

AGGF1中和抗体联合抗CTLA-4抗体抑制小鼠黑色素瘤生长的分子机制研究

李 夏^{1,2}, 牧苏婉¹, 杨惠元¹, 韦妙灵¹, 韦柳青¹, 李 勇^{1*}

¹桂林医学院智能医学与生物技术学院, 广西 桂林

²桂林医学院广西脑与认知神经科学重点实验室, 广西 桂林

收稿日期: 2024年7月27日; 录用日期: 2024年8月19日; 发布日期: 2024年8月29日

摘 要

目的: 探究抗AGGF1中和抗体(RDD-Ab), RDD-Ab + 抗CTLA-4抗体联合治疗对小鼠黑色素瘤的治疗作用。方法: 合成AGGF1的GTFQRDDAPASVHSE肽并制备多克隆中和抗体(RDD-Ab)。为了评估RDD-Ab对血管生成活性和黑色素瘤生长的影响, 我们实施了小管生成实验、迁移实验、细胞增殖实验、黑色素瘤细胞皮下移植性模型实验和免疫组化等实验。结果: 实验结果显示, 制备的RDD-Ab可以识别细胞中天然的AGGF1蛋白和过表达的AGGF1蛋白。RDD-Ab可显著抑制血管内皮细胞小管形成、迁移和增殖。与IgG对照组相比, RDD-Ab治疗显著减缓黑色素瘤生长, RDD-Ab + CTLA-4抗体联合治疗时肿瘤生长速度最慢。免疫组化实验也表明, RDD-Ab显著减少瘤内微血管生成与肿瘤细胞增殖, 同时, 联合治疗可显著增加瘤内CD⁴⁺和CD⁸⁺淋巴细胞的浸润。结论: RDD-Ab可在体外抑制血管内皮细胞的血管新生功能, 具有高效的黑色素瘤生长抑制作用, RDD-Ab + CTLA-4联合治疗黑色素瘤效果更佳(显著增加瘤内CD⁴⁺和CD⁸⁺淋巴细胞的浸润), 这为未来黑色素瘤的临床干预提供了一种新的潜在治疗方案。

关键词

黑色素瘤, 移植性模型, AGGF1, CTLA-4, 中和抗体, 联合治疗

Study on Molecular Mechanism of AGGF1 Neutralizing Antibody Combined with Anti CTLA-4 Antibody in Suppressing the Growth of Mouse Melanoma

Xia Li^{1,2}, Suwan Mu¹, Huiyuan Yang¹, Miaoling Wei¹, Liuqing Wei¹, Yong Li^{1*}

¹School of Intelligent Medicine and Biotechnology, Guilin Medical University, Guilin Guangxi

*通讯作者。

文章引用: 李夏, 牧苏婉, 杨惠元, 韦妙灵, 韦柳青, 李勇. AGGF1中和抗体联合抗CTLA-4抗体抑制小鼠黑色素瘤生长的分子机制研究[J]. 临床医学进展, 2024, 14(8): 1601-1609. DOI: 10.12677/acm.2024.1482396

Abstract

Objective: To investigate the therapeutic effect of neutralizing antibody (against AGGF1, RDD-Ab), RDD-Ab + CTLA-4 therapy on mouse melanoma. **Methods:** Synthesize GTFQRDAPASVHSE peptide of AGGF1 and prepare polyclonal neutralizing antibody (RDD-Ab). In order to evaluate the effects of RDD-Ab on angiogenesis and melanoma growth, we conducted tube formation, migration, cell proliferation, subcutaneous melanoma cell transplantation model and immunohistochemistry (IHC). **Results:** RDD-Ab can recognize both natural AGGF1 protein and overexpressed AGGF1 protein in cells. The experimental results showed that RDD-Ab significantly inhibits the formation, migration, and proliferation of endothelial cell tubules. Compared with the IgG control group, RDD-Ab significantly slowed down the growth of melanoma. IHC experiments showed that RDD-Ab significantly suppressed tumor angiogenesis and proliferation. The combination therapy of RDD-Ab + CTLA-4 antibody has the slowest tumor growth rate, and the combination therapy increases the infiltration of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes robustly in solid tumors. **Conclusion:** RDD-Ab can inhibit the angiogenesis function of endothelial cells *in vitro* and has a highly effective inhibitory effect on melanoma growth, and the combined treatment with CTLA-4 antibody is more effective. This provides a new potential treatment option for clinical intervention of melanoma in the future.

Keywords

Melanoma, Transplantable Model, AGGF1, CTLA-4, Neutralizing Antibodies, Combination Therapy

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

黑色素瘤是极具破坏性的皮肤癌，其发病率在全球范围内不断上升，严重危害人类健康[1]。根据全球癌症数据流行病学评估，2020年黑色素瘤新发病例数约为325,000例，因黑色素瘤死亡的人数达57,000人[2]。到2040年，全球黑色素瘤预计将达510,000例新发病例和96,000例死亡病例[3]。据估计，每年黑色素瘤的治疗费用高达33亿美元[4]。早期确诊的黑色瘤可以通过手术切除治愈。如果在早期(I期或II期)未发现，由于其转移快，生存率仅为6个月，5年生存率下降81% [5]。

涉及免疫调节检查点分子的抗体，如细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 (CTLA-4)，已被证明能强烈刺激免疫系统。CTLA-4是CD28的同源物，也是T细胞激活后上调的抑制性T细胞受体。由于CTLA-4是T细胞活性的负向调节器，阻断CTLA-4可以增强T细胞激活和增殖，包括肿瘤浸润的T效应细胞[6]。Ipilimumab (2011年获得FDA批准用于治疗黑色素瘤)是一种人源化CTLA-4阻断抗体，可增加T细胞的反应性[7]，是用于治疗黑色素瘤的免疫检查点药物[8]。

血管生成因子1 (AGGF1)是2004年克隆的一种新型血管生成因子基因。AGGF1蛋白具有类似VEGF的促血管生成能力[9]。Aggf1^{+/-} (纯合子胚胎致死)敲除小鼠来源的血管内皮的血管生成能力显著低于野生

型小鼠的血管内皮细胞[10]。AGGF1 也是骨骼肌萎缩发病机制的新调节因子, AGGF1 蛋白治疗可显著抑制骨骼肌萎缩[11]。在基于血管生成的抗肿瘤研究方面, 靶向 VEGF/VEGFR 的药物已被开发并用于癌症治疗[12]。

在本研究中, 我们制备了抗 AGGF1 核心区短肽(GTFQRDDAPASVHSE) [13]的中和抗体 RDD-Ab, 并初步探究了其对血管新生功能和黑色素瘤生长的影响。在黑色素瘤移植模型中进行了 RDD-Ab 和 CTLA-4 抗体的联合治疗, 结果表明 RDD-Ab 可显著抑制小鼠体内的黑色素瘤生长和肿瘤血管新生, 这为未来临床治疗黑色素瘤提供了新的方案。

2. 材料与方法

2.1. 一般资料

小鼠细胞 B16F10 (C57BL/6J)、人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、细胞 Hela 均购自中国典型培养物保藏中心, 并在高糖 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM)中培养, 培养基中添加 10% (V/V)的胎牛血清(Gibico Life Technologies)。C57BL/6 小鼠(雄性, 6~8 周龄)购自广东维通利华实验动物技术有限公司。GTFQRDDAPASVHSE 合成由南京斯拜科生物科技完成, 多抗制备由武汉三鹰生物技术有限公司(Proteintech)完成。

2.2. 仪器与试剂

DMEM 培养基、胎牛血清、细胞培养用双抗(青链霉素混合液)均购于赛默飞世尔科技公司。实验所需的主要仪器包括超净工作台(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)、台式离心机(赛默飞世尔科技公司)、CO₂ 培养箱(赛默飞世尔科技公司)、低温冷冻离心机(赛默飞世尔科技公司)、切片机(赛默飞世尔科技公司)、摊烤片机(赛默飞世尔科技公司)、显微镜(尼康株式会社)等。

2.3. 细胞增殖测定

为明确 RDD-Ab 对 HUVECs 细胞生长的影响, 将 HUVECs 细胞接种在 96 孔板中, 过夜培养后按 Cell Counting Kit-8 说明书检测细胞增殖。简单来说, 对细胞进行预处理后每孔加入 1/10 体积的 CCK-8 试剂, 在加入 CCK-8 试剂后, 继续培养箱内避光孵育 1 小时, 之后进行酶标仪检测(450 nm 波长处测定吸光度值)。

2.4. 内皮细胞迁移测定

HUVECs 细胞经胰蛋白酶消化后重悬, 生长至 90%汇合度后用无血清生长培养基对 HUVECs 细胞进行 6 小时的饥饿处理。然后用 200 μ L 枪头轻轻地垂直划过细胞层以去除一些细胞并制造伤口, PBS 洗涤两次以清除细胞碎片且使划痕伤口的边缘变平滑。HUVECs 在 37°C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 小时, 然后使用倒置显微镜捕获图像。对于 Transwell 迁移实验, 我们使用 Transwell 小室系统(3422, BD Biosciences), 擦掉上层多余未迁移的细胞后再利用结晶紫等染色剂去染膜下方的细胞(已迁移过去的细胞, 12 小时), 每个孔选取 5 个不同视野拍摄并计数迁移细胞数。

2.5. 内皮细胞小管形成实验

内皮细胞小管形成实验为评估 AGGF1 和 RDD-Ab 对 HUVECs 小管形成能力的影响。小管形成实验使用 Matrigel 作为基底膜基质(356234, BD Biosciences)。在实验前, 将 48 孔板和相关的移液枪头在 4°C 下过夜预冷, 4°C 下过夜解冻 Matrigel, 用预冷移液枪头向 48 孔板中加入 200 μ L Matrigel, 室温下 1500 rpm

离心 15 分钟使表面平整, 37℃ 孵育 30 分钟使基质完全凝胶化。HUVECs 在 37℃ 下培养 6 小时后, 使用倒置显微镜捕获小管形成图像并进行定量分析, 每个孔捕获 5 个小管图像并计算封闭小管的数量。

2.6. 黑色素瘤移植模型实验

所有涉及动物的实验程序均获得桂林医学院伦理委员会的批准。收集处于对数生长期的大约 5×10^6 B16F10 细胞, 经过生理盐水洗涤后重悬于 100 μ L 生理盐水中。将细胞悬液注射到 C56/BL6J 小鼠的背部皮下, 注射细胞的小鼠随机分为对照组、RDD-Ab 组、CTLA4 (BioXCell) 组和 RDD-Ab + CTLA 组。第二天, 将 100 μ g RDD-抗体和 100 μ g CTLA4 稀释在预冷的 PBS 中, 通过皮下注射注入肿瘤附近, 注射等量 IgG 的小鼠作为对照组。从第 6 天开始, 每 2 天测量一次肿瘤体积(共测量 14 天)。肿瘤体积(V) = $0.5 \times (L \times W^2)$ 计算, L 代表长度, W 代表宽度[14]。到达实验终点后用手术剪和镊子小心地从小鼠背部剥离实体瘤, 称重后将其保存在 4% 多聚甲醛中, 之后将进行相关免疫组织化学分析。

2.7. 免疫组化(IHC)分析

简而言之, 免疫组化主要包括样本固定、包埋、切片、抗原修复、封闭、一抗孵育、二抗孵育、酶底物显色、封片观察。肿瘤组织在 4% 多聚甲醛中固定过夜, 石蜡包埋并切片。石蜡包埋肿瘤切片(5 μ M), 切片后进行脱蜡、脱水和复水化处理。微波抗原修复后, 室温下用内源性过氧化物酶封闭液在黑暗中封闭 15 分钟并在平衡缓冲液中使用正常山羊血清封闭(50 μ L/片)后, 之后进行一抗二抗孵育。DAB (3,3'-二氨基联苯)用作显色底物。所有准备好的切片用透明指甲油或中性香脂(封片介质)封片。图片捕捉采用倒置显微镜, 使用 Image-Pro Plus 6.0 版软件(Media Cybernetics Inc, 美国)计算每个切片 6 个不同视野的免疫组化染色强度。

2.8. 统计学分析

数据以平均值 $\pm$ 标准差(SD)的形式呈现。比较两个以上组的均值, 对于正态分布的数据使用单因素方差分析(ANOVA)或广义线性回归方法, 两组间差异分析采用 t 检验。P < 0.05 被认为具有统计学意义, NS 表示无统计学意义。

3. 结果与分析

3.1. RDD-Ab 逆转 AGGF1 蛋白对 HUVECs 功能的促进作用。

AGGF1 是一种非常强的血管生成因子[9], 我们推测, 靶向 AGGF1 的中和抗体可能具有抑制血管新生的功能, 从而抑制肿瘤生长。因此, 我们首先制备了 AGGF1 的中和抗体(RDD-Ab), 并初步探究其对血管新生相关功能的影响。Western Blot 实验与免疫荧光结果显示, RDD-Ab 具有类似商品化 AGGF1 抗体(Proteintech 11889-1-AP)的功能(图 1(A), 1(B)), RDD-Ab 可以识别 Hela 细胞内本底水平与过表达的 AGGF1 蛋白。CCK-8 细胞增殖实验显示, 纯化的 AGGF1 蛋白可显著增加 HUVECs 的增殖, RDD-Ab 可有效逆转 AGGF1 对 HUVECs 增殖的促进(图 1(C))。在 HUVECs 小管形成实验中, 当培养液中添加 AGGF1 蛋白时, 形成的闭环小管数量较添加 BSA (牛血清白蛋白)时显著增加, RDD-Ab 处理则显著逆转了 AGGF1 蛋白对 HUVECs 小管形成的促进作用(图 1(D))。HUVECs 划痕实验和 Transwell 实验可检测 RDD-Ab 对 HUVECs 运动能力的影响。类似地, 在划痕实验与 Transwell 实验中, RDD-Ab 均可有效逆转 AGGF1 对 HUVECs 运动能力的促进作用(图 1(E), 1(F))。这些结果表明中和抗体 RDD-Ab 可以识别 AGGF1 蛋白并减弱 AGGF1 蛋白对 HUVECs 功能的促进, 这也暗示 RDD-Ab 可能具有通过靶向 AGGF1 抑制肿瘤内血管新生, 从而抑制肿瘤生长的功能。

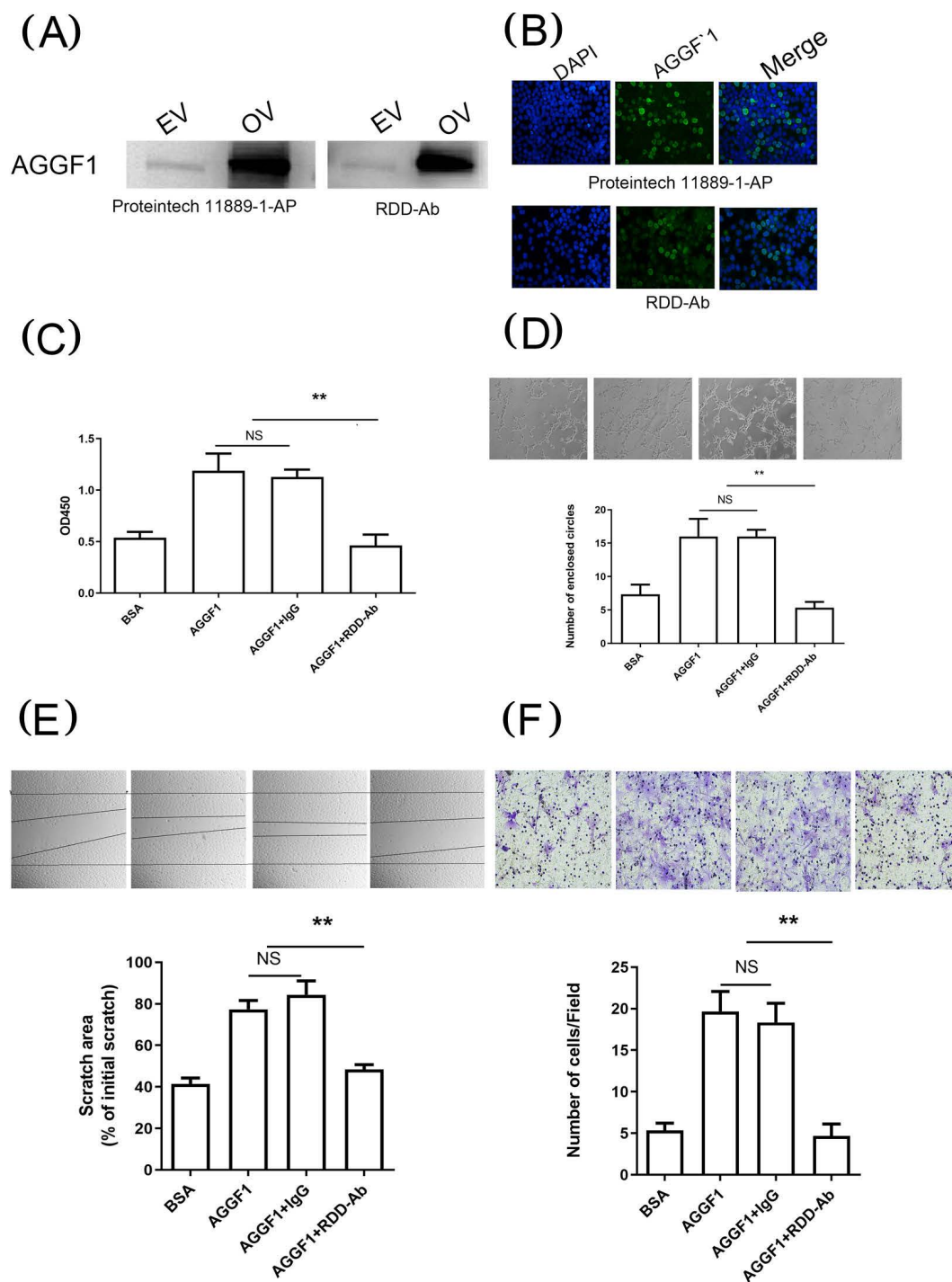


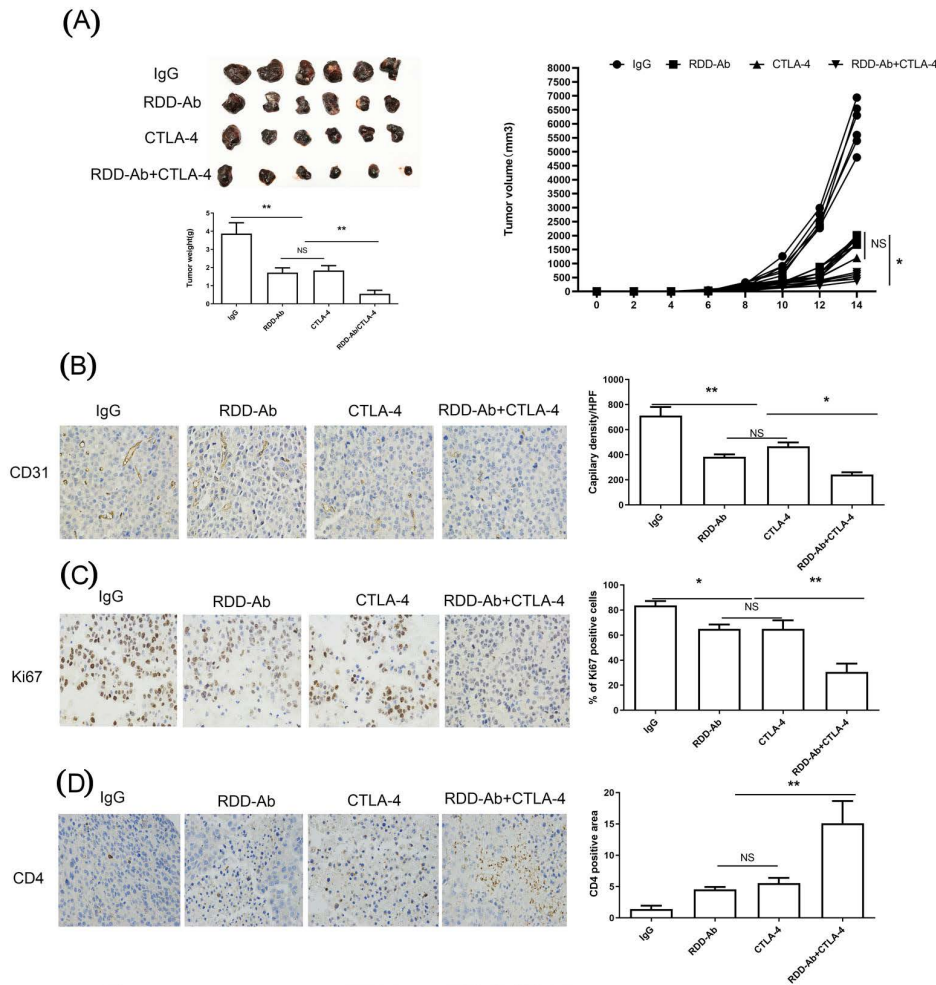
Figure 1. RDD-Ab reversed the promoting effect of AGGF1 protein on the angiogenesis function of HUVECs

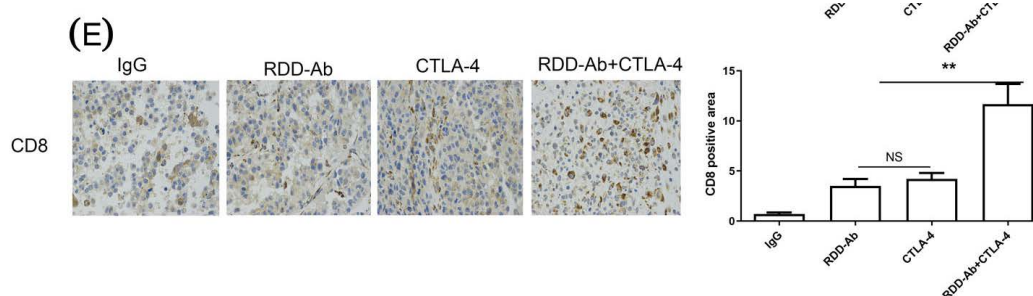
图 1. RDD-Ab 逆转 AGGF1 蛋白对 HUVECs 血管新生功能的促进作用

(A) HeLa 细胞中本底水平 AGGF1 与过表达 AGGF1 的 Western Blot 检测。EV (empty vector)空载体, pCMV-3xFLAG 空载体, OV (over-expression vector), pCMV-3xFLAG-AGGF1 过表达载体, Proteintech 11889-1-AP 为 Proteintech 公司商品化 AGGF1 抗体。(B) HeLa 细胞中 AGGF1 的免疫荧光染色。(C) HUVECs 增殖实验(CCK-8)。NS, 无显著性差异, $**P < 0.01$ 。(D) HUVECs 小管形成实验(tube formation assay, 6 小时)。NS, 无显著性差异, $**P < 0.01$ 。(E) HUVECs 划痕实验(24 小时)。NS, 无显著性差异, $**P < 0.01$ 。(F) HUVECs Transwell 实验(12 小时)。NS, 无显著性差异, $**P < 0.01$ 。

3.2. RDD-Ab + CTLA-4 抗体协同抑制小鼠黑色素瘤生长

为了进一步证明 RDD-Ab 是否能够在体内抑制肿瘤生长,我们利用小鼠皮肤黑色素瘤细胞系 B16F10 建立了 C57BL/6 小鼠黑色素瘤移植模型。将 B16F10 细胞皮下注射至 C57BL/6 小鼠背部,随机分为 IgG 组、RDD-Ab 组、CTLA-4 组和 RDD-Ab + CTLA-4 组。从肿瘤接种后第 1 天开始,此后每隔 2 天腹腔注射 IgG、RDD-Ab、CTLA-4 和 RDD-Ab + CTLA-4。每隔一天测量肿瘤生长情况。在实验截止日将实体瘤剥离并称重。肿瘤生长曲线显示, RDD-Ab 组实体瘤生长速度显著慢于 IgG 对照组, RDD-Ab 组肿瘤大小与重量均显著轻于 IgG 对照组;当 RDD-Ab 与传统的 CTLA-4 抗体联合使用时,肿瘤的生长最为缓慢(图 2(A))。之后我们对肿瘤微血管密度(CD31)与肿瘤细胞增殖能力(Ki67)进行了检测,结果显示,与 IgG 组相比, RDD-Ab 给药组肿瘤中 CD31 阳性血管密度显著降低,类似地,与 IgG 组相比, RDD-Ab 给药组肿瘤中 Ki67 阳性细胞密度显著降低(图 2(B), 2(C))。由于 CTLA-4 参与免疫系统应答,因此,我们进一步评估了实体瘤中 CD4 阳性(CD⁴⁺)、CD8 阳性(CD⁸⁺)淋巴细胞浸润。与和 IgG 对照组相比, RDD-Ab 组和 CTLA-4 组中小鼠瘤内 CD⁴⁺、CD⁸⁺淋巴细胞浸润均有增加, RDD-Ab + CTLA-4 组肿瘤中 CD⁴⁺与 CD⁸⁺淋巴细胞浸润最多(图 2(D), 2(E))。上述结果表明,抗 AGGF1/CTLA-4 联合治疗具有协同抑制肿瘤作用,这种协同抑制作用可能是通过降低瘤内微血管密度,抑制肿瘤细胞增殖,增加 CD⁴⁺与 CD⁸⁺淋巴细胞浸润实现的。





(A) RDD-Ab+CTLA-4 联合治疗抑制 C56/BL6J 小鼠黑色素瘤生长, 左上: 皮下移植瘤剥离后照片($n = 6$); 左下, 皮下移植瘤剥离后重量统计分析; 右: 皮下移植瘤生长曲线(体积, mm^3)。NS, 无显著性差异, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。(B) 皮下移植瘤内 CD31 (微血管标志蛋白)的免疫组化分析。NS, 无显著性差异, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。(C) 皮下移植瘤内 Ki67 (增殖标志蛋白)的免疫组化分析。NS, 无显著性差异, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。(D)~(E)皮下移植瘤内 CD4/CD8 (T 淋巴细胞标志蛋白)的免疫组化分析。NS, 无显著性差异, $**P < 0.01$ 。

Figure 2. RDD-Ab + CTLA-4 therapeutic antibody synergistically inhibits melanoma growth in mice

图 2. RDD-Ab + CTLA-4 治疗抗体协同抑制小鼠黑色素瘤生长

4. 讨论

据报道, 我国黑色素瘤以每年 3%~5%的比例激增, 2017 年中国黑色素瘤年龄标准化发病率为每 10 万人年 0.9 例[15]。黑色素瘤可以通过手术治疗, 但更重要的是, 通过阻断共抑制受体 CTLA-4 或 PD-1 已显示出广泛的抗肿瘤效果[16]。

血管生成因子在血管生成的启动中起着关键作用, 是维持体内血管系统所必需的[17]。它们也被认为是治疗癌症的潜在临床和治疗靶点[18]。在临床上, 抗 VEGF 单克隆抗体(贝伐珠单抗), 阿瓦斯汀(Avastin)已获得美国食品药品监督管理局批准, 并改善了总生存期[19]~[21]。在本研究中, 基于 Matrigel 的 HUVECs 小管形成实验、迁移实验和增殖实验表明, RDD-Ab 在体外显著抑制内皮细胞的血管新生功能。免疫组织化学分析表明, RDD-Ab 可显著减弱肿瘤血管新生和肿瘤细胞增殖。在免疫反应方面, 观察到 RDD-Ab 与 CTLA 联合治疗组 CD4、CD8 阳性 T 细胞浸润增加, 这与其他研究团队观察结果类似[6] [22]。已发表的数据还表明, 抗 CTLA-4 治疗可通过减少肿瘤内调节性 T 细胞来促进抗肿瘤活性[23], RDD-Ab + CTLA-4 联合治疗对调节性 T 细胞的影响可在我们后续的深究中继续开展。

本文对 AGGF1 中和抗体联合抗 CTLA-4 抗体治疗小鼠黑色素瘤进行了初步探究, 本研究仍存在一些局限性。(1) 本研究采用瘤旁注射法向小鼠进行 RDD-Ab 治疗, 并没有对抗体进行其他加工修饰, 后期可开发纳米包裹技术等对抗体进行包裹以增加其稳定性, 从而增加其对肿瘤抑制的效率, 减少抗体的注射量。(2) 血管新生, 即在原有血管基础上生成新血管的过程, 在促进肿瘤生长、进展和转移中起着至关重要的作用[24], 本文并未对 RDD-Ab 在肿瘤转移中的作用进行探究。(3) 我们采用免疫组化分析来评价 CD4、CD8 阳性细胞在瘤内的浸润, 这仍不够精准反映体内的免疫应答, 在后续的研究中, 可用流式细胞术来评估免疫系统的微妙变化。(4) 临床上阻断 CTLA-4 治疗晚期实体瘤已显示出良好的潜力, 但相关免疫不良事件也相当严重[25]。本文中, 我们没有检测 RDD-Ab 治疗和联合治疗引起的不良反应, 后续研究需进一步评估 RDD-Ab 治疗和联合治疗对肝毒性、肾毒性、甲状腺功能亢进等的影响。

综上所述, AGGF1 的中和抗体治疗和联合 CTLA-4 治疗均具有显著的黑色素瘤抑制效果, 且 RDD-Ab 联合 CTLA-4 治疗具有协同抑制效果, 这为未来临床治疗黑色素瘤提供了新的方案。

基金项目

广西科技计划项目(2019AC20357)、广西脑与认知神经科学重点实验室开放课题(GKLBCN-202301-03)、

国家自然科学基金(32260166)、大学生创新训练项目(202210601046, 202310601047)。

参考文献

- [1] Parhi, R., Kaishap, P.P. and Jena, G.K. (2023) Recent Advances in Nanomaterial-Based Drug Delivery Systems for Melanoma Therapy. *ADMET and DMPK*, **12**, 107-150. <https://doi.org/10.5599/admet.2088>
- [2] Arnold, M., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Vaccarella, S., Meheus, F., *et al.* (2022) Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA Dermatology*, **158**, 495-503. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2022.0160>
- [3] Russi, M., Valeri, R., Marson, D., Danielli, C., Felluga, F., Tintaru, A., *et al.* (2023) Some Things Old, New and Borrowed: Delivery of Dabrafenib and Vemurafenib to Melanoma Cells via Self-Assembled Nanomicelles Based on an Amphiphilic Dendrimer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **180**, Article 106311. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106311>
- [4] Lee, C., Thomas, C.M. and Ng, K.E. (2017) An Overview of the Changing Landscape of Treatment for Advanced Melanoma. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, **37**, 319-333. <https://doi.org/10.1002/phar.1895>
- [5] Cordeiro, A.P., Feuser, P.E., Figueiredo, P.G., da Cunha, E.S., Martinez, G.R., Machado-de-Ávila, R.A., *et al.* (2021) *In vitro* Synergic Activity of Diethyldithiocarbamate and 4-Nitrochalcone Loaded in Beeswax Nanoparticles against Melanoma (B16F10) Cells. *Materials Science and Engineering: C*, **120**, Article 111651. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111651>
- [6] Curran, M.A., Kim, M., Montalvo, W., Al-Shamkhani, A. and Allison, J.P. (2011) Combination CTLA-4 Blockade and 4-1BB Activation Enhances Tumor Rejection by Increasing T-Cell Infiltration, Proliferation, and Cytokine Production. *PLOS ONE*, **6**, e19499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019499>
- [7] Koller, K.M., Mackley, H.B., Liu, J., Wagner, H., Talamo, G., Schell, T.D., *et al.* (2016) Improved Survival and Complete Response Rates in Patients with Advanced Melanoma Treated with Concurrent Ipilimumab and Radiotherapy versus Ipilimumab Alone. *Cancer Biology & Therapy*, **18**, 36-42. <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1264543>
- [8] Wolchok, J.D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J., Rutkowski, P., Lao, C.D., *et al.* (2022) Long-Term Outcomes with Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone versus Ipilimumab in Patients with Advanced Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, **40**, 127-137. <https://doi.org/10.1200/jco.21.02229>
- [9] Da, X., Li, Z., Huang, X., He, Z., Yu, Y., Tian, T., *et al.* (2023) AGGF1 Therapy Inhibits Thoracic Aortic Aneurysms by Enhancing Integrin $\alpha 7$ -Mediated Inhibition of TGF- $\beta 1$ Maturation and ERK1/2 Signaling. *Nature Communications*, **14**, Article No. 2265. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37809-x>
- [10] Zhang, T., Yao, Y., Wang, J., Li, Y., He, P., Pasupuleti, V., *et al.* (2016) Haploinsufficiency of Klippel-Trenaunay Syndrome Gene *Aggf1* Inhibits Developmental and Pathological Angiogenesis by Inactivating PI3K and AKT and Disrupts Vascular Integrity by Activating VE-Cadherin. *Human Molecular Genetics*, **25**, 5094-5110. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw273>
- [11] He, Z., Song, Q., Yu, Y., Liu, F., Zhao, J., Un, W., *et al.* (2023) Protein Therapy of Skeletal Muscle Atrophy and Mechanism by Angiogenic Factor *Aggf1*. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, **14**, 978-991. <https://doi.org/10.1002/jcsm.13179>
- [12] LaFargue, C.J., Amero, P., Noh, K., Mangala, L.S., Wen, Y., Bayraktar, E., *et al.* (2023) Overcoming Adaptive Resistance to Anti-VEGF Therapy by Targeting CD5L. *Nature Communications*, **14**, Article No. 2407. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36910-5>
- [13] Yu, Y., Li, Y., Peng, H., Song, Q., Da, X., Li, H., *et al.* (2022) Angiogenic Factor AGGF1 Blocks Neointimal Formation after Vascular Injury via Interaction with Integrin A7 on Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **298**, Article 101759. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101759>
- [14] Park, B.Y., Grisham, R.N., den Hollander, B., Thapi, D., Berman, T., de Stanchina, E., *et al.* (2016) Tumor Inhibition by Enzalutamide in a Xenograft Model of Ovarian Cancer. *Cancer Investigation*, **34**, 517-520. <https://doi.org/10.1080/07357907.2016.1242598>
- [15] Mao, L., Qi, Z., Zhang, L., Guo, J. and Si, L. (2021) Immunotherapy in Acral and Mucosal Melanoma: Current Status and Future Directions. *Frontiers in Immunology*, **12**, Article 680407. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.680407>
- [16] Willsmore, Z.N., Coumbe, B.G.T., Crescioli, S., Reci, S., Gupta, A., Harris, R.J., *et al.* (2021) Combined Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Checkpoint Blockade: Treatment of Melanoma and Immune Mechanisms of Action. *European Journal of Immunology*, **51**, 544-556. <https://doi.org/10.1002/eji.202048747>
- [17] Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J. and Holash, J. (2000) Vascular-Specific Growth Factors and Blood Vessel Formation. *Nature*, **407**, 242-248. <https://doi.org/10.1038/35025215>

-
- [18] Carmeliet, P. and Jain, R.K. (2011) Molecular Mechanisms and Clinical Applications of Angiogenesis. *Nature*, **473**, 298-307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>
- [19] Ferrara, N., Hillan, K.J. and Novotny, W. (2005) Bevacizumab (Avastin), a Humanized Anti-VEGF Monoclonal Antibody for Cancer Therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **333**, 328-335. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.132>
- [20] Krämer, I. and Lipp, H.-P. (2007) Bevacizumab, a Humanized Anti-Angiogenic Monoclonal Antibody for the Treatment of Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **32**, 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2007.00800.x>
- [21] Jain, R.K., Duda, D.G., Clark, J.W. and Loeffler, J.S. (2006) Lessons from Phase III Clinical Trials on Anti-VEGF Therapy for Cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, **3**, 24-40. <https://doi.org/10.1038/ncponc0403>
- [22] Wei, H., Zhao, L., Li, W., Fan, K., Qian, W., Hou, S., *et al.* (2013) Combinatorial PD-1 Blockade and CD137 Activation Has Therapeutic Efficacy in Murine Cancer Models and Synergizes with Cisplatin. *PLOS ONE*, **8**, e84927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084927>
- [23] Selby, M.J., Engelhardt, J.J., Quigley, M., Henning, K.A., Chen, T., Srinivasan, M., *et al.* (2013) Anti-CTLA-4 Antibodies of IgG2a Isotype Enhance Antitumor Activity through Reduction of Intratumoral Regulatory T Cells. *Cancer Immunology Research*, **1**, 32-42. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-13-0013>
- [24] La Porta, S., Roth, L., Singhal, M., Mogler, C., Spegg, C., Schieb, B., *et al.* (2018) Endothelial Tie1-Mediated Angiogenesis and Vascular Abnormalization Promote Tumor Progression and Metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, **128**, 834-845. <https://doi.org/10.1172/jci94674>
- [25] Zhang, Y., Du, X., Liu, M., Tang, F., Zhang, P., Ai, C., *et al.* (2019) Hijacking Antibody-Induced CTLA-4 Lysosomal Degradation for Safer and More Effective Cancer Immunotherapy. *Cell Research*, **29**, 609-627. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0184-1>