

Komórka niedotleniona celem dla terapii selektywnej w onkologii

The hypoxic cell a target for selective cancer therapy

Bogdan Michalski¹, Anna Banyś², Agnieszka Droszdzol¹, Violetta Skrzypulec¹, Urszula Mazurek³

¹Katedra Zdrowia Kobiety, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach; kierownik Katedry: dr hab. med., prof. ŚUM Violetta Skrzypulec

²Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Sosnowcu; kierownik: dr hab. n. farm. Andrzej Jankowski

³Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Sosnowcu; kierownik: dr hab. med., prof. ŚUM Urszula Mazurek

Przeгляд Menopauzalny 2009; 4: 196-201

Streszczenie

Hipoksja jest czynnikiem niekorzystnym, który predysponuje nie tylko do bardziej agresywnego przebiegu choroby i szybszego powstawania przerzutów, ale również do oporności pacjentek na standardowe schematy leczenia. Paradygmatem jest stwierdzenie, że wzrost guza nowotworowego zależy od ilości tlenu i produktów odżywczych dostarczanych przez nowo powstałą sieć naczyń krwionośnych (angiogeneza), a bezpośrednim efektem tego wzrostu jest powstawanie przerzutów odległych poprzez nową sieć naczyń limfatycznych (limfangiogeneza). Patofizjologicznym fundamentem angiogenezy i limfangiogenezy w guzie nowotworowym jest niedotlenienie. Badania kliniczne ostatnich lat jednoznacznie potwierdzają, że niedotlenienie stanowi główny problem dla radioterapii, a małe wysycenie komórek tlenem przyspiesza progresję nowotworu, bez względu na to, jakie leczenie przeciwnowotworowe jest stosowane. Hipoksja może przyczynić się do powstania oporności na leki poprzez amplifikację genów powodujących występowanie lekooporności oraz indukcję związanych z hipoksją białek stresu.

Słowa kluczowe: hipoksja, angiogeneza, HIF – czynnik indukowany przez hipoksję, apoptoza

Summary

Hypoxia is an unfavourable factor which predisposes both to more aggressive disease course and frequent metastases as well as patients' resistance to standard therapy procedures. The development of neoplasm is dependent on oxygen amount and nutritive products supplied by the new blood vessels' network (angiogenesis) with following direct distant metastases formation by new lymphatic vessels (lymphangiogenesis). This statement constitutes a paradigm. Hypoxia is a pathophysiological factor for angiogenesis and lymphangiogenesis in the neoplastic tumor. According to the latest clinical research, it was confirmed that hypoxia is a fundamental problem in radiotherapy and low cell's oxygen saturation accelerates neoplasm progression in spite of the cancer therapy used. Hypoxia might cause drug-resistance through the amplification of specific genes as well as the induction of stress-proteins related to hypoxia.

Key words: hypoxia, angiogenesis, HIF – hypoxia inducible factor, apoptosis

Wstęp

Hipoksja w raku szyjki macicy jest czynnikiem niekorzystnym, który nie tylko predysponuje do bardziej agresywnego przebiegu choroby i szybszego powstawania przerzutów, ale też do oporności pacjentek na standardowe schematy leczenia [1]. Paradygmatem jest stwierdzenie, że wzrost guza nowotworowego jest zależny od ilości tlenu i produktów odżywczych dostarczonych przez nowo powstałą sieć naczyń krwionośnych (angiogeneza),

a bezpośrednim efektem tego wzrostu jest powstawanie przerzutów odległych poprzez nową sieć naczyń limfatycznych (limfangiogeneza). Patofizjologicznym fundamentem angiogenezy i limfangiogenezy w guzie nowotworowym jest niedotlenienie – spadek poziomu tlenu w komórce nowotworowej. Niedotlenienie jest wspólną cechą wszystkich guzów litych, wpływającą na ich biologię i prognozowanie odpowiedzi na leczenie i tym samym na rokowanie dla pacjentów [2]. Badania nad metodami przezwyciężenia problemu, jakim dla radioterapii i che-

Adres do korespondencji:

dr hab. med. **Bogdan Michalski**, Katedra Zdrowia Kobiety, Wydział Opieki Zdrowotnej, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Medyków 12, 40-752 Katowice, tel. +48 32 208 87 30, faks +48 32 208 87 30, e-mail: bogdan@procl.com.pl

mioteraapii jest niedotlenienie komórek w guzach litych, trwają od ponad 50 lat [3]. Ostatnie badania kliniczne jednoznacznie potwierdzają, że niedotlenienie jest głównym problemem dla radioterapii, a małe wysycenie komórek tlenem przyspiesza progresję nowotworu, bez względu na to, jakie leczenie przeciwnowotworowe jest stosowane [4]. Wdrażanie nowych leków do badań klinicznych, które są wybiórczo toksyczne dla niedotlenionych komórek, ma teoretyczne podstawy oraz pozytywne kliniczne potwierdzenie wyników [5]. Prezentowany przegląd piśmiennictwa zwraca uwagę na kilka ważnych pojęć i koncepcji związanych ze ścieżkami sygnalizacyjnymi komórki niedotlenionej, które doprowadziły do obecnego stanu wiedzy i rozpoczęcia badań nad selektywnym leczeniem niedotlenionej masy guza nowotworowego.

Rola hipoksji w radioterapii i chemioterapii

Pionierskie badania Graya i wsp. wykazały, że za oporność na promieniowanie jonizujące jest odpowiedzialna hipoksja [6]. Badania, wykonane tuż po II wojnie światowej, pokazały, że niedotlenienie wywołuje radiooporność w szerokim zakresie komórek i tkanek. Ponadto zaobserwowano, że prawidłowe ciśnienie parcjale tleny w czasie naświetlania powoduje większą promieniowrażliwość niż jakiegokolwiek inne efekty metaboliczne w komórce [3]. Różnica we wrażliwości na promieniowanie pomiędzy komórkami z prawidłowym ciśnieniem parcjale tleny a komórkami w stanie hipoksji, a nawet anoksji, jest znana jako wskaźnik wzmocnienia tlenowego, zdefiniowany w formie stosunku dawek napromieniowania w celu zniszczenia komórek nowotworowych na takim samym poziomie w warunkach hipoksji, jak również prawidłowego ich utleniania. Wartość prawidłowa tego wskaźnika zawiera się w zakresie 2,5–3 dla komórek człowieka.

Przyczyną tego efektu jest fakt wiązania się tlenu z miejscem uszkodzenia DNA wywołanego promieniowaniem jonizującym. Tlen, będąc najbardziej powinowatą elektronowo cząsteczką w komórce, reaguje nadzwyczaj szybko z wolnym elektronem wolnego rodnika, przez co utrwala uszkodzenie w strukturze DNA. W przypadku nieobecności tlenu wiele z powstałych uszkodzeń może być przywróconych do ich prawidłowej struktury, przez donację wodoru od niebiałkowych grup tiolowych w komórkach. Tak więc promieniowanie jonizujące jest wysoce nieskuteczne w niszczeniu niedotlenionych komórek wszystkich typów zarówno normalnych, jak i nowotworowych [7]. Hipoksyczne (niedotlenione) komórki są ok. 3 razy mniej wrażliwe na fotonowe promieniowanie jonizujące. Wynikają stąd istotne implikacje kliniczne w radioterapii guzów, w których część słabo unaczyniona i tym samym niedotleniona jest znacznie mniej wrażliwa na napromienianie [7].

W wycinkach histologicznych guzów litych Thomlinson i Gray wykazali, że odległość ognisk martwicy od na-

czynia krwionośnego jest stała i wynosi zwykle 100–150 μm – jest to odległość dyfuzji tlenu w tkance zależna od ciśnienia parcjalego w naczyniach włoskowatych oraz od tempa zużycia tlenu przez komórki [8].

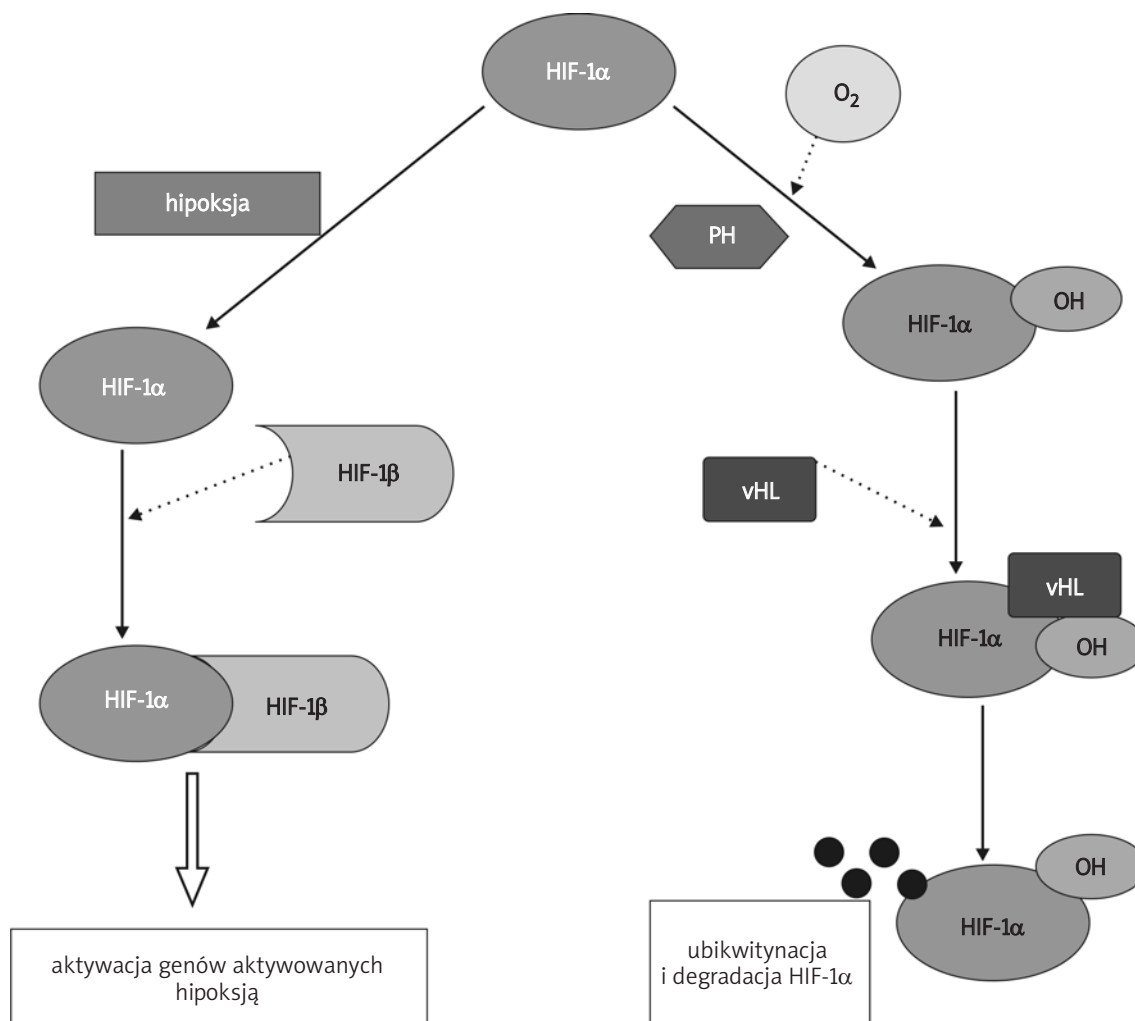
Mając na uwadze powyższe patofizjologiczne podstawy, należy stwierdzić, że wnioski wysunięte przez powyższych badaczy były niezwykle istotne dla poznania negatywnego wpływu niedotlenienia komórki w guzach litych na wynik radioterapii. Nie umniejszając rangi tego faktu, należy jednak zauważyć, że dopiero wyniki badań molekularnych pozwoliły na pełne poznanie zjawiska niedotlenienia guza nowotworowego w aspekcie klinicznym znacznie szerszym, niż badacze ci przypuszczali.

Niedotlenione komórki *in vitro* są odporne na promieniowanie jonizujące, lecz wrażliwe na działanie chemioterapeutyków. Leki te, podobnie jak promieniowanie, są bardziej toksyczne dla utlenianych komórek nowotworowych, jednak w guzie litym *in vivo* pewna liczba czynników, skojarzona bezpośrednio albo pośrednio z niedotlenieniem guza, przyczynia się do lekooporności [9, 10]. Po pierwsze, niedotlenienie skojarzone z niedoborem glukozy powoduje zwolnienie tempa progresji poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego [11]. Po drugie, stężenie leków przeciwnowotworowych będzie większe bliżej naczyń krwionośnych z powodu gorszego rozprzestrzeniania się w tkance nowotworowej w wyniku spadku pH pozakomórkowego [12]. Hipoksja może przyczynić się do powstania oporności na leki poprzez amplifikację genów powodujących występowanie lekooporności [13] oraz indukcję związanych z hipoksją białek stresu [14, 15].

Szlaki metaboliczne niedotlenienia w komórce nowotworowej

Odpowiedź komórkowa na zmniejszenie stężenia O_2 poniżej 2% zarówno zewnątrzkomórkowa, jak i wewnątrzkomórkowa jest skomplikowanym procesem, na który składa się odbiór bodźca przez odpowiedni receptor, jego przetworzenie oraz przesłanie informacji do jądra komórki, w celu wywołania odpowiedniej reakcji na hipoksję [16]. W komórkach prawidłowych sygnały proliferacyjne, migracyjne, apoptotyczne i ich wzajemne relacje podlegają ścisłej kontroli wewnątrzkomórkowej we wszystkich kompartmentach i pozostają w stanie równowagi. Wzrost guza nowotworowego odbywa się dzięki desynchronizacji wymienionych procesów oraz promowaniu „nieśmiertelności” komórek [17]. Głównym białkiem odpowiedzi komórki na brak tlenu jest czynnik transkrypcyjny o charakterze heterodimeru – HIF-1 (*hypoxia inducible factor-1* – czynnik indukowany przez hipoksję 1) [18], którego regulacja przebiega wieloetapowo (ryc. 1).

W warunkach hipoksji HIF-1 α po połączeniu z podjednostką HIF-1 β tworzy aktywną formę czynnika transkrypcyjnego, który indukuje transkrypcję szeregu genów, m.in. genu *VEGF* [19]. W warunkach normoksji czynnik HIF-1 jest nieaktywny z powodu hydroksylacji (przy proli-



HIF-1, najważniejszy czynnik transkrypcyjny dla genów regulowanych hipoksją, jest heterodimerem składającym się z HIF-1 α i HIF-1 β . W warunkach normoksji HIF-1 α ulega hydroksylacji za pomocą hydroksylazy (PH), następnie łączy się z białkiem von Hippel-Lindau (vHL), ulega ubikwitynacji, a w końcu degradacji.

Ryc. 1. Regulacja aktywności HIF-1 α

nie w pozycji 402 i 564), która jest katalizowana przez specyficzne hydroksylazy. Następnie do podjednostki tej przyłącza się białko vHL (białko von Hippel-Lindau) i ubikwityna, co prowadzi do degradacji całego kompleksu za pomocą systemu proteosomów. Mutacje supresorowego genu vHL, występujące często w chorobie von Hippel-Lindau, powodują powstawanie zmutowanego białka vHL, które nie wiąże się z podjednostką HIF-1 α , co powoduje, że również w warunkach normoksji gen *VEGF* jest konstytutywnie aktywny, w wyniku czego powstają mnogie nowotwory – mnogie naczyniaki, raki jasnokomórkowe nerki, raki nadnercza [20].

Dotychczas zidentyfikowano kilkadziesiąt genów regulowanych przez HIF-1, w wyniku czego białko to uczestniczy w szlakach metabolicznych większości procesów odpowiedzialnych za powstanie złośliwego („przerzutowego”) fenotypu komórki nowotworowej (tab. I) [21–38].

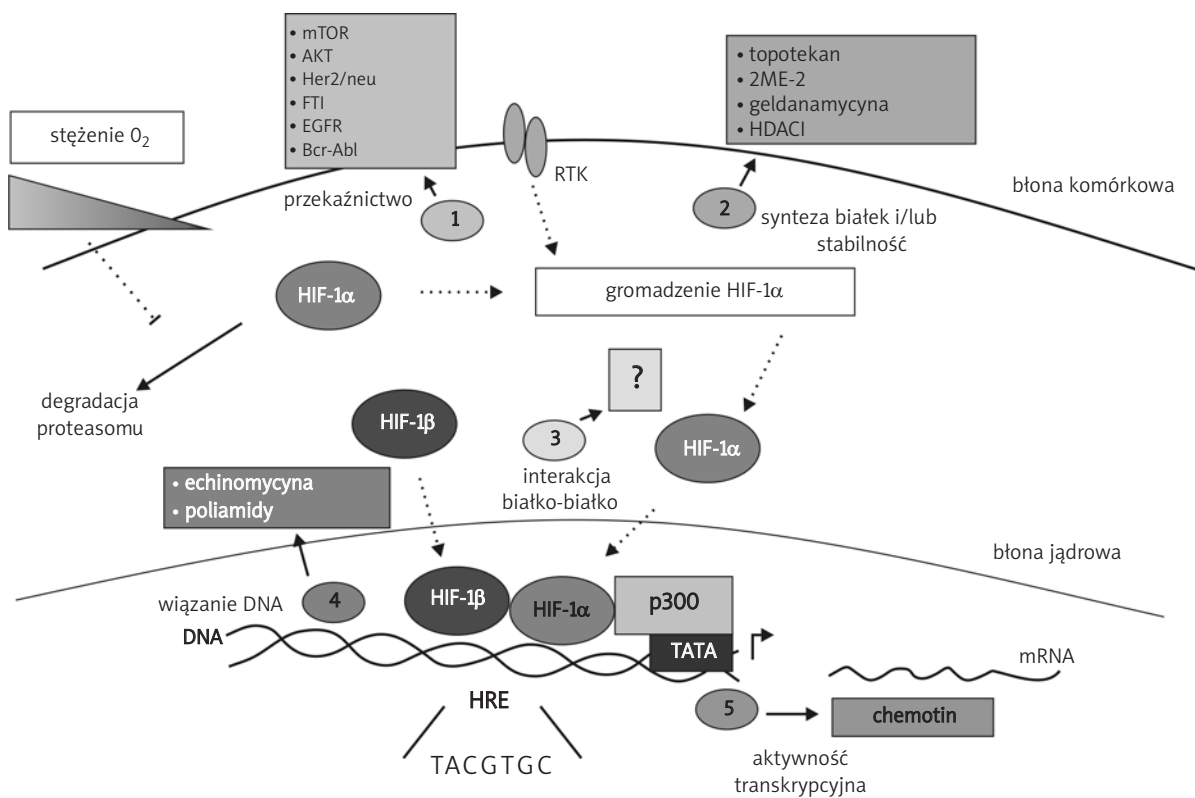
Geny produkujące białka, które uczestniczą w procesie powstawania nowych naczyń krwionośnych i limfatycznych są pierwszymi, których ekspresja regulowana jest bezpośrednio stężeniem HIF-1 w guzie nowotworowym [21].

Białko p53, produkt genu *TP53*, ma zasadnicze znaczenie w odpowiedzi komórki na stres indukowany niedotlenieniem, a w stanach przewlekłego niedotlenienia w guzie nowotworowym konkuruje z białkiem HIF-1 α o wiązanie p300, mogąc tym samym osłabiać przenoszenie sygnału pobudzających zainicjowanych HIF-1 α [28].

Gwałtowny rozwój wiedzy dotyczącej zaburzeń w transdukcji sygnału, mogącego wybitnie zakłócić takie mechanizmy komórkowe, jak proliferacja, apoptoza czy adhezja, umożliwił opracowanie nowych, celowanych terapii przeciwnowotworowych, mających za zadanie wybiórcze hamowanie funkcji białek kodowanych przez uszkodzone geny [39].

Tab. I. Geny aktywowane przez HIF-1

Proces	Gen regulowany przez HIF-1
angiogeneza limfangiogeneza	VEGF (vascular endothelial growth factor), PlGF (placental growth factor), VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor-1), iNOS (inducible nitric oxide synthase), ET-1 (endothelin-1), adrenomedulina, Cyr61 (cysteine-rich protein 61)
apoptoza	p53, pVHL (von Hippel-Lindau protein), PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)
proliferacja	IGF-2 (insulin-like growth factor), TGF- α (transforming growth factor α)
inwazja i przerzutowanie	katepsyna D, wimentyna, MMP3 (matrix metalloproteinase 3), ID2 (inhibitor of DNA binding/differentiation 2)
adaptacja metaboliczna	enzymy glikolityczne: GLUT-1 (glucose transporter – 1), GLUT-3 (glucose transporter – 3), CAIX (carbonic anhydrase IX)



Ryc. 2. Cele terapeutyczne metabolicznego szlaku niedotlenienia

Cele terapeutyczne metabolicznego szlaku niedotlenienia w komórce nowotworowej

Od początku lat 90. XX w., kiedy odkryto HIF-1, stał się on niezwykle intensywnie badany czynnikiem transkrypcyjnym zależnym od stężenia tlenu w tkance. Czy HIF-1 jest dobrym celem terapeutycznym w leczeniu

onkologicznym? Trudno jednoznacznie odpowiedzieć na to pytanie w aspekcie wyników uzyskanych z prowadzonych aktualnie programów badawczych, niemniej w licznych ośrodkach testowane są różne małowczątkowe inhibitory tego czynnika transkrypcyjnego [40]. Wśród badanych inhibitorów są echinomycyna [41] i syntetyczne poliamidy [42], które blokują wiązanie się

HIF-1 z DNA w jądrze komórkowym, oraz chetomin hamujący przyłączenie białka p300 – koaktywatora czynnika transkrypcyjnego (ryc. 2.) [43].

Małocząsteczkowe inhibitory HIF-1 są często identyfikowane jako białka opiekuńcze, białka mikrotubul, topozomeraza I, tioredoksyna, jak również liczne białka metabolicznego szlaku aktywacji HIF-1 (pkt 1., ryc. 2.). Drugim celem terapeutycznym metabolicznego szlaku niedotlenienia jest synteza i stabilizacja białka HIF-1 w cytoplazmie komórkowej, a wśród inhibitorów tego procesu najczęściej wymieniany jest toptotekan, stosowany w wielu schematach leczenia zwłaszcza drugiego rzutu [44].

Aktualnie w badaniach klinicznych ocenia się skuteczność różnych nieselektywnych inhibitorów HIF-1 w leczeniu nowotworów (m.in.: 17-N-allylamino-17-demetyksygeldanamycyna, 2-metoksyestradiol, małocząsteczkowe białka – ligandy dla receptora kinazy tyrozynowej) [40].

Piśmiennictwo

1. Markowska J, Mądry R, Grabowski JP i wsp. Niedotlenienie w raku szyjki macicy a odpowiedź na leczenie. *Współcz Onkol* 2008; 12: 11-5.
2. Harris AL. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 38-47.
3. Brown JM. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy – Eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1999; 59: 5863-70.
4. Marples B, Greco O, Joiner MC, Scott SD. Radiogenic therapy: strategies to overcome tumor resistance. *Curr Pharmacol Design* 2003; 9: 2105-12.
5. Lunt SJ, Telfer BA, Fitzmaurice RJ, et al. Tirapazamine administered as a neoadjuvant to radiotherapy reduces metastatic dissemination. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4212-6.
6. Gray LH, Conger AD, Ebert M, et al. Concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953; 26: 638-48.
7. Malicki J, Kornafel J. Podstawy fizyczne i radiobiologiczne radioterapii. W: Markowska J (red.). *Ginekologia onkologiczna*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2006: 169-99.
8. Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; 9: 539-49.
9. DiSaia PJ, Creasman WT. *Ginekologia onkologiczna*. Wydawnictwo Czelej Sp. z o.o., Lublin 1999.
10. Song X, Liu X, Chi W, et al. Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1alpha gene. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58: 776-84.
11. Airley RE, Mobasher A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy* 2007; 53: 233-56.
12. Byrne AM, Bouchier-Haynes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005; 9: 777-94.
13. Morales C, Ribas M, Aiza G, Peinado MA. Genetic determinants of methotrexate responsiveness and resistance in colon cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 6842-7.
14. Lee JH, Sun D, Cho KJ, et al. Overexpression of human 27 kDa heat shock protein in laryngeal cancer cells confers chemoresistance associated with cell growth delay. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 37-46.
15. Szymala B, Olejek A, Bodzek P i wsp. Co wiemy o białkach szoku termicznego. *Onkol Radioter* 2008; 3: 22-34.
16. Kruszyna K, Stokłosa T. Czynniki indukowane przez hipoksję-1 (HIF-1): budowa, regulacja ekspresji, funkcja oraz rola w progresji nowotworowej. *Post Biol Kom* 2005; 32: 707-728.
17. Zieliński T, Michalski B, Belowska A, Mazurek U. Wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnałów indukowanych w drodze aktywacji VEGFR2 w angiogenym stadium rozwoju raka szyjki macicy. *Gin Onkol* 2006; 4 (supl. 1): 28-31.
18. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 425-37.
19. Oh JM, Ryoo IJ, Yang Y, et al. Hypoxia-inducible transcription factor (HIF)-1 alpha stabilization by actin-sequestering protein, thymosin beta-4 (TB4) in HeLa cervical tumor cells. *Cancer Lett* 2008; 264: 29-35.
20. Łojko A, Komarnicki M. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu w angiogenezie w chorobach nowotworowych. *Współcz Onkol* 2004; 8: 1-4.
21. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Turley H, et al. Phosphorylated KDR expression in endometrial cancer cells relates to HIF1a/VEGF pathway and unfavourable prognosis. *Mod Pathol* 2006; 19: 701-7.
22. Patel N, Gonsalves CS, Malik P, Kalra VK. *Blood* 2008; 112: 856-65.
23. Okuyama H, Krishnamachary B, Zhou YF, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 2006; 281: 15554-63.
24. Yu JX, Cui L, Zhang QY, et al. Expression of NOS and HIF-1alpha in human colorectal carcinoma and implication in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4660-4.
25. Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, et al. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2000; 157: 1537-47.
26. Fritz-Six KL, Dunworth WP, Li M, Caron KM. Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development. *J Clin Invest* 2008; 118: 40-50.
27. Gellhaus A, Schmidt M, Dunk C, et al. Decreased expression of the angiogenic regulators CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) in human placenta is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 389-99.
28. Kilic M, Kasperczyk H, Fulda S, Debatin KM. Role of hypoxia inducible factor-1 alpha in modulation of apoptosis resistance. *Oncogene* 2007; 26: 2027-39.
29. Maina EN, Morris MR, Zatyka M, et al. Identification of novel VHL target genes and relationship to hypoxic response pathways. *Oncogene* 2005; 24: 4549-58.
30. Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer* 2006; 9: 44-9.
31. Varghese A, Burness M, Xu H, et al. Site-specific gene expression profiles and novel molecular prognostic factors in patients with lower gastrointestinal adenocarcinoma diffusely metastatic to liver or peritoneum. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 3460-71.
32. Tabatabai G, Frank B, Möhle R, et al. Irradiation and hypoxia promote homing of haematopoietic progenitor cells towards gliomas by TGF-beta-dependent HIF-1alpha-mediated induction of CXCL12. *Brain* 2006; 129: 2426-35.
33. Colombo E, Marine JC, Danovi D, et al. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nature Cell Biol* 2002; 4: 529-33.
34. del Casar JM, Corte MD, Alvarez A et al. Lymphatic and/or blood vessel invasion in gastric cancer: relationship with clinicopathological parameters, biological factors and prognostic significance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 153-61.
35. Lee MY, Chou CY, Tang MJ, Shen MR. Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4743-50.
36. Gius D, Funk MC, Chuang EY, et al. Profiling microdissected epithelium and stroma to model genomic signatures for cervical carcinogenesis accommodating for covariates. *Cancer Res* 2007; 67: 7113-23.
37. Tsunedomi R, Iizuka N, Tamesa T, et al. Decreased ID2 promotes metastatic potentials of hepatocellular carcinoma by altering secretion of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1025-31.
38. Airley RE, Mobasher A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy* 2007; 53: 233-56.
39. Melillo G. Targeting hypoxia cell signaling for cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 341-52.
40. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-32.

41. Kong D, Park EJ, Stephen AG, et al. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res* 2005; 65: 9047-55.
42. Olenyuk BZ, Zhang GJ, Klco JM, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor with a sequence-specific hypoxia response element antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 16768-73.
43. Kung AL, Zabudoff SD, France DS, et al. Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer Cell* 2004; 6: 33-43.
44. Puppo M, Battaglia F, Ottaviano C, et al. Topotecan inhibits vascular endothelial growth factor production and angiogenic activity induced by hypoxia in human neuroblastoma by targeting hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α . *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1974-84.