



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie

reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

### **Inhibice angiogeneze v komplexní léčbě zhoubných nádorů. (P.Klener)**

V léčbě nádorových onemocnění se v posledních letech stále více uplatňují léčebné strategie cílené na nádorové mikroprostředí. Ukázalo se totiž, že na nádor nelze pohlížet pouze jako na soubor nádorových buněk, ale že různější elementy mikroprostředí (extracelulární matrix, fibroblasty, makrofágy, cévy aj) se mohou svými působky podílet na invazivitě a šíření nádoru. Příkladem takového vztahu může být i novotvorba cév – vaskulogeneze a angiogeneze.

**Vaskulogeneze** je proces vývoje cév z endoteliálních prekurzorů nezávislý na preexistujících cévách, který se uplatňuje zejména při tvorbě primitivních embryonálních cév a nepochybně má svou roli i při novotvorbě cév nádoru. **Angiogeneze** tj. neovaskularizace v širším slova smyslu následuje vaskulogenezi. Fyziologicky se uplatňuje nejen při embryogenezi, ale také např. při hojení ran, ovulaci apod. Je regulována humorálními faktory angiogenními a antiangiogenními, které jsou za normálních okolností v rovnováze. Jejich přehled je uveden v **tab.1-**

Význam angiogeneze pro růst nádorů byl poznán již na sklonku minulého století. Ukázalo se, že nádor nebo metastáza potřebují ke svému růstu přívod živin a kyslíku. Pokud nádor po dosažení určité velikosti ( $1-2\text{mm}^3$  - což je difúzní limit pro kyslík) nezíská schopnost vytvářet nové cévy pro svou výživu, nemůže dále růst. Jakmile velikost nádoru přesáhne výše uvedené rozměry, dochází k hypoxii nádorových buněk, které začnou produkovat angiogenní faktory, především VEGF (vascular endothelial growth factor) a proteolytické enzymy zvané matrixmetaloproteázy (MMP). Kromě hypoxie, která má klíčový význam, se na výdeji angiogenních faktorů podílí i některé růstové faktory, cytokiny a produkty onkogenů. Za této situace však dochází k deregulaci angiogenního procesu a k převaze faktorů angiogenních nad antiangiogenními a začnou se vytvářet nové cévy vyživující nádor (tzv. angiogenní p-angiogenní přepnutí- angiogenní switch).



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie

reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

### Mechanismy angiogeneze u nádorů

Pro indukci angiogeneze má největší význam endoteliální růstový faktor **VEGF** *resp. rodina VEGF*. Šest různých variant VEGF (VEGF A až D a PlGF-.placenta induced growth factor -humoglní s VEGFA) a příslušné receptory pro tyto ligandy jsou znázorněny na **obr.1**. Členové rodiny VEGF významným způsobem stimulují proliferaci, migraci a přežití aktivovaných endotelových buněk. Receptory pro VEGF mají intracytoplazmatickou tyrozinkinázovou aktivitu, která zprostředkovává přenos signálu do buňky. VEGF-A, VEGF-B a VEGF-E mají podobné biologické účinky. Stimulují proliferaci a migraci endotelií a zvyšují cévní permeabilitu. Naproti tomu VEGF-C a VEGF-D hrají významnou roli při stimulaci lymfangiogeneze. Jejich zvýšená exprese byla nalezena zejména u nádorů metastazujících lymfatickou cestou. Vazbou VEGF na VEGFR se spustí transdukční kaskáda, jejímž výsledkem je zvýšená proliferace endotelových buněk, stimulace jejich migrace a zvýšení permeability cév.

Existují tři **receptory pro VEGF**: VEGFR1/FLT1 (*FMS-like tyrosinkinase-1*), VEGFR-2/KDR/FLK1 (*kinase domain receptor/fetal liver kinase 1*) a VEGFR3/FLT4 (*FMS-like tyrosinkinase 4*). VEGFR1 a VEGFR2 indukují proliferaci a migraci endotelií, snižují jejich citlivost k apoptóze a zvyšují cévní permeabilitu. VEGFR2 je nejčastěji zvýšeně exprimovaným receptorem na nádorových endoteliích a byl proto logicky jedním z prvních cílů antiangiogenní terapie. VEGFR3 je exprimován zejména na lymfatických cévách. VEGFA je ligandem ještě pro neuropilinové receptory **NP-1** (neuropilin-1). Mají roli koreceptorů pro VEGFR2 a jejich stimulace podporuje angiogenezi.

Mezi regulátory angiogeneze patří též **angiopoetiny** (angiopoetin 1-ANG1 a angiopoetin 2-ANG2), které mají pleiotropní a zdánlivě protichůdné účinky. Na rozdíl od VEGF nepůsobí mitogenně na endotelie, ale regulují především integritu endotelových buněk a pericytů (perivaskulárních buněk) a působí maturaci cév. ANG1 je produkován hlavně hladkými svalovými buňkami, kdežto ANG2 endoteliemi.

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie

reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

Vazbou ligandu na specifické membránové receptory se spouští transdukční kaskáda, která vede ke změně transkripce a stimulaci angiogeneze, popřípadě lymfangiogeneze.

Angiogeneze probíhá v několika etapách zvaných **angiogenní kaskáda**. V první etapě dochází vlivem VEGFA a VEGFB ke zvýšení cévní permeability, z cév uniká fibrinogen, který se v blízkosti cévy přeměňuje na fibrin. Permeabilitu cév zvyšují proteolytické enzymy matrixmetaloproteázy, produkované rovněž nádorovými buňkami. Následuje zvýšená proliferace endotelií, které začnou na stěně cévní vytvářet útvary podobné pupenům (tzv. sprouting angiogenesis), což jsou základy nové cévy utvářející se na fibrinové matici.

V poslední etapě se formuje nová céva pod vlivem dalších angiogenních faktorů, jako jsou angiopoetiny. Novotvořené cévy jsou však nevyzrálé, chaotické a strukturálně defektní, bez souvislé bazální membrány a téměř bez podpůrných stabilizačních buněk pericytů a hladkých svalových buněk. To vede ke zvýšenému průniku plasmy do intersticia a ke zvyšování intratumorálního tlaku. Důsledkem toho dochází ke špatnému průtoku krve nádorem, k hypoxickým nekrotickým zónám a tím k další stimulaci angiogeneze. Významně klesá také průnik cytostatik do nádoru. Jestliže se omezí novotvorba cév, omezí se růst nádoru a jeho metastazování.

### **Léčebné strategie k omezení angiogeneze.**

Existují dva zásadní přístupy. (1) Buď aplikace antiangiogenních faktorů, nebo (2) potlačení faktorů angiogenních.

Ad 1) Mezi nejdéle známé přirozené inhibitory angiogeneze patří trombospondin, který reguluje adhezi, proliferaci a přežití endotelových buněk. V klinické praxi se zkoušel substituovaný nonapeptid ABT-510 s vlastnostmi přirozeného trombospondinu, ale jeho praktické využití se příliš nerozšířilo. Rovněž rekombinantně připravené další inhibitory angiogeneze jako angiostatin, endostatin, nebo destičkový faktor 4 (PF 4) se v praktické antiangiogenní léčbě neosvědčily.



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie

reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

Ad 2) Mnohem efektivnější jsou různé varianty působící potlačení faktorů angiogenních. Je to především inhibice angiogenní kaskády, farmakologická disrupce nádorových cév a některé další antiangiogenní strategie.

**Inhibice angiogenní kaskády** je nejvíce prověřenou modalitou. Mezi třemi možnými způsoby inhibice je nejefektivnější inhibice signální dráhy VEGF-VEGFR. Signální dráha a možnosti její inhibice jsou schématicky znázorněny na **OBR.2**. Jak vyplývá ze schématu, angiogenní účinek VEGF lze inhibovat na několika úrovních. Blokádu ligandu, blokádu vazebné domény receptoru nebo blokádu tyrozinkinázové domény receptoru. Nejvíce zkušeností je zatím s **neutralizací ligandu VEGF** humanizovanou monoklonální protilátkou bevacizumabem (Avastin). Bevacizumab váže volný VEGF-A, VEGF-B i VEGF-C a účinně tak blokuje novotvorbu cév. Používá se výhradně v kombinaci s chemoterapií. Bevacizumab se začal používat nejprve v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu, kde byla na buňkách nádoru zjištěna vysoká exprese receptorů pro VEGF. Podává se v kombinaci s různými cytostatiky (např. s 5-fluorouracilem, s kapecitabinem) nebo s chemoterapeutickými kombinacemi. Přidání bevacizumabu zvyšovalo léčebnou odpověď až o 10%. Později se indikace rozšířily i pro karcinom prsu (v kombinaci s paklitaxelkem) nebo v kombinaci s platinovými režimy pro nemalobuněčný karcinom plic. Testuje se jeho použití i u dalších nádorových onemocnění (karcinom ledviny, glioblastom, karcinom pankreatu). Léčba bevacizumabem se dobře toleruje, z nežádoucích účinků se popisuje hypertenze, proteinurie a krvácivé projevy. Nejobávanější komplikací je perforace střeva (cca 1% pacientů). Zvýšené opatrnosti je třeba zejména u nemocných s kratším než 28denním odstupem od operačního výkonu (riziko rozpadu rány a krvácení) a u nemocných užívajících antikoagulační léčbu.

Jinou možností antiangiogenní léčby je eliminace VEGF ligandu použitím solubilního „decoy“ VEGF receptoru (decoy= návnada, vějíčka) s názvem VEGF-trap (aflibercept), který působí jako kompetitivní inhibitor VEGF receptorů. Jinou, dosud v praxi nevyužívanou

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie

reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

možností by bylo **použití blokační monoklonální protilátky** proti vazebné doméně příslušných receptorů.

Slibnou strategii představuje **blokáda tyrozinkinázové domény** intracelulární části receptorů po angiogenní faktory (VEGF, FGF2 aj) použitím tyrozinkinázových inhibitorů (TKI). Výhodou většiny používaných TKI je jejich účinek proti většímu počtu receptorových tyrosinkináz (multikinázové inhibitory). Vzhledem k tomu, že novotvorba cév je vysoce komplexní proces, na kterém se účastní mnoho angiogenních faktorů současně, zdá se logické, že multikinázové TKI mají výhodu proti vysoce selektivnímu účinku bevacizumabu. Přehled TKI je v **tab.2**

### **Inhibice proliferace endotelových buněk**

Blokádou proliferace endotelií účinkuje **fumagilin**, extrakt z houby *Aspergillus fumigatus*, který se však pro výraznou toxicitu v klinické praxi neuplatnil. Využití méně toxického syntetického analoga AGM1470 bránila značná neurotoxická. Naproti tomu **pegylovaná forma TNP-470** (Lodamin) je netoxická, jeví efekt u jaterních metastáz a protože proniká hematoencefalickou bariérou zkouší se i v léčbě mozkových nádorů.

**Interferony alfa a beta** tlumí proliferaci endotelií a používají se s dílčími úspěchy k omezení angiogeneze u progredujících angiomů. Inhibice endoteliální proliferace se předpokládá jako jeden z mechanismů antiangiogenního účinku **imunomodulačních látek (IMiDs)** mezi něž patří thalidomid, pomalidomid a lenalidomid.

### **Stabilizace bazální membrány**

Stabilizace bazální membrány znesnadňuje pučení endotelií mimo cévu. Inhibice enzymů, které bazální membránu rozrušují, může mít proto významný antiangiogenní účinek. K prostředkům cíleným na stabilizaci bazální membrány patří zejména inhibitory

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie

reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

matrixmetaloproteáz (marimastat, batimastat, prinomastat). Praktické aplikace této léčby však přinesly určité zklamání a používají se omezeně.

### Disrupce nádorových buněk (VDA)

VDA (vascular disruption agents) vykazují cytotoxický účinek vůči již vytvořené nádorové vaskulatuře a představují tak alternativní přístup směřující k blokádě cévního zásobení nádoru. Mezi VDA látky patří **kombretastatiny**, výtažky z africké rostliny *Combretum caffrum*, které indukují apoptózu endotelií a destabilizují mikrotubuly (většinou působí jejich depolymeraci). Vyvolají následně kolaps a nekrózu vaskulatury nádoru. Mezi nejúčinnější VDA patří ketopiperazinový analog NPI-2358 nebo kombrestatin A4-fosfát (Zybrestat), který vyvolá až stonásobné snížení průtoku krve nádorem s minimálním ovlivněním perfúze zdravých tkání. Zybresat je „prodrug“, v endotelových buňkách se konvertuje na kombrestatin. K dalším VDA ve stadiu klinického testování patří **soblidotin** (TZT-1027), derivát dolastatinu-10. Také **flavonoidy** vykazují účinky podobné VDA. Mezi klinicky prověřované látky patří např. *vadimezan*- DMXAA (5,6-dimethylxanthenon-4-acetic acid), který v kombinaci s chemoterapií prodloužil dobu přežití u nemocných s NSCLC průměrně o 5 měsíců, ve srovnání se samotnou chemoterapií.

### Další antiangiogenní strategie

V procesu angiogeneze se uplatňují ještě další procesy, které rovněž představují terapeutické cíle. Uplatňuje se stimulační vliv extracelulární matrix prostřednictvím integrinových receptorů. Proto **monoklonální protilátky proti integrinům** mohou tento proangiogenní účinek úspěšně blokovat. Za specifický inhibitor angiogeneze se považuje selektivní antagonistu alfa-v-beta5 integrinu *cilengitid*. (viz též obr.2) Jde o peptid, který kromě antiangiogenního účinku blokuje též proliferaci a migraci CD133+ endoteliálních progenitorových buněk. Komplexní antiangiogenní účinek se uplatňuje u **imunomodulačních látek (IMiDs)**, mezi něž patří thalidomid, lenalidomid a pomalidomid.

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie

reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

Jako efektivní antiangiogenní léčba se jeví opakovaná aplikace velmi nízkých dávek cytostatik (např. cyklofosfamid 50 mg denně nebo etopozid 50 mg denně). Tato metoda se nazývá **metronomická chemoterapie** nevykazuje toxické účinky na nádorové buňky, ale je schopna ničit a inhibovat endotelové buňky, včetně cirkulujících endotelových prekurzorů a

tím omezovat angiogenezi. Kromě toho, nízké dávky cytostatik indukují výdej antiangiogenního trombospondinu. Za výhodu metronomické chemoterapie lze považovat i skutečnost, že k této léčbě nevzniká rezistence, neboť je cílená na normální, geneticky stabilní endotelie, které rezistenci nepodléhají. Současně aplikovaná antiangiogenní léčba potencuje účinnost metronomické chemoterapie. Rozdíly mezi konvenční a metronomickou chemoterapií uvádí v přehledu **tab.3**

K antiangiogenní léčbě lze použít též protisměrné (antisense) oligonukleotidy proti mRNA pro VEGF (např. přípravek veglin) nebo specifické ribozymy (např. antiangiogenní ribozym angiozym). Dílčí antiangiogenní účinky byly zaznamenány také u většího počtu konvenčních chemoterapeutik (např. doxorubicin, taxany, 2-metoxystradiol aj.)

### **Z á v ě r:**

Angiogeneze je významná součást nádorového mikroprostředí a významně se podílí na růstu nádoru a jeho metastazování. Inhibice angiogeneze tedy představuje důležitý přínos k účinnosti protinádorové léčby. Nabývá větší účinnosti v kombinaci s chemoterapií nebo s jinými modalitami protinádorové terapie.



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie

reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

**Tab.1: PŘEHLED MEDIÁTORU ANGIOGENEZE**

### proangiogenní faktory

### antiangiogenní faktory

---

#### rodina VEGF

angiopoetiny

MMP

HGF

FGFb

PD-EPDGF, PDGF

EGF, TNF

IL-6

integriny

#### trombosponin

angiostatin, vazostatin

endostatin (fragment kolageu XVIII)

tumstatin, kanstatin ( fragmenty kolagenu IV)

TGF beta

IFN alfa, IFN beta

TIMPs, PAI

IL-12, IL-18

*vasohibin*

**Tab.2: INHIBITORY RECEPTOROVÝCH TYROZINKINÁZ  
S ANTIANGIOGENNÍM ÚČINKEM**

### účinná látka

### obchodní přípravek

### cílová tyrozinkináza

---

semaxanib

-

VEGFR2

cediranib

Recentin

VEGFR1-3

brivanib

-

VEGFR2, FGFR1

pazopanib

-

VEGFR1-3, PDGFR, KIT

vatalanib

-

VEGFR1-3, PDGFR, KIT

motesanib

-

VEGFR1-3, PDGFR, KIT



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie

reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

|           |          |                                |
|-----------|----------|--------------------------------|
| axitinib  | -        | VEGFR1-3, PDGFR, KIT           |
| telatinib | -        | VEGFR2-3, PDGFR, KIT           |
| BIBF 112  | Vergatef | VEGFR1-3, PFGFR, FGFR          |
| -----     |          |                                |
| sunitinib | Sutent   | VEGFR1.3, PDGFR, KIT, RET,     |
| sorafenib | Nexavar  | VEGFR1-3, PDGFR, KIT, RAF, RET |

**Tab.3: ROZDÍLY MEZI KONVENČNÍ A METRONOMICKOU CHEMOTERAPIÍ**

|                         | <b>konvenční</b>             | <b>metronomická (antiangiogenní).</b> |
|-------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| dávka                   | MTD                          | desetina dávky                        |
| přestávky mezi aplikací | týdny                        | dny                                   |
| cílové buňky            | nádor.buňky (NB)             | endotelie                             |
| záměr                   | zabít NB                     | zablokovat endotelie a růst           |
| využití                 | kurativní záměr<br>adjuvance | paliace                               |