

Antyangiogenna terapia genowa wykorzystuje geny kodujące białka ograniczające powstawanie nowych naczyń krwionośnych. W wypadku chorób nowotworowych stosowanie preparatów genowych antyangiogennych sprowadza się do prób ograniczenia wzrostu nowotworu poprzez blokowanie angiogenezy w guzie nowotworowym, zgodnie z dogmatem, że unaczynienie nowotworu jest czynnikiem bezpośrednio determinującym jego wzrost i tworzenie przerzutów. Zastosowany w pracy plazmidowy konstrukt psFLT-1 jest niewirusowym wektorem ekspresyjnym, kodującym rozpuszczalną formę receptora naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGFR1 (sFLT-1). Gen *sFLT-1* koduje część zewnątrzkomórkową receptora VEGFR1, która efektywnie blokuje aktywność angiogenną białka VEGF. Badania przedstawione w niniejszej pracy wykonano na zwierzętach laboratoryjnych zaszczepionych podskórnie lub dootrzewnowo komórkami mysiego mięsaka L1, oraz uzyskanymi w warunkach hodowli komórkowej transfektantami L1/psFLT-1 i L1/pVEGF. U badanych zwierząt oceniano wpływ plazmidu psFLT-1 na proces angiogenezy oraz wzrost nowotworów. Przeprowadzone badania wykazały, że plazmid psFLT-1 efektywnie hamuje, zarówno w teście angiogenezy skórnej, jak i matrigelowej, indukowany przez naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu proces angiogenezy. Wykazano również, iż wektor psFLT ogranicza wzrost podskórnych guzów L1 u zwierząt oraz wydłuża czas przeżycia zwierząt z wewnątrzotrzewnowym nowotworem L1. Na podstawie badań eksperymentalnych rozważono możliwość wykorzystania preparatu genowego psFLT-1 w klinice chorób nowotworowych. Obecnie wektor psFLT-1 jest wykorzystywany w prowadzonej w Centrum Onkologii-Instytucie w Warszawie próbie klinicznej antyangiogennej terapii genowej pacjentek chorych na raka sutka.

Słowa kluczowe: terapia genowa, angiogeneza, sFLT-1, nowotwory.

Plazmidowy wektor ekspresyjny kodujący receptor sFLT-1 (psFLT-1) ogranicza angiogenezę i wzrost guzów L1

Plasmid expression vector encoding sFLT-1 receptor (psFLT-1) inhibits angiogenesis and L1 tumour growth

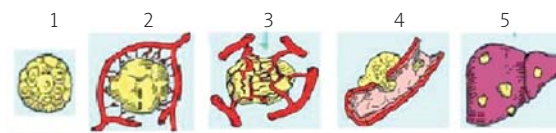
Maciej Małecki^{1,2}, Katarzyna Gromek², Małgorzata Przybyszewska¹, Przemysław Janik¹

¹Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa

²Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna, Warszawa

Wprowadzenie: angiogeneza i antyangiogenna terapia genowa

Proces powstawania naczyń krwionośnych – angiogeneza – obok nieprzeconionej funkcji fizjologicznej, obserwowanej np. podczas embriogenezy, gojenia ran, cyklu menstruacyjnego, warunkuje przebieg wielu procesów patologicznych, takich jak wzrost nowotworów i powstawanie przerzutów czy chorób o podłożu reumatycznym [1]. Angiogeneza (ryc. 1) jest krytycznym procesem wpływającym na wzrost nowotworów, np. przyjmuje się, że guzy lite bez sieci powstających naczyń krwionośnych nie są w stanie przekroczyć wielkości kilku mm³ [2]. Proces angiogenezy nowotworów jest wieloetapowy i złożony, jest wypadkową działania czynników pobudzających i hamujących unaczynienie (tab. 1). Należy również podkreślić fakt, że angiogenezę warunkują bezpośrednio interakcje między komórkami nowotworowymi a szeroko rozumianym mikrośrodowiskiem okołotumorowym [2, 3].



angiogeneza nowotworów

Ryc. 1. Podstawowe etapy angiogenezy nowotworów: 1) guz nowotworowy jest mały (1–3 mm³), awasularny, substancje odżywcze docierają na drodze dyfuzji (etap dyfuzji); 2) powiększająca się masa indukuje proliferację/migrację komórek śródbłonkowych sąsiadujących naczyń (etap indukcji); 3) nowe, powstające naczynia krwionośne wnikają w masę nowotworu (etap infiltracji); 4) unaczyniony nowotwór – komórki nowotworowe pokonują barierę ściany naczyń, wnikają do jego światła (etap inwazji); 5) oderwane od guza pierwotnego komórki nowotworowe tworzą wtórne ogniska nowotworzenia – przerzuty, wtórnie indukując angiogenezę (etap przerzutów). W odróżnieniu od normalnych naczyń, które najczęściej mają przebieg równomierny, na całej długości mają zbliżoną średnicę i tworzą uregulowane rozgałęzienia, naczynia powstające w nowotworach mają wiele cech nietypowych. Naczynia te tworzą nietypowe rozgałęzienia, pętle. Są kręte, poszarpane i rozdęte, cechują się dużą nieszczelnością – zwiększoną przepuszczalnością i brakiem limfatycznego drenażu. Inny jest też skład błony podstawnej. W naczyniach nowotworowych występuje np. więcej kwasu hialuronowego, a mniej proteoglikanu heparano-siarczanowego niż w błonie podstawnej naczyń prawidłowych [2]

Fig. 1. Basic steps of cancer angiogenesis: 1) avascular tumour (1–3 mm³) and the role of diffusion; 2) induction stage – a tumour stimulates endothelial cells proliferation and migration; 3) infiltration stage – the new vessels infiltrate the tumour mass; 4) the tumour cells penetrate to the bloodstream – invasion stage; 5) metastasis formation

Antiangiogenic gene therapy is based on genes encoding protein factors that suppress a process of new vessels formation – angiogenesis. It is common knowledge that angiogenesis is a crucial point of the tumour growth and metastasis formation. Therefore, many new anticancer strategies and drugs are focused on the inhibition of angiogenesis. psFLT-1 is a nonviral, plasmid expression vector encoding soluble form of vascular endothelial growth factor receptor VEGFR1 (sFLT-1). *sFLT-1* gene encodes only extracellular domain of the VEGFR1 and specifically blocks proangiogenic activity of VEGF. The studies were performed on laboratory animals subcutaneously or intraperitoneally injected with mouse L1 fibrosarcoma cells or their psFLT-1 transfectants. The new vessels formation, and tumour growth, and survival time were evaluated on tested animals.

The obtained outcomes revealed that psFLT-1 expression vector efficiently inhibits pVEGF induced angiogenesis as was measured by two *in vivo* angiogenesis tests. It was also shown the inhibitory psFLT-1 effect on L1 tumour growth and survival time of the L1 intraperitoneally injected animals. The prolonged survival time of L1/psFLT-1 animals was clearly observed. Finally, the clinical application of psFLT-1 gene construct was taken under consideration. At present, psFLT-1 based antiangiogenic clinical trial is in progress in the Centre of Oncology in Warsaw.

Key words: gene therapy, angiogenesis, sFLT-1, cancer.

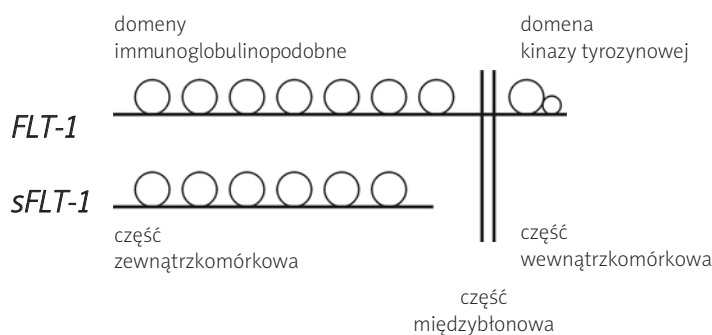
Tabela 1. Angiogeneza: czynniki angiogenne i antyangiogenne wykorzystywane w terapii genowej. VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu; FGF – fibroblastyczny czynnik wzrostu; HGF – hepatocytarny czynnik wzrostu; SDF – czynnik wzrostu pochodzący z komórek stromalnych; PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu; HIF – czynnik transkrypcyjny indukowany przez hipoksję; sFLT-1 – rozpuszczalny receptor FLT-1; VST – wazostatyna; TIMP – tkankowy inhibitor metaloproteaz; IL-12 – interleukina -12

Table 1. Angiogenesis: angiogenic and antiangiogenic factors applicable for gene therapy. VEGF – vascular-endothelial growth factor; FGF – fibroblast growth factor; HGF – hepatocyte growth factor; SDF – stromal cells-derived factor; PDGF – platelet-derived growth factor; HIF – hypoxia inducible growth factor; sFLT-1 – soluble FLT-1 receptor; VST – vasostatin; TIMP – tissue inhibitor of metalloproteinases; IL-12 – interleukin-12

Czynniki angiogenne	Czynniki antyangiogenne
VEGF	sFLT-1
FGF	VST
HGF	TIMP
SDF	IL12
PDGF	endostatyna
HIF	angiostatyna

Antyangiogenna terapia genowa jest jedną ze strategii terapeutycznych genowej terapii nowotworów. Zakłada się np., że bezpośredni, doguzowy transfer genów kodujących inhibitory angiogenezy zaburza unaczynienie i może ograniczać wzrost nowotworu [4]. Antyangiogenną terapię genową cechuje: uniwersalność – ma wpływ na różnorodne typy nowotworów; brak objawów klasycznej oporności na cytostatyki; brak efektów ubocznych; hamowanie powstawania nowych naczyń krwionośnych; hamowanie funkcji naczyń już istniejących; hamowanie wzrostu nowotworów i tworzenia przerzutów. Przeważająca część terapii antyangiogennej ukierunkowana jest na blokowanie sygnalizacji głównej cytokiny proangiogennej – naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) [4].

VEGF oddziałuje z komórkami za pomocą receptorów VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3 [5]. Receptory VEGFR-1 i VEGFR-2 posiadają wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej. Gen *VEGFR-1* (*FLT-1*) koduje nie tylko całą, pełną formę receptora FLT-1, ale również jego rozpuszczalną formę – sFLT-1 (ryc. 2.). *sFLT-1* po raz pierwszy opisano i sklonowano u człowieka [6], wkrótce jednak okazało się, iż jego obecność stwierdzono u innych ssaków i kręgowców. Wysoki stopień homologii z ludzkim *sFLT-1* (ponad 60 proc.) sugeruje, że sFLT-1 jest molekułą filogenetycznie konserwatywną [7, 8]. sFLT-1 powstaje w wyniku swoistego składania pre-mRNA genu *FLT-1*. Transkrypt *sFLT-1* koduje 6 z 7 N-terminalnych, immunoglobulinopodobnych domen, charakterystycznych dla części zewnątrzkomórkowej receptorów VEGF (ryc. 2.). W mRNA *sFLT-1*



Ryc. 2. Schemat budowy domenowej receptora FLT-1 i formy rozpuszczalnej (sFLT-1)
Fig. 2. Domain organisation of FLT-1 receptor and its soluble form (sFLT-1)

brak jest natomiast sekwencji kodującej fragment międzybłonowy oraz domenę wewnątrzkomórkową o aktywności kinazy tyrozynowej [6]. sFLT-1 wiąże wszystkie izoformy VEGFA, jest kluczowym regulatorem fizjologicznej i patofizjologicznej angiogenezy [6, 9]. Wykazano, iż wiąże on również inne cytokiny, np. PlGF, VEGFB [9]. Rozpuszczalna forma FLT-1, przez wiązanie naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu i blokowanie natywnych receptorów dla VEGF hamuje powstawanie nowych naczyń krwionośnych, ogranicza wzrost masy nowotworów litych i powstawanie przerzutów [6, 10–16]. sFLT-1 może być również wykorzystany w wielu innych stanach chorobowych determinowanych przez angiogenezę, np. w zapobieganiu wystąpieniu ślepoty pojawiającej się jako powikłanie retinopatii cukrzycowej [17–19]. Wśród mechanizmów oddziaływania sFLT-1 z VEGF i hamowania angiogenezy można wymienić:

- 1) mechanizm podstawowy, czyli wiązanie sFLT-1 z VEGF poza komórką (np. w naczyniach krwionośnych, jamie otrzewnej); powstaje nieaktywny kompleks; aktywność mitogenna VEGF wobec komórek śródbłonka zostaje zniesiona;
- 2) sFLT może również wiązać się z natywnymi komórkowymi receptorami FLT-1. Wiążąc się z częścią zewnątrzkomórkową FLT-1 (heterodimer) blokuje autofosforylację receptora i tym samym jego funkcję;
- 3) sFLT-1 może oddziaływać z formami VEGF związanymi z błoną komórkową (np. VEGF189), utrudniając tym samym interakcje między komórkami śródbłonka i komórkami stromalnymi;
- 4) sFLT-1 jako białko sekrecyjne może przedostawać się do krążenia ogólnego i wpływać na poziom aktywnego VEGF we krwi [9].

W niniejszej pracy wykorzystano niewirusowy wektor ekspresyjny, kodujący rozpuszczalną formę receptora VEGF (psFLT-1). Celem badań były próby ograniczenia angiogenezy i wzrostu guzów L1 u myszy poprzez zastosowanie genowego preparatu antyangiogenego. Praca dotyczy badań związanych z eksperymentalną terapią nowotworów wykorzystującą metody terapii genowej.

Materiał i metody

Wektor psFLT-1, białko sFLT-1

Procedurę klonowania molekularnego wektora psFLT-1 oraz przebieg otrzymywania białka sFLT-1 z stransfekowanych komórek mysiego mięsaka L1 opisano w poprzednich pracach [20, 21]. Gen *sFLT-1* amplifikowano metodą PCR na matrycy cDNA uzyskanego z komórek HUVEC, po czym wklonowano do wektora pSEC (Invitrogen) w miejsca EcoRI i XhoI. Uzyskany konstrukt psFLT-1 klonowano w bakteriach *E. coli* w obecności ampicyliny i izolowano metodą lizy alkalicznej (Endofree Giga kit, Qiagen). Obecność białka sFLT-1 w mediach hodowlanych znad stransfekowanych komórek L1 oceniano metodą Western blot.

Badania na zwierzętach laboratoryjnych

Do badań wykorzystano myszy Balb/c uzyskane w Zakładzie Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych Cen-

trum Onkologii-Instytutu w Warszawie. Każde badanie, opisane poniżej, wykonano 3-krotnie na grupie 14–21 myszy.

Test skórnej angiogenezy

Do badań wykorzystano 6–8-tygodniowe samce myszy Balb/c. Zwierzęta usypiano 3,6-proc. roztworem wodzianu chloralu i golono po obu bokach. Następnie wykonano śródskórne iniekcje wektora angiogenego kodującego VEGF165 (pVEGF) [22] (10 µg DNA/0,1 ml 0,9 proc. NaCl). Do iniekcji kontrolnych wykorzystano pusty wektor pSEC oraz 0,9 proc. roztwór NaCl. Śródskórnie podawano również komórki L1 stransfekowane wektorem pVEGF (5×10^5). Aby ułatwić wizualizację miejsca wstrzyknięcia, preparaty podbarwiano 0,1-proc. roztworem błękitu trypanu. Po 72 godz. zwierzęta uszpio preparatem Morbital, a miejsca wstrzyknięcia analizowano pod lupą (32x) – liczono nowe naczynia zgodnie z kryteriami zaproponowanymi przez Sidky'ego i Auerbacha [23].

Test angiogenezy matrigelowej

Do badań wykorzystano 6–8-tygodniowe myszy Balb/c (samce) i komórki mysiego mięsaka L1 oraz L1 stransfekowane wektorem pVEGF [22]. Komórki hodowano w pożywce Eagle'a z dodatkiem 10 proc. bydlęcej surowicy i antybiotyków (ampicylina/streptomycyna) w standardowych warunkach. Komórki zawieszano w 0,9 proc. NaCl i mieszano z matrigelem (Becton Dickinson) 1:1. Zwierzęta usypiano 3,6-proc. roztworem wodzianu chloralu, po czym wykonywano podskórne iniekcje mieszaniny matrigelowo-komórkowej do myszy (2 podania, po 6×10^5 komórek w 0,25 ml mieszaniny). Po 8 dniach myszy usypiano preparatem Morbital, wypreparowywano matrigele, które następnie ważono i rozpuszczano w odczynniku Drabkina (Sigma). Próby inkubowano w 4°C przez 24 godz., okazjonalnie wortexując, odwirowano (5 min, 10 000 rpm, w 4°C), a następnie mierzono absorbancję przy 540 nm wobec próby odczynnikowej. Z wykonanej wcześniej krzywej kalibracyjnej odczytano zawartość hemoglobiny w badanych próbach. Zawartość hemoglobiny podano w przeliczeniu na 1 g masy matrigelowej [g/g].

Iniekcja dootrzewnowa komórek nowotworowych

W badaniach wykorzystano 6–8-tygodniowe myszy Balb/c obu płci. Zwierzęta usypiano 3,6-proc. roztworem wodzianu chloralu, a następnie wykonano dootrzewnową (ip) iniekcję komórek nowotworowych linii L1 lub badanych transfektantów zawieszonych w 0,9-proc. roztworze NaCl w ilości $1-5 \times 10^5$. Wielkość powstającego wysięku oznaczano średnio co 3 dni, ważąc ciała zwierząt. Określano średni czas przeżycia zwierząt poddanych badaniom.

Iniekcja podskórna komórek nowotworowych

Do badań wykorzystano 6–8-tygodniowe myszy Balb/c obu płci. Zwierzęta usypiano 3,6-proc. roztworem wodzianu chloralu, a następnie wykonano podskórną iniekcję $1-3 \times 10^5$ /mysz komórek nietransfekowanych L1 zawieszonych w 0,9-proc. roztworze NaCl lub komórek L1 stransfekowanych badanymi preparatami genowymi. W części badań, po osiągnięciu przez guz L1 wymiaru 1–3 mm średnicy, zwierzęta otrzymywały doguzowo preparat antyangiogeny

Tabela 2. Próby ograniczenia angiogenezy śródskórnej przez konstrukt antyangiogeny psFLT-1 podany domięśniowo. Plazmid psFLT-1 podawano 13 dni (4 iniekcje po 100 µg pDNA co 3 dni) przed podaniem śródskórnym wektora angiogenego pVEGF. ^ – między grupami NaCl a psFLT-1 różnice wysoce znamienne statystycznie (test Cochran-Coxa, $p < 0,01$)

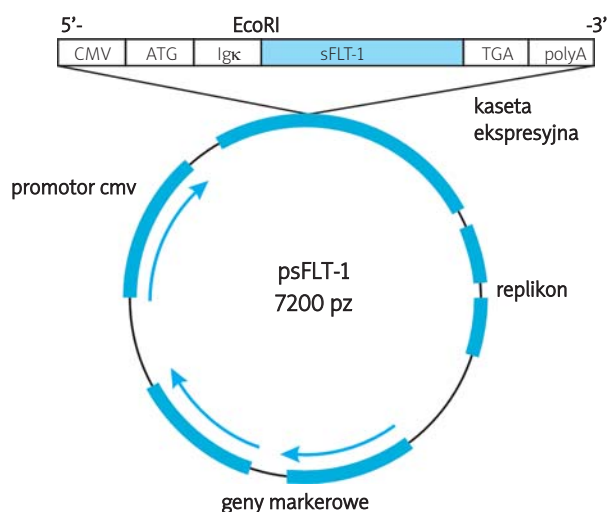
Table 2. Antiangiogenic gene therapy. psFLT-1 plasmid was injected in four times in the dose of 100 µg during 13 days before intradermal injection of the angiogenic pVEGF vector. Statistical significance between NaCl and psFLT-1 groups (Cochran-Cox test, $p < 0.01$)

domięśniowo	
NaCl [^]	psFLT-1
śródskórnym pVEGF	
liczba nowych naczyń	
14,5±3,1n=15	6,6±1,3n=14

psFLT-1 3 razy w tyg. (30 µg pDNA/0,1 ml 0,9 proc. NaCl). Wpływ wektora na wzrost nowotworu oceniano średnio co 3 dni, mierząc wielkość guza za pomocą suwmiarki. Objętość guzów określano według zależności: objętość guza [mm³] = (wymiar mniejszy)² × (wymiar większy) × 0,52.

Statystyczna analiza wyników

Wyniki badań opracowano statystycznie poprzez wyliczenie wartości średnich oraz odchyłeń standardowych. Oceny wpływu psFLT-1 na badane procesy dokonano za pomocą analizy wariancji ANOVA, testu Cochran-Coxa oraz t-Studenta dla zmiennych niezależnych. Wartość $p < 0,01$ przyjmowano za znamienne statystycznie. Analizy wpływu preparatów na przeżycie zwierząt dokonano metodą Kaplana-Meiera. Do obliczeń wykorzystano program Statistika 5,0.



Ryc. 3. Schematyczna mapa wektora ekspresyjnego psFLT-1. Gen sFLT-1 został wklonowany do wektora pSEC (Invitrogen) w miejsce EcoRI-XhoI [20]

Fig. 3. A schematic map of psFLT-1 expression vector. sFLT-1 gene was cloned into EcoRI-XhoI site of the pSEC vector (Invitrogen)

Wyniki

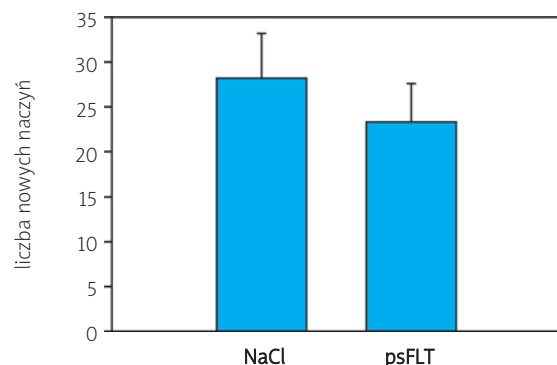
W badaniach wykorzystano sklonowany wcześniej [20] wektor ekspresyjny kodujący rozpuszczalną formę receptora VEGF – sFLT-1. Schematyczną mapę wektora przedstawiono na ryc. 3. Konstrukt psFLT-1 jest plazmidowym, niewirusowym wektorem, ekspresyjnym gen sFLT-1 pod transkrypcyjną kontrolą promotora cmv. Białko sFLT-1 jest efektywnie wydzielane poza transfekowane komórki dzięki obecności immunoglobulinowej sekwencji sekrecyjnej Igκ poprzedzającej w kasecie ekspresyjnej gen sFLT-1 (ryc. 3.).

Wpływ psFLT-1 na proces angiogenezy in vivo

Tabela 2. oraz ryc. 4. i 5. przedstawiają wyniki badań oceniających wpływ konstrukt psFLT-1 na proces angiogenezy in vivo. Badania wskazują, że wektor psFLT-1 hamuje angiogenezę indukowaną przez naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (transfekcje pVEGF165) zarówno w teście angiogenezy skórnej, jak i matrigelowej. Badania wykazały, że sFLT-1 wywiera efekt systemowy – po domięśniowym wprowadzeniu wektora psFLT-1 obserwowano zahamowanie angiogenezy skórnej i matrigelowej.

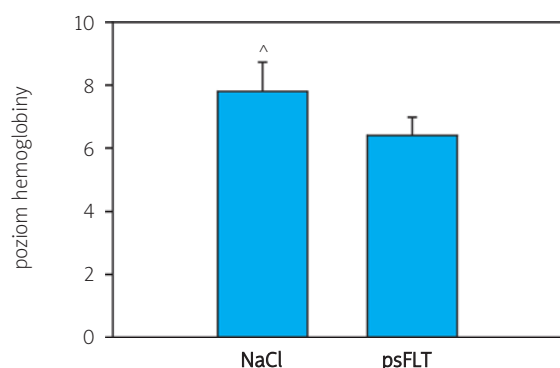
Wpływ wektora psFLT-1 na wzrost guzów nowotworowych L1

W pracy wykonano wiele badań oceniających wpływ wektora psFLT-1 na wzrost guzów L1 (podskórnych i otrzewnowych) i czas przeżycia zwierząt. Do badań wykorzystano zarówno preparat psFLT-1, jak i komórki L1 stransfekowane psFLT-1, wydzielające białko sFLT-1, co potwierdzono we wcześniejszych pracach [20, 21]. Wyniki doświadczeń przedstawiono na ryc. 6.–10. Badania wskazują, że guzy wywodzące się ze stransfekowanych psFLT-1 komórek L1 charakteryzują się, znamienne statystycznie, ograniczonym wzrostem w porównaniu z nietransfekowanymi komórkami L1 (ryc. 6.). Kon-



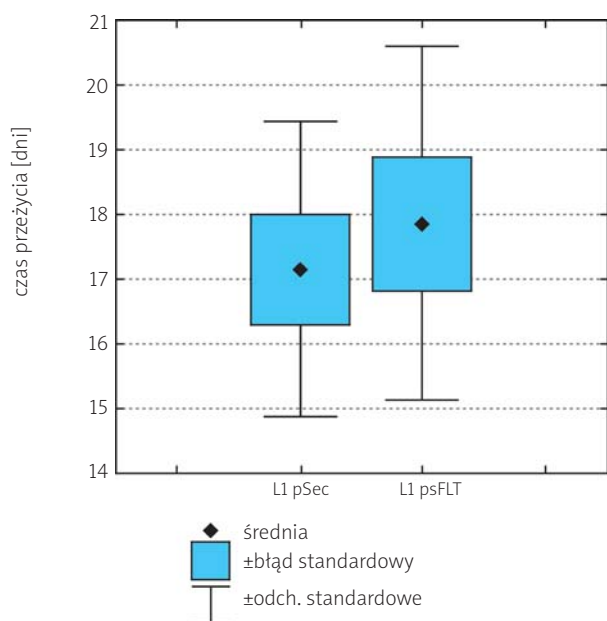
Ryc. 4. Próby systemowego ograniczenia angiogenezy śródskórnej indukowanej przez komórki L1 stransfekowane wektorem pVEGF (L1/pVEGF) poprzez domięśniowe podanie wektora psFLT. Plazmid psFLT-1 podawano 13 dni (4 iniekcje po 100 µg pDNA co 3 dni) przed podaniem śródskórnym komórek L1/pVEGF.

Fig. 4. Inhibition of L1/pVEGF induced intradermal angiogenesis by intramuscular injected psFLT-1 vector. The psFLT-1 plasmid was administered 13 days before L1/pVEGF cells injection (four injections in the dose of 100 µg pDNA, every three days)



Ryc. 5. Angiogeneza matrygelowa. Próby systemowego ograniczenia angiogenezy w guzach L1/pVEGF/matrygel poprzez domięśniowe podanie wektora psFLT-1. Podskórnie podawano komórki L1 transfekowane pVEGF (L1/pVEGF) z matrygelem, zaś domięśniowo wektor antyangiogeny psFLT. Mierzono poziom hemoglobiny (hb) w guzach matrygelowych. Między grupą *kontrolną NaCl, a psFLT różnice znamienne statystycznie ($p < 0,01$)

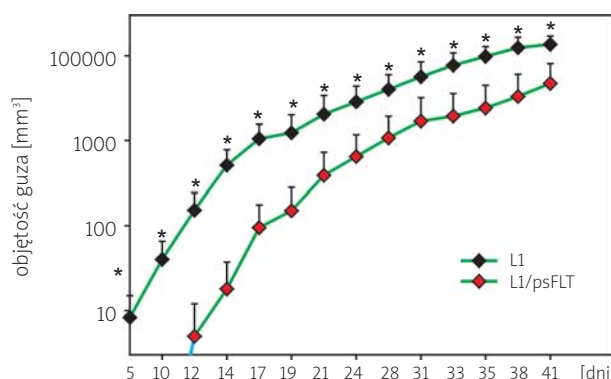
Fig. 5. Matrigel angiogenesis. Inhibition of L1/pVEGF/matrigel angiogenesis by intramuscular psFLT-1 vector injection. The L1/pVEGF transfectants mixed with matrigel were injected subcutaneously, and psFLT-1 vector was administered intramuscularly. The level of matrigel hb was measured. Statistical significance between *control NaCl group, and psFLT-1 ($p < 0.01$)



Ryc. 7. Wpływ terapii antyangiogennej na czas przeżycia zwierząt zaszczepionych ip komórkami L1. Zwierzęta otrzymywały domięśniowo wektor psFLT. Podawanie wektora rozpoczęto 2 dni przed iniekcją komórek L1 (log-rank, $p = 0,49$; $H = 0,3$, $p = 0,58$)

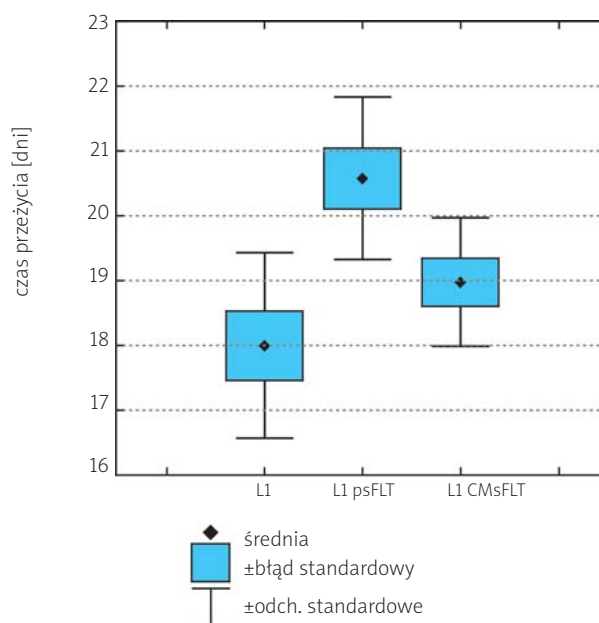
Fig. 7. Implication of antiangiogenic therapy in survival time of ip L1 injected animals. The animals were intramuscularly administered with psFLT-1 vector two days before L1 cells injection (log-rank, $p = 0.49$; $H = 0.3$, $p = 0.58$)

strukt antyangiogeny psFLT-1, podany zwierzętom domięśniowo (ryc. 7.–8.), również efektywnie wydłuża czas przeżycia zwierząt dootrzewnowo zaszczepionych komórkami L1. Podawanie medium hodowlanego bogatego w białko sFLT-1 również ogranicza ip wzrost L1 i wydłuża czas życia



Ryc. 6. Terapia antyangiogenna: wpływ wektora psFLT na wzrost guzów nowotworowych – wzrost guzów L1 i transfektantów L1/psFLT w czasie. * Różnice znamienne statystycznie między grupami w dniach: 5–17 i 33–41 ($p < 0,01$) oraz 19–31 ($p < 0,05$)

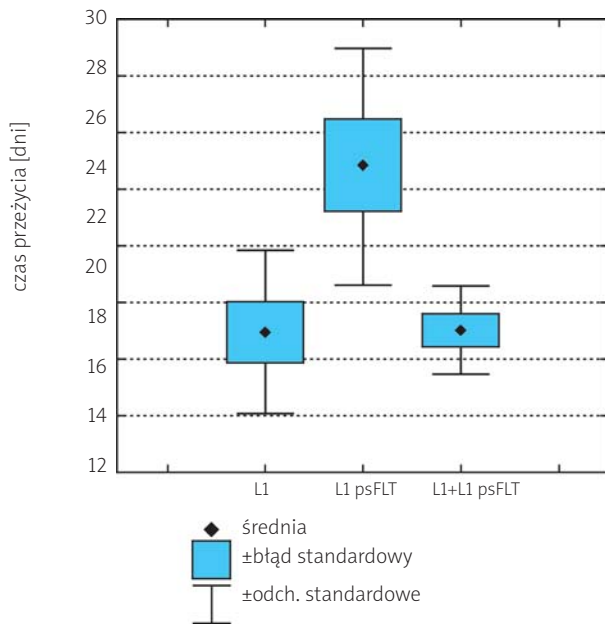
Fig. 6. Antiangiogenic therapy – application of psFLT-1 vector. Growth of L1 and L1/psFLT-1 tumours. Statistical significance between studied groups in days 5-17, and 33-41 ($p < 0.01$), and 19-31 ($p < 0.05$)



Ryc. 8. Wpływ terapii antyangiogennej na czas przeżycia zwierząt z ip nowotworem L1. Średni czas przeżycia zwierząt, którym ip podano komórki L1. Część zwierząt otrzymywała im iniekcje preparatu psFLT (L1psFLT), a część ip podania medium bogatego w białko sFLT, otrzymane in vitro z komórek transfekowanych psFLT (L1CM-sFLT) [20] ($\chi^2 = 10,22$, $p = 0,0061$; ANOVA rang K-W, $H = 10,23$, $p = 0,006$)

Fig. 8. Implication of antiangiogenic therapy in survival time of ip L1 injected animals. The part of the animals was ip administered with sFLT-1 protein isolated in vitro from the culture medium of L1/psFLT-1 cells [20] ($\chi^2 = 10.22$, $p = 0.0061$; ANOVA rang K-W, $H = 10.23$, $p = 0.006$)

zwierząt. Wyniki doświadczeń na zwierzętach potwierdzają wcześniejsze obserwacje [21] wskazujące, że sFLT-1 jest swoistym inhibitorem angiogenezy indukowanej przez VEGF. Zaszczepianie zwierząt, np. mieszaniną komórek (1:1) stransfekowanych wektorem proangiogenym pVEGF i antyangiogen-



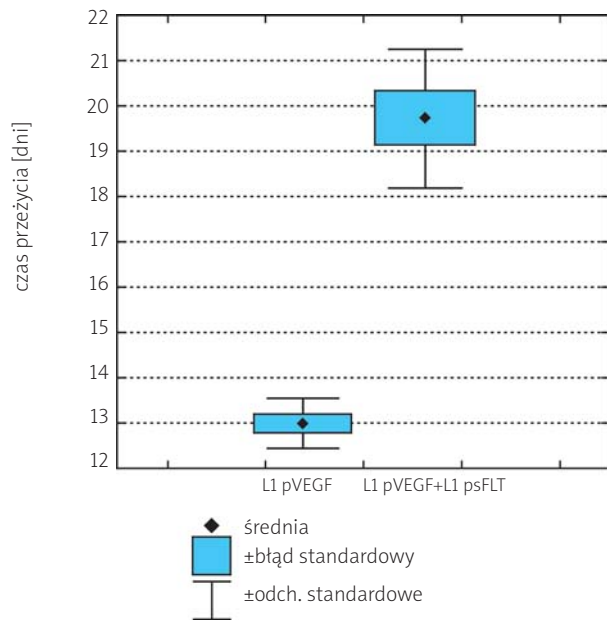
Ryc. 9. Wpływ terapii antyangiogennej na czas przeżycia zwierząt z ip nowotworem L1. Średni czas przeżycia zwierząt zaszczepionych ip niestransfekowanymi komórkami L1 oraz komórkami L1 stransfekowanymi wektorem psFLT (L1psFLT). Część zwierząt otrzymała ip łącznie komórki L1 oraz transfektanty L1psFLT (1:1) ($\chi^2=9,97$, $p=0,0069$; ANOVA rang K-W, $H=9,97$, $p=0,0068$)

Fig. 9. Implication of antiangiogenic therapy in survival time of ip L1 injected animals. The part of the animals was ip administered with L1, and L1/psFLT-1 cells in the ratio of 1:1 ($\chi^2=9.97$, $p=0.0069$; ANOVA rang K-W, $H=9.97$, $p=0.0068$)

genem psFLT-1 (ryc. 10.) znamiennej statystycznie wydłuża czas przeżycia zwierząt, zaś wektor pVEGF podany myszom śródskórnie nie indukuje angiogenezy, jeśli myszy wcześniej zaszczepiono domięśniowo (tab. 2.) lub również śródskórnie wektorem psFLT-1.

Dyskusja

Białko sFLT-1 jest fizjologicznym, negatywnym regulatorem procesów angiogenicznych [6–9]. Wykazano, że pełni ono funkcję regulacyjną w czasie tworzenia naczyń krwionośnych w okresie embrionalnym. W czasie ciąży szczególnie trofoblast silnie ekspresuje sFLT-1 wpływając na funkcje biologiczne VEGF (angiogeneza, przepuszczalność naczyń) [7]. Schemat domenowej budowy sFLT-1 przedstawia ryc. 2. Badania wskazują, że w wiązaniu VEGF biorą udział przede wszystkim dwie pierwsze pętle immunoglobulinopodobne nr 1 i 2 [9], choć wiadomo również, iż domena nr 3 warunkuje wysokie powinowactwo receptora do ligandów, zaś domena nr 4 jest niezbędna do dimeryzacji receptora [9]. Wykazano, że oddziaływanie między VEGF a pierwszymi domenami sFLT-1 mają charakter hydrofobowy, przy czym wskazuje się, że powinowactwo rekombinowanych form sFLT-1 do VEGF jest znacznie wyższe niż form VEGFR-2. Klonowanie wektorów kodujących formy receptora FLT-1, różne niż trzydomenowa postać natywnego receptora FLT-1, ma na celu konstruowanie skutecznych narzędzi do prób terapii genowej, np. chorób nowotworowych [6, 9]. Badania eksperymentalne, jak również pierwsze próby kliniczne antyangi-



Ryc. 10. Wpływ terapii antyangiogennej na czas przeżycia zwierząt z ip nowotworem L1. Średni czas przeżycia zwierząt zaszczepionych ip: komórkami L1 stransfekowanymi wektorem pVEGF (L1pVEGF) oraz łącznie: transfektantami L1pVEGF i L1psFLT (L1pVEGF + L1psFLT; 1:1) (log-rank 2,8, $p=0,0051$; ANOVA rang K-W, $H=10,37$, $p=0,0013$)

Fig. 10. Implication of antiangiogenic therapy in survival time of ip L1 injected animals. The animals were injected with L1/pVEGF, and the combination of L1/pVEGF and L1/psFLT-1 in the ratio of 1:1 (log-rank 2.8, $p=0.0051$; ANOVA rang K-W, $H=10.37$, $p=0.0013$).

gennej terapii genowej, wykorzystujące konstrukty genowe psFLT-1 wskazują, że kodowane białka poprzez hamowanie angiogenezy ograniczają wzrost guzów nowotworowych [10–16, 20]. Jak pokazują ryc. 4. i 5. oraz tab. 2. sFLT-1 blokuje proces angiogenezy. W przedstawionych badaniach do indukcji angiogenezy wykorzystano konstrukt kodujący jedną z najsilniejszych cytokin proangiogenicznych – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). Wykazano, że sFLT-1 znosi proangiogenną sygnalizację VEGF. Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniej opublikowanymi obserwacjami, opisującymi, że w warunkach *in vitro* sFLT-1 utrudnia migrację komórek nowotworowych L1 stransfekowanych genem VEGF pozostając bez wpływu na zachowanie komórek stransfekowanych np. genem fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGF-2) [21]. Wydłużenie czasu życia i niezauważalna ilość wysięku u zwierząt z nadekspresją sFLT w porównaniu z grupą zwierząt L1 i L1/pVEGF (ryc. 7.–10.) wskazują, że obecny w płynie wysiękowym VEGF może być skutecznie blokowany przez białko sFLT. Hasumi i wsp. [11] wykazali, że sFLT hamuje rozrost raka jajnika i tworzenie wysięku. Badacze, wykorzystując komórki raka jajnika stransfekowane wcześniej genem *sFLT*, wykazali, że np. objętość wysięku, liczba komórek nowotworowych, były zdecydowanie niższe w tej grupie niż w grupie kontrolnej. Hoshida i wsp. [15] oraz Takayama i wsp. [16] dowodzą, że sFLT może również hamować rozwój guzów litych. W niniejszej pracy (ryc. 6.) wykazano, że transfektanty L1/psFLT rozwijają u zwierząt guzy nowotworowe zdecydowanie wolniej niż komórki nietransfekowane. Wcześniej również wykazano, że guzy L1 poddane bezpośrednim

iniekcjom psFLT-1 wzrastają wolniej niż kontrolne [20], choć efekt terapeutyczny był mniej znamienny niż w przypadku guzów wywodzących się z hodowlanych transfektantów L1/psFLT. Takie obserwacje nie są jednak zaskoczeniem, bowiem powszechnie wiadomo, że skuteczność terapii genowej determinowana jest przede wszystkim, jak dotychczas, przez wydajny transfer genów i ich efektywną ekspresję. System stransfekowanych komórek nowotworowych ma charakter przede wszystkim eksperymentalny – dostarcza ważnych informacji, czy preparat genowy wywołuje efekt biologiczny i w jakim stopniu efekt ten jest zależny od stopnia transfekcji komórek.

W aspekcie wykorzystania niewirusowych wektorów antyangiogennych w klinice, niezbędną jest staranna selekcja pacjentów, którzy mogą być leczeni preparatami genowymi. W przypadku preparatów niewirusowych ważną jest np. lokalizacja guza nowotworowego, która pozwala na nieobciążające pacjenta proste zabiegi kliniczne umożliwiające zarówno prowadzenie terapii (iniekcje wektora), jak i bezpośrednią ocenę jej skuteczności. Przedstawiony w niniejszej pracy konstrukt psFLT-1 jest obecnie wykorzystywany w prowadzonej w Centrum Onkologii-Instytucie w Warszawie próbie klinicznej antyangiogennej terapii genowej pacjentek chorych na raka sromu [24].

Podziękowania

Autorzy dziękują dr Monice Gos za pomoc w statystycznym opracowaniu wyników.

Praca finansowana częściowo z grantu KBN 2 P05E 07126.

Piśmiennictwo

- Kontos CD, Annex BH. Angiogenesis. *Curr Atheroscler Rep* 1999; 1: 165-71.
- Szala S, Radzikowski C. Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów. *Nowotwory* 1997; 47: 1-19.
- Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Rak J. Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 5-20.
- Malecki M, Kolsut P, Proczka R. Angiogenic and antiangiogenic gene therapy. *Gene Ther* 2005; 12 (Suppl): S159-S169.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-76.
- Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10705-9.
- Yamaguchi S, Iwata K, Shibuya M. Soluble Flt-1 (soluble VEGFR-1), a potent natural antiangiogenic molecule in mammals, is phylogenetically conserved in avians. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 554-9.
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor family genes: when did the three genes phylogenetically segregate? *Biol Chem* 2002; 383: 1573-9.
- Hornig CH, Weich HA. Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis* 1999; 3: 33-9.
- Mahasreshthi PJ, Navarro JG, Kataram M, et al. Adenovirus-mediated soluble FLT-1 gene therapy for ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2057-66.
- Hasumi Y, Mizukami H, Urabe M, et al. Soluble FLT-1 expression suppresses carcinomatous ascites in nude mice bearing ovarian cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 2019-23.
- Boocock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright KA, Twentyman PR, Smith SK. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 506-16.
- Mori A, Arai S, Furutani M, et al. Soluble Flt-1 gene therapy for peritoneal metastases using HVJ-cationic liposomes. *Gene Ther* 2000; 7: 1027-33.
- Yang W, Arai S, Mori A, et al. sFlt-1 gene-transfected fibroblasts: a wound-specific gene therapy inhibits local cancer recurrence. *Cancer Res* 2001; 61: 7840-5.
- Hoshida T, Sunamura M, Duda DG, et al. Gene therapy for pancreatic cancer using an adenovirus vector encoding soluble flt-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Pancreas* 2002; 25: 111-21.
- Takayama K, Ueno H, Nakanishi Y, Sakamoto T, Inoue K, Shimizu K, Oohashi H, Hara N. Suppression of tumor angiogenesis and growth by gene transfer of a soluble form of vascular endothelial growth factor receptor into a remote organ. *Cancer Res* 2000; 60: 2169-77.
- Bainbridge JW, Mistry A, De Alwis M, Paleolog E, Baker A, Thrasher AJ, Ali RR. Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. *Gene Ther* 2002; 9: 320-6.
- Gehlbach P, Demetriades AM, Yamamoto S, et al. Periocular gene transfer of sFlt-1 suppresses ocular neovascularization and vascular endothelial growth factor-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 129-41.
- Lai YK, Shen WY, Brankov M, Lai CM, Constable JJ, Rakoczy PE. Potential long-term inhibition of ocular neovascularisation by recombinant adeno-associated virus-mediated secretion gene therapy. *Gene Ther* 2002; 9: 804-13.
- Malecki M, Jastrzębski Z, Przybyszewska M, Proczka R, Janik P. Antiangiogenic gene therapy: application of soluble FLT-1 receptor. *Adv Clin Exp Med* 2004; 13: 227-33.
- Malecki M, Trembacz H, Szaniawska B, Przybyszewska M, Janik P. Vascular endothelial growth factor and soluble FLT-1 receptor interactions and biological implications. *Oncol Rep* 2005; 14: 1565-9.
- Malecki M, Przybyszewska M, Janik P. In vitro and in vivo study of the expression vector encoding vascular endothelial growth factor. *Arch Immunol Ther Exp* 2001; 49: 243-6.
- Sidky YA, Auerbach R. Lymphocyte-induced angiogenesis: a quantitative and sensitive assay of the graft-vs.-host reaction. *J Exp Med* 1975; 141: 1084-100.
- Panek G, Gawrychowski K, Bidziński M, Krynicki R, Matecki M. Przypadek skutecznego zastosowania plazmidowego wektora ekspresyjnego psFLT i chemio-radioterapii do leczenia zaawansowanego miejscowo raka sromu. *Przegląd Menopauzalny* 2005; 4: 17-21.

Adres do korespondencji

dr n. med. **Maciej Matecki**
Zakład Biologii Komórki
Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Roentgena 5
02-781 Warszawa
tel. +48 22 546 26 21
e-mail: mahan@poczta.wp.pl