

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Michaela Vondráčková

Neoangiogeneze jako cíl protinádorové terapie

Neoangiogenesis as a target for tumor therapy

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Ladislav Sivák

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16. 8. 2018

Podpis.....

Michaela Vondráčková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Mgr. Ladislavu Sivákovi za vedení mé bakalářské práce, trpělivost, vstřícnost a ochotu se mnou vše konzultovat. Dále děkuji RNDr. Marku Kovářovi, Ph.D. za formální kontrolu mé práce, cenné rady a připomínky. A v neposlední řadě mé díky patří rodině a přátelům, kteří mě během studia velmi podporovali a dodávali sílu.

Abstrakt

Neoangiogeneze asociovaná s tumory, neboli tvorba nových drobných cév v nádorové tkáni, představuje patologickou formu fyziologické angiogeneze. I přes svoji složitost a množství pro-angiogenních a anti-angiogenních faktorů v ní zapojených se neoangiogeneze stala slibným cílem v léčbě nádorů, a to hlavně z toho důvodu, že je pro růst nádorů a jejich diseminaci naprosto esenciální. Anti-angiogenní strategie jsou založeny na neutralizaci pro-angiogenních signálních molekul, blokaci vazebného místa jejich receptorů či inhibici receptorové tyrozinkinázové domény těchto receptorů. Pro anti-angiogenní strategii terapie nádorů je dále možno použít endogenní inhibitory angiogeneze, inhibici proliferace endotelových buněk, stabilizaci bazální membrány a v neposlední řadě cílenou disrupci samotné nádorové vaskulatury. Přestože v dnešní době již známe řadu anti-angiogenních molekul, pouze několik jich prošlo všemi fázemi klinického testování a bylo oficiálně schváleno pro léčbu nádorů. Mezi tato klinicky využívaná léčiva patří anti-VEGF-A protilátka bevacizumab (Avastin[®]), solubilní VEGF receptor aflibercept (Zaltrap[®]), protilátka cílená k VEGFR-2 receptoru ramucirumab (Cyramza[®]) a nízkomolekulární inhibitory tyrozinkinázové domény VEGFR sunitinib (Sutent[®]) a sorafenib (Nexavar[®]).

Klíčová slova: angiogeneze, neoangiogeneze, anti-angiogenní terapie, HIF-1, VEGF, bevacizumab

Abstract

Neoangiogenesis associated with tumours is formation of new blood vessels from pre-existing quiescent vessels in surrounding tumour tissue and it results from pathological employment of normal angiogenesis. Neoangiogenesis became a promising target for cancer treatment in spite of its complexity and many pro-angiogenic and anti-angiogenic factors involved in this process. Anti-angiogenic strategies are based on neutralization of angiogenic ligands, their receptors or inhibition of signalling pathways employed by such receptors. Other potential strategies include upregulation or delivery of endogenous inhibitors, inhibition of endothelial cell proliferation, stabilization of basement membrane and direct disruption of tumour vasculature. Many anti-angiogenic agents have been identified in past several decades but only a few of them were approved for clinical use. Anti-VEGF-A monoclonal antibody bevacizumab (Avastin[®]), soluble decoy VEGF receptor aflibercept (Zaltrap[®]), monoclonal antibody directed against VEGFR-2 ramucirumab (Cyramza[®]) and tyrosin kinase VEGFR inhibitors sunitinib (Sutent[®]) and sorafenib (Nexavar[®]) belong among approved agents.

Key words: angiogenesis, neoangiogenesis, anti-angiogenic therapy, HIF-1, VEGF, bevacizumab

Seznam zkratek

aFGF	acidic FGF	acidický FGF
Akt	protein kinase B	proteinkináza B
Ang	angiopoetin	angiopoetin
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
bFGF	basic FGF	bazický FGF
CA4	combretastatin A4	kombretastatin A4
CA4-P	combretastatin A4 phosphate	kombretastatin A4 fosfát
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	cyklický guanosin monofosfát
Dll4	Delta-like 4	Delta-like 4
DMXAA	5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid	5,6-dimethylxanthenon-4-octová kyselina
EGF	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
EGFR	EGF receptor	receptor pro EGF
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
ERK	extracellular signal regulated kinase	extracelulární signál regulující kináza
FGF	fibroblast growth factor	fibroblastový růstový faktor
FIH	factor inhibiting HIF	faktor inhibující HIF
FOLFIRI	leucovorin/fluorouracil/irinotecan	leucovorin/fluorouracil/irinotekan
HIF-1	hypoxia-inducible factor 1	hypoxií indukovaný faktor 1
HRE	hypoxia response element	hypoxický responzivní element
INF	interferon	interferon
IL	interleukin	interleukin
IMiD	immunomodulatory imide drugs	imunomodulační látky odvozené od imidu
Jag-1	Jagged 1	Jagged 1
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MEK	MAPK/ERK kinase	MAPK/ERK kináza
MMP	matrix metalloproteinase	matrix metaloproteináza
mTOR	mammalian target of rapamycin	savčí cíl rapamycinu
NO	nitric oxide	oxid dusnatý
PDGF	platelet-derived growth factor	destičkový růstový faktor
PDGFR	platelet-derived growth factor receptors	receptor pro PDGF
PHD	prolylhydroxylase	prolylhydroxyláza
PI3K	phosphatidylinositide 3-kinases	fosfatidylinositol-3-kináza
PKC	phospholipase C	fosfolipáza C
PIGF	placental growth factor	placentární růstový faktor
sGC	soluble guanylyl cyclase	solubilní guanylát cykláza
TAD-C	C-terminal transactivation domain	C-terminální transaktivační doména
TGF	transforming growth factor	transformující růstový faktor
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases	tkáňový inhibitor metaloproteináz
TNF-α	tumor necrosis factor α	tumor nekrotizující faktor α
TNFR	TNF receptor	receptor pro TNF
Tie2	receptor for Ang-2	receptor pro Ang-2
TSP	thrombospondin	trombospondin
VDA	vascular disrupting agents	látky působící disrupci cév
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	VEGF receptor	receptor pro VEGF
VHL	Von Hippel–Lindau	Von Hippel–Lindau

Obsah

1. Úvod	8
2. Fyziologická angiogeneze	9
2.1. <i>Sprouting</i> angiogeneze	9
2.2. Intususcepce cév.....	11
3. Nádorová angiogeneze	13
3.1. Regulace neoangiogeneze pomocí HIF-1	15
3.2. Regulace neoangiogeneze pomocí NO.....	16
4. Neoangiogeneze v nádorové terapii	17
4.1. Inhibice VEGF signalizace.....	17
4.2. Endogenní inhibitory	20
4.3. Inhibice proliferace endotelových buněk	21
4.4. Stabilizace bazální membrány	21
4.5. Selektivní disrupce nádorové vaskulatury.....	22
5. Inhibice neoangiogeneze v klinické praxi	22
6. Závěr	24
7. Seznam použité literatury	25

1. Úvod

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější a nejzávažnější onemocnění s vysokou mírou mortality. O jednu z prvních teorií o původu nádorového onemocnění se zasloužil antický lékař Hippokrates, který postuloval, že lidské tělo se skládá ze 4 základních tekutin: krev, hlen, žluč a černá žluč. Jakákoliv nerovnováha mezi těmito tekutinami pak vede k různým onemocněním a nadbytek černé žluči v daném místě orgánu je příčinou nádoru. Dnes je tato teorie spolu s ostatními nahrazena molekulárně genetickým konceptem. Pochopení mechanismu vzniku a šíření nádorů může přispět ke zlepšení našich schopností léčit nádorová onemocnění, která dnes zahrnují chirurgii, chemoterapii, radioterapii a imunoterapii.

Vedle těchto konvenčních terapií se rozvíjela terapie zaměřená na nádorovou vaskulaturu. Impulzem bylo zjištění, že krevní cévy mají nepřímý vliv na růst a šíření nádorů. Průkopníkem v této oblasti byl Judah Folkman, který potvrdil předpoklad svých předchůdců, že populace nádorových buněk a endotelové buňky krevních kapilár spolu mohou vytvářet vysoce integrovaný systém. Prokázal existenci solubilního faktoru sekretovaného nádorovými buňkami jako potencionálního mediátora neovaskularizace nádorové tkáně [1]. Tato molekula byla později popsána jako fibroblastový růstový faktor (FGF) a stala se tak první identifikovanou pro-angiogenní molekulou [2]. Dalším důležitým milníkem byla v roce 1982 identifikace vaskulárního endotelového faktoru (VEGF), původně známého pod názvem faktor vaskulární permeability, a objasnění jeho klíčové role ve vývoji neovaskulatury [3]. Tyto a další studie vedly k vývoji dnešních anti-angiogenních terapeutik, z nichž se některá dostala do klinické praxe a dnes jsou využívány k léčbě solidních nádorů v kombinaci s chemoterapií, radioterapií či imunoterapií.

2. Fyziologická angiogeneze

Srdce a cévy jsou první soustavou vznikající ve vyvíjejícím se organismu. Zabezpečují přísun živin do nově vznikajících tkání, výměnu plynů a odvod metabolitů. Formování oběhové soustavy je zahájeno již v průběhu embryonálního vývoje procesem zvaným vaskulogeneze. Jedná se o proces, kdy jsou cévy formovány *de novo* z progenitorů endotelových buněk, tzv. angioblastů. Během vaskulogeneze angioblasty proliferují a splývají v primitivní kapilární plexus. Následná expanze kapilárního plexu je zprostředkována pučením a větvením nových cév v procesu zvaném angiogeneze.

Angiogeneze je tvorba nových cév z již preexistujících a za fyziologických podmínek charakteristická zejména pro vyvíjející se embryo, kdy se vytváří vaskulatura důležitá pro správný růst a vývoj orgánů. U dospělých jedinců je angiogeneze naopak z velké části potlačena, uplatňuje se zejména v reparačních procesech, při hojení ran, a u žen při změnách v endometriu v průběhu menstruačního cyklu [4].

Fyziologická angiogeneze se uskutečňuje dvěma různými mechanismy. Nejlépe prozkoumanou a nejčastější formou je angiogeneze pučením, tzv. *sprouting* angiogeneze. Druhou formu představuje intususcepce novotvořených cév [5].

2.1. *Sprouting* angiogeneze

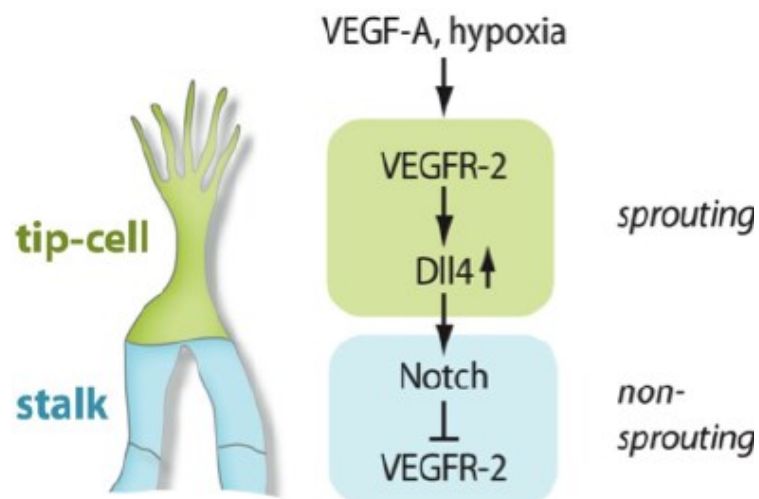
Sprouting angiogeneze představuje přísně regulovanou kaskádu kroků vedoucích od disoluce bazální membrány mateřské cévy ke vzniku plně funkční dceřiné cévy.

Po stimulaci klidové endotelové buňky vaskulárním endotelovým faktorem (VEGF) dochází k jejímu přechodu na aktivovaný fenotyp a je narušena rovnováha mezi angiopoetinem 1 a 2 (Ang-1, Ang-2). Oba tyto faktory, Ang-1 i Ang-2, zprostředkovávají svoji funkci prostřednictvím receptoru Tie2 na povrchu endotelových buněk. Ang-1, který je sekretován zejména perivaskulárními buňkami (tj. pericyty a buňky hladké svaloviny přiléhající k cévní stěně), udržuje endotelové buňky ve stabilizovaném stavu. Zatímco Ang-2, který je produkován samotnými endotelovými buňkami, funguje jako autokrinní antagonist Ang-1 a působí na destabilizaci bazální membrány [6]. Dochází k narušení mezibuněčných kontaktů u endotelií a uvolnění pericytů od cévní stěny. Vlivem oxidu dusnatého (NO), který způsobuje vazodilataci cév, a VEGF stimulujícího zvýšení permeability cévní stěny, je umožněna

extravazace proteáz a komponent podílejících se na tvorbě extracelulární matrix. Na degradaci bazální membrány endotelu se podílejí zejména matrix metaloproteinázy (MMP) [7].

Endotelové buňky následně proliferují, migrují a uchytávají se v nově utvořené matrix, kde se formují a tvoří základ pro nové cévy [4]. Působením VEGF dojde v aktivovaných endotelových buňkách k rozdělení na dva buněčné subtypy, *tip* a *stalk* buňky, které se liší svojí morfologií a charakteristickými vlastnostmi. *Tip* buňky se nacházejí na špičce nově vznikající cévy, jsou velmi pohyblivé, bohaté na filopodia a vykazují vysokou invazivitu. Tyto buňky se dělí jen minimálně. Jejich hlavní funkcí je migrace a vedení nově vznikající cévy ve směru pro-angiogenních signálů. *Stalk* buňky se naopak vyznačují vysoce proliferativním fenotypem a jsou zodpovědné za prodlužování a integritu cév [8].

Diferenciace endotelových buněk do *tip* nebo *stalk* fenotypu je regulována Notch-Delta/Jagged signalizací. Jako odpověď na interakci VEGF s VEGFR-2 receptorem je v *tip* buňkách upregulována exprese Delta-like ligandu 4 (Dll4). Dll4 se na sousedních endotelových *stalk* buňkách váže na Notch receptor, což vede ke snížení exprese VEGFR-2 a zvýšení exprese VEGFR-1. VEGFR-1 váže VEGF s vyšší afinitou než VEGFR-2. Na rozdíl od VEGFR-2 však vykazuje VEGFR-1 slabší kinázovou aktivitu a funguje tak jako regulátor VEGFR-2 signalizace. *Stalk* buňky se tak stávají méně responzivní k VEGF, naopak *tip* buňky jsou zodpovědné za prodlužování cévy ve směru nejsilnějšího signálu VEGF. Další molekula zapojena v *tip/stalk* diferenciaci je Jagged 1 (Jag-1), která je sekretována *stalk* buňkami a funguje jako antagonist Dll4 (obrázek 1) [9-11].



Obrázek 1: Diferenciace endotelových buněk. Signalizace VEGF diferencuje endotelové buňky na dva fenotypy, *tip* a *stalk*. V *tip* buňkách je zvýšena exprese Dll4, jehož interakce s Notch receptorem snižuje expresi VEGFR-2 v sousedních *stalk* buňkách a snižuje jejich senzitivitu k VEGF ligandu. Vazba VEGF k VEGFR-2 v *tip* buňkách umožňuje prodlužování cévy ve směru nejsilnějšího pro-angiogenního signálu. Převzato a upraveno z [11].

V poslední fázi angiogeneze nově vzniklé cévy morfologicky a funkčně dozrávají. Dochází k přechodu do klidového neproliferativního stádia (tzv. *phalanx*) [12], posílení mezibuněčných spojů a dokončení tvorby nové matrix. Na stabilizaci nově vzniklých cév se podílejí také pericyty, které dozrávají pod vlivem destičkového růstového faktoru (PDGF). Pericyty těsně přiléhají k endotelovým buňkám a slouží tak jako mechanická opora cév.

V jednotlivých fázích angiogenní kaskády je zapojena řada molekul, které regulují průběh jednotlivých dějů. Nejdůležitější faktory a jejich funkce v rámci angiogeneze jsou shrnuty v tabulce 1 [4].

Tabulka 1: Angiogenní ligandy, jejich receptory a efektorové funkce v angiogenezi.

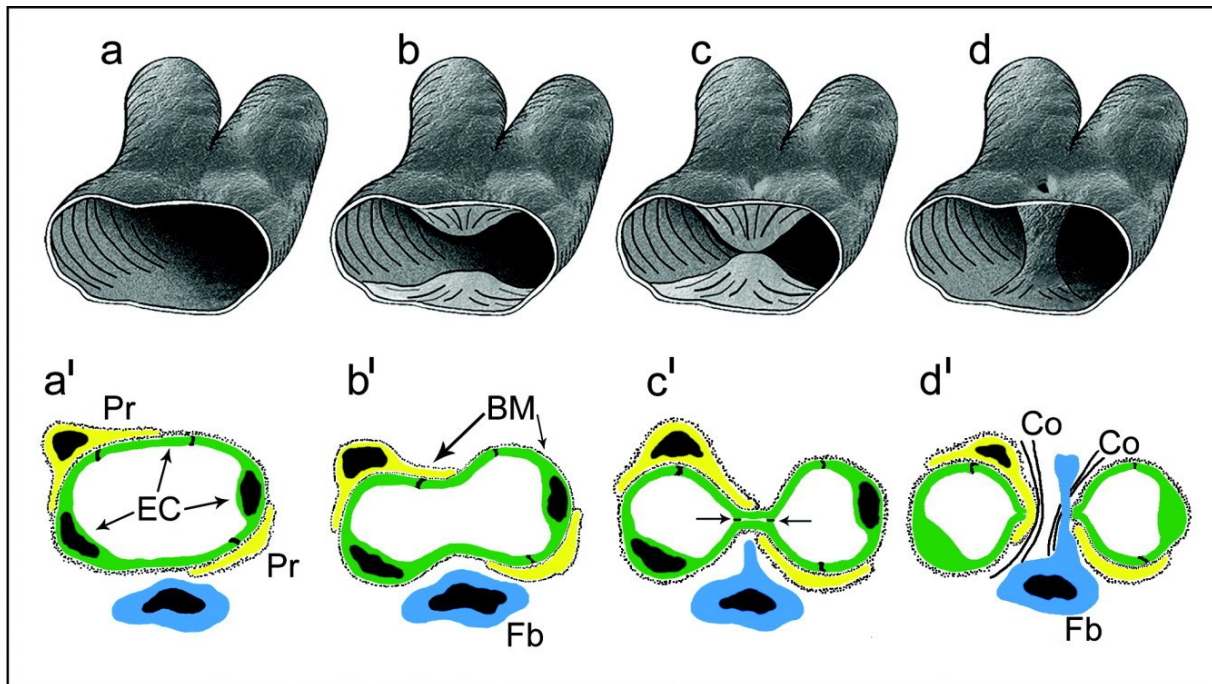
Ligand	Receptor	Funkce
VEGF	VEGFR-1, VEGFR-2 VEGFR-3	Zvýšení permeability cévní stěny Stimulace proliferaci a migrace endotelových buněk Inhibice apoptózy endotelových buněk Lymfangiogeneze
Ang-1	Tie2	Stabilizace endotelu Snížení permeability cév
Ang-2		Antagonista Ang-1 signalizace
PDGF	PDGFR- α , PDGFR- β	Stimulace DNA syntézy v endotelových buňkách Stimulace proliferace pericytů a buněk hladké svaloviny
aFGF/bFGF	FGFR	Stimulace proliferace a migrace endotelových buněk Stimulace tubulární formace endotelových buněk
TGF- β	TGF- β receptor	Stimulace a regulace produkce extracelulární matrix
TNF- α	TNFR	Stimulace tubulární formace Inhibice proliferace endotelií
EGF, TGF- α	EGFR	Stimulace proliferace endotelových buněk

Tabulka 1: VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor; VEGFR-(1-3) – receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor (1-3); Ang-(1,2) – angiopoetin (1,2); Tie2 – receptor pro Ang; PDGF – destičkový růstový faktor; PDGFR-(α,β) – receptor pro destičkový růstový faktor (α,β); a/bFGF – acidický/bazický fibroblastový růstový faktor; FGFR – receptor pro fibroblastový růstový faktor; TGF- β – transformující růstový faktor β ; TNF- α – tumor nekrotizující faktor α ; TNFR – receptor pro tumor nekrotizující faktor; EGF – epidermální růstový faktor; TGF- α – transformující růstový faktor α ; EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor. Převzato a upraveno z [4].

2.2. Intususcepce cév

Druhým mechanismem podílejícím se na remodelaci cévního systému je intususcepce cév. Dochází při něm k vchlipování protilehlých stěn endotelu do lumen a tím k rozdělení

preexistující cévy ve dvě (obrázek 2) [5]. Mechanismus je rozdělen do čtyřech postupných kroků, během nichž dochází nejprve k přiblížení protilehlých stěn endotelu a jejich vzájemnému kontaktu. Vzniká dvojvrstva endotelových buněk, která je následně perforována a vytvářejí se intraluminální pilíře. Ve třetím kroku se formuje cévní intersticiium, do jádra pilíře pronikají pericyty a myofibroblasty produkující kolagenní vlákna, která napomáhají jeho stabilizaci. V posledním kroku vznikají dvě plně funkční stabilizované cévy [13].



Obrázek 2: Intususcepcce cév. Trojrozměrné (a-d) a dvojrozměrné (a'-d') znázornění mechanismu intususcepcce. Proces začíná vchlipováním protilehlých buněk endotelu (EC) do nitra lumen (a, b, a', b'). Po intraendoteliálním kontaktu (c, c') dochází k perforaci vzniklé dvojvrstvy endotelových buněk a bazální membrány (BM) a tvorbě pilíře (d,d'). Vzniklý pilíř je postupován pericyty (Pr) a fibroblasty (Fb) produkujícími kolagenová vlákna (Co). Převzato z [5].

Angiogeneze intususcepcí je, na rozdíl od *sprouting* angiogeneze, poměrně rychlým procesem probíhající v řádově v hodinách, protože nevyžaduje proliferaci endotelových buněk. Na druhou stranu se vyznačuje menší invazivitou do okolní tkáně [5]. K tvorbě orgánové vaskulatury jsou během embryonálního vývoje využívány oba angiogenní mechanismy. Zásadní rozdíl mezi oběma mechanismy spočívá v jejich vzájemném načasování během vývoje. *Sprouting* angiogeneze působí zejména v prvních fázích vývoje a předchází rychlé expanzi a remodelaci krevního řečiště mechanismem intususcepcce. Mechanismus intususcepcce je využíván také v postembryonálním stadiu. Hlavním podnětem jsou buď fyziologické změny, např. v krevním toku během namáhání svalů, či lokální biochemické změny v expresi molekul, zejména bFGF a VEGF [14, 15].

3. Nádorová angiogeneze

Fenomén angiogeneze v nádorové tkáni (neoangiogeneze) byl poprvé popsán v roce 1907 [16]. Nicméně teprve v roce 1971 Judah Folkman postuloval, že růst nádorů a metastazování je závislé na angiogenezi a tudíž blokáce tohoto procesu by mohla být účinnou strategií v protinádorové léčbě [1]. Při hledání faktorů důležitých pro neovaskularizaci nádorové tkáně se ukázalo, že neoplastická nádorová tkáň konstantě exprimuje pro-angiogenní molekuly, kdežto normální buňky tak činí jen výjimečně [17]. Tento fenomén je označován jako angiogenní přepnutí (*switch*).

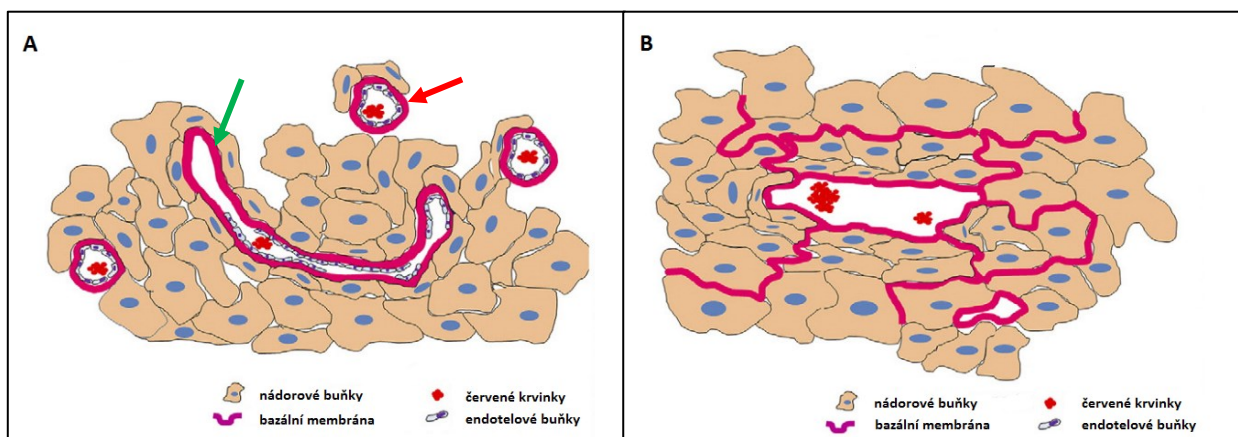
Angiogenní přepnutí představuje důležitý krok pro progresi nádoru, během kterého dochází k narušení rovnováhy mezi pro- a anti-angiogenními faktory (přirozenými angiogenními inhibitory) ve prospěch angiogeneze [18]. Angiogenní *switch* může spouštět řada signálů, mezi něž patří metabolický stres (např. nízké pH, nízká hladina pO_2 nebo hypoglykémie), mechanický stres (např. tlak způsobený proliferujícími buňkami) či genetické mutace (např. aktivace onkogenů nebo delece tumor-supresorových genů, které kontrolují produkci angiogenních regulátorů) [19]. Pro-angiogenní a anti-angiogenní faktory jsou sekretovány nejenom nádorovými buňkami, ale také stromálními buňkami a leukocyty infiltrujícími nádory (tabulka 2) [20, 21]. Jejich účinek na neoangiogenezi v nádorové tkáni se mění v závislosti na typu nádoru, jeho lokaci v organismu a průběhu jeho vývoje [22].

Tabulka 2: Přehled pro-angiogenních a anti-angiogenních faktorů

Pro-angiogenní faktory	Anti-angiogenní faktory
rodina VEGF	trombospondin
angiopoetiny	endostatin
aFGF/bFGF	TGF- β
PDGF	IFN- α , IFN- β
MMP	angiostatin
TNF- α	TIMP
IL-6	IL-12, IL-18

Tabulka 2: VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor; a/bFGF – acidický/bazický fibroblastový růstový faktor; TGF- β – transformující růstový faktor β ; PDGF – destičkový růstový faktor; IFN-(α , β) – interferon (α , β); MMP – matrix metaloproteináza; TNF- α – tumor nekrotizující faktor α ; TIMP – tkáňový inhibitor matrix metaloproteináz; IL-(6, 12,18) – interleukin (6, 12, 18). Převzato a upraveno z [23].

Při samotné neovaskularizaci nádorové tkáně se uplatňují stejné mechanismy jako při fyziologické angiogenezi, tj. *sprouting* angiogeneze a intususcepce cév. Mezi alternativní mechanismy novotvorby cév v nádorech patří vaskulogenní mimikry. Během tohoto procesu nádorové buňky napodobují funkci endotelových buněk tak, že vytvářejí funkční kanál napojený na vlastní cévu. Dalším alternativním mechanismem jsou tzv. mozaikové cévy, kdy se nádorové buňky stávají součástí stěny endotelu a vytvářejí tak mozaikovou strukturu cév [24]. Poslední mechanismus je označován jako tzv. koopce cév, kdy nádor roste podél již existujících cév a nepotřebuje tak indukovat neoangiogenní proces (obrázek 3) [25].



Obrázek 3: Alternativní mechanismy neoangiogeneze. A) červená šipka – kooptované cévy, kdy nádor roste podél funkčních cév; zelená šipka – mozaikové cévy sestávající částečně z nádorových buněk a endotelových buněk. B) vaskulogenní mimikry, které představují funkční avaskulární tubulární strukturu sestávající z nádorových buněk. Převzato a upraveno z [26].

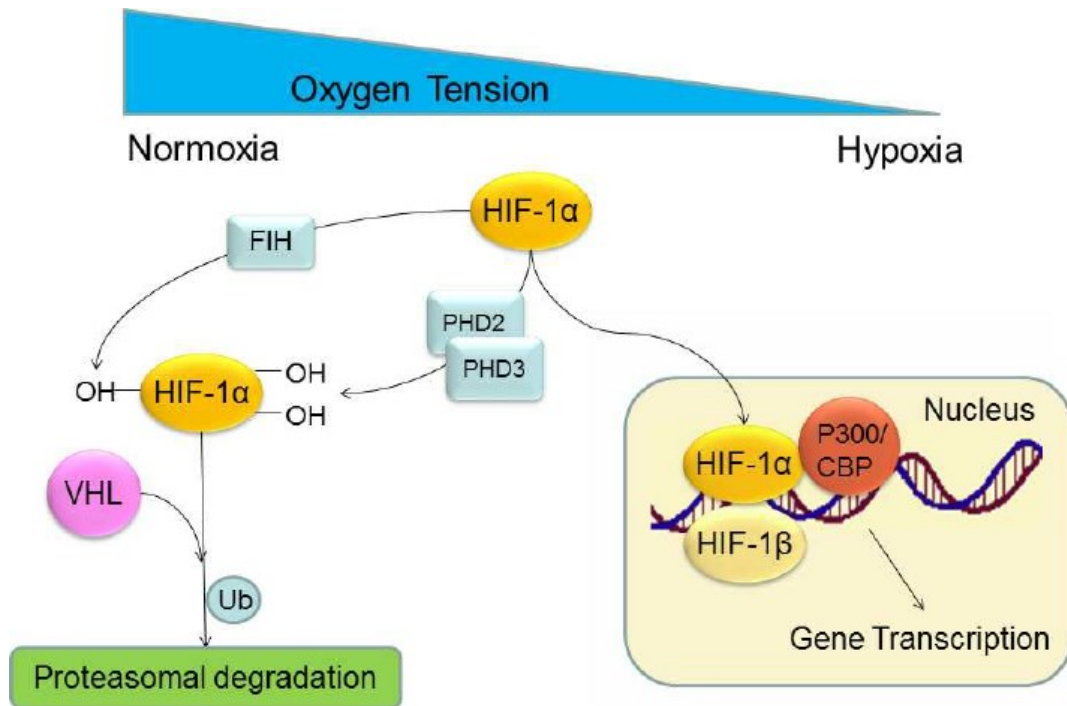
Mezi hlavní faktory nádorové tkáně regulující neoangiogenní proces patří zejména VEGF a angiopoetiny. Hrají stejnou úlohu jako ve fyziologickém procesu angiogeneze. Nicméně několik faktorů (např. HIF-1 a NO) včetně řady angiogenních inhibitorů mají specifickou funkci v procesu neoangiogeneze. Navíc exprese těchto faktorů není časově koordinována, což vede k abnormální morfologii cév. V kontrastu s normálními cévami jsou cévy nádoru nevyzrálé, vysoce dezorganizované, nekompletní, s nejednotným průměrem a tvarem, bez souvislé bazální membrány a fenestrované. Rozdíly jsou i v samotné ultrastruktuře cév. Endotelové buňky mají nepravidelný tvar a velikost, mohou růst nad sebou či vyčnívat do lumen. Pericyty a hladká svalovina, které cévy pomáhají stabilizovat, jsou uvolněné nebo zcela chybí [27]. Tato patologie má za následek špatný průtok krve cévami způsobující hypoxické a acidické oblasti v nádoru, což stimuluje další tvorbu cév [28].

3.1. Regulace neoangiogeneze pomocí HIF-1

Jeden z hlavních faktorů regulujících neoangiogenezi v nádorech je hypoxií indukovaný faktor 1 (HIF-1). Jedná se o heterodimer sestávající ze dvou podjednotek, α a β , který je regulován hladinou kyslíku. V normoxickém prostředí při dostatečném přísunu kyslíku je HIF-1 α podjednotka v buňkách hydroxylována pomocí prolylhydroxyláz 1-3 (PHD1-3) [29], ubikvitinylována za spoluúčasti Von Hippel-Lindau komplexu (VHL) a degradována v proteazomu [30]. Oproti tomu podjednotka β (HIF-1 β) není na hladině kyslíku závislá [31]. V hypoxickém prostředí jsou prolylhydroxylázy inaktivní, a proto nedochází k degradaci HIF-1 α podjednotky. V tkáních se sníženou hladinou kyslíku, proto dochází ke vzniku funkčního HIF-1 heterodimeru, který se váže na svá specifická místa na DNA, tzv. responzivní elementy (HRE) a spouští transkripci široké škály genů zapojených v adaptaci na hypoxii. Mezi tyto geny patří i geny pro faktory stimující angiogenezi jako např. VEGF (obrázek 4) [32, 33].

Aktivita HIF-1 α proteinu je také regulována pomocí přímého inhibitoru HIF-1, faktoru inhibujícího HIF-1 (FIH). Jedná se o peptidaspartát beta-dioxygenázu, která je závislá na koncentraci kyslíku ve tkáni a přímo ovlivňuje transkripční aktivitu faktoru HIF [34]. Za normoxických podmínek FIH hydroxyluje asparaginové zbytky v C-terminální oblasti transkripční domény (TAD-C) HIF-1 α , čímž inhibuje interakci HIF-1 α s transkripčním faktorem p300/CBP a tím blokuje jeho aktivitu [35, 36].

Další mechanismus podílející se na regulaci transkripční aktivity HIF-1 α , který je na rozdíl od regulace FIH nezávislý na koncentraci kyslíku, je proteinkinázami zprostředkovaná fosforylace. To se děje prostřednictvím p42/p44 mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) a vede ke zvýšení transkripční aktivity HIF-1 α [37, 38].



Obrázek 4: Regulace HIF-1 α . V normoxickém prostředí je aktivita HIF-1 regulována prolylhydroxylázami (PHD) nebo FIH. HIF-1 α podjednotka je hydroxylována PHD, ubiquitinylována a poslána k degradaci do proteazomu. Regulace FIH blokuje transkripční aktivitu HIF-1 hydroxylací podjednotky HIF-1 α v C-terminální transaktivační doméně. Převzato z [39].

3.2. Regulace neoangiogeneze pomocí NO

Oxid dusnatý (NO) je malá signální molekula, která je v endotelových buňkách produkována endoteliální syntázou oxidu dusnatého (eNOS). NO volně difunduje do buněk, kde se váže na solubilní guanylát cyklázu (sGC) a iniciuje produkci cyklického guanisinmonofosfátu (cGMP), který reguluje řadu signálních drah ovlivňujících funkci endotelových buněk [40].

Přímý vliv je zprostředkován stimulací sGC/cGMP signální dráhy, která zvyšuje DNA syntézu, proliferaci a migraci endotelií [41]. Tento pro-angiogenní účinek je přímo závislý na koncentraci NO v endotelových buňkách. Nízká koncentrace efekt potencuje, zatímco vysoká naopak inhibuje [42].

Hlavní nepřímý vliv NO na indukci neoangiogeneze probíhá prostřednictvím regulace exprese VEGF v nádorových buňkách. Za normoxických podmínek NO indukuje syntézu HIF-1 α a inhibuje aktivitu prolylhydroxyláz, což vede k akumulaci HIF-1 α a aktivaci HIF-1 [43-45]. Mezi nepřímé vlivy NO na neoangiogenezi v nádorech řadíme též schopnost inhibovat

expresi endogenních anti-angiogenních faktorů trombospondinu 1 (TSP-1) a angiostatinu, a podporovat stabilizaci novotvořených cév perivaskulárními buňkami [46-48].

4. Neoangiogeneze v nádorové terapii

Cílená terapie proti neoangiogennímu procesu představuje v kombinaci s chemoterapií a radioterapií slibnou strategii v léčbě solidních nádorů. Výhodou kombinované terapie je, že angiogenní inhibitory nevykazují dlouhodobější cytotoxický efekt a na rozdíl od chemoterapie neindukují rezistenci nádorových buněk. Navíc široké spektrum angiogenních faktorů a jejich vzájemná provázanost umožňuje cílenou terapií ovlivňovat několik procesů angiogeneze najednou. Nevýhodou představuje redundance těchto faktorů – je-li jedna molekula blokována (např. VEGF), tumor může zvýšit sekreci jiné pro-angiogenní molekuly (např. bFGF).

Způsoby léčby lze rozdělit do tří základních strategií: (1) neutralizace angiogenních ligandů, blokace receptorů a blokace signálních dráh vyvolaných interakcí ligandů s příslušnými receptory, (2) zvýšení sekrece nebo aplikace endogenních inhibitorů angiogeneze či (3) přímé zacílení na nádorovou vaskulaturu (inhibice proliferace endotelových buněk, stabilizace bazální membrány, disrupce nádorové vaskulatury) [19].

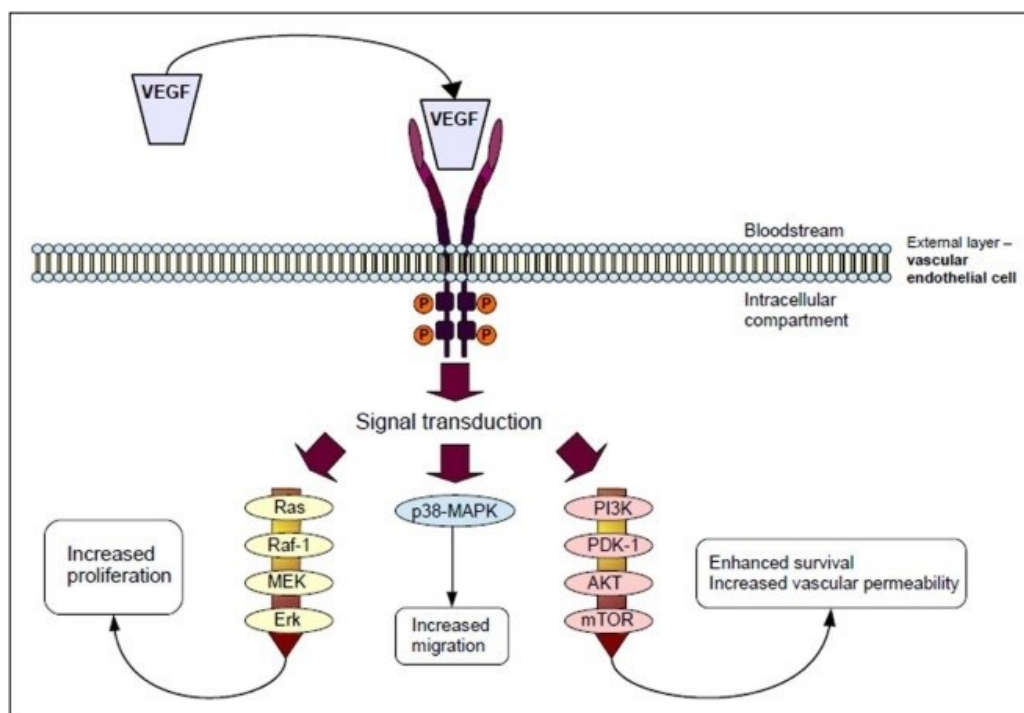
4.1. Inhibice VEGF signalizace

Hlavním regulátorem fyziologické a patologické angiogeneze je VEGF-A patřící do genové rodiny homodimerických glykoproteinů s osmi cysteinovými zbytky, která dále zahrnuje VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a placentární růstový faktor (PlGF). Na počátku 90. let minulého století byl v Ofr viru identifikován také VEGF-E, který vykazuje sekvenční homologii k VEGF-A. A jako poslední člen genové rodiny byl v nedávné době identifikován i VEGF-F izolovaný z hadího jedu. Tyto molekuly se s různou specifitou a afinitou váží k tyrozinkinázovým receptorům VEGFR-1, -2 a -3.

Zatímco interakce VEGF-A s VEGFR-2, lokalizovaného na povrchu endotelových buněk, podporuje angiogenezi, VEGF-C a -D se preferenčně váží k VEGFR-3 na lymfatických endotelových buňkách a indukují lymfangiogenezi (tj. novotvorbu lymfatických cév) [4]. Nicméně VEGFR-3 může být exprimován také na *tip* buňkách nádorových cév a skrze VEGF-C a -D podporovat neoangiogenezi [49]. Vazba VEGF-A k VEGFR-2 vede k autofosforylaci

specifických tyrosinových zbytků v cytoplazmatické doméně VEGFR-2 a spuštění řady signálních kaskád vedoucích k proliferaci endotelových buněk, migraci a tubulární formaci (obrázek 5). Aktivace fosfatidylinositol-3-kinázové (PI3K) transdukční dráhy signalizující přes proteinkinázu B (Akt) a proteinkinázu mTOR reguluje proliferaci endotelii, inhibuje jejich apoptózu a zvyšuje permeabilitu cév [50]. Další důležitá dráha je zprostředkována přes aktivaci proteinkinázy C (PKC) a následné aktivaci extracelulární signál regulující proteinkinázy 1/2 (ERK1/2), která je zásadní pro proliferaci endotelových buněk [51]. Migrace endotelových buněk je modulována prostřednictvím aktivace p38-MAPK regulující reorganizaci aktinu a formování stresových vláken [52].

Účinek VEGF faktoru lze inhibovat na třech úrovních – neutralizací ligandu, blokadí vazebné domény receptoru nebo blokadí receptorové tyrozinkinázové domény.



Obrázek 5: Signální dráha VEGFR receptoru. Vazba VEGF k příslušnému VEGFR na povrchu endotelových buněk vede k autofosforylaci receptorové tyrozinkinázové domény a následné aktivaci řady signálních drah. Ras/Raf/MEK/ERK signální dráha moduluje buněčnou proliferaci, p38-MAPK kinázová dráha řídí migraci endotelových buněk a PI3K/Akt/mTOR kaskáda reguluje životnost buněk a zvyšuje permeabilitu cév. Převzato a upraveno z [53].

Nejvýznamnějším zástupcem VEGF inhibitorů fungujících na principu neutralizace ligandu je bevacizumab, humanizovaná IgG1 monoklonální protilátka, která byla prvním schváleným léčivem pro terapii nádorových onemocnění cíleným k neangiogennímu procesu. Bevacizumab váže volný VEGF-A, čímž zamezuje jeho vazbu na receptor [54].

V protinádorové terapii se používá zejména v kombinaci s konvenční chemoterapií nebo radioterapií, kde potencuje účinek léčby [55]. Nicméně vzhledem k důležité roli VEGF-A ve fyziologické angiogenezi způsobuje jeho inhibice bevacizumabem vážné nežádoucí účinky, atypické od vedlejších účinků spojených s chemoterapií a radioterapií (např. rozestup ran v průběhu hojení, krvácivost, tromboembolie), a vyšší riziko úmrtí [56]. S bevacizumabem, ale i dalšími VEGF inhibitory, je spojen koncept tzv. cévní normalizace. Ten cílí na cévní abnormality v nádoru indukované vysokou hladinou pro-angiogenního VEGF. Pomocí bevacizumabu lze indukovat rovnováhu mezi pro-angiogenními a anti-angiogenními faktory, což vede k remodelaci nádorové vaskulatury, která strukturně i funkčně připomíná normální cévy. Tím je dosaženo lepšího průtoku krve cévami v nádoru a s tím spojené lepší koncentrace chemoterapeutika v nádoru. Navíc lepším zásobením nádoru kyslíkem se zvyšuje účinnost radioterapie založené na tvorbě kyslíkových radikálů [57].

Dalším zástupcem inhibitorů vazajících ligand je aflibercept. Jedná se o solubilní fúzní protein, jehož vazebná doména je podobná extracelulární doméně povrchového receptoru VEGFR-1 a VEGFR-2 [58]. Aflibercept váže VEGF-A s vyšší afinitou než monoklonální protilátky (např. bevacizumab) cílené proti tomuto ligandu. Navíc váže další členy VEGF rodiny, VEGF-B a PlGF, což zvyšuje jeho účinnost v nádorové terapii [59].

Zástupcem inhibitorů, kteří inhibují VEGF signalizaci prostřednictvím kompetitivní vazby na VEGFR receptor je ramucirumab. Jedná se o lidskou blokační IgG1 monoklonální protilátku, která se s vysokou afinitou váže na VEGFR-2 receptor, čímž blokuje buněčnou odpověď, která by byla spuštěna navázáním ligandu na receptor [60]. V klinické praxi se používá zejména v kombinaci s cytostatiky založených na bázi platiny [61].

Sunitinib a sorafenib jsou zástupci nízkomolekulárních inhibitorů receptorové tyrozinkinázové aktivity VEGFR. Sunitinib se váže na ATP vazebné místo tyrozinkinázové domény VEGFR, čímž zabraňuje fosforylaci proteinů a brání tak přenosu signálu. Mezi jeho cílové struktury patří nejen VEGFR-1 až -3, ale řada dalších receptorových tyrozinkináz (např. receptor pro faktor kmenových buněk c-Kit/CD117), jejichž blokace může mít přímý protinádorový efekt [62, 63]. Sorafenib je také multikinázový inhibitor, který nejenže působí na tyrozinkinázy receptorů endotelových buněk (např. VEGFR-2), čímž působí jako anti-angiogenní molekula, ale inhibuje také proliferaci samotných nádorových buněk. Proliferace nádorových buněk je inhibována blokací Raf kinázy a tím celé Raf/MEK/ERK signální dráhy [64, 65].

4.2. Endogenní inhibitory

Mezi přirozené endogenní inhibitory angiogeneze patří endostatin, peptidický fragment, vznikající štěpením C-konce kolagenu XVIII [66]. Jeho vznik a následné působení na lokální angiogenezi je spuštěno během aktivace endotelových buněk, kdy jsou uvolňovány proteolytické enzymy [67]. Endostatin inhibuje proliferaci endotelových buněk zastavením buněčného cyklu v G1 fázi [68]. Navíc inhibuje migraci endotelových buněk, snižuje expresi VEGF a přímou interakcí s VEGFR-2 brání navázání ligandu [69, 70].

Další z endogenních inhibitorů, tumstatin, dostal své označení pro svoji schopnost inhibovat růst nádoru, *tumor stasis*. Jedná se o fragment z C-koncové globulární domény kolagenu IV s přímým protinádorovým a anti-angiogenním účinkem. V nádorových buňkách snižuje potenciál mitochondriální membrány a indukuje uvolnění cytochromu c z mitochondrií do cytosolu. Tím je spuštěna kaspázová kaskáda vedoucí k apoptóze nádorových buněk [71]. Anti-angiogenní efekt tumstatinu je zprostředkován inhibicí exprese mTOR kinázy vedoucí k inhibici translace proteinů v proliferujících endotelových buňkách a indukcí apoptózy endotelových buněk [72, 73].

Trombospondiny jsou skupinou pěti multimerních glykoproteinů, z nichž trombospondin-1 a -2 (TSP-1, TSP-2) mají inhibiční účinek na angiogenezi. TSP-1 byl prvním identifikovaným endogenním inhibitorem. Jeho aktivita není omezena pouze na endotelové buňky, ale také inhibuje růst a metastazování nádorů. Anti-angiogenní účinek TSP-1 je zprostředkován interakcí s multivalentními receptory CD47 a CD36 na povrchu endotelových buněk. Vazba TSP-1 k CD47 inhibuje NO/cGMP signalizaci, což vede k negativní regulaci proliferace a přežívání endotelových buněk [74]. Interakce s CD36 indukuje v endotelových buňkách expresi tzv. ligandu smrti FasL/CD95L. FasL se váže na tzv. receptor smrti Fas/CD95, jehož exprese je nízká v klidových endotelových buňkách, ale naopak zvýšena po stimulaci pro-angiogenními faktory (VEGF, bFGF). Po aktivaci Fas je v endotelových buňkách spuštěna vnější apoptická dráha zahrnující kaspázy 8 a 3 [75]. Syntetickým analogem TSP-1 je ABT-510, 9 aminokyselin dlouhý peptid, který inhibuje VEGF indukovanou migraci, proliferaci a tubulární formaci endotelových buněk. ABT-510 také váže CD36, čímž mimikuje intracelulární signalizaci TSP-1/CD36 [76].

4.3. Inhibice proliferace endotelových buněk

Inhibitorem proliferace endotelových buněk je fumagilin, přírodní antibiotikum, jehož potenciální anti-angiogenní účinek byl objeven náhodou, když kultivační miska s endotelovými buňkami byla kontaminována houbou *Aspergillus fumigatus*. Nicméně fumagilin vykazoval limitující vedlejší efekt projevující se závažným snížením váhy u experimentálních myších modelů, který neumožnil jeho převedení do klinické praxe. Ve snaze obejít tento vedlejší efekt bylo syntetizováno několik analogů fumagilinu, mezi nimiž se jako nejvíce potentní derivát jevil TNP-470. Ten postoupil až do fáze I klinického testování, ale pro vedlejší neurotoxické účinky bylo jeho testování pozastaveno [77, 78].

Skupinou látek působící také na inhibici proliferace endotelových buněk jsou imunomodulační látky (IMiD). První popsanou látkou je thalidomid, což je racemická směs derivátu kyseliny glutamové. R-enantiomer má hypnotické účinky, naopak S-enantiomer je silně teratogenní [79]. V 50. letech minulého století byl thalidomid užíván těhotnými ženami na ranní nevolnost, ale pro své teratogenní účinky, které způsobovaly závažné vrozené vady u dětí, byl zakázán [80]. Znovuobjevení a prokázání anti-angiogenních, ale i dalších protinádorových a imunomodulačních účinků thalidomidu vedlo k syntéze jeho potentnějších derivátů – lenalidomidu a pomalidomidu [81]. Anti-angiogenní efekt těchto látek je zprostředkován snížením exprese pro-angiogenních faktorů VEGF a bFGF, a snížením produkce matrix metaloproteináz. Tím je zamezena migrace a adheze endotelových buněk a formace nových krevních kapilár [82].

4.4. Stabilizace bazální membrány

Další možností nádorové terapie zaměřené na inhibici neoangiogeneze představuje stabilizace bazální membrány cév, která je degradována matrix metaloproteinázami. Použitím inhibitorů MMP je blokována jejich proteolytická aktivita, čímž je zabráněna fragmentace bazální membrány a zamezena migrace endotelových buněk. Přírodní látkou patřící mezi inhibitory MMP je Neovastat, což je purifikovaný extrakt ze žraločí chrupavky. Vedle jeho schopnosti inhibovat MMP, inhibuje VEGF/VEGFR-2 signální dráhu a indukuje apoptózu v endotelových buňkách [83, 84]. Marimastat a Batimastat jsou zástupci syntetických MMP inhibitorů. Jedná se širokospektrální nízkomolekulární látky kovalentně vázající ion zinku v aktivním místě metaloproteináz, který je nutný k jejich proteolytické aktivitě [85]. Jejich

využití v protinádorové terapii je značně ovlivněno nejenom specifitou inhibovat MMP, ale také tím, že aktivita některých MMP je asociována jak se stimulací, tak inhibicí růstu nádoru [86].

4.5. Selektivní disrupce nádorové vaskulatury

Anti-angiogenní strategií zaměřenou přímo proti nádorové vaskulatuře představuje aplikace látek způsobujících disrupci cév, tzv. VDA (*vascular disruption agents*).

První identifikovanou látkou je výtažek z kůry jihoafrického stromu *Combretum caffrum*, který se váže na vazebné místo pro kolchicin na tubulinu a způsobuje depolymerizaci mikrotubulů [87, 88]. Jeho nejúčinnějším derivátem je kombretastatin A4 fosfát (CA4-P), který je v organismu konvertován endogenními nespecifickými fosfatázami na kombretastatin A4 (CA4) [89]. CA4 způsobuje disrupci cytoskeletu endotelových buněk v nádoru, což vede k rapidnímu snížení průtoku krve touto oblastí a nekróze nádorové tkáně [90, 91]. Preferenční destrukce nádorových oproti normálním endoteliím pomocí CA4 je dána jejich relativní nevyzrálostí a nestabilitou [89].

Další VDA molekulou, odvozenou od kyseliny flavonové, je DMXAA (5,6-dimethylxanthenon-4 octová kyselina) [92]. DMXAA přímo indukuje hyperpermeabilitu cév nádorové tkáně zvýšením sekrece TNF- α , a tím zvýší únik krve do okolní tkáně, vznik hypoxie a sníží průtok krve nádorem [93-95]. Poškození cév a nádorová hypoxie vzniklé v důsledku selhání průtoku krve nádorem mají vliv na uvolňování serotoninu, který amplifikuje efekt TNF- α , a podílí se redukci krevního toku a indukci hemorhagické nekrózy [96, 97].

5. Inhibice neoangiogeneze v klinické praxi

V současné době je řada léčiv s anti-angiogenním účinkem již schválena pro léčbu nádorů.

Bevacizumab, prodáváný pod obchodní značkou Avastin[®], je v České republice registrovaným léčivem od roku 2005. V kombinaci s různými typy chemoterapeutik se používá k léčbě metastazujícího karcinomu tlustého střeva, prsu a nemalobuněčného plicního karcinomu. V kombinaci s INF- α je indikován k léčbě pacientů s pokročilým a/nebo metastazujícím karcinomem ledvin. Dále se používá k léčbě epitelového nádoru vaječníků,

vejcovodů, primárního nádoru pobřišnice a karcinomu děložního čípku [98]. Pozitivní výsledky projevil ve fázi II klinického testování, kde byl použit v kombinaci s irinotekanem, inhibitorem topoisomerázy I, k léčbě rekurentního glioblastomu [99].

Aflibercept (Zaltrap[®]) v kombinaci s chemoterapií leucovorin/fluorouracil/irinotekan (FOLFIRI) výrazně prodlužuje život pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem v porovnání s FOLFIRI samotným po předchozí léčbě oxaliplatinou [100].

Ramucirumab (Cyramza[®]) úspěšně dokončil fázi III klinického testování pro léčbu karcinomu žaludku nebo adenokarcinomu gastroesofageální junkce jak v monoterapii, čímž je prvním takto používaným léčivem, tak v kombinaci s paklitaxelem [101, 102]. V kombinaci s FOLFIRI lze ramucirumab použít k 2. linii léčby metastatického kolorektálního karcinomu, který byl v 1. linii léčen bevacizumabem [103]. Kombinace s docetaxelem je se používá pro léčbu pacientů s pokročilým nebo metastazujícím nemalobuněčným karcinomem plic [104]. V současné době je ramucirumab ve III fázi klinických testů pro léčbu karcinomu prsu. V rámci této studie byla provedena retrospektivní analýza prokazující pozitivní účinek blokátorů β -adrenergických receptorů v kombinaci s ramucirumabem [105]. Další probíhající studií ve fázi III klinického testování je použití ramucirumabu s docetaxelem k léčbě uroteliálního karcinomu [106].

Sunitinib (Sutent[®]) a sorafenib (Nexavar[®]) také úspěšně dokončily fázi III klinických testů a prokázaly signifikantní podíl na regresi některých typů nádorů. Nexavar prokázal aktivitu s klinicky přijatelnou toxicitou při léčbě pokročilého renálního karcinomu, hepatocelulárního karcinomu a diferencovaného karcinomu štítné žlázy rezistentního ke standardní léčbě radioaktivním jodem [107-109]. Je indikován k léčbě gastrointestinálního stromálního tumoru a metastatického renálního karcinomu rezistentního vůči konvenční terapii [110]. V nedávné době úspěšně dokončil fázi III klinického testování pro léčbu pacientů s vysokým rizikem recidivy renálního karcinomu po nefrektomii [111].

Další látky jsou stále v preklinických studiích a hledá se způsob, jak zefektivnit jejich anti-angiogenní účinek a minimalizovat vedlejší efekty. Řada léčiv postoupila až do fáze III klinických studií, avšak kvůli vážným vedlejším účinkům, či nesignifikantnímu efektu na regresi nádoru a z kvalitnění života, neuspěly.

6. Závěr

Od doby, kdy byla zjištěna přímá souvislost mezi nádorem a neovaskularitou, došlo k velkému pokroku našich znalostí o principu a mechanismu neoangiogeneze a faktorech, které jsou v tomto procesu zapojeny. Díky tomu byly navrženy různé strategie inhibice neoangiogeneze a některé byly pro svůj relativní úspěch převedeny do klinické praxe. Nicméně klinický potenciál zatím vykazují převážně molekuly, které specificky blokují účinek pouze jednoho pro-angiogenního faktoru. Redundance těchto pro-angiogenních signálů sekretovaných nádorovými buňkami či nepřímo buňkami nádorového mikroprostředí může významně snižovat terapeutický účinek takového léčiva. Každý nádor vykazuje odlišný angiogenní potenciál v závislosti na jeho lokaci v organismu a původu buňky, která dala základ celému malignímu klonu. Proto by přesná charakterizace angiogenního profilu daného nádoru mohla vést k navržení vhodné kombinace anti-angiogenních molekul, které by současně cílily na více míst angiogenní kaskády.

Některé nádory jsou navíc schopné využít alternativní mechanismy neoangiogeneze, jako jsou vaskulogenní mimikry, mozaikové cévy, koopce cévy, k tvorbě cévní vaskulatury a obejít tak terapeutickou blokaci. Nalezení specifických mechanismů, kterými jsou nádory schopné vyvinout rezistenci k dané anti-angiogenní terapii, by mohlo vést k identifikaci nových typů léčiv a k efektivnějšímu využití terapeutického potenciálu inhibice neoangiogeneze.

7. Seznam použité literatury

- [1] J. Folkman, "Tumor angiogenesis: therapeutic implications," *N Engl J Med*, vol. 285, pp. 1182-6, Nov 18 1971.*
- [2] J. Folkman and M. Klagsbrun, "Angiogenic factors," *Science*, vol. 235, pp. 442-7, Jan 23 1987.*
- [3] D. R. Senger, S. J. Galli, A. M. Dvorak, C. A. Perruzzi, V. S. Harvey, and H. F. Dvorak, "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid," *Science*, vol. 219, pp. 983-5, Feb 25 1983.
- [4] M. Papetti and I. M. Herman, "Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 282, pp. C947-70, May 2002.*
- [5] P. H. Burri, R. Hlushchuk, and V. Djonov, "Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance," *Dev Dyn*, vol. 231, pp. 474-88, Nov 2004.*
- [6] M. Felcht, R. Luck, A. Schering, P. Seidel, K. Srivastava, J. Hu, *et al.*, "Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling," *J Clin Invest*, vol. 122, pp. 1991-2005, Jun 2012.
- [7] P. Carmeliet, "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis," *Nat Med*, vol. 6, pp. 389-95, Apr 2000.*
- [8] H. Gerhardt, M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, *et al.*, "VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia," *J Cell Biol*, vol. 161, pp. 1163-77, Jun 23 2003.
- [9] R. Benedito, C. Roca, I. Sorensen, S. Adams, A. Gossler, M. Fruttiger, *et al.*, "The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis," *Cell*, vol. 137, pp. 1124-35, Jun 12 2009.
- [10] M. Hellstrom, L. K. Phng, J. J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, *et al.*, "Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis," *Nature*, vol. 445, pp. 776-80, Feb 15 2007.
- [11] R. H. Adams and K. Alitalo, "Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, pp. 464-78, Jun 2007.*
- [12] M. Mazzone, D. Dettori, R. L. de Oliveira, S. Loges, T. Schmidt, B. Jonckx, *et al.*, "Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization," *Cell*, vol. 136, pp. 839-851, Mar 6 2009.
- [13] V. G. Djonov, H. Kurz, and P. H. Burri, "Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism," *Dev Dyn*, vol. 224, pp. 391-402, Aug 2002.
- [14] A. N. Makanya, R. Hlushchuk, and V. G. Djonov, "Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling," *Angiogenesis*, vol. 12, pp. 113-23, 2009.*

- [15] A. N. Makanya, R. Hlushchuk, O. Baum, N. Velinov, M. Ochs, and V. Djonov, "Microvascular endowment in the developing chicken embryo lung," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 292, pp. L1136-46, May 2007.
- [16] E. Goldmann, "The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals, with special reference to the Vascular System," *Proc R Soc Med*, vol. 1, pp. 1-13, 1908.
- [17] P. M. Gullino, "Angiogenesis and oncogenesis," *J Natl Cancer Inst*, vol. 61, pp. 639-43, Sep 1978.*
- [18] D. Hanahan and J. Folkman, "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis," *Cell*, vol. 86, pp. 353-64, Aug 9 1996.*
- [19] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Angiogenesis in cancer and other diseases," *Nature*, vol. 407, pp. 249-57, Sep 14 2000.*
- [20] M. R. Freeman, F. X. Schneck, M. L. Gagnon, C. Corless, S. Soker, K. Niknejad, *et al.*, "Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis," *Cancer Res*, vol. 55, pp. 4140-5, Sep 15 1995.
- [21] D. Fukumura, R. Xavier, T. Sugiura, Y. Chen, E. C. Park, N. Lu, *et al.*, "Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells," *Cell*, vol. 94, pp. 715-25, Sep 18 1998.
- [22] S. Ramanujan, G. C. Koenig, T. P. Padera, B. R. Stoll, and R. K. Jain, "Local imbalance of proangiogenic and antiangiogenic factors: a potential mechanism of focal necrosis and dormancy in tumors," *Cancer Res*, vol. 60, pp. 1442-8, Mar 1 2000.
- [23] P. Klener, "[Angiogenesis as part of the tumor "ecosystem" and possibilities to influence it]," *Klin Onkol*, vol. 23, pp. 14-20, 2010.*
- [24] R. Folberg, M. J. Hendrix, and A. J. Maniotis, "Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis," *Am J Pathol*, vol. 156, pp. 361-81, Feb 2000.*
- [25] C. N. Qian, H. Q. Min, X. M. Liang, S. S. Zheng, and H. L. Lin, "Primary study of neovasculature correlating with metastatic nasopharyngeal carcinoma using computer image analysis," *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 123, pp. 645-51, 1997.
- [26] K. Angara, T. F. Borin, and A. S. Arbab, "Vascular Mimicry: A Novel Neovascularization Mechanism Driving Anti-Angiogenic Therapy (AAT) Resistance in Glioblastoma," *Transl Oncol*, vol. 10, pp. 650-660, Aug 2017.*
- [27] J. W. Baish and R. K. Jain, "Fractals and cancer," *Cancer Res*, vol. 60, pp. 3683-8, Jul 15 2000.
- [28] G. Helmlinger, F. Yuan, M. Dellian, and R. K. Jain, "Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation," *Nat Med*, vol. 3, pp. 177-82, Feb 1997.
- [29] P. Jaakkola, D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, *et al.*, "Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation," *Science*, vol. 292, pp. 468-72, Apr 20 2001.
- [30] M. Ivan, K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, *et al.*, "HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing," *Science*, vol. 292, pp. 464-8, Apr 20 2001.

- [31] L. E. Huang and H. F. Bunn, "Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 19575-8, May 30 2003.*
- [32] G. L. Semenza and G. L. Wang, "A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation," *Mol Cell Biol*, vol. 12, pp. 5447-54, Dec 1992.
- [33] J. A. Forsythe, B. H. Jiang, N. V. Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos, *et al.*, "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1," *Mol Cell Biol*, vol. 16, pp. 4604-13, Sep 1996.
- [34] P. C. Mahon, K. Hirota, and G. L. Semenza, "FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity," *Genes Dev*, vol. 15, pp. 2675-86, Oct 15 2001.
- [35] D. Lando, D. J. Peet, J. J. Gorman, D. A. Whelan, M. L. Whitelaw, and R. K. Bruick, "FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor," *Genes Dev*, vol. 16, pp. 1466-71, Jun 15 2002.
- [36] Z. Arany, L. E. Huang, R. Eckner, S. Bhattacharya, C. Jiang, M. A. Goldberg, *et al.*, "An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, pp. 12969-73, Nov 12 1996.*
- [37] D. E. Richard, E. Berra, E. Gothie, D. Roux, and J. Pouyssegur, "p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1," *J Biol Chem*, vol. 274, pp. 32631-7, Nov 12 1999.
- [38] I. Mylonis, G. Chachami, M. Samiotaki, G. Panayotou, E. Paraskeva, A. Kalousi, *et al.*, "Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha," *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 33095-106, Nov 3 2006.
- [39] R. Tal, "The role of hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha in preeclampsia pathogenesis," *Biol Reprod*, vol. 87, p. 134, Jun 2012.*
- [40] L. J. Ignarro, "Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview," *J Physiol Pharmacol*, vol. 53, pp. 503-14, Dec 2002.*
- [41] C. J. Oliveira, F. Schindler, A. M. Ventura, M. S. Morais, R. J. Arai, V. Debbas, *et al.*, "Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells," *Free Radic Biol Med*, vol. 35, pp. 381-96, Aug 15 2003.
- [42] M. K. Jones, K. Tsugawa, A. S. Tarnawski, and D. Baatar, "Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 318, pp. 520-8, May 28 2004.
- [43] E. Metzen, J. Zhou, W. Jelkmann, J. Fandrey, and B. Brune, "Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases," *Mol Biol Cell*, vol. 14, pp. 3470-81, Aug 2003.
- [44] K. Kasuno, S. Takabuchi, K. Fukuda, S. Kizaka-Kondoh, J. Yodoi, T. Adachi, *et al.*, "Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling," *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 2550-8, Jan 23 2004.

- [45] M. Quintero, P. A. Brennan, G. J. Thomas, and S. Moncada, "Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha in cancer: role of free radical formation," *Cancer Res*, vol. 66, pp. 770-4, Jan 15 2006.
- [46] L. A. Ridnour, J. S. Isenberg, M. G. Espey, D. D. Thomas, D. D. Roberts, and D. A. Wink, "Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, pp. 13147-52, Sep 13 2005.
- [47] T. Matsunaga, D. W. Weihrauch, M. C. Moniz, J. Tessmer, D. C. Warltier, and W. M. Chilian, "Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide," *Circulation*, vol. 105, pp. 2185-91, May 7 2002.
- [48] S. Kashiwagi, Y. Izumi, T. Gohongi, Z. N. Demou, L. Xu, P. L. Huang, *et al.*, "NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissue-engineered blood vessels," *J Clin Invest*, vol. 115, pp. 1816-27, Jul 2005.
- [49] T. Tammela, G. Zarkada, E. Wallgard, A. Murtomaki, S. Suchting, M. Wirzenius, *et al.*, "Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation," *Nature*, vol. 454, pp. 656-60, Jul 31 2008.
- [50] J. P. Gratton, M. Morales-Ruiz, Y. Kureishi, D. Fulton, K. Walsh, and W. C. Sessa, "Akt down-regulation of p38 signaling provides a novel mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated cytoprotection in endothelial cells," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 30359-65, Aug 10 2001.
- [51] T. Takahashi, S. Yamaguchi, K. Chida, and M. Shibuya, "A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells," *EMBO J*, vol. 20, pp. 2768-78, Jun 1 2001.
- [52] L. Lamalice, F. Houle, and J. Huot, "Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF," *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 34009-20, Nov 10 2006.
- [53] G. Roviello, A. Ravelli, A. I. Fiaschi, M. R. Cappelletti, A. Gobbi, C. Senti, *et al.*, "Apatinib for the treatment of gastric cancer," *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 10, pp. 887-92, Aug 2016.*
- [54] N. Ferrara, K. J. Hillan, H. P. Gerber, and W. Novotny, "Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 3, pp. 391-400, May 2004.*
- [55] A. Ohtsu, M. A. Shah, E. Van Cutsem, S. Y. Rha, A. Sawaki, S. R. Park, *et al.*, "Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study," *J Clin Oncol*, vol. 29, pp. 3968-76, Oct 20 2011.
- [56] V. Ranpura, S. Hapani, and S. Wu, "Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis," *JAMA*, vol. 305, pp. 487-94, Feb 2 2011.*
- [57] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 10, pp. 417-27, Jun 2011.*
- [58] J. Holash, S. Davis, N. Papadopoulos, S. D. Croll, L. Ho, M. Russell, *et al.*, "VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, pp. 11393-8, Aug 20 2002.
- [59] K. K. Ciombor, J. Berlin, and E. Chan, "Aflibercept," *Clin Cancer Res*, vol. 19, pp. 1920-5, Apr 15 2013.*

- [60] J. L. Spratlin, R. B. Cohen, M. Eadens, L. Gore, D. R. Camidge, S. Diab, *et al.*, "Phase I pharmacologic and biologic study of ramucirumab (IMC-1121B), a fully human immunoglobulin G1 monoclonal antibody targeting the vascular endothelial growth factor receptor-2," *J Clin Oncol*, vol. 28, pp. 780-7, Feb 10 2010.
- [61] E. Larkins, B. Scepura, G. M. Blumenthal, E. Bloomquist, S. Tang, M. Biabla, *et al.*, "U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: Ramucirumab for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Following Disease Progression On or After Platinum-Based Chemotherapy," *Oncologist*, vol. 20, pp. 1320-5, Nov 2015.*
- [62] D. B. Mendel, A. D. Laird, X. Xin, S. G. Louie, J. G. Christensen, G. Li, *et al.*, "In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship," *Clin Cancer Res*, vol. 9, pp. 327-37, Jan 2003.
- [63] T. J. Abrams, L. B. Lee, L. J. Murray, N. K. Pryer, and J. M. Cherrington, "SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer," *Mol Cancer Ther*, vol. 2, pp. 471-8, May 2003.
- [64] S. M. Wilhelm, C. Carter, L. Tang, D. Wilkie, A. McNabola, H. Rong, *et al.*, "BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis," *Cancer Res*, vol. 64, pp. 7099-109, Oct 1 2004.
- [65] L. Adnane, P. A. Trail, I. Taylor, and S. M. Wilhelm, "Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature," *Methods Enzymol*, vol. 407, pp. 597-612, 2006.
- [66] Y. Tomono, I. Naito, K. Ando, T. Yonezawa, Y. Sado, S. Hirakawa, *et al.*, "Epitope-defined monoclonal antibodies against multiplexin collagens demonstrate that type XV and XVIII collagens are expressed in specialized basement membranes," *Cell Struct Funct*, vol. 27, pp. 9-20, Feb 2002.
- [67] M. Ferreras, U. Felbor, T. Lenhard, B. R. Olsen, and J. Delaisse, "Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases," *FEBS Lett*, vol. 486, pp. 247-51, Dec 15 2000.
- [68] J. Hanai, M. Dhanabal, S. A. Karumanchi, C. Albanese, M. Waterman, B. Chan, *et al.*, "Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1," *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 16464-9, May 10 2002.
- [69] A. Hajitou, C. Grignet, L. Devy, S. Berndt, S. Blacher, C. F. Deroanne, *et al.*, "The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells," *FASEB J*, vol. 16, pp. 1802-4, Nov 2002.
- [70] Y. M. Kim, S. Hwang, Y. M. Kim, B. J. Pyun, T. Y. Kim, S. T. Lee, *et al.*, "Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1," *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 27872-9, Aug 2 2002.
- [71] Y. Liu, J. Li, H. Xu, Y. Zhang, Y. Liu, and X. Liu, "Mitochondria-mediated tumstatin peptide-induced HepG2 cell apoptosis," *Int J Mol Med*, vol. 24, pp. 653-9, Nov 2009.
- [72] Y. Maeshima, A. Sudhakar, J. C. Lively, K. Ueki, S. Kharbanda, C. R. Kahn, *et al.*, "Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis," *Science*, vol. 295, pp. 140-3, Jan 4 2002.

- [73] Y. Maeshima, P. C. Colorado, A. Torre, K. A. Holthaus, J. A. Grunkemeyer, M. B. Ericksen, *et al.*, "Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane," *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 21340-8, Jul 14 2000.
- [74] Q. Gao, K. Chen, L. Gao, Y. Zheng, and Y. G. Yang, "Thrombospondin-1 signaling through CD47 inhibits cell cycle progression and induces senescence in endothelial cells," *Cell Death Dis*, vol. 7, p. e2368, Sep 8 2016.
- [75] O. V. Volpert, T. Zaichuk, W. Zhou, F. Reiher, T. A. Ferguson, P. M. Stuart, *et al.*, "Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor," *Nat Med*, vol. 8, pp. 349-57, Apr 2002.
- [76] J. C. Anderson, J. R. Grammer, W. Wang, L. B. Nabors, J. Henkin, J. E. Stewart, Jr., *et al.*, "ABT-510, a modified type 1 repeat peptide of thrombospondin, inhibits malignant glioma growth in vivo by inhibiting angiogenesis," *Cancer Biol Ther*, vol. 6, pp. 454-62, Mar 2007.
- [77] D. Ingber, T. Fujita, S. Kishimoto, K. Sudo, T. Kanamaru, H. Brem, *et al.*, "Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth," *Nature*, vol. 348, pp. 555-7, Dec 6 1990.
- [78] R. Satchi-Fainaro, M. Puder, J. W. Davies, H. T. Tran, D. A. Sampson, A. K. Greene, *et al.*, "Targeting angiogenesis with a conjugate of HPMA copolymer and TNP-470," *Nat Med*, vol. 10, pp. 255-61, Mar 2004.
- [79] W. F. Kean, C. J. Lock, and H. E. Howard-Lock, "Chirality in antirheumatic drugs," *Lancet*, vol. 338, pp. 1565-8, Dec 21-28 1991.*
- [80] G. W. Mellin and M. Katzenstein, "The saga of thalidomide. Neuropathy to embryopathy, with case reports of congenital anomalies," *N Engl J Med*, vol. 267, pp. 1184-92 contd, Dec 6 1962.
- [81] R. J. D'Amato, M. S. Loughnan, E. Flynn, and J. Folkman, "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, pp. 4082-5, Apr 26 1994.
- [82] X. Chang, Y. Zhu, C. Shi, and A. K. Stewart, "Mechanism of immunomodulatory drugs' action in the treatment of multiple myeloma," *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, vol. 46, pp. 240-53, Mar 2014.*
- [83] E. Dupont, P. Falardeau, S. A. Mousa, V. Dimitriadou, M. C. Pepin, T. Wang, *et al.*, "Antiangiogenic and antimetastatic properties of Neovastat (AE-941), an orally active extract derived from cartilage tissue," *Clin Exp Metastasis*, vol. 19, pp. 145-53, 2002.
- [84] D. Boivin, S. Gendron, E. Beaulieu, D. Gingras, and R. Beliveau, "The antiangiogenic agent Neovastat (AE-941) induces endothelial cell apoptosis," *Mol Cancer Ther*, vol. 1, pp. 795-802, Aug 2002.
- [85] H. S. Rasmussen and P. P. McCann, "Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat," *Pharmacol Ther*, vol. 75, pp. 69-75, 1997.*
- [86] D. Rodriguez, C. J. Morrison, and C. M. Overall, "Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1803, pp. 39-54, Jan 2010.*
- [87] G. R. Pettit, J. E. Leet, C. L. Herald, Y. Kamano, and D. L. Doubek, "Antineoplastic agents, 116. An evaluation of the marine ascidian *Aplidium californicum*," *J Nat Prod*, vol. 49, pp. 231-5, Mar-Apr 1986.

- [88] E. Hamel and C. M. Lin, "Interactions of combretastatin, a new plant-derived antimetabolic agent, with tubulin," *Biochem Pharmacol*, vol. 32, pp. 3864-7, Dec 15 1983.
- [89] G. M. Tozer, V. E. Prise, J. Wilson, R. J. Locke, B. Vojnovic, M. R. Stratford, *et al.*, "Combretastatin A-4 phosphate as a tumor vascular-targeting agent: early effects in tumors and normal tissues," *Cancer Res*, vol. 59, pp. 1626-34, Apr 1 1999.
- [90] G. G. Dark, S. A. Hill, V. E. Prise, G. M. Tozer, G. R. Pettit, and D. J. Chaplin, "Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature," *Cancer Res*, vol. 57, pp. 1829-34, May 15 1997.
- [91] G. M. Tozer, V. E. Prise, J. Wilson, M. Cemazar, S. Shan, M. W. Dewhirst, *et al.*, "Mechanisms associated with tumor vascular shut-down induced by combretastatin A-4 phosphate: intravital microscopy and measurement of vascular permeability," *Cancer Res*, vol. 61, pp. 6413-22, Sep 1 2001.
- [92] L. J. Zwi, B. C. Baguley, J. B. Gavin, and W. R. Wilson, "Necrosis in non-tumour tissues caused by flavone acetic acid and 5,6-dimethyl xanthenone acetic acid," *Br J Cancer*, vol. 62, pp. 932-4, Dec 1990.
- [93] L. Zhao, L. M. Ching, P. Kestell, L. R. Kelland, and B. C. Baguley, "Mechanisms of tumor vascular shutdown induced by 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA): Increased tumor vascular permeability," *Int J Cancer*, vol. 116, pp. 322-6, Aug 20 2005.
- [94] L. M. Ching, Z. Cao, C. Kieda, S. Zwain, M. B. Jameson, and B. C. Baguley, "Induction of endothelial cell apoptosis by the antivascular agent 5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid," *Br J Cancer*, vol. 86, pp. 1937-42, Jun 17 2002.
- [95] L. M. Ching, D. Goldsmith, W. R. Joseph, H. Korner, J. D. Sedgwick, and B. C. Baguley, "Induction of intratumoral tumor necrosis factor (TNF) synthesis and hemorrhagic necrosis by 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) in TNF knockout mice," *Cancer Res*, vol. 59, pp. 3304-7, Jul 15 1999.
- [96] B. C. Baguley, G. Cole, L. L. Thomsen, and Z. Li, "Serotonin involvement in the antitumour and host effects of flavone-8-acetic acid and 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid," *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 33, pp. 77-81, 1993.
- [97] B. C. Baguley, L. Zhuang, and P. Kestell, "Increased plasma serotonin following treatment with flavone-8-acetic acid, 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid, vinblastine, and colchicine: relation to vascular effects," *Oncol Res*, vol. 9, pp. 55-60, 1997.
- [98] E. Maj, D. Papiernik, and J. Wietrzyk, "Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity (Review)," *Int J Oncol*, vol. 49, pp. 1773-1784, Nov 2016.*
- [99] H. S. Friedman, M. D. Prados, P. Y. Wen, T. Mikkelsen, D. Schiff, L. E. Abrey, *et al.*, "Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma," *J Clin Oncol*, vol. 27, pp. 4733-40, Oct 1 2009.
- [100] E. Van Cutsem, J. Tabernero, R. Lakomy, H. Prenen, J. Prausova, T. Macarulla, *et al.*, "Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen," *J Clin Oncol*, vol. 30, pp. 3499-506, Oct 1 2012.
- [101] H. Wilke, K. Muro, E. Van Cutsem, S. C. Oh, G. Bodoky, Y. Shimada, *et al.*, "Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-

- oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial," *Lancet Oncol*, vol. 15, pp. 1224-35, Oct 2014.
- [102] C. S. Fuchs, J. Tomasek, C. J. Yong, F. Dumitru, R. Passalacqua, C. Goswami, *et al.*, "Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial," *Lancet*, vol. 383, pp. 31-39, Jan 4 2014.
- [103] J. Tabernero, T. Yoshino, A. L. Cohn, R. Obermannova, G. Bodoky, R. Garcia-Carbonero, *et al.*, "Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study," *Lancet Oncol*, vol. 16, pp. 499-508, May 2015.
- [104] E. B. Garon, T. E. Ciuleanu, O. Arrieta, K. Prabhaskar, K. N. Syrigos, T. Goksel, *et al.*, "Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial," *Lancet*, vol. 384, pp. 665-73, Aug 23 2014.
- [105] G. Spera, R. Fresco, H. Fung, J. R. B. Dyck, E. Pituskin, I. Paterson, *et al.*, "Beta blockers and improved progression-free survival in patients with advanced HER2 negative breast cancer: a retrospective analysis of the ROSE/TRIO-012 study," *Ann Oncol*, vol. 28, pp. 1836-1841, Aug 1 2017.
- [106] D. P. Petrylak, R. de Wit, K. N. Chi, A. Drakaki, C. N. Sternberg, H. Nishiyama, *et al.*, "Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel in patients with locally advanced or metastatic urothelial carcinoma after platinum-based therapy (RANGE): a randomised, double-blind, phase 3 trial," *Lancet*, vol. 390, pp. 2266-2277, Nov 18 2017.
- [107] R. M. Bukowski, W. M. Stadler, D. F. McDermott, J. P. Dutcher, J. J. Knox, W. H. Miller, Jr., *et al.*, "Safety and efficacy of sorafenib in elderly patients treated in the North American advanced renal cell carcinoma sorafenib expanded access program," *Oncology*, vol. 78, pp. 340-7, 2010.
- [108] J. M. Llovet, S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J. F. Blanc, *et al.*, "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma," *N Engl J Med*, vol. 359, pp. 378-90, Jul 24 2008.
- [109] M. S. Brose, C. M. Nutting, B. Jarzab, R. Elisei, S. Siena, L. Bastholt, *et al.*, "Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial," *Lancet*, vol. 384, pp. 319-28, Jul 26 2014.
- [110] V. L. Goodman, E. P. Rock, R. Dagher, R. P. Ramchandani, S. Abraham, J. V. Gobburu, *et al.*, "Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma," *Clin Cancer Res*, vol. 13, pp. 1367-73, Mar 1 2007.*
- [111] R. J. Motzer, A. Ravaud, J. J. Patard, H. S. Pandha, D. J. George, A. Patel, *et al.*, "Adjuvant Sunitinib for High-risk Renal Cell Carcinoma After Nephrectomy: Subgroup Analyses and Updated Overall Survival Results," *Eur Urol*, vol. 73, pp. 62-68, Jan 2018.