

Therapeutic applications of vascular endothelial growth factor

Aplikacje terapeutyczne naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu

Robert M. Proczka¹, Maciej Małecki², Krzysztof Wikieł¹, Jerzy A. Polański¹

¹2nd Department of Surgery, Warsaw Medical Academy (II Katedra i Klinika Chirurgii II Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie)

²Department of Cell Biology, Centre of Oncology, Warsaw (Zakład Biologii Komórki Instytutu Onkologii w Warszawie)

Abstract

Usually the only one method of treatment of the patients with critical limb ischemia is extremity amputation. Since some time we try to stimulate angiogenesis as a new method of treatment. On the other hand anti-angiogenesis gives a chance for the patients with neoplasms.

Key words: angiogenesis, antiangiogenesis, vascular endothelial growth factor

Streszczenie

Zazwyczaj jedyną metodą pomocy pacjentom z krytycznym niedokrwieniem jest amputacja chorej kończyny. Od kilku lat podejmuje się próby pomocy takim pacjentom poprzez stymulację rozwoju naczyń krążenia obocznego.

Metody blokowania angiogenezy dają natomiast szansę na przełom w leczeniu chorób nowotworowych

Słowa kluczowe: angiogeneza, antiangiogeneza, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu

Recent advances in knowledge concerning vascular growth factors are allowing treatment trials of ischemic diseases — of both the heart and lower limbs, as well as tumours with these agents. Some researchers, through the stimulation of proangiogenic cytokine synthesis with these factors, hope that the formation of collateral circulation can be accelerated. Others, through blockage of vessel formation, see a chance of halting tumour progression. In addition, the fact that recent years have brought great progress in the field of genetics is considerably facilitating current and future clinical trials.

We have previously described the basis of the theory of proangiogenic cytokine actions in an article printed in *Acta Angiologica* [1].

Rozwój wiedzy na temat naczyniowych czynników wzrostowych, jaki nastąpił w ciągu ostatnich lat, stworzył możliwość wykorzystania ich w terapii choroby niedokrwiennej serca, kończyn dolnych, a także chorób nowotworowych. Jedni badacze, stymulując syntezę cytokin proangiogennych, mają nadzieję na przyspieszenie powstawania naczyń krążenia obocznego, inni — badając blokadę rozwoju naczyń krwionośnych — wiążą ją z szansą na zatrzymanie progresji chorób nowotworowych. Ponadto ogromny postęp, jaki osiągnięto w zakresie genetyki, sprzyja realizacji tych prób klinicznych.

Teoretyczne podstawy działania cytokin proangiogennych autorzy niniejszej pracy opisali w poprzednim artykule [1]. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Robert M. Proczka, II Katedra i Klinika Chirurgii Szpitala Czerniakowskiego
ul. Stępińska 19/25, 00–739 Warszawa

tel./fax: (+48 22) 841 15 92, (+48 22) 318 63 91, e-mail: ramjup@poczta.onet.pl

In 1994, Professor Isner proposed injections of the Rx protein (at that time this was the name given to the vascular endothelial factor) to treat peripheral ischemic disease. Unfortunately, this method had serious faults. To achieve the therapeutic effect the protein had to be injected several times during the day [2] since the half-life of VEGF is only 34 minutes [3]. The possibility of allergic reaction was an additional problem encountered. Judah Folkman, who in 1974 proposed tumour angiogenesis factor — later renamed vascular endothelial growth factor by Napoleon Ferrara — stressed the high cost of protein synthesis and difficulties in preparation of standard therapeutic doses.

Gene therapy by method of direct intramuscular injections of the naked DNA fragment responsible for the production of the VEGF protein seems to be a considerably better strategy. We should remember that aside from the plasmid vector, virus vectors have also been used. There are both positive and negative aspects of using these carriers. Non-virus vectors in use today are either plasmids or plasmids with liposomes attached. One of the down sides of plasmid vector use is the fact that it has relatively low bioavailability for the target cells (in this case mainly endothelial cells), which is caused by ineffective capture by the target cells and destruction of the plasmid by liposomes. Inside the cell, the plasmid does not join with the chromosomes and leads to expression of the carried genes for a period of several weeks [3, 4]. On the other hand, these carriers are inexpensive and fairly simple to synthesize in large quantities.

We still prefer to use virus vectors than plasmid carriers since the latter allow for considerably lower gene expression. Most often, adenovirus vectors are used both in therapy of coronary artery and peripheral arterial disease. With the use of virus carriers in human tissue, we are able to achieve transfection of 10–30% of cells. These vectors can enter the cell through specific receptors. Phase I and II clinical trials show the relative safety of these vectors. Use of adenovirus carriers allows the strong expression of genes for a period of one to two weeks [3]. Unfortunately, use of these as vectors can lead to post inflammatory reaction and can cause severe immune reactions.

Professor Isner and his team were also pioneers in the use of plasmid, which encodes vascular endothelial growth factor in therapy trials (it is somewhat of a paradox that Prof. Isner died suddenly of coronary disease on October 31st, 2001). The first report of clinical trials with vascular endothelial growth factor encoding plasmid can be found in a 1996 issue of Lancet [4]. The authors describe injections of 2000 µg of the VEGF plasmid into a patient suffering from right lower limb

klinicznych aspektów terapii proangiogennej oraz nawiązanie do terapii antyangiogennej.

W 1994 roku Isner zaproponował podawanie białka Rx — nazwa ta oznaczała naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu — w próbie leczenia chorych z obwodowym niedokrwieniem kończyn. Metoda polegająca na podawaniu gotowego białka miała jednak poważne wady. Aby uzyskać efekt terapeutyczny, należało podawać białko wielokrotnie w ciągu doby [2]. Czas półtrwania naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) wynosi bowiem zaledwie 34 min [3]. Dodatkowym problemem była możliwość występowania reakcji alergicznych. Folkman, który w 1974 roku odkrył czynnik angiogenezy nowotworowej (nazwany dzięki pracom Ferrary naczyniowo-śródbłonkowym czynnikiem wzrostu), zwraca uwagę także na ogromne koszty syntezy białka i dużą trudność w wystandaryzowaniu dawek terapeutycznych.

Zdecydowanie lepszą strategią terapii prawdopodobnie jest leczenie genowe polegające na podaniu bezpośrednio do mięśni plazmidu kodującego naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu. Należy tu wspomnieć, że oprócz nośnika plazmidowego wykorzystuje się także nośnik wirusowy.

Oba nośniki mają wady i zalety. Jak wcześniej wspomniano, używane obecnie wektory niewirusowe to plazmidy oraz połączenia plazmidu z liposomami. Wadą nośnika plazmidowego jest jego niewielka biodostępność dla komórek docelowych (przede wszystkim komórek śródbłonka) spowodowana słabym wychwytem oraz niszczeniem plazmidu przez lizosomy. Wewnątrz komórki plazmid nie łączy się z chromosomami i doprowadza do ekspresji zawartego w nim genu przez okres kilku tygodni [3, 4]. Zaletą przedstawionych nośników jest ich łatwiejsza i tańsza synteza.

Mała ekspresja przy wykorzystaniu nośników plazmidowych powoduje, że cały czas wykorzystuje się także nośniki wirusowe. W terapii choroby niedokrwiennej zarówno serca, jak i naczyń obwodowych najczęściej używa się wektora adenowirusowego. W tkankach ludzkich przy stosowaniu nośnika wirusowego uzyskuje się transfekcję 10–30% komórek. Do komórki dostają się one za pomocą specyficznych receptorów. Badania kliniczne I/II fazy wskazują na względne bezpieczeństwo użycia tego nośnika. Nośnik adenowirusowy powoduje silną ekspresję genu trwającą 1–2 tygodnie [3]. Niestety, użycie tego nośnika może wiązać się z efektem prozapalnym oraz immunogennością stosowanego wektora.

Pionierem terapii plazmidem kodującym naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu był Isner wraz ze swoim zespołem (paradoksem jest, że zmarł on nagle 31 października 2001 r. z powodu niedokrwienia mięśnia sercowego).

ischemia. The plasmid was injected intra-arterially into the distal popliteal artery by using a balloon covered with hydrogel, as used in angioplasty. Four weeks later an increase in the number of collaterals on the level of the knee was noted through digital subtraction angiography imaging. Professor Isner underlined that the vessels were also visible in angiography 12 weeks post injection. It is also worth mentioning that this patient had obstruction in all three major arteries below the knee level. The only noted side effects were telangiectasis [5] and transient oedema of the lower limb [4].

The data describing injection of the vascular endothelial growth factor in ninety patients was published four years later. Forty of these patients received the plasmid intra-arterially and fifty intra-muscularly. Lower limb oedema of the treated ischemic limb was observed in both groups. The severity of this finding corresponded directly to the severity of ischemia and was greatest in the patients with the greatest ischemia and peripheral necrosis. Simultaneously, the authors underlined that the degree of oedema did not correlate with the dose of the plasmid. Out of 57 patients from both groups diagnosed with critical lower limb ischemia, in 43 improvement of circulation was noted as a consequence of therapy. Rest pains were alleviated and ulcers due to ischemia substantially regressed [6].

Gene therapy has also been used in the treatment of Beurger's disease (thromboangiitis obliterans). Six patients with a total of seven ischemic limbs were treated with the VEGF encoding plasmid. In three of these patients, healing of limb ulcers was observed, in two more night pains were alleviated [7].

Professor Isner was also a pioneer in the use of gene therapy to treat coronary ischemic disease. In one of his studies, he reported injecting the plasmid that encodes VEGF 30 into patients with advanced coronary disease. In 29 patients from this group, an improvement characterized by a significant decrease in retrosternal pain and a decrease in nitroglycerine use was observed. In twelve more of the patients, symptoms did not worsen within a six month period, and in seven others twelve months [8].

Vascular endothelial growth factor is produced physiologically in humans. The angiogenesis is active all the time; for example, in wound healing. The plasma level of VEGF, in humans with critical limb ischemia and peripheral necrosis is very high [9]. Unfortunately, we do not know whether the VEGF level was also high at the beginning of ischemia.

The summary of possible uses of vascular endothelial growth factor coding plasmid presented in this work show that it is a promising strategy. The adverse effects observed seem to be clinically insignificant.

Pierwsze doniesienie na temat transferu genu kodującego naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu opublikowano w 1996 roku w piśmie „The Lancet” [4]. Autor pracy opisał podanie 71-letniej kobiecie z krytycznym niedokrwieniem kończyny dolnej 2000 mikrogramów plazmidu kodującego VEGF. Plazmid podano dotętniczo do dalszej części tętnicy podkolanowej za pomocą pokrytego hydrożelem balonu służącego do angioplastyki. W wykonanej cyfrowej angiografii subtrakcyjnej 4 tygodnie po transferze uzyskano wzrost liczby naczyń krążenia obocznego na poziomie kolana, podudzia oraz kostki. Isner podkreślał, że naczynia te były widoczne również w angiografii wykonanej 12 tygodni po podaniu plazmidu. Warto wspomnieć, że u pacjentki niedrożne były wszystkie 3 główne naczynia na podudziu. Działaniami niepożądanymi opisanymi przez autora były jedynie teleangiektazje [5] oraz przejściowy obrzęk leczonej kończyny [4].

Cztery lata później opublikowano wyniki wszczepienia plazmidu kodującego naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu 90 pacjentom. Czterdziestu pacjentów otrzymało plazmid dotętniczo, a 50 osób — domięśniowo.

W obu grupach pacjentów obserwowano wystąpienie obrzęku leczonych kończyn. Stopień obrzęku korelował ze stopniem niedokrwienia kończyny i był największy u osób z cechami krytycznego niedokrwienia i występującą martwicą obwodową. Jednocześnie autorzy podkreślili, że stopień obrzęku nie zależał od podanej dawki plazmidu.

Czterdziestu trzech spośród 57 pacjentów obu grup, których zakwalifikowano jako pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyny, w wyniku przeprowadzonej terapii uzyskało poprawę stanu ukrwienia. Chorzy przestali odczuwać ból spoczynkowy, a owrzodzenia niedokrwienne uległy widocznej regresji [6].

Terapię genową wykorzystano także w leczeniu choroby Buergera (*thromboangiitis obliterans*). Leczone 6 pacjentów (7 kończyn). Wygojenie owrzodzeń zaobserwowano u 3 spośród 5, a u pozostałych 2 osób ustąpienie bólu nocnego [7].

Isner był także pionierem wykorzystania terapii genowej w leczeniu niedokrwienia mięśnia sercowego. Donosi on o wszczepieniu plazmidu kodującego VEGF 30 pacjentom z zaawansowaną chorobą niedokrwinną serca. Spośród leczonej grupy u 29 pacjentów obserwowano poprawę wyrażoną zmniejszeniem bólu zamostkowego i zmniejszeniem zapotrzebowania na nitraty. U 12 pacjentów nie obserwowano pogorszenia stanu przez 6 miesięcy obserwacji, a u 7 osób — przez 12 miesięcy [8].

Również własne obserwacje kliniczne autorów niniejszego opracowania, dotąd niepublikowane, wskazują

Unfortunately, searching through literature concerning angiogenic therapy we discover that there are many more potential side effects. The injected plasmid has a global effect. There is a possibility of pathologic changes in the fundus of the eye. We know that the development of pathologic vessels in the retina can lead to vision impairment. These changes have been observed in patients with diabetes. Thus, because there is a possibility of pathologic vascular proliferation in the retina, currently diabetic patients are excluded from trials of therapy by way of angiogenesis stimulation [10]. On the other hand, there are studies that do not confirm this adverse effect of gene therapy on the retina [9].

Celatti, in his [11] two studies, turns our attention to the possibility of accelerating atherosclerotic plaque formation under the influence of vascular endothelial growth factor. We know that angiogenesis is a crucial process in the formation of atherosclerotic plaque [11]. High levels of VEGF cause mobilization of macrophages, which in turn lead to the acceleration of atherosclerosis. Some studies negate this interaction [5].

Another potential side effect of therapy with the VEGF coding plasmid is the possibility of accelerated tumour growth. The velocity of tumour growth is often dependant on the velocity of the vascular net development within; therefore high levels of VEGF can perhaps accelerate this process. There have been, though, many experiments, which have disproved this theory [12].

A promising strategy in the battle against cancer is the use of gene therapy in the process called antiangiogenesis. This is based on the theory that the development of a vascular net in the tumour mass is a direct factor which determines both its development and formation of metastasis [13–15]. Aside from conventional methods of pharmacotherapy using cytostatic drugs with antiangiogenic properties, more often, attention is turned to new methods discovered due to developments in genetic engineering. Several such antiangiogenic strategies are currently being investigated. Including, for example, trials with proteolytic fragments of proteins (arestin, angiostatin, endostatin, vasostatin), monoclonal antibodies against angiogenic growth factors or soluble receptor fragments for these factors; among these, of course, is VEGF [16]. Until now, more than forty endogenous angiogenesis inhibitors, with different synthesis and mechanisms of action, have been discovered [13]. Generally, they inhibit the migration and proliferation of endothelial cells, thereby inhibiting tumour and metastasis development [13, 14]. In many experiments, factors which directly react with proangiogenic cytokines, such as FGF, angiopoietin-1 or Del-1 have been used, but most studies deal with limiting of the effect of VEGF [17, 18]. Undertaken

na skuteczność leczenia krytycznego niedokrwienia poprzez stymulację angiogenezy.

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu jest cytokiną produkowaną fizjologicznie w organizmie człowieka. Praktycznie ciągle zachodzą procesy angiogenezy, choćby w trakcie gojenia ran. U pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych, u których występowała martwica, endogenne stężenie naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu było bardzo wysokie [9]. Niestety, nie wiadomo kiedy stężenie VEGF u tych pacjentów tak znacznie się zwiększyło. Trudno określić, czy było ono równie wysokie, gdy stan kończyny nie miał cech krytycznego niedokrwienia i martwicy. Zarówno tego, jak i wielu innych zagadnień dotyczących angiogenezy nadal nie wyjaśniono.

Wszczepiony plasmid działa ogólnoustrojowo, co wiąże się z możliwością wystąpienia działań niepożądanych zastosowanej terapii. Niekontrolowany rozrost naczyń siatkówki oka jest pierwszym, potencjalnie szkodliwym następstwem angiogennej terapii [10]. W związku z tym wszyscy pacjenci z cukrzycą są wyłączeni z prób leczenia drogą stymulacji angiogenezy. W piśmiennictwie można odnaleźć jednak prace, które negują możliwość wystąpienia takiego powikłania [9].

Celatti i wsp. [11] zwracają uwagę na możliwość przyspieszenia rozwoju blaszki miażdżycowej pod wpływem naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu. W doświadczeniu przeprowadzonym na myszach autorzy obserwowali znaczący wzrost blaszki miażdżycowej w porównaniu z grupą kontrolną. Wydaje się, że odpowiadają za to makrofagi, które pełnią funkcje zarówno w syntezie VEGF, jak i czynników prozapalnych [11]. W piśmiennictwie neguje się też aterogenne działanie leczenia plasmidem kodującym naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu [5].

Kolejnym potencjalnym efektem terapii plasmidem kodującym VEGF jest możliwość przyspieszenia rozwoju choroby nowotworowej. Szybkość rozwoju nowotworu zależy od narastania sieci naczyń wewnątrz zmiany. Wysokie stężenie VEGF może dodatkowo przyspieszać proces angiogenezy wewnątrznowotworowej; jednak niektóre doświadczenia negują taką tezę [12].

Obiecującą strategią leczenia chorób nowotworowych jest terapia antyangiogenna. Opiera się ona na założeniu, że powstawanie sieci naczyń krwionośnych w masie nowotworu jest czynnikiem bezpośrednio determinującym jego rozwój i warunkującym jednocześnie tworzenie przerzutów nowotworowych [13–15]. Oprócz konwencjonalnych metod farmakoterapii, wykorzystujących preparaty cytostatyczne mające charakter antyangiogeny, coraz częściej zwraca się uwagę na nowe metody leczenia wynikające z osiągnięć inżynierii

strategies involve the use of anti-VEGF antibodies, inhibiting VEGF synthesis through antisense sequences and the use of soluble VEGF receptors [13]. It has been demonstrated that the soluble form FLT-1, through binding to VEGF and blockage of native VEGF receptors, inhibits the development of new blood vessels, thus limiting the development of tumour mass and halting metastasis formation [19–23]. Potentially, sFLT-1 may also be used in many diseases caused by faulty angiogenesis, such as blindness due to diabetic retinopathy [24–26].

VEGF reacts with cells through the specific receptors VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3. The first two of these have tyrosine kinase internal activity. It is a well-known fact that VEGF has a stronger affinity for VEGFR-1, which has lower tyrosine kinase activity, than for VEGFR-2. The *FLT-1* gene codes not only the completely full form of the receptor FLT-1, but also its soluble form (sFLT-1). *sFLT-1* was first cloned and described in the human, but soon it was discovered that it also occurs in other mammals (mice and rats). Recent studies have shown that this protein can also be found in other vertebrates such as birds, and the homology with the human *sFLT-1* gene is over 60% [27, 28]. These studies have proven that sFLT-1 is a filo-genetically conserved molecule. sFLT-1 is an example of a soluble form of the VEGFR-1 receptor (FLT-1). It is synthesized through splicing by premRNA of the *FLT-1* gene. The *sFLT-1* transcript codes 6 of 7 N-terminal, immunoglobulin-like domain characteristic for extracellular part of the VEGF receptor (Figure 1). Neither the intramembranous fragment nor the intracellular domain with tyrosine kinase activity can be found in the mRNA of *sFLT-1* [20, 22].

genetycznej. Kilka strategii antyangiogennych jest w trakcie badań eksperymentalnych. Zaliczyć tu można np. próby wykorzystania proteolitycznych fragmentów białek budulcowych (arestyna, angiostatyna, endostatyna, wazostatyna), przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw angiogennym czynnikom wzrostowym czy rozpuszczalnych fragmentów receptorów dla tychże czynników, np. dla VEGF [16]. Dotychczas poznano ponad 40 endogennych inhibitorów angiogenezy, które różnią się mechanizmem powstawania i działania [13]. Generalnie hamują one proliferację, migrację komórek śródbłonkowych, dzięki czemu ograniczają wzrost nowotworów i powstawanie przerzutów [13, 14]. W wielu badaniach wykorzystuje się czynniki, które bezpośrednio oddziałują z cytokinami proangiogennymi — VEGF, FGF, angiopoetynę-1, Del-1; najczęściej prace dotyczą prób ograniczenia funkcji VEGF [17, 18]. Podejmowane strategie obejmują wykorzystanie przeciwciał antyVEGF, blokowanie receptorów dla VEGF, hamowanie syntezy VEGF przez sekwencje antysensowne oraz wykorzystanie rozpuszczalnych form receptorów dla VEGF [13]. Wskazuje się, iż 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 [19–23]. Potencjalnie sFLT-1 można również wykorzystać w wielu innych stanach chorobowych determinowanych przez angiogenezę, np. w zapobieganiu ślepotie pojawiającej się jako powikłanie retinopatii cukrzycowej [24–26].

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu oddziałuje z komórkami za pomocą receptorów VEGFR-1,

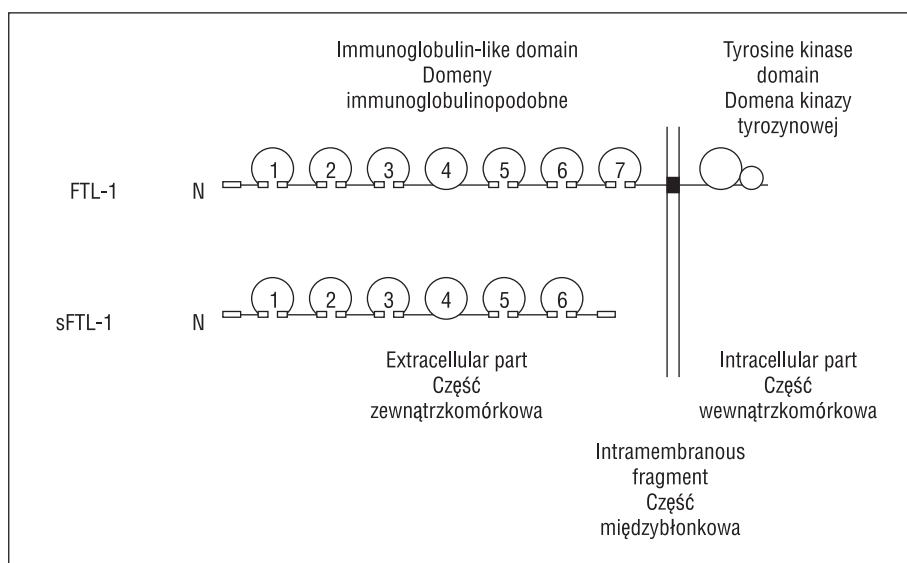


Figure 1. Structural scheme of the receptor FLT-1 and soluble for sFLT-1
Rycina 1. Schemat budowy receptora FLT-1 i formy rozpuszczalnej sFLT-1

The sFLT-1 protein is considered a physiologic, negative regulator of angiogenesis and vasculogenesis. It has been shown that it has a regulatory function during the angiogenesis process - for example, during embryonic development. During pregnancy, trophoblast strongly expresses sFLT-1, and in this way influences biological functions of VEGF (angiogenesis, vascular permeability) [18]. sFLT-1 domain structure is shown on Figure 1. Experiments show that the first two immunoglobulin-like loops numbers 1 and 2 (Ig2) take an active part in bond formation with VEGF [20]. The third domain is responsible for greater attraction of the receptor to the ligand, and domain number four is crucial for the dimerization of the receptor [20]. Studies have shown that bonds forming between VEGF and the first two domains of sFLT-1 are hydrophobic; they have also shown that the forces of attraction are considerably stronger between VEGF and sFLT-1 than VEGFR-2.

The aim behind the cloning of the vectors that code different forms of FLT-1 receptor than the native three domain form, is to create an effective tool in trials of gene therapy to battle, for example, cancers. The receptor sFLT-1 binds all isoforms of VEGFA, and is the main regulator of physiologic and pathologic angiogenesis [20]. It has been shown that this receptor binds other cytokines such as PIGF and VEGFB as well. It differs from VEGFR-2 in that it has a higher affinity for VEGF. Both *VEGFR-1* and *VEGF* are genes of which the expression can be induced and regulated by hypoxia [27]. This fact suggests direct functional and biological dependence of the VEGF/VEGFR-1 axis. In the case of the recombinant form of the sFLT protein derived from the expression vector, it suggests that there are several potential mechanisms of action of VEGF on sFLT:

- the basic mechanism is the extracellular binding of FLT-1 and VEGF (Figure 2); this creates an inert complex, and the mitogen activity of VEGF is inactivated;
- sFLT can also bind with native cellular FLT-1 receptors. By binding to the extracellular FLT-1 (heterodimer) it blocks autophosphorylation of the receptor and deactivates its function;
- sFLT-1 can also react with VEGF forms bound to the cell membrane (i.e. VEGF-189) and in such a way negatively affect the interaction between the endothelial and stromal cells;
- sFLT-1 can also be secreted into circulation and affect the levels of VEGF in peripheral blood.

References

1. Proczka MR, Polański AJ, Małecki M, Wikiel K (2003) The significance of vascular endothelial growth factor in the neoangiogenesis process. The role of hypoxia in the endothelial cells proliferation process and in the formation of collateral circulation. *Acta Angiol*, 9: 143–149.

VEGFR-2 i VEGFR-3. Receptory VEGFR-1 i VEGFR-2 mają wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej. Wiadomo, że VEGFR-1 ma silniejsze powinowactwo do VEGF niż VEGFR-2, natomiast mniejszą aktywność kinazy tyrozynowej. Gen *FLT-1* koduje nie tylko całą, pełną formę receptora FLT-1, ale również jego odmianę rozpuszczalną (sFLT-1). Gen *sFLT-1* po raz pierwszy opisano i sklonowano u człowieka [22], wkrótce jednak okazało się, że występuje również u innych ssaków (myszy, szczury), a ostatnio nawet opublikowano prace wskazujące, iż występuje on również u innych kręgowców (np. u ptaków) i jego homologia z ludzkim genem *sFLT* wynosi ponad 60% [27, 28]. Wykazano tym samym, że *sFLT-1* jest molekułą filogenetycznie konserwatywną. Gen *sFLT-1* jest przykładem rozpuszczalnej formy receptora VEGFR-1 (FLT-1) dla VEGF. Powstaje on w wyniku składania premRNA genu *FLT-1*. Transkrypt *sFLT-1* koduje 6 z 7 N-terminalnych, immunoglobulinopodobnych domen charakterystycznych dla części zewnątrzkomórkowej receptorów VEGF (ryc. 1). W mRNA *sFLT-1* brakuje natomiast fragmentu międzybłonkowego oraz domeny wewnątrzkomórkowej o aktywności kinazy tyrozynowej [20, 22].

Białko sFLT-1 uważa się za fizjologiczny, negatywny regulator angiogenezy i waskulogenezy. Wykazano, iż pełni ono funkcję regulacyjną w czasie tworzenia naczyń krwionośnych (np. w okresie embrionalnym). W czasie ciąży szczególnie trofoblast silnie ekspresuje sFLT-1, wpływając na funkcje biologiczne VEGF (angiogeneza, przepuszczalność naczyń) [28]. Domenową budowę sFLT-1 przedstawiono na rycinie 1. W badaniach wykazano, że w wiązaniu VEGF biorą udział przede wszystkim 2 pierwsze pętle immunoglobulinopodobne nr 1 i 2 (Ig2) [20], choć wiadomo również, iż domena nr 3 warunkuje wysokie powinowactwo receptora do ligandów, a domena nr 4 jest niezbędna do dimeryzacji receptora [20]. Wyniki badań wskazują, że oddziaływania między VEGF a pierwszymi domenami sFLT-1 mają charakter hydrofobowy, przy czym wskazuje się, iż powinowactwo rekombinowanych form sFLT-1 do VEGF jest znacznie wyższe niż form VEGFR-2.

Klonowanie wektorów kodujących formy receptora FLT-1 różnie niż 3-domenowa postać natywnego receptora FLT-1 ma na celu skonstruowanie skutecznego narzędzia do prób terapii genowej (np. chorób nowotworowych). Białko sFLT-1 wiąże wszystkie izoformy VEGFA, jest kluczowym regulatorem fizjologicznej i patofizjologicznej angiogenezy [20]. Wskazuje się, że wiąże on również inne cytokiny, np. PIGF, VEGFB. W odróżnieniu od VEGFR-2 cechuje go zdecydowanie wyższe powinowactwo do VEGF. Zarówno *VEGFR-1*, jak

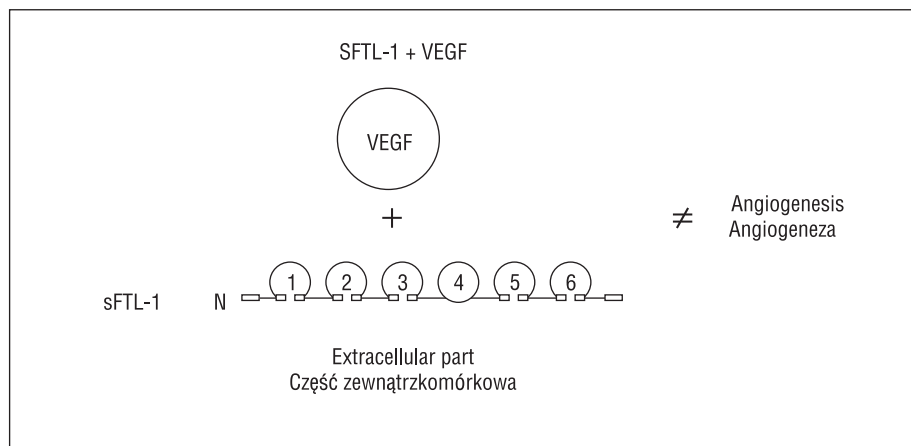


Figure 2. Blocking of the VEGF function by sFLT. sFLT effectively stops proangiogenic VEGF activity
Rycina 2. Blokowanie funkcji VEGF przez sFLT-1. sFLT-1 skutecznie znosi proangiogenną aktywność VEGF

2. Folkman J (1998) Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation*, 97: 1108–1110.
3. Kessler P (2004) Biobypass, ready for the NOVA Trial. *The NOGA letter*, 2–4.
4. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R et al (1996) Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of ph-VEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet*, 348: 370–374.
5. Brogi E, Winkles JA, Underwood R et al (1993) Distinct patterns of expression of fibroblast growth factor and their receptors in human atheroma and nonatherosclerotic arteries. *J Clin Invest*, 92: 2408–2418.
6. Baumgartner I, Guenter R, Pieczek A et al (2000) Lower-extremity edema associated with gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor. *Ann Intern Med*, 132: 880–884.
7. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R et al (1998) Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of VEGF: preliminary clinical results. *J Vasc Surg*, 28: 964–975.
8. Isner JM, Vale PR, Symes JF, Douglas WL (2001) Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ Res*, 89: 389–400.
9. Maclaren M, Newton DJ, Khan F, Belch JJ (2002) VEGF in patients with critical limb ischemia before and after amputation. *International Angiology*, 21: 165–168.
10. Ozaki H, Seo MS, Ozaki K et al (2000) Blockade of vascular endothelial growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am J Pathol*, 156: 697–707.
11. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD (2001) Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med*, 7: 403–404.
12. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y et al (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88: 277–285.
13. Feldman AL, Libutti SK (2000) Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer*, 89: 1181–1194.
14. Szala S, Szary J, Cichoń T, Sochanik A (2004) Antiangiogenic gene therapy in inhibition of metastasis. *Acta Biochim Pol*, 49: 313–321.

i VEGF są genami, których ekspresja może być wywołana, regulowana przez hipoksję [27]. Fakt ten wskazuje na ścisłą zależność funkcjonalną i biologiczną układu VEGF/VEGFR-1. W przypadku rekombinowanego białka sFLT otrzymywanego z wektora ekspresyjnego wskazuje się na kilka potencjalnych mechanizmów oddziaływania sFLT z VEGF i hamowania angiogenezy:

- podstawowy mechanizm to wiązanie sFLT-1 z VEGF poza komórką (ryc. 2); powstaje nieaktywny kompleks; aktywność mitogenna VEGF zostaje zniesiona;
- białko 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 dezaktywuje jego funkcję;
- białko sFLT-1 może oddziaływać z formami VEGF związanymi z błoną komórkową (np. VEGF189), utrudniając tym samym interakcje między komórkami śródbłonna i komórkami stromalnymi;
- białko sFLT-1 jako białko sekrecyjne może przedostawać się do krążenia ogólnego i wpływać na stężenie VEGF we krwi.

15. Wilczyńska U, Szary J, Szala S (1999) Antyangiogenna terapia genowa. *Współ Onkol*, 4: 139–142.
16. Zhang H-T, Harris AL (1998) Anti-angiogenic therapies in cancer clinical trials. *Exp Opin Invest Drugs*, 7: 1629–1655.
17. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Genet*, 9: 669–676.
18. Scappaticci FA (2002) Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. *J Clin Oncol*, 20: 3906–3927.
19. Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G (1998) Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 8795–8800.

20. Hornig CH, Weich HA (1999) Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis*, 3: 33–39.
21. Hornig CH, Barleon B, Ahmad S, Vuorela P, Ahmed A, Weich HA (2000) Release and complex formation of soluble VEGFR-1 from endothelial cells and biological fluids. *Lab Invest*, 80: 443–454.
22. Kendall RL, Thomas KA (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 10705–10709.
23. Roeckl W, Hecht D, Sztajer H, Waltenberger J, Yayon A, Weich HA (1998) Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Exp Cell Res*, 241: 161–170.
24. Bainbridge JW, Mistry A, de Alwis M et al (2002) Inhibition of retinal neovascularization by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. *Gene Ther*, 9: 320–326.
25. Gehlbach P, Demetriades AM, Yamamoto S et al (2003) Periocular gene transfer of sFlt-1 suppresses ocular neovascularization and vascular endothelial growth factor-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *Hum Gene Ther*, 14: 129–141.
26. Lai YK, Shen WY, Brankov M, Lai CM, Constable IJ, Rakoczy PE (2002) Potential long-term inhibition of ocular neovascularisation by recombinant adeno-associated virus-mediated secretion gene therapy. *Gene Ther*, 9: 804–813.
27. Shibuya M (2002) Vascular endothelial growth factor receptor family genes: when the three genes phylogenetically segregate? *Biol Chem*, 383: 1573–1579.
28. Yamaguchi S, Iwata K, Shibuya M (2002) Soluble Flt-1 (Soluble VEGFR-1), a potent natural antiangiogenic molecule in mammals, is phylogenetically conserved in avians. *Bioch Biophys Res Commun*, 291: 554–559.