

Kluczowym czynnikiem w procesie powstawania nowych naczyń okołonowotworowych jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*). Jednym z jego receptorów jest należący do rodziny kinaz tyrozynowych receptor VEGFR-2. Aktywacja tego receptora inicjuje w komórkach śródbłonkowych wiele procesów biochemicznych, które prowadzą do podziałów tych komórek i w konsekwencji do powstania naczyń krwionośnych w guzach nowotworowych. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie różnych rozwiązań terapeutycznych, których molekularnym celem jest receptor VEGFR-2. W fazie badań przedklinicznych i klinicznych znajdują się m.in. przeciwciała anti-VEGFR-2, cykliczne peptydy, dwudomenowe białka, niskocząsteczkowe inhibitory kinaz tyrozynowych oraz oligonukleotydy blokujące ekspresję VEGFR-2. W celach terapeutycznych usiłuje się także wykorzystać odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko naczyniom z tym receptorem.

Słowa kluczowe: receptory VEGF, angiogeneza, terapia antyangiogenna, terapia przeciwnaczyniowa, nowotwór.

Receptor VEGFR-2 – cel terapii kierowanej w chorobach nowotworowych

VEGFR-2 receptor – target for anticancer therapy

Joanna Hucz, Stanisław Szala

Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Wstęp

W 1971 r. Judah Folkman zaproponował hipotezę o wpływie naczyń okołonowotworowych na rozwój nowotworów [1]. Dzięki nowo powstałym naczyniom krwionośnym możliwy jest dopływ tlenu i substancji odżywczych do rozwijającego się guza nowotworowego. Poprzez naczynia krwionośne, komórki nowotworowe przemieszczają się do innych narządów, gdzie mogą tworzyć przerzuty [2]. Kluczową rolę w powstawaniu sieci naczyń okołonowotworowych odgrywa naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF. Za pośrednictwem swoistych receptorów, znajdujących się na powierzchni komórek śródbłonkowych, czynnik VEGF stymuluje powstawanie sieci naczyń, wokół których grupują się komórki nowotworowe. Decydująca rola VEGF w procesie unaczynienia guzów nowotworowych skłoniła badaczy do poszukiwania inhibitorów hamujących działanie VEGF i blokujących aktywność jego receptorów. Celem pracy było przedstawienie roli VEGF i receptora VEGFR-2 w powstawaniu naczyń okołonowotworowych oraz omówienie różnych rozwiązań terapeutycznych, których molekularnym celem jest ten receptor.

Angiogeneza w nowotworach

Istnieje kilka różnych mechanizmów powstawania naczyń w guzach. Jednym z nich jest angiogeneza, czyli tworzenie nowych naczyń krwionośnych z naczyń już istniejących. Fizjologicznie proces ten zachodzi podczas życia płodowego, cyklu owulacyjnego, w trakcie gojenia się ran. Odgrywa ważną rolę w powstawaniu różnego rodzaju stanów chorobowych, takich jak retinopatia cukrzycowa, reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczyca czy powstawanie nowotworów [3]. Angiogeneza jest wieloetapowym procesem, podczas którego dochodzi do istotnych zmian w środowisku otaczającym komórki. Proces ten zależy od lokalnej równowagi pomiędzy czynnikami angiogennymi (m.in. VEGF, FGF-1 i -2, metaloproteaz MMP) a inhibitorami angiogenezy (m.in. angiostatyny, angiopoetyny, kalretikuliny, czy endostatyny) działającymi na komórki śródbłonkowe, macierz pozakomórkową i błonę podstawną. W pierwszym etapie angiogenezy dochodzi do aktywacji proteaz, które rozkładają błonę podstawną naczyń krwionośnych i macierz pozakomórkową oraz do aktywacji czynników proangiogennych, które pobudzają komórki śródbłonkowe do proliferacji i migracji. Nowo powstałe komórki śródbłonka formują struktury tubularne dające początek nowym naczyniom krwionośnym [4]. W końcowym etapie dochodzi do odtworzenia błony podstawnej oddzielającej komórki śródbłonka od składników macierzy pozakomórkowej.

Naczynia okołonowotworowe mogą powstawać także w wyniku podłożnego rozszczepienia istniejących naczyń i proliferacji komórek śródbłonkowych wewnątrz naczynia (tzw. proces wgłobienia) [5], a także w wyniku kooptowania naczyń prawidłowych przez naczynia okołonowotworowe (ang. *vascular cooption*) bądź też przez budowanie naczyń mozaikowych, które tworzone są zarówno z komórek śródbłonkowych, jak i komórek nowotworowych [6, 7].

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent mitogen that plays a key role in the growth and maintenance of vascular endothelial cells as well as in the development of new physiological and tumour blood vessels. Among cell surface receptors responsible for internalizing this growth factor is VEGFR-2, a member of the receptor type tyrosine kinase superfamily. Following VEGF-mediated activation of this receptor in tumour endothelial cells, a series of biochemical events is initiated, leading to division of these cells and, subsequently, to the formation of new tumour blood vessels. This review presents molecular strategies of targeting the VEGFR-2 receptor for therapeutic purposes. Some of these strategies have been attaining preclinical or clinical stage of development, e.g. anti-VEGFR-2 antibodies, cyclic peptides, two-domain peptides, low-molecular-weight tyrosine kinase inhibitors or antisense oligonucleotides blocking VEGFR-2 expression. Attempts have also been made to take advantage of the immune response directed against blood vessels exhibiting this receptor.

Key words: VEGF receptors, angiogenesis, antiangiogenic therapy, antivasular therapy, cancer.

Doniesienia z ostatnich lat wskazują, że waskulogeneza, charakterystyczna dla wczesnego rozwoju zarodkowego, odgrywa również istotną rolę w powstawaniu naczyń okołonowotworowych [8, 9]. Naczynia powstałe z krążących w krwiobiegu prekursorowych komórek śródbłonka EPCs (ang. *endothelial progenitor cells*) mogą stanowić u myszy nawet do 50% wszystkich naczyń okołonowotworowych [10].

Naczynia krwionośne w nowotworach wyraźnie różnią się od naczyń prawidłowych [8, 9]. Posiadają wiele nietypowych rozgałęzień, pętli i połączeń, co często spowalnia przepływ krwi, a ich przepuszczalność powoduje wzrost ciśnienia śródmiąższowego wewnątrz guzów. W naczyniach okołonowotworowych brakuje często perycytów, a błona podstawna ma zmieniony skład chemiczny i luźno przylega do komórek śródbłonkowych. Profil transkrypcyjny komórek śródbłonkowych naczyń okołonowotworowych jest wyraźnie różny od profilu komórek naczyń prawidłowych. Na ich powierzchni występuje wiele charakterystycznych białek, m.in. receptory dla VEGF, integryny $\alpha_v\beta_3$, endogлина (CD105), VCAM-1, białka z rodziny TEM [11]. Charakterystyczne markery mogą także pojawić się w okołonowotworowych perycytach (np. proteoglikan NG-2) oraz w macierzy pozakomórkowej znajdującej się w sąsiedztwie naczyń okołonowotworowych (np. fibronektyna z dodatkową domeną ED-B) [12].

VEGF w angiogenezie nowotworów

Czynniki wzrostu VEGF tworzą dość dobrze poznaną grupę, do której zalicza się VEGF-A, -B, -C, -D, -F, wirusowy orf-VEGF oraz czynnik wzrostu łożyska (PlGF) [13]. Istotną rolę w angiogenezie odgrywa VEGF-A, nazywany w skrócie VEGF lub też VPF (ang. *vascular permeability factor*). Gen dla tej cytokiny na drodze alternatywnego dojrzewania mRNA tworzy 7 różnych izoform (121, 145, 148, 165, 183, 189, 206). Poza tym istnieje także forma VEGF110, która jest wynikiem proteolitycznego rozkładu VEGF165 i VEGF189. Poszczególne postacie różnią się liczbą i składem aminokwasów, co pociąga za sobą różnice we właściwościach biochemicznych i biologicznych [13].

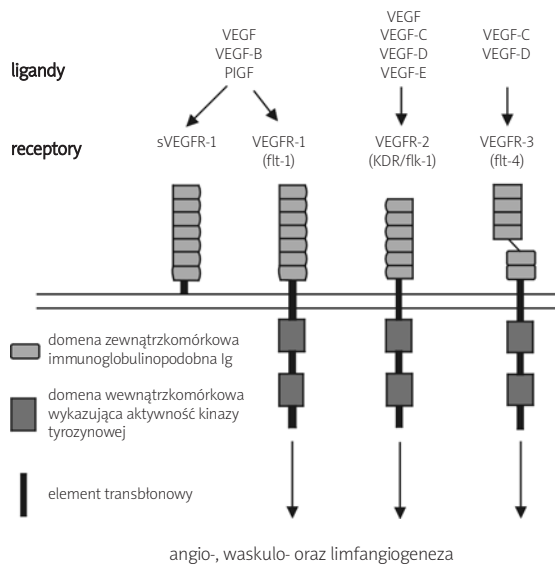
Ekspresja VEGF jest regulowana poprzez wiele mechanizmów. Najważniejszym jest niedotlenowanie (hipoksja). W odpowiedzi na miejscowe zmniejszenie ciśnienia parcjalnego tlenu gwałtownie zwiększa się w komórkach ilość czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α (ang. *hypoxia-inducible factor*). Czynniki HIF-1 α razem z HIF-1 β tworzy aktywny kompleks, który indukuje transkrypcję szeregu genów, w tym m.in. genu VEGF. Czynniki VEGF poprzez pobudzenie receptorów na komórkach śródbłonka, doprowadza do proliferacji i migracji komórek, z których tworzone są nowe naczynia krwionośne [13]. VEGF wpływa także na rozszerzanie naczyń, pośredniczy w sekrecji i aktywacji enzymów biorących udział w degradacji macierzy pozakomórkowej, a poprzez indukcję ekspresji białka antyapoptycznego Bcl-2 osłania komórki śródbłonkowe przed apoptozą [2].

VEGFR

VEGF jest ligandem dla dwóch receptorów: VEGFR-1 (Flt-1) i jego rozpuszczalnej formy sVEGFR1 oraz dla VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Trzeci z receptorów: VEGFR-3 (Flt-4) pośredniczy w przekazywaniu sygnałów limfangiogennych, które doprowadzają do podziału komórek naczyń limfatycznych, a ligandami dla tego receptora są czynniki VEGF-C oraz VEGF-D (ryc. 1) [14].

VEGFR-1

Receptor VEGFR-1, zwany też Flt-1 (ang. *fms-like tyrosine kinase-1*) jest pierwszym zidentyfikowanym receptorem należącym do rodziny RTK. W prawidłowych warunkach fizjologicznych ekspresja VEGFR-1 ma miejsce w komórkach śródbłonkowych i monocytach. U homozygotycznych myszy niedobór VEGFR-1 prowadzi do przerostu naczyń, co powoduje przedwczesną śmierć zarodków myszy już w połowie ciąży [15]. VEGFR-1 wykazuje zdolność wiązania nie tylko z VEGF-A, ale także PlGF i VEGF-B. W wielu różnych nowotworach obserwuje się nadekspresję VEGFR-1 oraz jego ligandów (PlGF i VEGF-B), co może świadczyć o udziale VEGFR-1 w patologicznej angiogenezie [3].



Ryc. 1. Receptory z rodziny kinaz tyrozynowych: VEGFR oraz ich ligandy, wg [14] zmodyfikowane

Fig. 1. Tyrosine kinase superfamily of VEGF receptors, acc. [14] modified

W wyniku alternatywnego składowania transkryptu VEGFR-1 powstaje tzw. rozpuszczalna forma receptora VEGFR-1 (sFlt-1), pozbawiona 6. i 7. domeny immunoglobulinopodobnej oraz domeny śródbłonkowej i wewnętrzkomórkowej kinazy tyrozynowej. Ta specyficzna budowa powoduje, że VEGFR-1, łącząc się z każdą wybraną izoformą VEGF zachowuje się jak czynnik antyangiogeny znoszący efekty działania VEGF [16].

VEGFR-2

VEGFR-2, nazywany u myszy Flk-1 (ang. *fetal liver kinase-1*) lub u ludzi KDR (ang. *kinase domain receptor*) odgrywa kluczową rolę w procesie waskulogenezy w okresie rozwoju embrionalnego oraz angiogenezy u osobników dojrzałych. U mysich embrionów wykazano obecność receptora VEGFR-2 w komórkach śródbłonkowych we wszystkich etapach embriogenezy i organogenezy, poczynając od momentu pojawienia się wyspek krwiotwórczych w pęcherzyku żółtkowym 8,5-dniowego zarodka. Embriony pozbawione receptora VEGFR-2 nie wykształcają naczyń i giną we wczesnym etapie embriogenezy [14]. W prawidłowych warunkach fizjologicznych receptor ten występuje prawie wyłącznie na powierzchni komórek śródbłonkowych i odgrywa decydującą rolę w proliferacji, migracji i różnicowaniu tych komórek [2].

Po przyłączeniu VEGF dochodzi do dimeryzacji receptora, a następnie do autofosforylacji kinazy tyrozynowej, co prowadzi do aktywacji wielu wewnętrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów, w tym m.in. aktywacji szeregu kinaz oraz czynników transkrypcyjnych (fosfolipazy C_γ, kinaz PI3, białek rodziny *scr*, *ras* i innych) (ryc. 2.) [13]. Efektem końcowym zachodzących w komórce mechanizmów jest m.in. proliferacja i migracja komórek śródbłonkowych oraz zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych.

Jednym z najsilniejszych induktorów transkrypcji VEGFR-2, podobnie jak VEGFR-1, jest niedotlenowanie. Mechanizm

indukowanej hipoksją nadekspresji VEGFR-2 jest jednak zupełnie inny niż w przypadku VEGFR-1. Mechanizm indukcji ekspresji VEGFR-1 odbywa się z udziałem czynnika transkrypcyjnego HIF1 α , który wiąże się z promotorem genu VEGFR-1 i indukuje jego transkrypcję. Ekspresja receptora VEGFR-2 indukowana niedotlenieniem jest natomiast efektem mechanizmów na poziomie potranskrypcyjnym, prawdopodobnie związanych z aktywacją innych białek indukowanych hipoksją [17].

Receptor VEGFR-2 ma zdolność oddziaływania nie tylko z VEGF-A, ale także z czynnikami limfangiogennymi VEGF-C i VEGF-D. Cytokiny VEGF-C i VEGF-D ulegają wysokiej ekspresji w wielu ludzkich nowotworach (czerniaku złośliwym, raku płuc, piersi, szyjki macicy, tarczycy, żołądka i odbytu), wpływając nie tylko na ich wzrost, ale również tworzenie przerzutów [18]. O udziale VEGF-D w procesie nowotworzenia świadczą badania przeprowadzone na myszach, u których zaobserwowano zahamowanie wzrostu guza i brak przerzutów po podaniu przeciwciał blokujących oddziaływanie VEGF-D z VEGFR-2 [19].

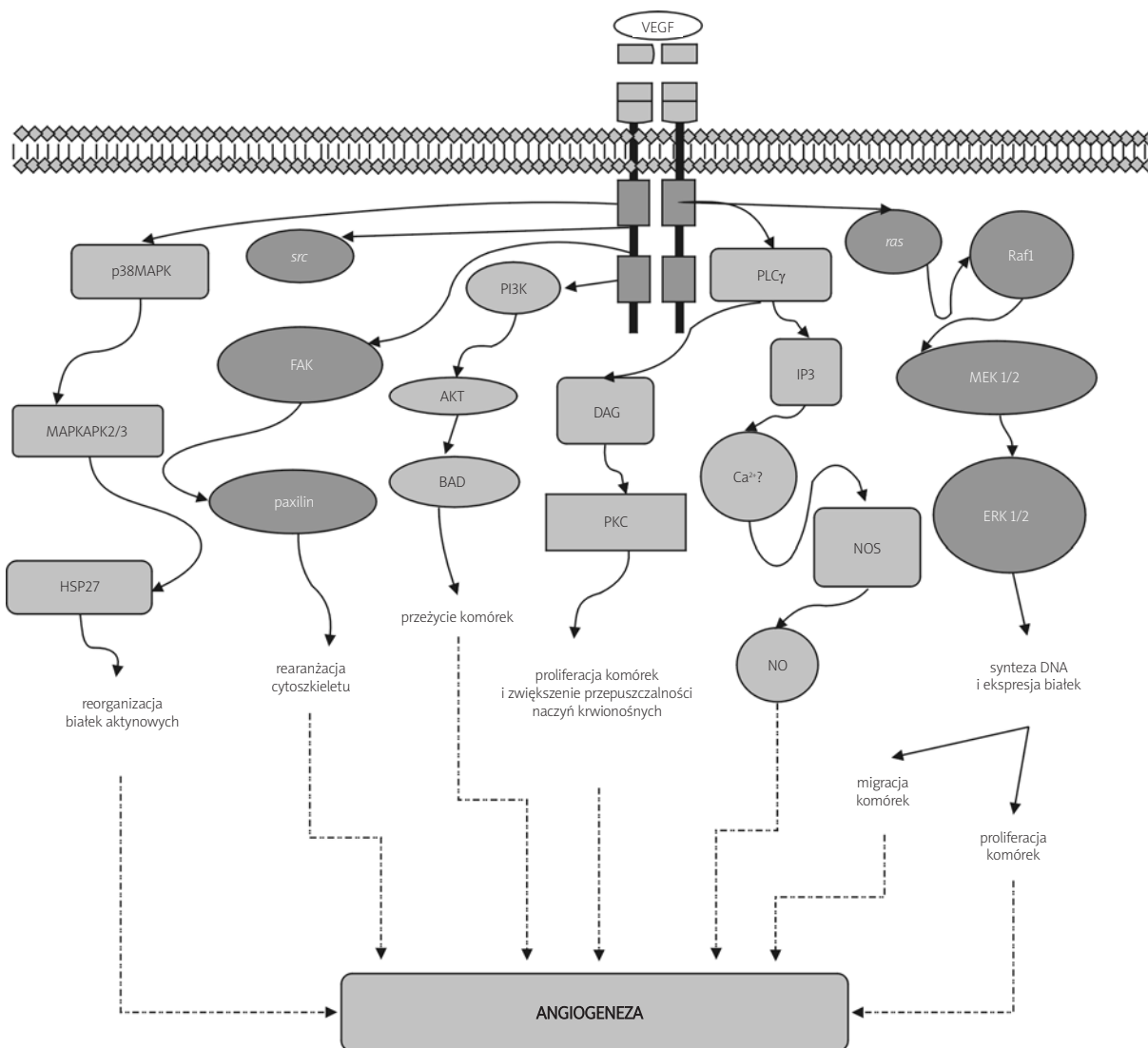
Niektóre doświadczenia wskazują na to, że dopamina, poprzez aktywację receptora dopaminowego D2, indukuje internalizację samego receptora VEGFR-2 i uniemożliwia w ten sposób wiązanie VEGF, co w efekcie hamuje sygnał proangiogeny [20]. Działanie dopaminy jest przy tym wysoce swoiste i ogranicza się wyłącznie do VEGFR-2. Blokiwanie dopaminy, czy też receptora D2 może być wykorzystane w terapii antyangiogennej [20].

W regulacji procesu angiogenezy, jako koreceptor VEGFR-2, uczestniczy również neuropilina 1 (NP1), która jest receptorem dla dwóch różnych ligandów: semaforyny A klasy trzeciej (Sema3A) i VEGF₁₆₅ [21]. Koekspresja NP1 i VEGFR-2 powoduje 6-krotny wzrost oddziaływania VEGF₁₆₅ z VEGFR-2. Zahamowanie wiązania VEGF₁₆₅ z NP1 powoduje spadek aktywności mitogennej i chemotaksji komórek, co sugeruje, że NP1, modulując wiązanie VEGF z VEGFR-2, uczestniczy w regulacji angiogenezy [22]. Embriony mysie pozbawione receptorów neuropilinowych ginęły *in utero* ok. 8.–9. dnia [23].

Nadekspresję VEGF i VEGFR-2 zaobserwowano w wielu typach nowotworów, m.in. w raku piersi, niedrobnokomórkowym raku płuc, wątroby, nerki, jelita grubego, pęcherza moczowego, tarczycy i jajnika [2]. Istotna rola VEGFR-2 w angiogenezie nowotworów sprawiła, że stał się on celem nowych rozwiązań terapeutycznych, które mogą być wykorzystane w leczeniu nowotworów.

Terapia antyangiogenna z wykorzystaniem VEGFR-2

- Obecnie w terapii antyangiogennej wykorzystuje się m.in.:
- blokowanie aktywności VEGFR-2 przeciwciałami anty-VEGFR-2, co ma zapobiegać wiązaniu VEGF do receptora [13],
 - fatszywe* ligandy, które stanowią konkurencję dla VEGF w wiązaniu do receptora VEGFR-2 i nie indukują transdukcji sygnału mitogennego [24],
 - inhibitory kinaz tyrozynowych, które hamują przekaz sygnału proangiogenego na poziomie domeny cytozolowej VEGFR-2 [25],
 - oligonukleotydy blokujące ekspresję VEGFR-2: antysensy oraz rybozymy [17].



Ryc. 2. Efekty aktywacji kinaz tyrozynowych receptora VEGFR-2, wg [13] zmodyfikowane
Fig. 2. Effects of VEGFR-2 tyrosine kinases' activation, acc. [13] modified

p38 – kinaza, MAPKAPK2/3 – kinaza białkowa aktywowana przez MAPK, MAPK – kinaza białek MAP (ang. mitogen activated protein kinase), HSP27 – białko szoku cieplnego o m.cz. 27kDa, src – kinaza tyrozynowa, FAK – kinaza białkowa FAK (ang. focal adhesion kinase), paxillin – białko cytoszkieletu, PI3K – kinaza fosfatydyloinozytolu, AKT (PKB) – kinaza białkowa B, PLCγ – fosfolipaza C, IP-3 – trójfosforan inozytolu, DAG – diacyloglicerol, PKC – kinaza białkowa C, Ca²⁺ – jony wapnia, NOS – syntaza tlenu azotu, NO – tlenek azotu, kinazy białkowe ras, raf, MEK1/2 – kinazy białek MAP/ERK, ERK1/2 – kinaza (ang. extracellularly regulated kinase)

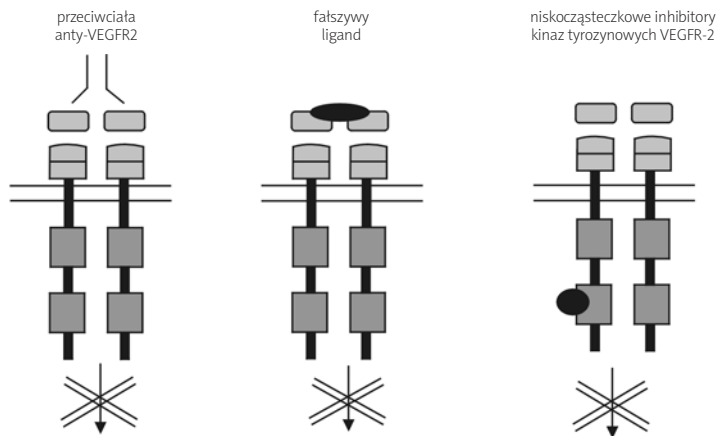
Rycina 3. przedstawia przykłady wymienionych zastosowań w terapii antyangiogennej z wykorzystaniem VEGFR-2. Oryginalnym rozwiązaniem terapeutycznym jest indukcja odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko naczyniom z receptorem VEGFR-2 [26].

Przeciwciała anty-VEGFR-2

W terapii antyangiogennej można zastosować przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko receptorom VEGFR-2. Przeciwciało anty-VEGFR-2, o symbolu DC-101, zostało uzyskane przez firmę ImClone Inc. Przeciwciało to w istotny sposób hamuje rozwój guzów pierwotnych, takich

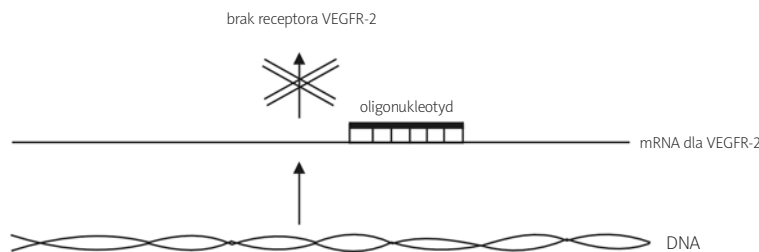
jak mysz rak płuca (*Lewis lung*), piersi (4T1), okrężnicy (CT-26) oraz czerniaka (B16), a także powstrzymuje rozwój przerzutów w raku płuc [27]. Skuteczność działania przeciwciała DC101 w kombinacji z chemioterapią badano również u myszy bezgranicznych zaszczepionych ludzkimi guzami, m.in. glejakiem, rakiem płaskonabłonkowym, gruczolakorakiem kory nadnerczy, rakiem trzustki, u których zaobserwowano 75–92% zahamowanie wzrostu guzów [27].

W badaniach stosowano również przeciwciało o symbolu 2C3. Przeciwciało to selektywnie blokuje wiązanie VEGF z VEGFR-2 oraz aktywację tego receptora i nie wykazuje takiego działania w stosunku do VEGFR-1. Blokowanie aktywności



zablokowanie ścieżki przekazywania sygnału angiogennego na poziomie receptora VEGFR-2

zahamowanie ekspresji VEGFR-2 przez oligonukleotydy (antysensy, rybozymy)



Ryc. 3. Różne możliwości zahamowania aktywności receptora VEGFR-2
Fig. 3. Different approaches to inhibiting VEGFR-2 activity

VEGFR-2 powoduje zahamowanie wzrostu naczyń okotnowotworowych oraz spadek ich przepuszczalności oraz ogranicza wzrost ludzkich guzów wykształconych u myszy [28].

Peptydy hamujące aktywność VEGFR-2

W badaniach stosuje się również tzw. fałszywe ligandy – peptydy, które wiążą się z receptorem VEGFR-2, a nie indukują sygnału angiogenego. Jednym z takich peptydów jest peptyd o symbolu K237 i sekwencji aminokwasowej HTMYHHQHHL [24]. Został on wyizolowany z biblioteki 12-aminokwasowych peptydów jako jeden z najbardziej efektywnych peptydów wykazujących powinowactwo do pozakomórkowej domeny receptora VEGFR-2. Peptyd K237 w 90% hamował podziały komórek HUVEC w badaniach *in vitro* oraz w 70% rozwój ludzkiego raka piersi u myszy zaszczipionych tym nowotworem [24].

Również 17-aminokwasowy peptyd (CBO-P11), nazywany cyklo-VEGI, konkuruje z VEGF o miejsce wiążące w domenie pozakomórkowej receptora VEGFR-2 [29]. Cyklo-VEGI blokuje także interakcję VEGF z receptorem VEGFR-1. Liniowy peptyd kontrolny takich właściwości nie posiada. Efekt blokowania receptora VEGFR-2 jest w tym przypadku ściśle uzależniony od struktury peptydu. Cyklo-VEGI konkuruje nie

tylko z VEGF, ale także z FGF-2 (ang. *fibroblast growth factor 2*). Jego powinowactwo do receptora FGFR jest jednak dużo mniejsze niż do VEGFR-2. Badania *in vivo* potwierdziły właściwości cyklo-VEGI jako inhibitora angiogenezy. Peptyd ten hamuje rozwój zarówno mysiego glejaka (78% zahamowania wzrostu guza), jak i ludzkiego (70% zahamowania wzrostu) oraz istotnie wydłuża czas przeżycia myszy leczonych peptydem w porównaniu z grupą kontrolną [29].

Niskocząsteczkowe inhibitory kinaz tyrozynowych VEGFR-2

Od wielu lat prowadzone są również badania nad swoistym blokowaniem kinazy tyrozynowej receptora VEGFR-2. Reakcja autofosforylacji VEGFR-2 może zostać zahamowana przez swoiste inhibitory kinaz tyrozynowych, które blokują transdukcję sygnału mitogenego indukowanego przez VEGF.

Jednym z pierwszych syntetycznych inhibitorów kinaz tyrozynowych receptorów VEGF, o wysoce skutecznym działaniu, był związek o symbolu PTK787/ZK222584. Inhibitor ten posiada wysokie powinowactwo do ludzkiego VEGFR-2 i w niewielkim stopniu hamuje aktywność VEGFR-1 [30]. Tylko w bardzo wysokich dawkach, w porównaniu z dawkami dla VEGFR-2, PTK787/ZK222584 hamuje aktywność innych

kinaz klasy III (m.in. PDGFR- β , c-Kit, c-Fms). Kinazy tyrozynowe innych klas (m.in. EGFR, c-Abl, c-Src, Cdc2, PKC- α) są niewrażliwe na działanie tego inhibitora. PTK787/ZK222584 nie tylko hamuje proliferację komórek, ale wpływa także na ich migrację. Działanie inhibitora PTK787/ZK222584 przebadano na wielu doświadczalnych modelach guzów, m.in. raku naskórka, nowotworach okrężnicy, prostaty i tarczycy [30, 31]. Rozwój raka prostaty CWR-22 u myszy został skutecznie powstrzymany, nie zaobserwowano jednak całkowitej regresji nowotworu. Obecnie PTK787/ZK222584 znajduje się w III fazie badań klinicznych, gdzie stosowany jest zarówno w celu wzmocnienia efektu działania klasycznej chemioterapii, jak i w monoterapii u pacjentów z rakiem okrężnicy [31].

Inhibitorem, który równie dobrze hamuje aktywność receptora VEGFR-2 jest lek o symbolu SU5416. Jest on równie swoisty, jak PTK/ZK. Nie hamuje aktywności kinaz serynowo-treoninowych oraz wielu innych kinaz tyrozynowych (m.in. c-Src, receptora FGF, Met i Abl) i tylko w niewielkim stopniu hamuje aktywność receptora PDGF (ang. *platelet derived growth factor*) [32]. SU5416 znacznie obniża liczbę nowych naczyń i ich gęstość w obrębie guza. Lek ten hamuje rozwój guzów, m.in. czerniaka, raka piersi, prostaty, płuc, naskórka, włóknakiomiasa i glejaka oraz tworzenie przerzutów [32, 33].

Oligonukleotydy hamujące ekspresję genu VEGFR-2

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 ok. 20–30 nukleotydów (zarówno rybo-, jak i deoksynukleotydy), których sekwencja jest komplementarna do mRNA lub sekwencji kodujących gen (często są to sekwencje jego promotora). Hybrydując z mRNA oligonukleotydy blokują dostęp do rybosomów [34], zaburzają składanie pre-mRNA [35], lub inicjują jego degradację [36].

Antysensowne oligonukleotydy po przyłączeniu do docelowego mRNA tworzą dwupasmowy hybryd aktywujący enzym RNazę H degradujący mRNA w tym duplesie. Odmianną oligonukleotydów antysensownych są małe cząsteczki RNA o długości ok. 20–25 nukleotydów, nazywane siRNA (ang. *small interfering RNA*). Po wnikięciu do komórki jedna z nici siRNA aktywuje rybonukleoproteinowy kompleks zwany RISC, który rozpoznaje komplementarną sekwencję w obrębie docelowego mRNA. W wyniku endonukleolitycznej degradacji (fragmentacji) mRNA przez kompleks RISC translacja mRNA zostaje zablokowana [37].

Do hamowania ekspresji genów wykorzystuje się również oligonukleotydy zwane rybozymami. Są to katalityczne cząsteczki RNA, zdolne do specyficznego rozpoznawania i fragmentacji docelowego mRNA. Rybozym po rozpoznaniu sekwencji komplementarnej docelowego mRNA przyjmuje aktywną konformację i hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe w nici mRNA powodując jego fragmentację. Do hamowania ekspresji genów w komórkach ssaków wykorzystuje się najczęściej rybozomy niskocząsteczkowe typu *głowa młotka* (ang. *hammerhead*) oraz typu *spinka* (ang.

harpin), co wynika z ich niewielkich rozmiarów (do 30 nukleotydów). Stosuje się także rybozomy wielkocząsteczkowe m.in. rybonukleazę P (RNazaP) – właściwym rybozymem jest w tym przypadku cząsteczka RNA M1, związana z podjednostką białkową C5 [38].

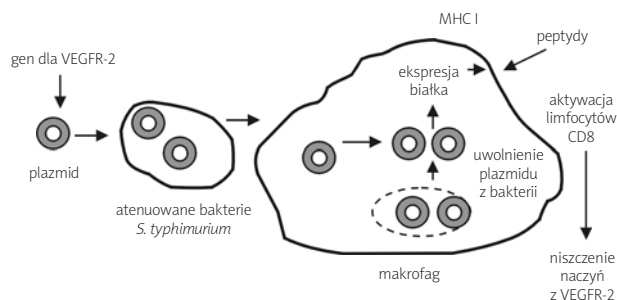
Oligonukleotydy antysensowne, siRNA i rybozomy znalazły zastosowanie w wyciszaniu ekspresji genu receptora VEGFR-2 w terapii antyangiogennej nowotworów. U myszy leczonych antysensownymi oligonukleotydami, skierowanymi przeciwko mRNA VEGFR-1 oraz VEGFR-2, zaobserwowano zahamowanie rozwoju unaczynienia [39]. Podobne wyniki zaobserwowano również u myszy bezgranicznych zaszczerpionych ludzkim rakiem żołądka, w których zastosowanie antysensownych oligonukleotydów skierowanych przeciwko VEGFR-2 znacznie zmniejszyło liczbę naczyń krwionośnych w guzie i ograniczyło jego wzrost [40].

Zastosowanie rybozymów typu *głowa młotka* skierowanych przeciwko mRNA VEGFR-1 i VEGFR-2 zahamowało proliferację ludzkich komórek śródbłonkowych HMVEC (ang. *human dermal microvascular endothelial cell*) [41]. Terapia z użyciem rybozymów przeciwko obu receptorom VEGFR znacznie ograniczyła powstawanie unaczynienia, zahamowała rozwój guza oraz zredukowała liczbę tworzonych przerzutów [41, 42].

Cząsteczki siRNA z powodzeniem wykorzystano do wyciszania ekspresji receptora VEGFR-2. Zaobserwowano zahamowanie angiogenezy oraz ograniczenie rozwoju guza neuroblastomy (nowotworu pnia współczulnego) [43, 44].

Indukcja odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko naczyńiom z receptorem VEGFR-2

To oryginalne rozwiązanie terapeutyczne polega na swoistym niszczeniu naczyń okołotumorowych przez limfocyty CD8⁺. 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 niosącym gen VEGFR-2. W organizmie biorcy, w makrofagach i komórkach dendrytycznych, dochodzi do ekspresji genu, a następnie indukcji odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko naczyńiom okołotumorowym posiadającym receptor VEGFR-2 (ryc. 4.) [26].



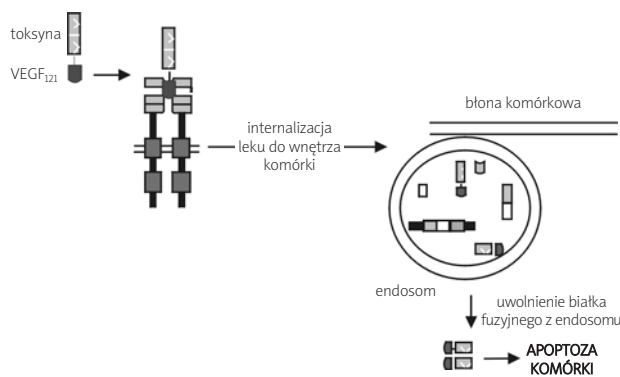
Ryc. 4. Indukcja odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom śródbłonkowym naczyń z receptorem VEGFR-2
Fig. 4. Immune response induction against blood vessel endothelial cells exhibiting VEGFR-2

Na podstawie niektórych badań można było prześledzić rozwój bakterii z eukariotycznymi, ekspresyjnymi plazmidami w organizmie myszy [45]. Podane doustnie atenuowane bakterie *S. typhimurium* (AroA⁻) są gromadzone w jelicie cienkim, skąd są wychwytywane i gromadzone przez makrofagi oraz komórki dendrytyczne [46, 47]. W czasie wędrówki komórek do śledziony bakterie uwalniają plazmidowy DNA. Geny kodujące białka naczyniowe ulegają ekspresji, a pojawiające się białka podlegają ubikwitynizacji i proteolitycznej degradacji w proteosomach. Powstające w wyniku takiej obróbki peptydy są następnie prezentowane z udziałem cząsteczek MHC klasy I i biorą udział w aktywacji limfocytów T cytotoksycznych (CD8⁺) [47].

W prezentacji antygenów bakteryjnych ważną rolę odgrywają także cząsteczki klasy II. Limfocyty T pomocnicze (CD4⁺), które rozpoznają antygeny prezentowane przez te cząsteczki uczestniczą we wspomaganie odpowiedzi komórkowej oraz humoralnej. Limfocyty pomocnicze, głównie poprzez wydzielane cytokiny, m.in. IFN- γ , mogą również pośrednio hamować powstawanie nowych naczyń w obrębie guza. Przeprowadzone doświadczenia wskazują na istnienie obu typów odpowiedzi, w wyniku których dochodzi do aktywacji zarówno limfocytów CD8⁺, jak i CD4⁺. Zastosowanie takiej doustnej szczepionki znosi obwodową tolerancję limfocytów T dla receptora VEGFR-2, w wyniku czego dochodzi do eliminacji proliferujących komórek śródbłonkowych naczyń. W badaniach przedklinicznych na modelach mysich nowotworów czerniaka, okrężnicy i niedrobnokomórkowego raka płuc wykazano zahamowanie rozwój guzów [26].

Terapia przeciwnaczyniowa z wykorzystaniem receptora VEGFR-2

Receptor VEGFR-2 występuje u 30–70% komórek śródbłonkowych naczyń okołonowotworowych, a w komórkach naczyń prawidłowych – poniżej 5% [48]. Stwarza to duże możliwości celowego wprowadzania za pośrednictwem VEGFR2 tzw. leków dwudomenowych (związanych z VEGF toksyn czy innych ligandów niszczących komórki śródbłonkowe) [12] (ryc. 5.). Leki te, po związaniu z receptorem, muszą zostać internalizowane wraz z receptorem przez komór-



Ryc. 5. Internalizacja dwudomenowego leku przeciwnaczyniowego przez komórki docelowe

Fig. 5. Internalization of two-domain anti-vascular drug by target cells

ki docelowe. Tylko wtedy skoniugowana z ligandem toksyna może dostać się do wnętrza komórki [12]. Niszczenie naczyń okołonowotworowych przez toksyczne leki ma pociągać za sobą niedotlenowanie komórek nowotworowych i w konsekwencji ich śmierć nekrotyczną.

Dwudomenowe leki przeciwnaczyniowe mają charakterystyczną budowę. Jedna z domen, tzw. kognitywna, swoiście rozpoznaje komórki docelowe, np. receptory czynnika wzrostowego VEGF czy receptory integryn $\alpha_v\beta_3$. Druga, tzw. efektorowa, to najczęściej fragment toksyny, która indukuje w komórkach docelowych apoptozę [12]. Do chwili obecnej, w badaniach przedklinicznych, wykazano już przeciwnaczyniowe właściwości kilku leków, w których domeną kognitywną jest VEGF₁₂₁ rozpoznający receptor VEGFR-2, a jako domen efektorowych użyto m.in. toksyny dyfterytu [49, 50], geloniny [51] i granzymu B [52].

Jednym z pierwszych skonstruowanych dwudomenowych leków był koniugat toksyny dyfterytu z VEGF₁₆₅. Ramakrishnan i wsp. [49] wykazali, że taki dwudomenowy lek specyficznie rozpoznaje VEGFR-2 i zostaje internalizowany do wnętrza komórki. W badaniach *in vitro* oba białka fuzyjne VEGF₁₆₅/DT (toksyna dyfterytu) i VEGF₁₂₁-DT są wysoce toksyczne zarówno dla proliferujących komórek śródbłonkowych, jak i dla komórek nowotworowych mięsaka Kaposiego KS, a terapia z wykorzystaniem VEGF₁₂₁/DT prowadzona na myszach z mięsakiem Kaposiego powstrzymała rozwój guza [50].

Veenendaal i wsp. [51] skonstruowali białko fuzyjne złożone z VEGF₁₂₁ i toksyny roślinnej: geloniny. Gelonina jest zasadową glikoproteiną o właściwościach enzymatycznych, katalizującą hydrolizę wiązań N-glikozydowego specyficznie przy jednej adenozylinie w 28S rRNA, co powoduje inaktywację rybosomów w komórce i w rezultacie śmierć komórki. Uszkodzenie naczyń okołonowotworowych u myszy z ludzkim rakiem prostaty (PC-3) obserwowano już po 48 godz. od momentu podania VEGF₁₂₁/rGel, przy czym nie zaobserwowano zmian morfologicznych w innych narządach myszy. Badania przedkliniczne z użyciem konstruktu VEGF₁₂₁/rGel wykazały zahamowanie wzrostu guzów raka prostaty i czerniaka [51].

Elementem efektorowym zastosowanym w konstrukcjach dwudomenowych leków przeciwnaczyniowych z VEGF₁₂₁ jest także granzym B (GrB), proteaza serynowa typu B, biorąca udział w aktywacji szeregu kaspaz biorących udział w apoptozie [52]. Białko fuzyjne VEGF₁₂₁/GrB indukuje apoptozę w komórkach z receptorem VEGFR-2 powodując uwalnianie cytochromu c z mitochondrium do cytoplazmy, aktywację kaspazy-3 i -8 oraz fragmentację białka syntazy poli-ADP-rybozy (PARP) (ang. *poly ADP-ribose polymerase*) naprawiającego uszkodzenia DNA [52].

Podsumowanie

Receptor VEGFR-2 jest obiecującym celem terapii, gdyż hamowanie jego aktywności wykazało istotny efekt przeciwnowotworowy w badaniach *in vivo*. VEGFR-2 może być dobrym celem terapii antyangiogennej z kilku powodów:

- VEGFR-2 występuje u 30–70% komórek śródbłonkowych naczyń okołonowotworowych, a tylko w niewielkim procencie (<5%) w komórkach śródbłonkowych naczyń prawidłowych;

- b) inaktywacja receptora VEGFR-2 powoduje indukcję apoptozy w komórkach śródbłonkowych, co hamuje angiogenezę i pośrednio wzrost guza;
- c) leki przeciwnaczyniowe z domeną VEGF są swoiście internalizowane przez komórki śródbłonkowe posiadające receptor VEGFR-2;
- d) badania doświadczalne i kliniczne wskazują, że kombinacja czynników anti-VEGFR-2 z chemioterapeutykami daje wyraźny efekt terapeutyczny (zahamowanie wzrostu guzów nowotworowych).

Duże nadzieje pokłada się obecnie w terapii kombinowanej, w której kojarzy się leki antyangiogenne i przeciwnaczyniowe z chemioterapeutykami bądź napromienieniem. Doniesienia ostatnich lat wskazują, że kombinacje poszczególnych metod terapeutycznych o różnych mechanizmach działania są bardziej skuteczne niż jakiegokolwiek inne sposoby leczenia [53–56].

Piśmiennictwo

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-6.
2. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor as a Target for Anti-cancer Therapy. *The Oncologist* 2004; 9: 2-10.
3. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611.
4. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 507-21.
5. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-4.
6. Scappaticci FA. Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3906-27.
7. Hendrix MJ, Sefter EA, Hess AR, Sefter REB. Vasculogenic mimicry and tumor-cell plasticity: lessons from melanoma. *Cancer* 2003; 3: 411-21.
8. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 6: 653-60.
9. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9: 685-93.
10. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003; 300: 1155-9.
11. Neri D, Bicknell R. Tumor vascular targeting. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 436-46.
12. Szala S. Two-domain vascular disruptive agents in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 501-9.
13. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom A, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 549-80.
14. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312: 549-60.
15. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 65-9.
16. Chen H, Ikeda U, Shirnpo M, Maeda Y, Shibuya M, Ozawa K, Shimada K. Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by transfection with the soluble flt-1 gene. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 496-502.
17. Joško J, Knefel K. The role of vascular endothelial growth factor in cerebral oedema formation. *Folia Neuropathol* 2003; 43: 161-6.
18. Jain RK, Fenton BT. Intratumoral lymphatic vessels: a case of mistaken identity or malfunction? *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 417-21.
19. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; 7: 186-91.
20. Basu SB, Nagy JA, Pal S, et al. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2001; 7: 569-74.
21. Oh H, Takagi H, Otani A, Koyama S, Kemmochi S, Ukemura A, Honda Y. Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF): a mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis. *PNAS* 2002; 99: 383-8.
22. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsburn M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998; 92: 735-45.
23. Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Tashiro F, Niwa H, Miyazaki Jij i wsp. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 3657-62.
24. Hetian L, Ping A, Shumei S, et al. 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: 43137-42.
25. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2002; 5: 3-10.
26. Niethammer AG, Xiang R, Becker JC, Wodrich H, Peri 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: 1369-75.
27. Prewett M, Huber J, Li Y, et al. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 5209-18.
28. Brekken RA, Overholser JP, Stastny VA, Waltenberger J, Minna JD, Thorpe PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* 2000; 60: 5117-24.
29. Zilberberg L, Shinkaruk S, Lequin O, Rousseau B, Hagedorn M, Costa F, Caronzolo D, Balke M i wsp. Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor. *J Biol Chem* 2003; 278: 35564-73.
30. Wood JM, Bold G, Buchdunger E, et al. 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: 2178-89.
31. Schoenberger J, Grimm D, Kossmehl P, Infanger M, Hurth E, Eilles C. Effects of PTK787/ZK222584, a tyrosine kinase inhibitor, on the growth of a poorly differentiated thyroid carcinoma: an animal study. *Endocrinology* 2006; 145: 1031-1038.
32. Fong TAT, Shawver LK, Sun L, et al. 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.
33. Shaheen RM, Davis DW, Liu W, et al. Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* 1999; 59: 5412-16.
34. Baker BF, Lot SS, Condon TP, Cheng-Flournoy S, Lesnik EA, Sasmor HM, Bennet CF. 2''-O-(2-Methoxy) ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 11994-2000.
35. Mercatante DR, Sazani P, Kole R. Modification of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy for cancer and other diseases. *Curr Cancer Drug Targets* 2001; 1: 211-30.
36. Vickers TA, Koo S, Bennett CF, Croke ST, Dean NM, Baker BF. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. *J Biol Chem* 2003; 278: 7108-18.
37. Tuschl T, Borkhardt A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv* 2002; 2: 158-67.
38. Cobaleda C, Sanchez-Garcia I. RNase P: from biological function to biotechnological applications. *Trends Biotechnol* 2001; 19: 406-11.
39. 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: 194-204.

40. Kamiyama M, Ichikawa Y, Ishikawa T, et al. VEGF receptor antisense therapy inhibits angiogenesis and peritoneal dissemination of human gastric cancer in nude mice. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 197-201.
41. Parry TJ, Cushman C, Gallegos AM, et al. Bioactivity of anti-angiogenic ribozymes targeting Flt-1 and KDR mRNA. *Nucleic Acid Res* 1999; 27: 2569-77.
42. Pavco PA, Bouhana KS, Gallegos AM, et al. Antitumor and antimetastatic activity of ribozymes targeting the messenger RNA of vascular endothelial growth factor receptors. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2094-103.
43. Kim B, Tang Q, Biswas P, et al. Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes: therapeutic strategy for herpetic stromal keratitis. *Am J Pathol* 2004; 165: 2177-85.
44. Schiffelers RM, Ansari A, Xu J, et al. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e149.
45. Reisfeld RA, Niethammer AG, Luo Y, Xiang R. DNA vaccines suppress tumor growth and metastases by the induction of anti-angiogenesis. *Immunol Rev* 2004; 199: 181-90.
46. Luo Y, Zhou H, Mizutani M, Mizutani N, Reisfeld RA. Transcription factor Fos-related antigen 1 is an effective target for a breast cancer vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8850-5.
47. Darji A, Guzman CA, Gerstel B, Wachholz P, Timmis KN, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* 1997; 91: 765-75.
48. Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. The vascular network of tumors – what is it not for? *J Pathol* 2003; 201: 173-80.
49. Ramakrishnan S, Olson TA, Bautch VL, Mohanraj D. Vascular endothelial growth factor-toxin conjugate specifically inhibits KDR/flk-1-positive endothelial cell proliferation in vitro and angiogenesis in vivo. *Cancer Res* 1996; 56: 1324-30.
50. Wild R, Dhanabal M, Olson TA, Ramakrishnan S. Inhibition of angiogenesis and tumor growth by VEGF121-toxin conjugate: differential effect on proliferating cells. *Brit J Cancer* 2000; 83: 1077-83.
51. Veenendaal LM, Jin H, Ran S, et al. In vitro and in vivo studies of a VEGF121/rGelonin chimeric fusion toxin targeting the neovascularity of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7866-71.
52. Liu Y, Cheung LH, Thorpe P, Rosenblum MG. Mechanistic studies of novel, human fusion toxin composed of vascular endothelial growth factor (VEGF)₁₂₁ and the serine protease granzyme B: Directed apoptotic events in vascular endothelial cells. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 949-59.
53. Zhang L, Hannay JA, Liu J, et al. Vascular endothelial growth factor overexpression by soft tissue sarcoma cells: implications for tumor growth, metastasis, and chemoresistance. *Cancer Res* 2006; 66: 8770-8.
54. Abdollahi A, Lipson KE, Sckell A, et al. Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Res* 2003; 63: 8890-8.
55. Strieth S, Eichhorn ME, Sutter A, Jonczyk A, Berghaus A, Dellian M. Antiangiogenic combination tumor therapy blocking alpha (v)-integrins and VEGF-receptor-2 increased therapeutic effects in vivo. *Int J Cancer* 2006; 119: 423-31.
56. Feng KK, Zhao HY, Qiu H, Liu JX, Chen J. Combined therapy with flk1-based DNA vaccine and interleukin-12 results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Lett* 2005; 221: 41-7.

Adres do korespondencji

prof. dr hab. **Stanisław Szala**
Zakład Biologii Molekularnej
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
Oddział w Gliwicach
Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-101 Gliwice
tel. +48 32 278 98 79
faks +48 32 231 35 12
e-mail: sszala@io.gliwice.pl