM, PITHAVALA YK, REICH SD, FREDDO JL, WILDING G. Phase I trial of the oral antiangiogenesis agent AG-013736 in patients with advanced solid tumors: pharmacokinetic and clinical results. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 5474–5483.
- [50] SAARISTO A, KARPANEN T, ALITALO K. Mechanism of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene* 2000; **19**: 6122–6129.
- [51] SENGER DR, GALLISJ, DVORAK AM, PERRUZZI CA, HARVEY VS, DVORAK HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; **219**: 983–985.
- [52] SHALABY F, HO J, STANFORD WL, FISCHER KD, SCHUH AC, SCHWARTZ L, BERNSTEIN A, ROSSANT J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997; **89**: 981–990.
- [53] SHEN BQ, LEE DY, CORTOPASSI KM, DAMICO LA, ZIONCHECK TF. Vascular Endothelial Growth Factor KDR Receptor Signaling Potentiates Tumor Necrosis Factor-induced Tissue Factor Expression in Endothelial Cells. *J Biol Chem* 2001; **276**: 5281–5286.
- [54] SORIA JC, FAYETTE J, ARMAND JP. Molecular targeting: targeting angiogenesis in solid tumors. *Ann Oncol* 2004; **15**: 223–227.
- [55] STRAIGHT AM, OAKLEY K, MOORES R, BAUER AJ, PATEL A, TUTTLE RM, JIMENO J, FRANCIS GL. Aplidin reduces growth of anaplastic thyroid cancer xenografts and the expression of several angiogenic genes. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; **57**: 7–14.
- [56] TAKAHASHI H, SHIBUYA M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005; **109**: 227–241.

- [57] VACCA A, SCAVELLI C, MONTEFUSCO V, DI PIETRO G, NERI A, MATTIOLI M, BICCIATO S, NICO B, RIBATTI D, DAMMACCO F, CORRADINI P. Thalidomide downregulates angiogenic genes in bone marrow endothelial cells of patients with active multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 5334–5346.
- [58] VEENENDAAL LM, JIN H, RAN S, CHEUNG L, NAVONE N, MARKS JW, WALTENBERGER J, THORPE P, ROSENBLUM MG. *In vitro* and *in vivo* studies of a VEGF121/rGelolin chimera fusion toxin targeting the neovasculature of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 7866–7871.
- [59] WANG XF, TU LF, WANG LH, ZHOU JY. Inhibition of expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pulmonary adenocarcinoma cell by TNP-470 in combination with gemcitabine. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006; **7**: 837–843.
- [60] WEI MH, POPESCU NC, LERMAN MI, MERRILL MJ, ZIMONJIC DB. Localization of the human vascular endothelial growth factor gene, VEGF, at chromosome 6p12. *Hum Genet* 1996; **97**: 794–779.
- [61] WENG DE, USMAN N. Angiozyme: a novel angiogenesis inhibitor. *Curr Oncol Rep* 2001; **3**: 141–146.
- [62] WHITTLE C, GILLESPIE K, HARRISON R, MATHIESON PW, HARPER SJ. Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant. *Clin Sci (Lond)* 1999; **97**: 303–312.
- [63] WILD R, DHANABAL M, OLSON TA, RAMAKRISHNAN S. Inhibition of angiogenesis and tumour growth by VEGF121-toxin conjugate: differential effect on proliferating endothelial cells. *Br J Cancer* 2000; **83**: 1077–1083.
- [64] WILHELM SM, CARTER C, TANG L, WILKIE D, MCNABOLA A, RONG H, CHEN C, ZHANG X, VINCENT P, MCHUGH M, CAO Y, SHUJATH J, GAWLAK S, EVELEIGH D, ROWLEY B, LIU L, ADNANE L, LYNCH M, AUCLAIR D, TAYLOR I, GEDRICH R, VOZNESENSKY A, RIEDL B, POST LE, BOLLAG G, TRAIL PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; **64**: 7099–70109.
- [65] WILLETT CG, BOUCHER Y, DI TOMASO E, DUDA DG, MUNN LL, TONG RT, CHUNG DC, SAHANI DV, KALVA SP, KOZIN SV, MINO M, COHEN KS, SCADDEN DT, HARTFORD AC, FISCHMAN AJ, CLARK JW, RYAN DP, ZHU AX, BLASZKOWSKY LS, CHEN HX, SHELLITO PC, LAUWERS GY, JAIN RK. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 2004; **10**: 145–147.
- [66] WOOD JM, BOLD G, BUCHDUNGER E, COZENS R, FERRARI S, FREI J, HOFMANN F, MESTAN J, METT H, O'REILLY T, PERSOHN E, ROSEL J, SCHNELL C, STOVER D, THEUER A, TOWBIN H, WENGER F, WOODS-COOK K, MENRAD A, SIEMEISTER G, SCHIRNER M, THIARAUCH KH, SCHNEIDER MR, DREVS J, MARTINY-BARON G, TOTZKE F. PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 2000; **60**: 2178–2189.
- [67] XIONG HQ, HERBST R, FARIA SC, SCHOLZ C, DAVIS D, JACKSON EF, MADDEN T, MCCONKEY D, HICKS M, HESS K, CHARNSANGAVEJ CA, ABBRUZZESE JL. A phase I surrogate endpoint study of SU6668 in patients with solid tumors. *Invest New Drugs* 2004; **22**: 459–466.
- [68] YANG JC, HAWORTH L, SHERRY RM, HWU P, SCHWARTZENTRUBER DJ, TOPALIAN SL, STEINBERG SM, CHEN HX, ROSENBERG SA. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003; **349**: 427–434.
- [69] ZIELONKA TM, DEMKOW U. Angiogeneza w chorobach płuc. *Nowa Medycyna* 1999; **3**: 48–52.
- [70] ZILBERBERG L, SHINKARUK S, LEQUIN O, ROUSSEAU B, HAGEDORN M, COSTA F, CARONZOLO D, BALKE M, CANRON X, CONVERT O, LAIN G, GIONNET K, GONCALVES M, BAYLE M, BELL O. Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor. *J Biol Chem* 2003; **278**: 35564–35573.
- [71] Strona internetowa: <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/avastin/default.htm>
- [72] Strona internetowa: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/lucentis/lucentis.htm>
- [73] Strona internetowa: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/macugen/macugen.htm>

*Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz*

*Otrzymano: 31.08. 2007 r.*

*Przyjęto: 12.09. 2007 r.*

*ul. Narcyzów 1, 41-200 Sosnowiec,*

*agruchlik@slam.katowice.pl*