

Terapia antyangiogenna jest jedną z intensywnie badanych metod leczenia chorób nowotworowych. Polega na zahamowaniu wzrostu guza nowotworowego i przerzutów poprzez zablokowanie tworzenia nowych naczyń okołotworowych. Lek antyangiogeny to inhibitor angiogenezy hamujący proliferację komórek śródbłonkowych, migrację lub etap rekonstrukcji naczyń krwionośnych. Większość czynników antyangiogennych jest dobrze tolerowana, nie indukuje oporności oraz wykazuje działanie cytostatyczne.

Jedną z badanych grup inhibitorów angiogenezy stanowią proteolityczne fragmenty białek endogennych, z których najlepiej zbadanymi są angiostatyna i endostatyna. W badaniach przedklinicznych wszystkie antyangiogenne polipeptydy silnie hamowały proces angiogenezy oraz wzrost różnych typów nowotworów. Zaobserwowano również zwiększoną skuteczność, gdy czynniki te łączono z radioterapią lub chemioterapią oraz gdy stosowano dwa inhibitory jednocześnie.

Obecnie w fazie badań klinicznych znajduje się ponad 75 czynników antyangiogennych, z czego ponad 20 stanowią endogenne inhibitory angiogenezy. Dotychczasowe badania ujawniły wiele problemów związanych z oceną tych potencjalnych leków. Trudności sprawia wykazanie ich aktywności *in vivo* (określenie tzw. punktu końcowego, oznaczenie maksymalnej dawki), ocena skuteczności w leczeniu chorób nowotworowych oraz dobranie odpowiedniego schematu terapii. Pomimo wysokiej skuteczności w hamowaniu wzrostu nowotworów doświadczalnych, większość czynników antyangiogennych nie wykazywała podobnej aktywności przeciwnowotworowej w badaniach klinicznych. Przypuszcza się, że rozbieżności te wynikają głównie z niedoskonałości modelu zwierzęcego oraz z faktu, że w fazie klinicznej leki antyangiogenne badane są na niejednorodnych grupach pacjentów w stadium zaawansowanej choroby nowotworowej. W świetle uzyskanych wyników wydaje się, że czynniki antyangiogenne mogą być stosowane przede wszystkim w zapobieganiu rozwojowi choroby nowotworowej oraz we wspomaganiu terapii cytotoksycznych. W pracy tej przedstawiono wyniki badań terapeutycznych najważniejszych polipeptydowych czynników antyangiogennych, uzyskane w fazie przedklinicznej oraz omówiono problemy i perspektywy terapii antyangiogennej

Słowa kluczowe: angiogeneza, terapia antyangiogenna, proteolityczne fragmenty białek, polipeptydy antyangiogenne.

Białkowe inhibitory angiogenezy w terapii nowotworów

Protein inhibitors of angiogenesis in cancer therapy

Magdalena Olbryt, Stanisław Szala

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

Wstęp

Ponad 30 lat temu Judah Folkman [1] przedstawił hipotezę, że wzrost guzów nowotworowych zależy od wytworzenia własnej sieci naczyń krwionośnych. Hipoteza ta stała się podstawą terapii antyangiogennej. Celem tej strategii jest zahamowanie wzrostu guza poprzez zablokowanie procesu angiogenezy. Angiogeneza, inaczej neowaskularyzacja, to proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych z już istniejących, regulowany czynnikami proangiogennymi i antyangiogennymi. W zależności od tego, która grupa czynników dominuje, ma miejsce indukcja angiogenezy lub jej zahamowanie [1].

Dotychczas zbadano ok. 370 inhibitorów angiogenezy, z czego część stanowią proteolityczne fragmenty większych białek [2]. Najbardziej znane czynniki to angiostatyna [3] i endostatyna [4]. Do grupy tej należą także m.in. wazostatyna – fragment kalretikuliny, tumstatyna, która jest C-końcowym fragmentem kolagenu IV, a także fragment prolaktyny o masie cząsteczkowej 16 kDa i fragment metaloproteazy 2 (PEX) [2]. W badaniach przedklinicznych fragmenty białek okazały się silnymi inhibitorami angiogenezy oraz wykazywały działanie przeciwnowotworowe [2, 5, 6]. Badania kliniczne ujawniły jednak wiele problemów, związanych z oceną działania czynników antyangiogennych. Ponadto angiostatyna i endostatyna nie wykazywały większej aktywności przeciwnowotworowej w I fazie badań [7, 8].

Rola białkowych czynników antyangiogennych w terapii nowotworów

Znanych jest ponad 20 endogennych czynników antyangiogennych [1, 9, 10], które dzielą się na kilka podgrup. Są to: cytokiny (interleukina-12, -18, interferon α/β), inhibitory angiogenezy (angiopoetyna-2, inhibitory metaloproteaz – TIMPs, inhibitor aktywatorów plazminogenu – PAI, antytrombina-1, IP-10, maspina), antagoniści czynników proangiogennych (rozpuszczalny receptor naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu – VEGFR-1) oraz polipeptydy antyangiogenne – proteolityczne fragmenty białek (tab. 1.).

Wszystkie antyangiogenne polipeptydy są proteolitycznymi fragmentami białek. Białka te (z wyjątkiem kalretikuliny [11]) nie mają właściwości antyangiogennych i pełnią różne funkcje w organizmie [2]. Niektóre z polipeptydów powstają w warunkach fizjologicznych i biorą udział w regulacji angiogenezy. Należą do nich: angiostatyna, endostatyna, antytrombina, tumstatyna, fragment kolagenu XV [5] i fragment metaloproteiny 2 (PEX) [12]. Wykazano, że sam guz nowotworowy może indukować powstawanie inhibitorów polipeptydowych poprzez wydzielanie lub aktywację proteaz, które biorą udział w powstaniu fragmentów antyangiogennych [2].

Wszystkie białkowe czynniki antyangiogenne hamują wzrost doświadczalnych guzów pierwotnych oraz przerzutów (tab. 2., 3.). Poprzez blokowanie różnych etapów angiogenezy, takich jak proliferacja komórek śródbłonkowych, migracja lub rekonstrukcja naczyń powodują one zahamowanie tworzenia nowych naczyń okołotworowych [2, 5, 6]. W konsekwencji wzrost

Antiangiogenic therapy is one of the most intensively studied approaches to cancer treatment. The goal of this strategy is to inhibit growth of primary tumors and metastases through blocking new blood vessels' formation in tumor mass. The antiangiogenic drug is an angiogenesis inhibitor that interferes with endothelial cell proliferation, endothelial cell migration or blood vessel tube formation. Most antiangiogenic factors exhibit cytostatic mode of action, are well tolerated and do not induce resistance.

One group of anti-angiogenic agents consists of proteolytic fragments of endogenous proteins of which the best known are angiostatin and endostatin. All antiangiogenic polypeptides strongly inhibited angiogenesis and growth of different tumor cell lines in preclinical studies. An increased efficacy of these agents was observed when combined with radiotherapy or chemotherapy as well as when two different polypeptides were delivered together. Some angiogenesis inhibitors are currently subjected to clinical trials. Such studies have revealed some obstacles with regard to evaluating the therapeutic potential of these drugs. It was difficult to assess their antiangiogenic activity *in vivo* (lack of reliable biologic end points, difficulty in determining of maximally tolerated dose), to evaluate antitumoural efficacy or setting appropriate scheduling of drugs.

In spite of high efficacy in inhibiting experimental tumours, most anti-angiogenic agents did not show similar activity in clinical trials. Presumably, this discrepancy stems mainly from imperfection of animal models and the specificity of clinical studies in which drugs are tested on heterogeneous groups of patients with advanced disease.

In view of the gathered results it seems that the anti-angiogenic agents may be used mostly to prevent progression of early-stage cancer and as adjuvant therapy combined with cytotoxic strategies.

In this paper, we present therapeutic results of most antiangiogenic polypeptides used in preclinical studies and discuss obstacles and perspectives of antiangiogenic therapy.

Key words: angiogenesis, antiangiogenic therapy, proteolytic fragments of proteins, antiangiogenic polypeptides.

Tab. 1. Proteolityczne fragmenty białek posiadające właściwości antyangiogenne [2, 5, 9, 10]

Table 1. Proteolytic fragments that inhibit angiogenesis

Nazwa czynnika	
endostatyna	C-koniec kolagenu XVIII
angiostatyna	domeny K1-4 plazminogenu
K5	domena K5 plazminogenu
K1-5	domeny K1-5 plazminogenu
p22	domena K1 plazminogenu
K1-3	domeny K1-3 plazminogenu
tumstatyna	C-koniec kolagenu IV (łańcuch $\alpha 3$)
Tum5	fragment tumstatyny
aresten	C-koniec kolagenu IV (łańcuch $\alpha 1$)
kanstatyna	C-koniec kolagenu IV (łańcuch $\alpha 2$)
restyna	C-koniec kolagenu XV
wastatyna	C-koniec kolagenu VIII
fragment PF4	C-koniec czynnika płytkowego 4
wazostatyna	N-koniec kalretikuliny
PEX	fragment MMP2
16K prolaktyna	N-koniec prolaktyny o masie 16 kDa
fragment urokinazowego aktywatora plazminogenu PA	

guza zostaje zahamowany, a przerzuty pozostają w stanie *uśpienia*.

W doświadczeniach przedklinicznych obserwowano zahamowanie różnych typów nowotworów, gdy podawano zwierzętom zrekombinowane białka antyangiogenne, podczas stosowania antyangiogennej terapii genowej oraz kiedy zaszczepiano zwierzęta komórkami nowotworowymi wydzielającymi dany czynnik antyangiogeny. Przykładowe wyniki przedstawiono w tab. 2. i 3.

Czynniki antyangiogenne są lekami cytostatycznymi, dla których nie obserwuje się prostej zależności uzyskanego efektu od stężenia czynnika. Jednak w niektórych doświadczeniach uzyskany efekt terapeutyczny zależał od ilości podawanego białka [4, 13], a także od czasu trwania terapii (po zaprzestaniu leczenia guz odrastał) [4], wielkości guza w momencie rozpoczęcia terapii (im mniejszy guz, tym lepsze efekty terapeutyczne [14]) oraz od typu nowotworu. Wrażliwość guza na terapię antyangiogenną może zależeć od swoistego dla danego nowotworu fenotypu angiogenego, czyli rodzaju wytwarzanych przez komórki nowotworowe czynników proangiogennych, a także od możliwości wytworzenia oporności na lek antyangiogeny [9].

Zwiększoną skuteczność terapii antyangiogennej obserwuje się w wyniku skojarzenia inhibitorów angiogenezy z radioterapią [15] lub chemioterapią [16]. Również zastosowanie dwóch czynników antyangiogennych zwiększa efekt terapeutyczny [17–19]. Grupa Weischelbauma [20] zaobserwowała synergiczny efekt radioterapii i angiostatyny w leczeniu różnych typów nowotworów. Podobny efekt uzyskano podczas podawania cisplatyny i fragmentu aktywatora plazminogenu uPa, peptydu Å6 o właściwościach antyangiogennych [21]. Przypuszcza się, że czynniki antyangiogenne hamują rozwój niekompletnych naczyń, *normalizują* unaczynienie guza, co prowadzi do lepszego utlenowania komórek nowotworowych i zmniejszenia ciśnienia wewnątrzmiąższowego. W ten sposób czynniki antyangiogenne zwiększają efektywność chemio- i radioterapii [22]. Zwiększoną skuteczność terapii

Tab. 2. Zestawienie właściwości antynowotworowych niektórych białkowych czynników antyangiogennych (badania przedkliniczne)
Table 2. Antitumoural properties of protein antiangiogenic factors (preclinical studies)

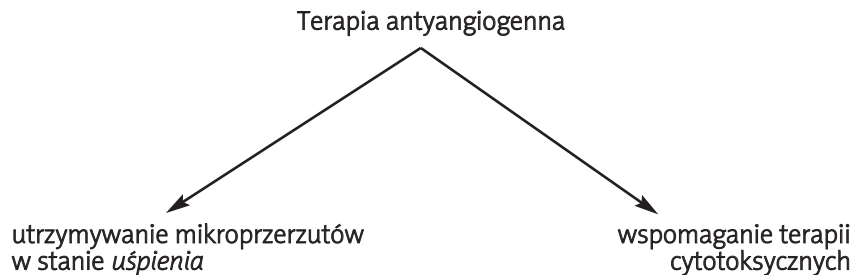
Czynnik	Linia nowotworowa	Proc. zahamowania guzów pierwotnych	Piśmiennictwo
kanstatyna	ludzki rak nerki	70 proc.	[34]
	ludzki rak prostaty	60 proc.	
wazostatyna	ludzki rak jelita grubego	50 proc.	[13]
	chłoniak Burkitta	62 proc.	
tumstatyna	ludzki rak prostaty	50 proc.	[35]
	ludzki rak nerki	50 proc.	
endostatyna	mysi włóknakiomięśniak, czerniak myszy, myszy śródbłoniak naczyń krwionośnych	99 proc., 97 proc.	[4]
	szczurzy rak sutka	70 proc.	[36]
	ludzki rak jajnika	40 proc.	[17]
	szczurzy glejak	71 proc.	[37]
angiostatyna	mysi rak płuc, włóknakiomięśniak, chłoniak	81-87 proc.	[3]
	ludzki rak prostaty, jelita grubego, sutka	99 proc., 97 proc., 95 proc.	[3]
	mysi rak płuc	85 proc.	[3]
	mysi śródbłoniak naczyń krwionośnych	92 proc.	[39]
	mysi rak płuc	40 proc. 90 proc. (przerzuty)	[38]
	ludzki rak jajnika	60 proc.	[17]
K1-5	włóknakiomięśniak	65 proc.	[41]
K1-3	ludzki glejak	71 proc.	[40]
16k PRL	ludzki rak jelita grubego	63 proc.	[42]

Tab. 3. Wybrane białkowe czynniki antyangiogenne w terapii genowej (badania przedkliniczne)
Table 3. Selected protein antiangiogenic factors in gene therapy (preclinical studies)

Czynnik	Linia nowotworowa	Proc. zahamowania guzów pierwotnych	Piśmiennictwo
wazostatyna	mysi włóknakiomięśniak	80 proc.	[43]
	mysi rak płuc	60 proc.	
mysia endostatyna	mysi rak nerki	95 proc. (u 4 z 5 myszy brak guza przez 100 dni)	[44]
	mysi rak sutka	65 proc.	[45]
	ludzki rak sutka	49 proc.	[46]
angiostatyna	szczurzy glejak	80 proc.	[48]
	ludzki rak sutka	85 proc.	[48]
	ludzki rak sutka	30 proc.	[46]
	rak sutka	85 proc. (100 proc. zahamowanie przerzutów)	[47]
	ludzki glejak glioblastoma	75 proc.	[49]

antyangiogennej obserwuje się również podczas stosowania dwóch czynników antyangiogennych razem, np. angiostatyna + endostatyna [17], wazostatyna + interleukina-12 [19] czy białko 10 indukowane interferonem z wazostatyną [18], a także w połączeniu z innymi strategiami terapeutycznymi, np. tzw. antysensami (np. endostatyna + oligonukle-

tyd hamujący ekspresję receptora naskórkowego czynnika wzrostu – EGF) [23]. W przypadku łączenia dwóch lub więcej czynników, efektu addycji lub synergii należy się spodziewać wyłącznie, gdy inhibitory działają na różne etapy tworzenia naczyń lub gdy mają różne mechanizmy działania [24].



Ryc. 1. Założenia terapii antyangiogennej

Fig. 1. Basic concepts of antiangiogenic therapy

Problemy i perspektywy terapii antyangiogennej

W różnych fazach badań klinicznych znajduje się ponad 75 czynników antyangiogennych [9]. Wyłoniły się podczas nich dwa problemy: trudności w ocenie aktywności inhibitorów angiogenezy jako leków przeciwnowotworowych oraz niska skuteczność czynników antyangiogennych w leczeniu zaawansowanych stadiów choroby nowotworowej.

Dlaczego trudno jest badać czynniki antyangiogenne?

Ze względu na cytostatyczny charakter leków antyangiogennych badanie ich nie jest zadaniem łatwym. Białkowe czynniki antyangiogenne są bardzo dobrze tolerowane i podczas ich stosowania nie obserwuje się większych efektów ubocznych [25]. Trudno jest określić maksymalną dopuszczalną dawkę. Nie obserwuje się ponadto znaczącego wpływu dawek czynnika antyangiogennego na uzyskany efekt terapeutyczny [7]. Większość czynników antyangiogennych stabilizuje wzrost nowotworu dopiero po dłuższym czasie stosowania terapii, dlatego nie można określić skuteczności leku dokonując tylko pomiaru wielkości guza. Z tego względu jako efekty końcowe dla terapii antyangiogennej przyjmuje się unaczynienie guza [25], a także pomiar stężenia niektórych markerów angiogenezy we krwi, takich jak poziom VEGF, E-selektyny, czy VCAM-1 (molekuła adhezyjna-1 komórki naczyniowej) [1]. Wydaje się, że oznaczanie ilości komórek śródbłonkowych rozsiewanych do krwiobiegu z naczyń okołonowotworowych może być także wskaźnikiem skuteczności terapii [9].

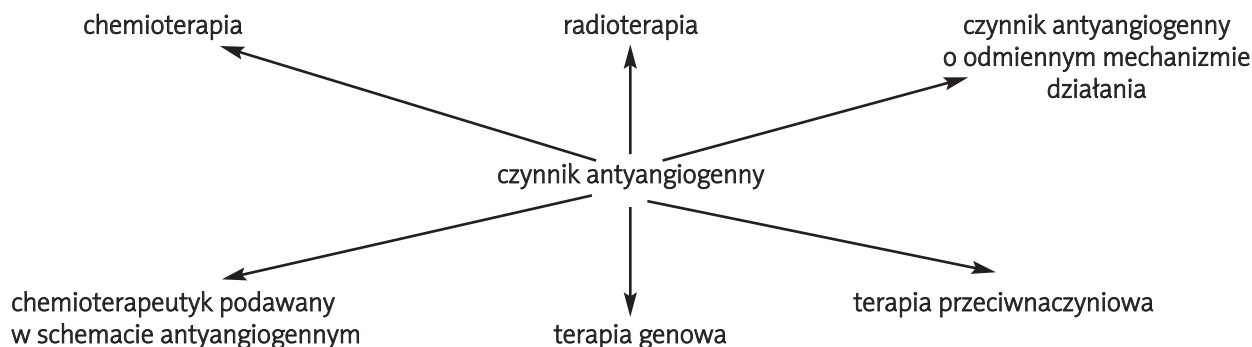
Ze względu na konieczność ciągłego podawania leku istotne jest ustalenie schematu terapii, który uwzględniałby zarówno właściwości farmakokinetyczne czynnika (np. okres półtrwania we krwi), jak i typ nowotworu, stadium choroby oraz fenotyp angiogeny guza danego pacjenta, który zależy zarówno od jego typu, jak i stadium progresji [26, 31]. Aby ocenić skuteczność leków antyangiogennych pacjenci powinni być dobierani pod kątem typu nowotworu, stadium choroby oraz fenotypu angiogenego.

Problemem jest także niska skuteczność terapii antyangiogennej w leczeniu zaawansowanych nowotworów. Mimo iż endostatyna i angiostatyna w badaniach przedklinicznych na modelach zwierzęcych silnie hamowały wzrost różnych

typów nowotworów (tab. 2., 3.), to jednak nie wykazywały podobnej skuteczności w I fazie badań klinicznych [7, 8].

Dlaczego dotychczasowe wyniki badań klinicznych nie pokrywają się z rezultatami eksperymentów na zwierzętach?

Próbując wyjaśnić te rozbieżności, zwraca się uwagę na kilka aspektów. Pierwszy to trudności w interpretowaniu wyników badań aktywności leków antyangiogennych uzyskanych na zwierzęcych modelach ludzkich nowotworów. Przypuszcza się, że mysie naczynia krwionośne w guzie pochodzenia ludzkiego, w obcym środowisku, mogą być bardziej podatne na terapię antyangiogenną [1]. Cao [26] zwraca uwagę na różnice w budowie między nowotworami doświadczalnymi a ludzkimi. Nowotwory przeszczepiane zwierzętom są rosnącymi szybko guzami, zbudowanymi z jednakowych komórek. Natomiast ludzkie nowotwory spontanicznie rosną wolno i składają się z niejednorodnych pod względem genetycznym komórek nowotworowych, które mogą wytwarzać różne czynniki proangiogenne [26]. Zablockowanie jednego z czynników proangiogennych może nie wystarczać, aby zahamować proces angiogenezy. Yu i wsp. [27] wykazali natomiast zmniejszoną wrażliwość na terapię antyangiogenną nowotworów z nieaktywnym genem p53. Pokazali, że komórki te są prawie całkowicie odporne na apoptozę, czyli proces kontrolowanej śmierci, indukowaną stanem hipoksji [27]. Problem stanowi również badanie tych leków u chorych z zaawansowaną chorobą nowotworową. Na tym etapie choroby angiogeneza nie odgrywa już decydującej roli, ponieważ doszło do rozsiewu i rozwoju przerzutów. Wydaje się, że terapia antyangiogenna może być bardziej korzystna dla pacjentów z niezaawansowaną chorobą nowotworową lub uznawanych za wyleczonych, ale z potencjalnym ryzykiem nawrotu choroby i rozwoju przerzutów (np. stadium IIIa raka płuc lub czerniaka). Przypuszczenia te potwierdzają doświadczenia przedkliniczne, w których obserwowano najwyższą skuteczność inhibitorów angiogenezy, gdy były podawane w stadium początkowym choroby, czyli przejścia guza nieunaczynionego do etapu guza unaczynionego [14]. Niska skuteczność czynników antyangiogennych może się również wiązać z działaniem czynników antyangiogennych tylko na jeden z wielu wydzielanych przez guz czynników proangiogennych. Zahamowanie jednego z nich, np. poprzez przeciw-



Ryc. 2. Kombinacja terapii antyangiogennej z innymi strategiami terapeutycznymi
Fig. 2. Antiangiogenic therapy combined with other therapeutic strategies

ciała, może być kompensowane nadekspresją innych podobnie działających czynników, co w konsekwencji prowadzi do wytworzenia oporności na dany czynnik. Oporność na leki antyangiogenne indukujące apoptozę w komórkach śródbłonkowych (głównie czynniki białkowe, inhibitory kinazy tyrozynowej i integryn) może być również spowodowana ekspresją w tych komórkach innych receptorów lub nadekspresją wewnątrzkomórkowych czynników antyapoptycznych, np. białka surwiwiny [9].

Perspektywy terapii antyangiogennej

W świetle dotychczasowych badań wydaje się, że terapia antyangiogenna może być stosowana jako strategia zapobiegająca rozwojowi choroby oraz wspomagająca strategie cytotoksyczne (ryc. 1.).

Białkowe czynniki antyangiogenne mogą być skuteczne w zapobieganiu nawrotowi choroby lub rozwojowi przerzutów u pacjentów po zabiegu chirurgicznym, u których pomimo braku objawów istnieje ryzyko nawrotu i występowania niewykrywalnych, małych ognisk przerzutowych. Taka terapia miałaby charakter chroniczny, a leki musiałyby być podawane w odpowiednich kombinacjach i schemacie dostosowanym indywidualnie do danego typu nowotworu oraz pacjenta, aby zwiększyć skuteczność terapii oraz zapobiec indukowaniu oporności. Konieczność indywidualizacji terapii jest podyktowana zróżnicowaniem guzów nowotworowych pomiędzy poszczególnymi pacjentami. Wynika to ze wspomnianego wcześniej specyficznego fenotypu angiogenego guza oraz tzw. mikrośrodowiska guza, na które składają się komórki nowotworowe, prawidłowe (fibroblasty, komórki śródbłonkowe, komórki układu immunologicznego) oraz macierz pozakomórkowa [26, 28, 29, 31]. Przewagę nad terapią monolekową miałyby stosowanie kombinacji leków o odmiennych mechanizmach działania (większa skuteczność i mniejsze prawdopodobieństwo indukcji oporności). Ze względu na ciągłość terapii leki antyangiogenne musiałyby być bardzo dobrze tolerowane, nawet przy dłuższym podawaniu w wysokiej dawce.

Warto wspomnieć także o tzw. chemioterapii antyangiogennej. Strategia ta polega na częstszym niż w schemacie klasycznym podawaniu chemioterapeutyku (paklitaksel, cy-

klofosamid, doksorubicyna, winkrystyna) w mniejszej dawce nietoksycznej dla komórek nowotworowych, natomiast działającej cytotoksycznie na komórki śródbłonkowe [30]. Taki schemat podawania pozwala zapobiec indukowaniu chemooporności oraz zmniejszyć efekty uboczne obserwowane podczas stosowania maksymalnej dawki w chemioterapii konwencjonalnej.

W przypadku bardziej zaawansowanych stadiów choroby nowotworowej terapia antyangiogenna może stanowić element wspomagający, zwiększający skuteczność strategii tradycyjnych, takich jak radioterapia i chemioterapia oraz nowszych, jak immunoradioterapia (ryc. 2.). Pewnym rozwiązaniem dla kosztownej terapii białkowej może być antyangiogenna terapia genowa. Skuteczna terapia genowa nie tylko znacznie ograniczyłaby koszty leczenia, ale również zapewniłaby ciągłą obecność terapeutycznego czynnika we krwi [6]. Terapia antyangiogenna może być także skojarzona z lekami lub genami przenoszonymi za pomocą nośników swoiście rozpoznających komórki nowotworowe lub śródbłonkowe naczyń okołonowotworowych (terapia przeciwnacyniowa). Dotychczasowe wyniki badań przedklinicznych wskazują na dużą skuteczność tych strategii [32, 33].

Piśmiennictwo

1. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic Inflammation. *Pharmacol Reviews* 2000; 52: 237-68.
2. Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 357-69.
3. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Medicine* 1996; 12: 689-92.
4. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-85.
5. Marneros AG, Olsen BR. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol* 2001; 20: 337-45.
6. Tandle A, Blazer DG 3rd, Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *J Transl Med* 2004; 2: 22.
7. Thomas JP, Arzooanian RZ, Alberti D, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2003; 21: 223-31.

8. Beerepoot LV, Witteveen EO, Groenewegen G, et al. Recombinant human angiostatin by twice-daily subcutaneous injection in advanced cancer: a pharmacokinetic and long-term safety study. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4025-33.
9. Scappaticci FA. Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3906-27.
10. Luttun A, Auterio M, Tjewa M, Carmeliet P. Genetic dissection of tumor angiogenesis: are PIGF and VEGFR-1 novel anti-cancer targets? *Biochim Biophys Acta* 2004; 1654: 79-94.
11. Coppolino MG, Woodside MJ, Demaurex N, Grinstein S, et al. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* 1997; 386: 843-7.
12. Brooks PC, Stilletti S, Von Schalscha TL, et al. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 1998; 92: 391-400.
13. Pike SE, Yao L, Jones KD, et al. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* 1998; 188: 2349-26.
14. Bergers G, Javaherian K, Lo K-M, et al. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 1999; 284: 808-11.
15. Greenberg JS. Antitumor Interactions of Short Course Endostatin and Ionizing Radiation. *Cancer J* 2000; 6: 279-81.
16. Kakeji Y, Teicher BA. Preclinical studies of the combination of angiogenesis inhibitors with cytotoxic agents. *Invest New Drugs* 1997; 15: 39-48.
17. Yokoyama Y, Dhanabal M, Griffioen AW, et al. Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth. *Cancer Res* 2000; 60: 2190-6.
18. Yao L, Pike SE, Pittaluga S, et al. Anti-tumor activities of the angiogenesis inhibitors interferon-inducible protein-10 and the calreticulin fragment vasostatin. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 358-66.
19. Yao L, Pike SE, Setsuda J, et al. Effective targeting of tumor vasculature by the angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin-12. *Blood* 2000; 96: 1900-5.
20. Mauceri HJ, Hannan NN, Beckett MA, et al. Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumor therapy. *Nature* 1998; 394: 287-91.
21. Mishima K, Mazar AP, Gown A, et al. A peptide derived from the non-receptor-binding region of urokinase plasminogen activator inhibits glioblastoma growth and angiogenesis in vivo in combination with cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2000; 97: 8484-9.
22. Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 159-67.
23. Li M, Ye C, Feng Ch, et al. Enhanced antiangiogenic therapy of squamous cell carcinoma by combined endostatin and epidermal growth factor receptor – antisense therapy. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3570-8.
24. Cline EJ, Biccato S, DiBello C, Lingen MW. Prediction of in vivo synergistic activity of antiangiogenic compounds by gene expression profiling. *Cancer Res* 2002; 62: 7143-8.
25. Herbst RS, Mullani NA, Davis DW, et al. Development of biologic markers of response and assessment of antiangiogenic activity in a clinical trial of human recombinant endostatin. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3804-14.
26. Cao Y. Antiangiogenic cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 139-45.
27. Yu JL, Rak JW, Coomber BL, et al. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science* 2002; 295: 1526-8.
28. Radisky D, Hagios C, Bissell MJ. Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 87-95.
29. Ahmad SA, Jung YD, Liu W, et al. The role of the microenvironment and intercellular cross-talk in tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 105-12.
30. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 1878-86.
31. Bamias A, Dimopoulos MA. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. *Eur J Intern Med* 2003; 14: 459-69.
32. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998; 279: 377-80.
33. Hood JD, Bednarski M, Frausto R, et al. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* 2002; 296: 2404-7.
34. Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, et al. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem* 2000; 275: 1209-15.
35. Maeshima Y, Kolorado PC, Torre A, et al. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem* 2000; 275: 21340-8.
36. Perletti G, Concari P, Giardini Ret al. Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. *Cancer Res* 2000; 60: 1793-6.
37. Peroulis I, Jonas N, Saleh M. Antiangiogenic activity of endostatin inhibits C6 glioma growth. *Int J Cancer* 2002; 97: 839-45.
38. Kim Lee Sim B, O'Reilly MS, Liang H, et al. A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1329-34.
39. Lannutti BJ, Gately ST, Quevedo ME, et al. Human angiostatin inhibits murine hemangioendothelioma tumor growth in vivo. *Cancer Res* 1997; 57: 5277-80.
40. Joe Y-A, Hong Y-K, Chung D-S, et al. Inhibition of human malignant glioma growth in vivo by human recombinant plasminogen kringle 1-3. *Int J Cancer* 1999; 82: 694-9.
41. Cao R, Wu H-L, Veitonmäki N, et al. Suppression of angiogenesis and tumor growth by the inhibitor K1-5 generated by plasmin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1999; 96: 5728-33.
42. Bentzien F, Struman I, Martini J-F, et al. Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1^{-/-} mice. *Cancer Res* 2001; 62: 7356-62.
43. Xiao F, Wei Y, Yang L, et al. A gene therapy for cancer based on the angiogenesis inhibitor, vasostatin. *Gene Therapy* 2002; 9: 1207-13.
44. Szary J, Szala S. Intra-tumoral administration of naked plasmid DNA encoding mouse endostatin inhibits renal carcinoma growth. *Int J Cancer* 2001; 91: 835-9.
45. Ding I, Sun JZ, Fenton B, et al. Intratumoral administration of endostatin plasmid inhibits vascular growth and perfusion in MCa-4 murine mammary carcinomas. *Cancer Res* 2001; 61: 526-31.
46. Chen Q-R, Kumar D, Stass SA, Mixson J. Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59: 3308-12.
47. Sacco MG, Caniatti M, Catò EM, et al. Liposome-delivered angiostatin strongly inhibits tumor growth and metastatization in a transgenic model of spontaneous breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 2660-5.
48. Griscelli F, Li H, Bennaceur-Griscelli A, et al. Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1998; 95: 6367-72.
49. Tanaka T, Cao Y, Folkman J, Fine HA. Viral vector-targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res* 1998; 58: 3362-9.

Adres do korespondencji

Magdalena Olbryt

Zakład Biologii Molekularnej
Centrum Onkologii – Instytut
im. M. Skłodowskiej-Curie
Oddział w Gliwicach
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-101 Gliwice
tel. +48 32 278 96 16
faks +48 32 231 35 12
e-mail: molbryt@io.gliwice.pl

Praca została sfinansowana z grantu Nr 6 P05A 062 21