

6.10 Endostatin

組換えヒト Endostatin のフェーズ I 臨床試験では、組換えヒト Endostatin が 28 日を 1 サイクルとして 15~600 mg/m² で、進行性の固形腫瘍の患者 25 人に毎日投与された²⁶¹⁾。2 人の患者に抗腫瘍活性を示す知見が得られたが、寛解はみられなかった。他の組換えヒト Endostatin のフェーズ I 臨床試験では、組換えヒト Endostatin が 28 日を 1 サイクルとして 30~600 mg/m² で進行性固形腫瘍の患者 21 人に毎日投与された²⁶²⁾。処置は十分耐容性であり、投与量に限定された有害事象はみられなかった。また、寛解はみられなかった。

進行性神経内分泌腫瘍の患者 42 人において組換えヒト Endostatin のフェーズ II 臨床試験が行われた²⁶³⁾。組換えヒト Endostatin は 1 日当たり 60~90 mg/m² 投与された。最小限の有害事象しかみられなかった。また、部分寛解はみられなかった。進行性癌の患者 32 人に対して組換えヒト Endostatin のフェーズ I 臨床試験が行われた²⁶³⁾。客観的な寛解はみられなかったが、2 人の患者で病勢の安定が長期間みられた。

6.11 ABT-510

ABT-510 は TSP-1 の抗血管新生活性を模倣した非ペプチド類似化合物である。ABT-510 のフェーズ I 臨床試験について三つの報告がある。1 番目の報告では、進行性固形腫瘍の患者 39 人に 28 日を 1 サイクルとして ABT-510 が持続注入（100 mg/時間）及びボーラス注入（1 日 1 回 100~260 mg, 1 日 2 回 50, 100 mg）により皮下に投与された²⁶⁴⁾。2 番目の報告では、進行性固形腫瘍の患者 12 人に 5-FU+LV と ABT-510 の併用で行われた²⁶⁵⁾。1 日当たり 5-FU は 90 mg/m², LV は 425 mg/m² が 4 週間ごとに 5 日間投与された。ABT-510 は 2 日目から 1 日に 2 回投与された。この併用は十分耐容性であり、毒性のプロフィールは 5-FU と LV の組み合わせと同等であった。3 番目の報告では進行性固形腫瘍の患者 13 人に Gemcitabine+Cisplatin と ABT-510 の併用で行われた²⁶⁶⁾。3 週間を 1 サイクルとして Gemcitabine (425 mg/m²) は 1 日と 8 日目, Cisplatin (425 mg/m²) は 1 日目, ABT-510 は 50 mg あるいは 100 mg で 1 日に 2 回投与された。この併用における毒性のプロフィールは Gemcitabine+Cisplatin+5-FU の併用と同等であった。部

分寛解がそれぞれ 1 人ずつ頭頸部癌, メラノーマ, 非小細胞肺癌でみられた。

6.12 VEGF-Trap

VEGF-Trap の癌に対する臨床試験の結果はまだ報告されていないので、その他の血管新生亢進により生じる疾患の治療結果について述べる。VEGF-Trap のフェーズ I 試験が黄斑変性症による脈絡膜血管新生の患者 25 人に対して行われた²⁶⁷⁾。VEGF-Trap は 0.3, 1.0, あるいは 3.0 mg/kg を単回投与後 4 週間経過観察し、その 2 週間後 3 回投与した。主要な有害事象は軽度から中程度の重症化であった。過度の網膜厚は投与量に依存して低下し、1 mg/kg の単回及び複数回投与で 40% になった。なお、視力は変化しなかった。

6.13 Aplidine

Aplidine のフェーズ I 試験が二つ報告されている。1 番目では進行性悪性腫瘍の患者 67 人に 2 週間ごとに 0.2 から 8 mg/m² で投与された²⁶⁸⁾。用量を制限する筋毒性が 6 mg/m² 投与した患者 6 人のうち 2 人でみられ、それにはグレード 2 から 3 のクレアチン・ホスホキナーゼの上昇及びグレード 1 から 2 の筋痛症、筋衰弱であった。心臓に対する有害事象はみられず、ミオシンの太いフィラメントが消失した。グレード 3 の筋肉に対する有害事象が推奨投与量である 8 mg/m² で 14 人の患者のうち 3 人でみられたが、カルニチン 1 g/kg の経口投与で容易に回復した。他の有害事象は吐き気、嘔吐、下痢、無力症そして弱い血液毒性を伴うトランスアミナーゼの上昇であった。弱い奏功及び腫瘍の安定の延長が甲状腺腫瘍様癌の患者でみられた。2 番目では難治性固形腫瘍の患者 37 人に 3 週間ごとに 5 日間 80~1500 µg/m² が投与された²⁶⁹⁾。1350 µg/m² 及び 1500 µg/m² で用量を制限する有害事象がみられ、それには吐き気、嘔吐、筋痛症、倦怠感、皮膚発疹、下痢が含まれた。複数のサイクル投与した患者において軽度から中程度の筋肉痛、筋衰弱が見られたが、有意な神経毒性はみられなかった。試験時において病勢が進行した 9 人の患者で病勢が安定化し、非小細胞肺癌及び結腸直腸癌の患者それぞれ 1 人でやや寛解がみられた。

7. 今後の課題

7.1 抗血管新生治療薬が最大の治療効果をもたらす最適なタイミング

抗血管新生治療薬のデリバリーに伴い血管の正常化が起きる。しかし、その治療期間が短ければ治療効果が低く、逆に長ければ有害事象が発現する。したがって、最適の治療期間が存在することに注意する必要がある。VEGFR2に対する抗体を評価するマウスの研究で、血管の正常化が起きる最適な期間は約6日間続き、腫瘍の酸化及び血管周皮細胞の被覆の増加が特徴であった²⁷⁰⁾。この考えを裏付けるように、VEGF及びbFGFのシグナルをブロックする薬剤であるThalidomideで動物をその最適な期間に処理すると、腫瘍の酸化及びマウス繊維肉腫の放射線に対する反応性が増加することが示された²⁷¹⁾。このように最大限の治療効果を得るため、将来の研究は化学療法剤あるいは放射線と共に抗血管新生治療薬を投与する最適なタイミングの特定に焦点を合わせる必要がある。

7.2 抗VEGF療法における潜在的な落とし穴

VEGFを分子標的とする臨床における成功から、この治療はヒト癌の治療において有効であることが立証されている。しかし、広範囲のヒト癌に対してこの戦略が一般的に適用できるかどうかについては問題が残る。難治性乳癌におけるBevacizumab治療の有効性を調べるフェーズIII臨床試験²⁷²⁾、VEGFRチロシンキナーゼインヒビターであるSU 516の臨床試験^{273,274)}でみられるように、VEGFを標的とすることはすべてのタイプの癌について十分な治療効果を得るという観点では単純に満足できるものではないかもしれない。

VEGFはヒト癌の約60%で発現するかアップレギュレートされている。しかし、残りの約40%のVEGFを発現していない場合には抗VEGF療法は有効ではない²⁷⁵⁾。癌はbFGF、PDGF、EGFのようなVEGF以外の血管新生促進因子を発現して血管新生を促進する場合もある。更に、ほとんどのタイプの癌は1種類以上の血管新生促進因子を発現し、腫瘍の進行の過程においてこれら血管新生促進因子の発現が変化する²¹²⁾。VEGFを分子標的として成功している場合はあるが、抗腫瘍療法及び単独の抗VEGF療法を用いる場合には先に述べたような血管新生促進因子のうちのどれが癌において発現が充

進しているかを考慮に入れる必要がある。

7.3 抗血管新生療法の有効性を増加させる戦略

先に述べたことと関連するが、血管新生は多くの分子が関与する複雑なプロセスである。更に、そのプロセスには複数の分子が関与する可能性があり、血管が発達する間に様々な因子が異なった時間で作用する。腫瘍の血管新生におけるVEGFの重要性から、最近の治療はVEGFのブロックに主に焦点が合わされてきた。しかし、今後は他の血管新生経路も標的にすることを考える必要がある。例えば、抗HER2抗体であるTrastuzumabは複数の血管新生経路をブロックすることが最近示された²⁷⁶⁾。また、単一の増殖因子のみを標的として治療した患者では腫瘍内に変異が生じ、他の血管新生たん白質の活性化を導く。その結果、治療に対して抵抗性が生じる²⁷⁵⁾。したがって、複数の血管新生メディエーターの機能を同時に標的とする戦略が必要である。

化学療法剤による抗腫瘍効果を増大させる方法としてメトロノーム療法が注目されている。この療法は腫瘍内皮細胞に対する感受性を高めるために、化学療法剤をメトロノームのようにあるいは少量を再度にわたって投与すると、抗血管新生効果が増強されるというものである²⁷⁷⁾。このようなより治療効果の高い化学療法と抗血管新生治療薬の組み合わせにより、有害事象を最小限にした状態で最大限の治療効果が得られる可能性がある²⁷⁸⁾。

7.4 抗血管新生療法に対する抵抗性の獲得

内皮細胞は腫瘍細胞よりも遺伝的に安定であり変異が少ないため、抗血管新生療法ではこれまでの細胞傷害性化学療法を悩ませてきた遺伝子変異による抵抗性は起こりにくい。しかし、他の機構により抵抗性が起こりうる²⁷⁹⁾。これに関連して興味深い知見は、p53たん白質の変異がヒト癌の50%で観察され²⁸⁰⁾、その変異により癌が抗血管新生治療に対して抵抗性を示すようになることである²⁸¹⁾。いくつかの非臨床試験から、一つの抗血管新生治療薬よりも異なった機構を有する抗血管新生治療薬の組み合わせのほうがより効果的であり、抵抗性を抑制あるいは無効にできることが示唆されている²⁷⁹⁾。

7.5 抗血管新生治療薬の有害事象の低減

今後化学療法と抗血管新生治療薬のより治療効果の高い組み合わせが開発されると思われる。その際、安全性上の懸念（例、創傷治癒の遅延、腎臓、甲状腺

腺、肺、脳及び心臓における有害事象）が生じない程度に血管新生をブロックすることが重要となる。これまでに述べたように腫瘍における血管新生のプロセスは非常に複雑であることから、複数の経路を標的として抗血管新生治療薬を投与することが有効と思われる。また、その投与スケジュール及び投与量等については慎重に設定することにより、有害作用を誘導しないで最適な治療効果を得ることが可能になるとと思われる。

抗血管新生治療の最適な投薬量は将来の研究において重要な問題である。最大耐量を用いるという概念は先に述べた治療法には適用できないことが非臨床のデータから示唆されている。ある研究では、VEGF 活性を抑制すると複数の器官における正常血管に有害作用が及ぼされる²⁸²⁻²⁸⁵。VEGF ブロックの初期の用量漸増臨床試験では用量の増加により抗血管新生活性に直接関連する有害事象が増加する場合のあることが示唆されている^{8,9}。

7.6 適切なエンドポイントの設定

これまでの抗血管新生臨床試験において成功に導く妨げとなっている原因の一つは、投薬及び有効性を評価できる信頼性の高いエンドポイントが不足していることである。

化学療法剤の場合とは異なり生体由来の抗血管新生治療薬では投与量を制限するような毒性はほとんどみられず、その最適な有効投与量はそれまでに検討した最大投与量よりも低い可能性がある²⁸⁶。血管新生阻害により増殖を抑制しても短期間では腫瘍のサイズは低下しない。病勢の安定及び無憎悪期間は適切なエンドポイントであるが、このようなエンドポイントは長いインターバルでは示されても初期の臨床試験では示すことはできない。したがって生体由来の抗血管新生治療薬において推定される生物学至適用量はフェーズ I で決定され、有効性は無憎悪期間及び生存に関するデータが得られる前にフェーズ II/III 試験で示される。そこで有効性の指標となるサロゲートマーカーが必要となるが、そのようなサロゲートマーカーに関する検討が最近行われている。

抗血管新生治療薬の投与前及び投与後組織におけるバイオマーカーの発現を調べることにより抗血管新生治療薬の有効性を調べることができ的可能性がある。レーザースキニングサイトメトリー

“Laser scanning cytometry” (LSC) は研究治療薬の標的である特定のたん白質の発現、アポトーシスを受けた内皮細胞の割合、腫瘍血管密度などの血管新生に関連した組織バイオマーカーの定量的な評価に用いられる。LSC を用いた Endostatin のフェーズ I 臨床試験で、中間の投与レベルで治療した患者において内皮細胞死及び微小血管密度の統計的に有意な変化が起こり、その中の 2 人は軽微な抗腫瘍反応を示した^{261,287}。しかし、繰り返しの生検を行う場合、生検を腫瘍から採取することは必ずしも容易ではないこと、生検に固有のリスクが患者にあることから非侵襲性的方法を考案する必要性が指摘されるようになった。

血管新生促進因子は癌患者の血清、血漿及び尿において検出可能であり、抗血管新生治療における血管新生促進因子の発現の変化は有効性を示す指標となる可能性がある。しかし、3 例の Endostatin のフェーズ I 試験では、血漿あるいは尿における ELISA を用いた VEGF、bFGF、vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) あるいは E-selectin の測定値と治療効果の推移とは関連しなかった^{261,262,287,288}。血漿 VEGF における有意な低下が転移性腎臓癌の IM862 のフェーズ II 試験で示されたが、奏功とは関連しなかった²⁸⁹。したがって、現時点ではこれらサロゲートマーカーにより治療効果を判定することは妥当ではないように思われる。これは血管新生の不均一性によるもので、腫瘍により血管新生促進たん白質の依存度が異なり、血管新生が起こる系及びその能力も異なる。腫瘍の血管新生状態を正確に把握するには、このような個別のマーカーよりもむしろ血管新生に関与する一連のメディエーターを測定する必要がある。これは全たん白質のプロファイルが分析できるようなプロテオミクスを用いたアプローチが進歩すれば達成可能と思われる²⁹⁰。

これに関連し、血清プロテオミクスの変化により Angiostatin, Carboplatin, Paclitaxel を用いた非小細胞肺癌の治療効果を予測する試みとして、“Surface Enhanced Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry” (SELDI-TOF MS) の有用性が報告されている²⁹¹。また、同様なプロテオーム研究で、“a disintegrin and metalloproteinase 12” (ADAM-12) のような MMP

のレベルと疾患の程度との間に直接的な相関があり²⁹²⁾、尿中のMMPを治療の有効性のモニタリングに用いることができることが示された²⁹³⁾。

VEGFにより誘導される血液循環内皮前駆細胞の動員は腫瘍の新しい血管形成に重要な役割を果たしている^{20,294,295)}。血管新生の阻害剤は血液循環内皮前駆細胞の数を減少させ、傷害を受けた腫瘍内皮の脱落により遊離される血液循環内皮細胞を増加させる²⁹⁶⁾。これら細胞型のフローサイトメーターを用いた測定により抗血管新生治療薬の有効性が示されるかもしれない。EndostatinのフェーズII試験において、7人の患者のうち6人で、最初の2箇月以内に血液循環内皮細胞が2倍以上に増加し、そのうち5人で病勢が安定化し1人で軽微な奏功を示した。このように、進行中の生体由来の抗血管新生治療薬の試験において血液循環内皮前駆細胞及び血液循環内皮細胞数の増減が有効性の指標として有用であることが示されている。放射断層撮影法“positron emission tomography” (PET)、動的造影増強磁気共鳴イメージング“dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging” (DCE-MRI)、三次元超音波のような非侵襲的なイメージング技術により腫瘍の血流、血管の透過性の変化が解析できる。また、PETにより代謝の変化の解析ができる。フェーズI試験においてDCE-MRI及びPETによりCA4Pの抗血管新生活性が確認できた^{297,298)}。PETはEndostatinのフェーズI試験において腫瘍の血流及び腫瘍の代謝の変化の測定にも用いられたが、その有用性について統一的な見解は得られていない^{262,287,288)}。

症状の安定、無増悪期間、最終的には患者の生存のような根拠のある結果とバイオマーカーの比較によりこれら予備的な知見を確認し、バイオマーカーの候補の妥当性を綿密に評価する努力が今後も更に必要である。

おわりに

腫瘍の成長と進行において血管新生が重要な役割を果たしていることはよく知られている。それに基づいて抗血管新生治療に関する多くの非臨床及び臨床研究が行われてきた。そのなかでもBevacizumabと化学療法の組み合わせによる結腸直腸癌患者の生存の延長は典型的な成功例である。また、そ

他の血管新生阻害剤についても一部は臨床上有効性が認められており、また、非臨床研究から多くの抗血管新生治療薬の候補が見つまっている。これら抗血管新生治療薬の候補は薬剤抵抗性をほとんど誘導しないで一般的に低毒性であることから、抗血管新生治療は長期にわたる治療法として理想的なものの一つであると考えられる。今後の課題としては、異なった血管新生の阻害剤及びアプローチを組み合わせた治療法の確立、適切なエンドポイントの設定などがあげられる。これらの点が解決されれば、癌を末期の病気というよりは慢性の病気と考えることも可能になると思われる。今後の抗血管新生治療の発展に期待したい。

謝 辞

本研究の一部は厚生科学研究費補助金医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業(H18-医薬-002)として実施されたものである。

文 献

- 1) Folkman, J.: *N Engl J Med*, 285(21), 1182-6 (1971).
- 2) Gullino, P. M.: *J Natl Cancer Inst*, 61(3), 639-43 (1978).
- 3) Fayette, J., Soria, J. C. and Armand, J. P.: *Eur J Cancer*, 41(8), 1109-16 (2005).
- 4) Rhee, J. and Hoff, P. M.: *Expert Opin Pharmacother*, 6(10), 1701-11 (2005).
- 5) Gasparini, G., Longo, R., Toi, M. and Ferrara, N.: *Nat Clin Pract Oncol*, 2(11), 562-77 (2005).
- 6) Zakarija, A. and Soff, G.: *Curr Opin Oncol*, 17(6), 578-83 (2005).
- 7) Quesada, A. R., Munoz-Chapuli, R. and Medina, M. A.: *Med Res Rev*, 26(4), 483-530 (2006).
- 8) Cobleigh, M. A., Langmuir, V. K., Sledge, G. W., Miller, K. D., Haney, L., Novotny, W. F., Reimann, J. D. and Vassel, A.: *Semin Oncol*, 30(5 Suppl 16), 117-24 (2003).
- 9) Yang, J. C., Haworth, L., Sherry, R. M., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Steinberg, S. M., Chen, H. X. and Rosenberg, S. A.: *N Engl J Med*, 349(5), 427-34 (2003).
- 10) Mayer, R. J.: *N Engl J Med*, 350(23), 2406-8 (2004).

- 11) Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R. and Kabbinavar, F.: *N Engl J Med*, **350**(23), 2335-42 (2004).
- 12) Hudis, C. A.: *Oncology (Williston Park)*, **19** (4 Suppl 3), 26-31 (2005).
- 13) Lenz, H. J.: *Oncology (Williston Park)*, **19**(4 Suppl 3), 17-25 (2005).
- 14) Jain, R. K.: *Oncology (Williston Park)*, **19**(4 Suppl 3), 7-16 (2005).
- 15) Benouchan, M. and Colombo, B. M.: *Int J Oncol*, **27**(2), 563-71 (2005).
- 16) Harper, J. and Moses, M. A.: *Exs*, (96), 223-68 (2006).
- 17) Milkiewicz, M., Ispanovic, E., Doyle, J. L. and Haas, T. L.: *Int J Biochem Cell Biol*, **38** (3), 333-57 (2006).
- 18) Folkman, J. and Kalluri, R.: *Nature*, **427** (6977), 787 (2004).
- 19) Hanahan, D. and Folkman, J.: *Cell*, **86**(3), 353-64 (1996).
- 20) Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M. and Isner, J. M.: *Circ Res*, **85** (3), 221-8 (1999).
- 21) Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., Wu, Y., Hicklin, D., Zhu, Z., Hackett, N. R., Crystal, R. G., et al.: *Nat Med*, **7**(11), 1194-201 (2001).
- 22) Rak, J., Filmus, J. and Kerbel, R. S.: *Eur J Cancer*, **32A**(14), 2438-50 (1996).
- 23) Brooks, P. C., Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F. H. and Cheresch, D. A.: *J Clin Invest*, **96**(4), 1815-22 (1995).
- 24) Skobe, M., Rockwell, P., Goldstein, N., Vosseler, S. and Fusenig, N. E.: *Nat Med*, **3**(11), 1222-7 (1997).
- 25) Folkman, J.: *Adv Cancer Res*, **43**, 175-203 (1985).
- 26) Cavallaro, U. and Christofori, G.: *J Neurooncol*, **50**(1-2), 63-70 (2000).
- 27) Fidler, I. J.: *J Natl Cancer Inst Monogr*, (28), 10-4 (2001).
- 28) Hasan, J., Byers, R. and Jayson, G. C.: *Br J Cancer*, **86**(10), 1566-77 (2002).
- 29) Dvorak, H. F.: *J Clin Oncol*, **20**(21), 4368-80 (2002).
- 30) Patan, S., Munn, L. L. and Jain, R. K.: *Microvasc Res*, **51**(2), 260-72 (1996).
- 31) Patan, S., Tanda, S., Roberge, S., Jones, R. C., Jain, R. K. and Munn, L. L.: *Circ Res*, **89** (8), 732-9 (2001).
- 32) Patan, S., Munn, L. L., Tanda, S., Roberge, S., Jain, R. K. and Jones, R. C.: *Circ Res*, **89** (8), 723-31 (2001).
- 33) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 野間誠司, 川西 徹, 早川堯夫: *医薬品研究*, **37**(10), 641-670 (2006).
- 34) Jain, R. K.: *Nat Med*, **7**(9), 987-9 (2001).
- 35) Carmeliet, P.: *Nat Med*, **6**(4), 389-95 (2000).
- 36) Jain, R. K., Schlenger, K., Hockel, M. and Yuan, F.: *Nat Med*, **3**(11), 1203-8 (1997).
- 37) Jain, R. K.: *Nat Med*, **9**(6), 685-93 (2003).
- 38) Isner, J. M.: *Nature*, **415**(6868), 234-9 (2002).
- 39) Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K. and Heissig, B.: *Nat Rev Cancer*, **2**(11), 826-35 (2002).
- 40) Duda, D. G., Cohen, K. S., Scadden, D. T. and Jain, R. K.: *Nat Protoc*, **2**(4), 805-10 (2007).
- 41) Stoll, B. R., Migliorini, C., Kadambi, A., Munn, L. L. and Jain, R. K.: *Blood*, **102**(7), 2555-61 (2003).
- 42) Jain, R. K.: *Science*, **307**(5706), 58-62 (2005).
- 43) Jain, R. K.: *Sci Am*, **271**(1), 58-65 (1994).
- 44) Bottaro, D. P. and Liotta, L. A.: *Nature*, **423** (6940), 593-5 (2003).
- 45) Semenza, G. L.: *Nat Rev Cancer*, **3**(10), 721-32 (2003).
- 46) Ferrara, N.: *Oncologist*, **9**, Suppl 1, 2-10 (2004).
- 47) Padro, T., Bieker, R., Ruiz, S., Steins, M., Retzlaff, S., Burger, H., Buchner, T., Kessler, T., Herrera, F., Kienast, J., Muller-Tidow, C., Serve, H., Berdel, W. E. and Mesters, R. M.: *Leukemia*, **16**(7), 1302-10 (2002).
- 48) Yoshiji, H., Gomez, D. E., Shibuya, M. and Thorgeirsson, U. P.: *Cancer Res*, **56**(9), 2013-6 (1996).
- 49) Guidi, A. J., Abu-Jawdeh, G., Tognazzi, K., Dvorak, H. F. and Brown, L. F.: *Cancer*, **78** (3), 454-60 (1996).
- 50) Harada, Y., Ogata, Y. and Shirouzu, K.: *Int J Clin Oncol*, **6**(5), 221-8 (2001).
- 51) Fontanini, G., Faviana, P., Lucchi, M., Boldrini, L., Mussi, A., Camacci, T., Mariani, M. A., Angeletti, C. A., Basolo, F. and Pingitore,

- R.: *Br J Cancer*, **86**(4), 558-63 (2002).
- 52) Yuan, A., Yu, C. J., Kuo, S. H., Chen, W. J., Lin, F. Y., Luh, K. T., Yang, P. C. and Lee, Y. C.: *J Clin Oncol*, **19**(2), 432-41 (2001).
- 53) Bando, H., Weich, H. A., Brokelmann, M., Horiguchi, S., Funata, N., Ogawa, T. and Toi, M.: *Br J Cancer*, **92**(3), 553-61 (2005).
- 54) Tanigawa, N., Amaya, H., Matsumura, M. and Shimomatsuya, T.: *J Clin Oncol*, **15**(2), 826-32 (1997).
- 55) Fine, B. A., Valente, P. T., Feinstein, G. I. and Dey, T.: *Gynecol Oncol*, **76**(1), 33-9 (2000).
- 56) Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S. and Ferrara, N.: *Nature*, **362**(6423), 841-4 (1993).
- 57) Gerber, H. P. and Ferrara, N.: *Cancer Res*, **65**(3), 671-80 (2005).
- 58) Warren, R. S., Yuan, H., Matli, M. R., Gillett, N. A. and Ferrara, N.: *J Clin Invest*, **95**(4), 1789-97 (1995).
- 59) Ignoffo, R. J.: *Am J Health Syst Pharm*, **61**(21 Suppl 5), S21-6 (2004).
- 60) Borgstrom, P., Gold, D. P., Hillan, K. J. and Ferrara, N.: *Anticancer Res*, **19**(5B), 4203-14 (1999).
- 61) Presta, L. G., Chen, H., O'Connor, S. J., Chisholm, V., Meng, Y. G., Krummen, L., Winkler, M. and Ferrara, N.: *Cancer Res*, **57**(20), 4593-9 (1997).
- 62) Fernando, N. H. and Hurwitz, H. I.: *Semin Oncol*, **30**(3 Suppl 6), 39-50 (2003).
- 63) Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S. D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Ioffe, E., Huang, T., Radziejewski, C., Bailey, K., Fandl, J. P., *et al.*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(17), 11393-8 (2002).
- 64) Konner, J. and Dupont, J.: *Clin Colorectal Cancer*, **4**, Suppl 2, S81-5 (2004).
- 65) Kim, E. S., Serur, A., Huang, J., Manley, C. A., McCrudden, K. W., Frischer, J. S., Soffer, S. Z., Ring, L., New, T., Zabski, S., Rudge, J. S., Holash, J., Yancopoulos, G. D., Kandel, J. J. and Yamashiro, D. J.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(17), 11399-404 (2002).
- 66) Huang, J., Frischer, J. S., Serur, A., Kadenhe, A., Yokoi, A., McCrudden, K. W., New, T., O'Toole, K., Zabski, S., Rudge, J. S., Holash, J., Yancopoulos, G. D., Yamashiro, D. J. and Kandel, J. J.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(13), 7785-90 (2003).
- 67) Byrne, A. T., Ross, L., Holash, J., Nakanishi, M., Hu, L., Hofmann, J. I., Yancopoulos, G. D. and Jaffe, R. B.: *Clin Cancer Res*, **9**(15), 5721-8 (2003).
- 68) Fukasawa, M. and Korc, M.: *Clin Cancer Res*, **10**(10), 3327-32 (2004).
- 69) Inai, T., Mancuso, M., Hashizume, H., Baffert, F., Haskell, A., Baluk, P., Hu-Lowe, D. D., Shalinsky, D. R., Thurston, G., Yancopoulos, G. D. and McDonald, D. M.: *Am J Pathol*, **165**(1), 35-52 (2004).
- 70) Frischer, J. S., Huang, J., Serur, A., Kadenhe-Chiweshe, A., McCrudden, K. W., O'Toole, K., Holash, J., Yancopoulos, G. D., Yamashiro, D. J. and Kandel, J. J.: *Int J Oncol*, **25**(3), 549-53 (2004).
- 71) Lin, P., Polverini, P., Dewhirst, M., Shan, S., Rao, P. S. and Peters, K.: *J Clin Invest*, **100**(8), 2072-8 (1997).
- 72) Lin, P., Sankar, S., Shan, S., Dewhirst, M. W., Polverini, P. J., Quinn, T. Q. and Peters, K. G.: *Cell Growth Differ*, **9**(1), 49-58 (1998).
- 73) Wang, E. S., Teruya-Feldstein, J., Wu, Y., Zhu, Z., Hicklin, D. J. and Moore, M. A.: *Blood*, **104**(9), 2893-902 (2004).
- 74) Prewett, M., Huber, J., Li, Y., Santiago, A., O'Connor, W., King, K., Overholser, J., Hooper, A., Pytowski, B., Witte, L., Bohlen, P. and Hicklin, D. J.: *Cancer Res*, **59**(20), 5209-18 (1999).
- 75) Zhu, Z., Rockwell, P., Lu, D., Kotanides, H., Pytowski, B., Hicklin, D. J., Bohlen, P. and Witte, L.: *Cancer Res*, **58**(15), 3209-14 (1998).
- 76) Lu, D., Shen, J., Vil, M. D., Zhang, H., Jimenez, X., Bohlen, P., Witte, L. and Zhu, Z.: *J Biol Chem*, **278**(44), 43496-507 (2003).
- 77) Zhu, Z., Hattori, K., Zhang, H., Jimenez, X., Ludwig, D. L., Dias, S., Kussie, P., Koo, H., Kim, H. J., Lu, D., Liu, M., Tejada, R., Friedrich, M., Bohlen, P., Witte, L., *et al.*: *Leukemia*, **17**(3), 604-11 (2003).
- 78) Jimenez, X., Lu, D., Brennan, L., Persaud, K., Liu, M., Miao, H., Witte, L. and Zhu, Z.: *Mol Cancer Ther*, **4**(3), 427-34 (2005).
- 79) Brekken, R. A., Overholser, J. P., Stastny, V. A., Waltenberger, J., Minna, J. D. and Thorpe, P. E.: *Cancer Res*, **60**(18), 5117-24 (2000).

- 80) Kunkel, P., Ulbricht, U., Bohlen, P., Brockmann, M. A., Fillbrandt, R., Stavrou, D., Westphal, M. and Lamszus, K.: *Cancer Res*, **61**(18), 6624-8 (2001).
- 81) Hicklin, D. J., Witte, L., Zhu, Z., Liao, F., Wu, Y., Li, Y. and Bohlen, P.: *Drug Discov Today*, **6**(10), 517-528 (2001).
- 82) Zhu, Z., Bohlen, P. and Witte, L.: *Curr Cancer Drug Targets*, **2**(2), 135-56 (2002).
- 83) Arora, N., Masood, R., Zheng, T., Cai, J., Smith, D. L. and Gill, P. S.: *Cancer Res*, **59**(1), 183-8 (1999).
- 84) Veenendaal, L. M., Jin, H., Ran, S., Cheung, L., Navone, N., Marks, J. W., Waltenberger, J., Thorpe, P. and Rosenblum, M. G.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(12), 7866-71 (2002).
- 85) Frankel, A. E.: *Clin Cancer Res*, **8**(4), 942-4 (2002).
- 86) O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H. and Folkman, J.: *Cell*, **79**(2), 315-28 (1994).
- 87) Holmgren, L., O'Reilly, M. S. and Folkman, J.: *Nat Med*, **1**(2), 149-53 (1995).
- 88) Claesson-Welsh, L., Welsh, M., Ito, N., Anand-Apte, B., Soker, S., Zetter, B., O'Reilly, M. and Folkman, J.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(10), 5579-83 (1998).
- 89) Lucas, R., Holmgren, L., Garcia, I., Jimenez, B., Mandriota, S. J., Borlat, F., Sim, B. K., Wu, Z., Grau, G. E., Shing, Y., Soff, G. A., Bouck, N. and Pepper, M. S.: *Blood*, **92**(12), 4730-41 (1998).
- 90) Parsons-Wingerter, P., Lwai, B., Yang, M. C., Elliott, K. E., Milaninia, A., Redlitz, A., Clark, J. I. and Sage, E. H.: *Microvasc Res*, **55**(3), 201-14 (1998).
- 91) Moser, T. L., Stack, M. S., Asplin, I., Enghild, J. J., Hojrup, P., Everitt, L., Hubchak, S., Schnaper, H. W. and Pizzo, S. V.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(6), 2811-6 (1999).
- 92) Moser, T. L., Kenan, D. J., Ashley, T. A., Roy, J. A., Goodman, M. D., Misra, U. K., Cheek, D. J. and Pizzo, S. V.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(12), 6656-61 (2001).
- 93) Tarui, T., Miles, L. A. and Takada, Y.: *J Biol Chem*, **276**(43), 39562-8 (2001).
- 94) Troyanovsky, B., Levchenko, T., Mansson, G., Matvijenko, O. and Holmgren, L.: *J Cell Biol*, **152**(6), 1247-54 (2001).
- 95) Griscelli, F., Li, H., Bennaceur-Griscelli, A., Soria, J., Opolon, P., Soria, C., Perricaudet, M., Yeh, P. and Lu, H.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(11), 6367-72 (1998).
- 96) Wajih, N. and Sane, D. C.: *Blood*, **101**(5), 1857-63 (2003).
- 97) O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. and Folkman, J.: *Cell*, **88**(2), 277-85 (1997).
- 98) Shichiri, M. and Hirata, Y.: *Faseb J*, **15**(6), 1044-53 (2001).
- 99) Dhanabal, M., Ramchandran, R., Waterman, M. J., Lu, H., Knebelmann, B., Segal, M. and Sukhatme, V. P.: *J Biol Chem*, **274**(17), 11721-6 (1999).
- 100) Yamaguchi, N., Anand-Apte, B., Lee, M., Sasaki, T., Fukai, N., Shapiro, R., Que, I., Lowik, C., Timpl, R. and Olsen, B. R.: *Embo J*, **18**(16), 4414-23 (1999).
- 101) Kim, Y. M., Hwang, S., Kim, Y. M., Pyun, B. J., Kim, T. Y., Lee, S. T., Gho, Y. S. and Kwon, Y. G.: *J Biol Chem*, **277**(31), 27872-9 (2002).
- 102) Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K. M., Folkman, J. and Hanahan, D.: *Science*, **284**(5415), 808-12 (1999).
- 103) Boehm, T., Folkman, J., Browder, T. and O'Reilly, M. S.: *Nature*, **390**(6658), 404-7 (1997).
- 104) Dixelius, J., Cross, M. J., Matsumoto, T. and Claesson-Welsh, L.: *Cancer Lett*, **196**(1), 1-12 (2003).
- 105) Kim, Y. M., Jang, J. W., Lee, O. H., Yeon, J., Choi, E. Y., Kim, K. W., Lee, S. T. and Kwon, Y. G.: *Cancer Res*, **60**(19), 5410-3 (2000).
- 106) Lee, S. J., Jang, J. W., Kim, Y. M., Lee, H. I., Jeon, J. Y., Kwon, Y. G. and Lee, S. T.: *FEBS Lett*, **519**(1-3), 147-52 (2002).
- 107) Abdollahi, A., Hahnfeldt, P., Maercker, C., Grone, H. J., Debus, J., Ansorge, W., Folkman, J., Hlatky, L. and Huber, P. E.: *Mol Cell*, **13**(5), 649-63 (2004).
- 108) Eriksson, K., Magnusson, P., Dixelius, J., Claesson-Welsh, L. and Cross, M. J.: *FEBS Lett*, **536**(1-3), 19-24 (2003).
- 109) Schuch, G., Heymach, J. V., Nomi, M., Machluf, M., Force, J., Atala, A., Eder, J. P.,

- Jr., Folkman, J. and Soker, S.: *Cancer Res*, **63**(23), 8345-50 (2003).
- 110) Taddei, L., Chiarugi, P., Brogelli, L., Cirri, P., Magnelli, L., Raugei, G., Ziche, M., Granger, H. J., Chiarugi, V. and Ramponi, G.: *Biochem Biophys Res Commun*, **263**(2), 340-5 (1999).
- 111) Furumatsu, T., Yamaguchi, N., Nishida, K., Kawai, A., Kunisada, T., Namba, M., Inoue, H. and Ninomiya, Y.: *J Biochem (Tokyo)*, **131**(4), 619-26 (2002).
- 112) Olsson, A. K., Johansson, I., Akerud, H., Einarsson, B., Christofferson, R., Sasaki, T., Timpl, R. and Claesson-Welsh, L.: *Cancer Res*, **64**(24), 9012-7 (2004).
- 113) Wickstrom, S. A., Alitalo, K. and Keski-Oja, J.: *Cancer Res*, **62**(19), 5580-9 (2002).
- 114) Karumanchi, S. A., Jha, V., Ramchandran, R., Karihaloo, A., Tsiokas, L., Chan, B., Dhanabal, M., Hanai, J. I., Venkataraman, G., Shriver, Z., Keiser, N., Kalluri, R., Zeng, H., Mukhopadhyay, D., Chen, R. L., *et al.*: *Mol Cell*, **7**(4), 811-22 (2001).
- 115) Lawler, J. W., Slayter, H. S. and Coligan, J. E.: *J Biol Chem*, **253**(23), 8609-16 (1978).
- 116) Rastinejad, F., Polverini, P. J. and Bouck, N. P.: *Cell*, **56**(3), 345-55 (1989).
- 117) Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A. and Bouck, N. P.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**(17), 6624-8 (1990).
- 118) Lawler, J.: *J Cell Mol Med*, **6**(1), 1-12 (2002).
- 119) Taraboletti, G., Roberts, D., Liotta, L. A. and Giavazzi, R.: *J Cell Biol*, **111**(2), 765-72 (1990).
- 120) Bagavandoss, P. and Wilks, J. W.: *Biochem Biophys Res Commun*, **170**(2), 867-72 (1990).
- 121) Taraboletti, G., Belotti, D. and Giavazzi, R.: *Exs*, **61**, 210-3 (1992).
- 122) Tolsma, S. S., Volpert, O. V., Good, D. J., Frazier, W. A., Polverini, P. J. and Bouck, N.: *J Cell Biol*, **122**(2), 497-511 (1993).
- 123) Jimenez, B., Volpert, O. V., Crawford, S. E., Febbraio, M., Silverstein, R. L. and Bouck, N.: *Nat Med*, **6**(1), 41-8 (2000).
- 124) Nor, J. E., Mitra, R. S., Sutorik, M. M., Mooney, D. J., Castle, V. P. and Polverini, P. J.: *J Vasc Res*, **37**(3), 209-18 (2000).
- 125) Asch, A. S., Liu, I., Briccetti, F. M., Barnwell, J. W., Kwakye-Berko, F., Dokun, A., Goldberger, J. and Pernambuco, M.: *Science*, **262**(5138), 1436-40 (1993).
- 126) Dawson, D. W., Pearce, S. F., Zhong, R., Silverstein, R. L., Frazier, W. A. and Bouck, N. P.: *J Cell Biol*, **138**(3), 707-17 (1997).
- 127) Lawler, J., Weinstein, R. and Hynes, R. O.: *J Cell Biol*, **107**(6 Pt 1), 2351-61 (1988).
- 128) Ashton, A. W., Cheng, Y., Helisch, A. and Ware, J. A.: *Circ Res*, **94**(6), 735-42 (2004).
- 129) Gao, A. G., Lindberg, F. P., Finn, M. B., Blystone, S. D., Brown, E. J. and Frazier, W. A.: *J Biol Chem*, **271**(1), 21-4 (1996).
- 130) Freyberg, M. A., Kaiser, D., Graf, R., Vischer, P. and Friedl, P.: *Biochem Biophys Res Commun*, **271**(3), 584-8 (2000).
- 131) Lawler, J., Miao, W. M., Duquette, M., Bouck, N., Bronson, R. T. and Hynes, R. O.: *Am J Pathol*, **159**(5), 1949-56 (2001).
- 132) Rodriguez-Manzanegue, J. C., Lane, T. F., Ortega, M. A., Hynes, R. O., Lawler, J. and Iruela-Arispe, M. L.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(22), 12485-90 (2001).
- 133) Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. and Hanahan, D.: *Nat Cell Biol*, **2**(10), 737-44 (2000).
- 134) Haviv, F., Bradley, M. F., Calvin, D. M., Schneider, A. J., Davidson, D. J., Majest, S. M., McKay, L. M., Haskell, C. J., Bell, R. L., Nguyen, B., Marsh, K. C., Surber, B. W., Uchic, J. T., Ferrero, J., Wang, Y. C., *et al.*: *J Med Chem*, **48**(8), 2838-46 (2005).
- 135) Maeshima, Y., Manfredi, M., Reimer, C., Holthaus, K. A., Hopfer, H., Chandamuri, B. R., Kharbanda, S. and Kalluri, R.: *J Biol Chem*, **276**(18), 15240-8 (2001).
- 136) Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J. C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R. O., Werb, Z., Sudhakar, A. and Kalluri, R.: *Cancer Cell*, **3**(6), 589-601 (2003).
- 137) Maeshima, Y., Sudhakar, A., Lively, J. C., Ueki, K., Kharbanda, S., Kahn, C. R., Sonenberg, N., Hynes, R. O. and Kalluri, R.: *Science*, **295**(5552), 140-3 (2002).
- 138) Sudhakar, A., Sugimoto, H., Yang, C., Lively, J., Zeisberg, M. and Kalluri, R.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(8), 4766-71 (2003).
- 139) Moses, M. A., Wiederschain, D., Wu, I., Fernandez, C. A., Ghazizadeh, V., Lane, W.

- S., Flynn, E., Sytkowski, A., Tao, T. and Langer, R.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(6), 2645-50 (1999).
- 140) Feldman, L. and Rouleau, C.: *Microvasc Res*, **63**(1), 41-9 (2002).
- 141) Kern, B. E., Balcom, J. H., Antoniu, B. A., Warshaw, A. L. and Fernandez-del Castillo, C.: *J Gastrointest Surg*, **7**(8), 961-8; discussion 969 (2003).
- 142) Egeblad, M. and Werb, Z.: *Nat Rev Cancer*, **2**(3), 161-74 (2002).
- 143) Fang, J., Shing, Y., Wiederschain, D., Yan, L., Butterfield, C., Jackson, G., Harper, J., Tamvakopoulos, G. and Moses, M. A.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(8), 3884-9 (2000).
- 144) Heissig, B., Hattori, K., Friedrich, M., Rafii, S. and Werb, Z.: *Curr Opin Hematol*, **10**(2), 136-41 (2003).
- 145) Mook, O. R., Frederiks, W. M. and Van Noorden, C. J.: *Biochim Biophys Acta*, **1705**(2), 69-89 (2004).
- 146) Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L. and Matrisian, L. M.: *J Clin Oncol*, **18**(5), 1135-49 (2000).
- 147) Moses, M. A., Sudhalter, J. and Langer, R.: *Science*, **248**(4961), 1408-10 (1990).
- 148) Moses, M. A. and Langer, R.: *J Cell Biochem*, **47**(3), 230-5 (1991).
- 149) Moses, M. A.: *Stem Cells*, **15**(3), 180-9 (1997).
- 150) Takigawa, M., Nishida, Y., Suzuki, F., Kishi, J., Yamashita, K. and Hayakawa, T.: *Biochem Biophys Res Commun*, **171**(3), 1264-71 (1990).
- 151) Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. and Iwata, K.: *FEBS Lett*, **298**(1), 29-32 (1992).
- 152) Murphy, A. N., Unsworth, E. J. and Stetler-Stevenson, W. G.: *J Cell Physiol*, **157**(2), 351-8 (1993).
- 153) Stetler-Stevenson, W. G. and Seo, D. W.: *Trends Mol Med*, **11**(3), 97-103 (2005).
- 154) Seo, D. W., Li, H., Guedez, L., Wingfield, P. T., Diaz, T., Salloum, R., Wei, B. Y. and Stetler-Stevenson, W. G.: *Cell*, **114**(2), 171-80 (2003).
- 155) Murphy, G., Houbrechts, A., Cockett, M. I., Williamson, R. A., O'Shea, M. and Docherty, A. J.: *Biochemistry*, **30**(33), 8097-102 (1991).
- 156) Muskett, F. W., Frenkiel, T. A., Feeney, J., Freedman, R. B., Carr, M. D. and Williamson, R. A.: *J Biol Chem*, **273**(34), 21736-43 (1998).
- 157) Fernandez, C. A., Butterfield, C., Jackson, G. and Moses, M. A.: *J Biol Chem*, **278**(42), 40989-95 (2003).
- 158) O'Reilly, M. S., Wiederschain, D., Stetler-Stevenson, W. G., Folkman, J. and Moses, M. A.: *J Biol Chem*, **274**(41), 29568-71 (1999).
- 159) Zucker, S., Cao, J. and Chen, W. T.: *Oncogene*, **19**(56), 6642-50 (2000).
- 160) Coussens, L. M., Fingleton, B. and Matrisian, L. M.: *Science*, **295**(5564), 2387-92 (2002).
- 161) Wen, W., Moses, M. A., Wiederschain, D., Arbiser, J. L. and Folkman, J.: *Cancer Res*, **59**(24), 6052-6 (1999).
- 162) Levi, E., Fridman, R., Miao, H. Q., Ma, Y. S., Yayon, A. and Vlodavsky, I.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(14), 7069-74 (1996).
- 163) Frater-Schroder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P. and Bohlen, P.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(15), 5277-81 (1987).
- 164) Gearing, A. J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., Gordon, J. L. and *et al.*: *Nature*, **370**(6490), 555-7 (1994).
- 165) Brooks, P. C., Silletti, S., von Schalscha, T. L., Friedlander, M. and Cheresch, D. A.: *Cell*, **92**(3), 391-400 (1998).
- 166) Silletti, S., Kessler, T., Goldberg, J., Boger, D. L. and Cheresch, D. A.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(1), 119-24 (2001).
- 167) Ciardiello, F. and Tortora, G.: *Clin Cancer Res*, **7**(10), 2958-70 (2001).
- 168) Kim, E. S., Khuri, F. R. and Herbst, R. S.: *Curr Opin Oncol*, **13**(6), 506-13 (2001).
- 169) Mendelsohn, J.: *J Clin Oncol*, **20**(18 Suppl), 1S-13S (2002).
- 170) Wu, X., Rubin, M., Fan, Z., DeBlasio, T., Soos, T., Koff, A. and Mendelsohn, J.: *Oncogene*, **12**(7), 1397-403 (1996).
- 171) Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J. and Kumar, R.: *Oncogene*, **17**(8), 999-1007 (1998).
- 172) Petit, A. M., Rak, J., Hung, M. C., Rockwell, P., Goldstein, N., Fendly, B. and Kerbel, R. S.: *Am J Pathol*, **151**(6), 1523-30 (1997).

- 173) Prewett, M. C., Hooper, A. T., Bassi, R., Ellis, L. M., Waksal, H. W. and Hicklin, D. J.: *Clin Cancer Res*, **8**(5), 994-1003 (2002).
- 174) Brooks, P. C., Montgomery, A. M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G. and Cheresch, D. A.: *Cell*, **79**(7), 1157-64 (1994).
- 175) Kim, S., Bell, K., Mousa, S. A. and Varner, J. A.: *Am J Pathol*, **156**(4), 1345-62 (2000).
- 176) Sipkins, D. A., Cheresch, D. A., Kazemi, M. R., Nevin, L. M., Bednarski, M. D. and Li, K. C.: *Nat Med*, **4**(5), 623-6 (1998).
- 177) Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Streit, M., Koteliansky, V. E., de Fougerolles, A. R. and Detmar, M.: *Am J Pathol*, **160**(1), 195-204 (2002).
- 178) Mitjans, F., Meyer, T., Fittschen, C., Goodman, S., Jonczyk, A., Marshall, J. F., Reyes, G. and Piulats, J.: *Int J Cancer*, **87**(5), 716-23 (2000).
- 179) Matsumoto, K. and Nakamura, T.: *Cancer Sci*, **94**(4), 321-7 (2003).
- 180) Cao, D. J., Guo, Y. L. and Colman, R. W.: *Circ Res*, **94**(9), 1227-34 (2004).
- 181) Colman, R. W., Jameson, B. A., Lin, Y., Johnson, D. and Mousa, S. A.: *Blood*, **95**(2), 543-50 (2000).
- 182) Zhang, J. C., Claffey, K., Sakthivel, R., Darzynkiewicz, Z., Shaw, D. E., Leal, J., Wang, Y. C., Lu, F. M. and McCrae, K. R.: *Faseb J*, **14**(15), 2589-600 (2000).
- 183) Colman, R. W., Pixley, R. A., Sainz, I. M., Song, J. S., Isordia-Salas, I., Muhamed, S. N., Powell, J. A., Jr. and Mousa, S. A.: *J Thromb Haemost*, **1**(1), 164-70 (2003).
- 184) Espinola, R. G., Uknis, A., Sainz, I. M., Isordia-Salas, I., Pixley, R., DeLa Cadena, R., Long, W., Agelan, A., Gaughan, J., Adam, A. and Colman, R. W.: *Am J Pathol*, **165**(3), 969-76 (2004).
- 185) Stewart, J. M.: *Peptides*, **25**(3), 527-32 (2004).
- 186) Wohlfart, P., Dedio, J., Wirth, K., Scholkens, B. A. and Wiemer, G.: *J Pharmacol Exp Ther*, **280**(2), 1109-16 (1997).
- 187) Figueroa, C. D., Marchant, A., Novoa, U., Forstermann, U., Jarnagin, K., Scholkens, B. and Muller-Esterl, W.: *Hypertension*, **37**(1), 110-120 (2001).
- 188) Watanabe, K., Hasegawa, Y., Yamashita, H., Shimizu, K., Ding, Y., Abe, M., Ohta, H., Imagawa, K., Hojo, K., Maki, H., Sonoda, H. and Sato, Y.: *J Clin Invest*, **114**(7), 898-907 (2004).
- 189) Broggin, M., Marchini, S. V., Galliera, E., Borsotti, P., Taraboletti, G., Erba, E., Sironi, M., Jimeno, J., Faircloth, G. T., Giavazzi, R. and D'Incalci, M.: *Leukemia*, **17**(1), 52-9 (2003).
- 190) Taraboletti, G., Poli, M., Dossi, R., Manenti, L., Borsotti, P., Faircloth, G. T., Broggin, M., D'Incalci, M., Ribatti, D. and Giavazzi, R.: *Br J Cancer*, **90**(12), 2418-24 (2004).
- 191) Gordon, M. S., Margolin, K., Talpaz, M., Sledge, G. W., Jr., Holmgren, E., Benjamin, R., Stalter, S., Shak, S. and Adelman, D.: *J Clin Oncol*, **19**(3), 843-50 (2001).
- 192) Margolin, K., Gordon, M. S., Holmgren, E., Gaudreault, J., Novotny, W., Fyfe, G., Adelman, D., Stalter, S. and Breed, J.: *J Clin Oncol*, **19**(3), 851-6 (2001).
- 193) Takahashi, Y., Kitadai, Y., Bucana, C. D., Cleary, K. R. and Ellis, L. M.: *Cancer Res*, **55**(18), 3964-8 (1995).
- 194) Takahashi, Y., Tucker, S. L., Kitadai, Y., Koura, A. N., Bucana, C. D., Cleary, K. R. and Ellis, L. M.: *Arch Surg*, **132**(5), 541-6 (1997).
- 195) Kabbinavar, F., Hurwitz, H. I., Fehrenbacher, L., Meropol, N. J., Novotny, W. F., Lieberman, G., Griffing, S. and Bergsland, E.: *J Clin Oncol*, **21**(1), 60-5 (2003).
- 196) Saltz, L. B., Cox, J. V., Blanke, C., Rosen, L. S., Fehrenbacher, L., Moore, M. J., Maroun, J. A., Ackland, S. P., Locker, P. K., Pirotta, N., Elfring, G. L. and Miller, L. L.: *N Engl J Med*, **343**(13), 905-14 (2000).
- 197) Kabbinavar, F. F., Schulz, J., McCleod, M., Patel, T., Hamm, J. T., Hecht, J. R., Mass, R., Perrou, B., Nelson, B. and Novotny, W. F.: *J Clin Oncol*, **23**(16), 3697-705 (2005).
- 198) Kabbinavar, F. F., Hambleton, J., Mass, R. D., Hurwitz, H. I., Bergsland, E. and Sarkar, S.: *J Clin Oncol*, **23**(16), 3706-12 (2005).
- 199) de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., Papamichael, D., Le Bail, N., Louvet, C., Hendler, D., de Braud, F., et al.: *J Clin Oncol*, **18**(16), 2938-47 (2000).
- 200) Goldberg, R. M., Sargent, D. J., Morton, R.

- F., Fuchs, C. S., Ramanathan, R. K., Williamson, S. K., Findlay, B. P., Pitot, H. C. and Alberts, S. R.: *J Clin Oncol*, **22**(1), 23-30 (2004).
- 201) Giantonio, B. J., Catalano, P. J., Meropol, N. J., O'Dwyer, P. J., Mitchell, E. P., Alberts, S. R., Schwartz, M. A. and Benson, A. B., 3rd: *J Clin Oncol*, **25**(12), 1539-44 (2007).
- 202) Emmanouilides, C., Sfakiotaki, G., Androulakis, N., Kalbakis, K., Christophylakis, C., Kalykaki, A., Vamvakas, L., Kotsakis, A., Agelaki, S., Diamandidou, E., Touroutoglou, N., Chatzidakis, A., Georgoulis, V., Mavroudis, D. and Souglakos, J.: *BMC Cancer*, **7**, 91 (2007).
- 203) Scappaticci, F. A., Fehrenbacher, L., Cartwright, T., Hainsworth, J. D., Heim, W., Berlin, J., Kabbinavar, F., Novotny, W., Sarkar, S. and Hurwitz, H.: *J Surg Oncol*, **91**(3), 173-80 (2005).
- 204) Chen, H. X., Mooney, M., Boron, M., Vena, D., Mosby, K., Grochow, L., Jaffe, C., Rubinstein, L., Zwiebel, J. and Kaplan, R. S.: *J Clin Oncol*, **24**(21), 3354-60 (2006).
- 205) Giantonio, B. J., Levy, D. E., O'Dwyer P. J., Meropol, N. J., Catalano, P. J. and Benson, A. B., 3rd: *Ann Oncol*, **17**(9), 1399-403 (2006).
- 206) Lonser, R. R., Glenn, G. M., Walther, M., Chew, E. Y., Libutti, S. K., Linehan, W. M. and Oldfield, E. H.: *Lancet*, **361**(9374), 2059-67 (2003).
- 207) Rini, B. I. and Small, E. J.: *J Clin Oncol*, **23**(5), 1028-43 (2005).
- 208) Shuin, T., Kondo, K., Torigoe, S., Kishida, T., Kubota, Y., Hosaka, M., Nagashima, Y., Kitamura, H., Latif, F., Zbar, B., *et al.*: *Cancer Res*, **54**(11), 2852-5 (1994).
- 209) Rini, B. I., Halabi, S., Taylor, J., Small, E. J. and Schilsky, R. L.: *Clin Cancer Res*, **10**(8), 2584-6 (2004).
- 210) Hainsworth, J. D., Sosman, J. A., Spigel, D. R., Edwards, D. L., Baughman, C. and Greco, A.: *J Clin Oncol*, **23**(31), 7889-96 (2005).
- 211) Brown, L. F., Berse, B., Jackman, R. W., Tognazzi, K., Guidi, A. J., Dvorak, H. F., Senger, D. R., Connolly, J. L. and Schnitt, S. J.: *Hum Pathol*, **26**(1), 86-91 (1995).
- 212) Relf, M., LeJeune, S., Scott, P. A., Fox, S., Smith, K., Leek, R., Moghaddam, A., Whitehouse, R., Bicknell, R. and Harris, A. L.: *Cancer Res*, **57**(5), 963-9 (1997).
- 213) Sledge, G. W., Jr.: *Semin Oncol*, **29**(3 Suppl 11), 104-10 (2002).
- 214) Foekens, J. A., Peters, H. A., Grebenchtchikov, N., Look, M. P., Meijer-van Gelder, M. E., Geurts-Moespot, A., van der Kwast, T. H., Sweep, C. G. and Klijn, J.-G.: *Cancer Res*, **61**(14), 5407-14 (2001).
- 215) Miller, K. D., Chap, L. I., Holmes, F. A., Cobleigh, M. A., Marcom, P. K., Fehrenbacher, L., Dickler, M., Overmoyer, B. A., Reimann, J. D., Sing, A. P., Langmuir, V. and Rugo, H. S.: *J Clin Oncol*, **23**(4), 792-9 (2005).
- 216) Scott, L. J.: *Drugs*, **67**(12), 1793-9 (2007).
- 217) Ramaswamy, B., Elias, A. D., Kelbick, N. T., Dodley, A., Morrow, M., Hauger, M., Allen, J., Rhoades, C., Kendra, K., Chen, H. X., Eckhardt, S. G. and Shapiro, C. L.: *Clin Cancer Res*, **12**(10), 3124-9 (2006).
- 218) Rugo, H. S.: *Oncologist*, **9**, Suppl 1, 43-9 (2004).
- 219) Johnson, D. H., Fehrenbacher, L., Novotny, W. F., Herbst, R. S., Nemunaitis, J. J., Jablons, D. M., Langer, C. J., DeVore, R. F., 3rd, Gaudreault, J., Damico, L. A., Holmgren, E. and Kabbinavar, F.: *J Clin Oncol*, **22**(11), 2184-91 (2004).
- 220) Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., Lilienbaum, R. and Johnson, D. H.: *N Engl J Med*, **355**(24), 2542-50 (2006).
- 221) Herbst, R. S. and Sandler, A. B.: *Oncologist*, **9**, Suppl 1, 19-26 (2004).
- 222) Herbst, R. S., Johnson, D. H., Mininberg, E., Carbone, D. P., Henderson, T., Kim, E. S., Blumenschein, G., Jr., Lee, J. J., Liu, D. D., Truong, M. T., Hong, W. K., Tran, H., Tsao, A., Xie, D., Ramies, D. A., *et al.*: *J Clin Oncol*, **23**(11), 2544-55 (2005).
- 223) Itakura, J., Ishiwata, T., Shen, B., Kornmann, M. and Korc, M.: *Int J Cancer*, **85**(1), 27-34 (2000).
- 224) Seo, Y., Baba, H., Fukuda, T., Takashima, M. and Sugimachi, K.: *Cancer*, **88**(10), 2239-45 (2000).
- 225) Kindler, H. L., Friberg, G., Singh, D. A., Locker, G., Nattam, S., Kozloff, M., Taber, D. A., Karrison, T., Dachman, A., Stadler,

- W. M. and Vokes, E. E.: *J Clin Oncol*, **23** (31), 8033-40 (2005).
- 226) Monk, B. J., Han, E., Josephs-Cowan, C. A., Pugmire, G. and Burger, R. A.: *Gynecol Oncol*, **102**(2), 140-4 (2006).
- 227) Wright, J. D., Viviano, D., Powell, M. A., Gibb, R. K., Mutch, D. G., Grigsby, P. W. and Rader, J. S.: *Gynecol Oncol*, **103**(2), 489-93 (2006).
- 228) Zhu, A. X., Blaszkowsky, L. S., Ryan, D. P., Clark, J. W., Muzikansky, A., Horgan, K., Sheehan, S., Hale, K. E., Enzinger, P. C., Bhargava, P. and Stuart, K.: *J Clin Oncol*, **24**(12), 1898-903 (2006).
- 229) Shah, M. A., Ramanathan, R. K., Ilson, D. H., Levnor, A., D'Adamo, D., O'Reilly, E., Tse, A., Trocola, R., Schwartz, L., Capanu, M., Schwartz, G. K. and Kelsen, D. P.: *J Clin Oncol*, **24**(33), 5201-6 (2006).
- 230) Vredenburgh, J. J., Desjardins, A., Herndon, J. E., 2nd, Dowell, J. M., Reardon, D. A., Quinn, J. A., Rich, J. N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Wagner, M., Bigner, D. D., Friedman, A. H. and Friedman, H. S.: *Clin Cancer Res*, **13**(4), 1253-9 (2007).
- 231) Hainsworth, J. D., Spigel, D. R., Farley, C., Thompson, D. S., Shipley, D. L. and Greco, F. A.: *J Clin Oncol*, **25**(13), 1747-52 (2007).
- 232) Posey, J. A., Ng, T. C., Yang, B., Khazaeli, M. B., Carpenter, M. D., Fox, F., Needle, M., Waksal, H. and LoBuglio, A. F.: *Clin Cancer Res*, **9**(4), 1323-32 (2003).
- 233) Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I. and Van Cutsem, E.: *N Engl J Med*, **351**(4), 337-45 (2004).
- 234) Saltz, L. B., Meropol, N. J., Loehrer, P. J., Sr., Needle, M. N., Kopit, J. and Mayer, R. J.: *J Clin Oncol*, **22**(7), 1201-8 (2004).
- 235) Folprecht, G., Lutz, M. P., Schoffski, P., Seufferlein, T., Nolting, A., Pollert, P. and Kohne, C. H.: *Ann Oncol*, **17**(3), 450-6 (2006).
- 236) Vincenzi, B., Santini, D., Rabitti, C., Coppola, R., Beomonte Zobel, B., Trodella, L. and Tonini, G.: *Br J Cancer*, **94**(6), 792-7 (2006).
- 237) Gebbia, V., Del Prete, S., Borsellino, N., Ferrau, F., Tralongo, P., Verderame, F., Leonardi, V., Capasso, E., Maiello, E., Bordonaro, R., Stinco, S., Agostara, B. and Barone, C.: *Clin Colorectal Cancer*, **5**(6), 422-8 (2006).
- 238) Meyerhardt, J. A., Heseltine, D., Ogino, S., Clark, J. W., Enzinger, P. C., Ryan, D. P., Earle, C. C., Zhu, A. X. and Fuchs, C. S.: *Clin Colorectal Cancer*, **6**(1), 59-65 (2006).
- 239) Lenz, H. J., Van Cutsem, E., Khambata-Ford, S., Mayer, R. J., Gold, P., Stella, P., Mirtsching, B., Cohn, A. L., Pippas, A. W., Azarnia, N., Tsuchihashi, Z., Mauro, D. J. and Rowinsky, E. K.: *J Clin Oncol*, **24**(30), 4914-21 (2006).
- 240) Souglakos, J., Kalykaki, A., Vamvakas, L., Androulakis, N., Kalbakis, K., Agelaki, S., Vardakis, N., Tzardi, M., Kotsakis, A. P., Gioulbasanis, J., Tsetis, D., Sfakiotaki, G., Chatzidaki, D., Mavroudis, D. and Georgoulas, V.: *Ann Oncol*, **18**(2), 305-10 (2007).
- 241) Xiong, H. Q., Rosenberg, A., LoBuglio, A., Schmidt, W., Wolff, R. A., Deutsch, J., Needle, M. and Abbuzzese, J. L.: *J Clin Oncol*, **22**(13), 2610-6 (2004).
- 242) Chan, A. T., Hsu, M. M., Goh, B. C., Hui, E. P., Liu, T. W., Millward, M. J., Hong, R. L., Whang-Peng, J., Ma, B. B., To, K. F., Mueser, M., Amellal, N., Lin, X. and Chang, A. Y.: *J Clin Oncol*, **23**(15), 3568-76 (2005).
- 243) Herbst, R. S., Arquette, M., Shin, D. M., Dicke, K., Vokes, E. E., Azarnia, N., Hong, W. K. and Kies, M. S.: *J Clin Oncol*, **23**(24), 5578-87 (2005).
- 244) Baselga, J., Trigo, J. M., Bourhis, J., Tortochaux, J., Cortes-Funes, H., Hitt, R., Gascon, P., Amellal, N., Harstrick, A. and Eckardt, A.: *J Clin Oncol*, **23**(24), 5568-77 (2005).
- 245) Burtneß, B., Goldwasser, M. A., Flood, W., Mattar, B. and Forastiere, A. A.: *J Clin Oncol*, **23**(34), 8646-54 (2005).
- 246) Bourhis, J., Rivera, F., Mesia, R., Awada, A., Geoffrois, L., Borel, C., Humblet, Y., Lopez-Pousa, A., Hitt, R., Vega Villegas, M. E., Duck, L., Rosine, D., Amellal, N., Schueler, A. and Harstrick, A.: *J Clin Oncol*, **24**(18), 2866-72 (2006).
- 247) Vermorken, J. B., Trigo, J., Hitt, R., Koralowski, P., Diaz-Rubio, E., Rolland, F., Knecht, R., Amellal, N., Schueler, A. and Basel-

- ga, J.: *J Clin Oncol*, **25**(16), 2171-7 (2007).
- 248) Hanna, N., Lilenbaum, R., Ansari, R., Lynch, T., Govindan, R., Janne, P. A. and Bonomi, P.: *J Clin Oncol*, **24**(33), 5253-8 (2006).
- 249) Thienelt, C. D., Bunn, P. A., Jr., Hanna, N., Rosenberg, A., Needle, M. N., Long, M. E., Gustafson, D. L. and Kelly, K.: *J Clin Oncol*, **23**(34), 8786-93 (2005).
- 250) Robert, F., Blumenschein, G., Herbst, R. S., Fossella, F. V., Tseng, J., Saleh, M. N. and Needle, M.: *J Clin Oncol*, **23**(36), 9089-96 (2005).
- 251) Pinto, C., Di Fabio, F., Siena, S., Cascinu, S., Rojas Llimpe, F. L., Ceccarelli, C., Mutri, V., Giannetta, L., Giaquinta, S., Funaioli, C., Berardi, R., Longobardi, C., Piana, E. and Martoni, A. A.: *Ann Oncol*, **18**(3), 510-7 (2007).
- 252) Kollmannsberger, C., Schittenhelm, M., Honecker, F., Tillner, J., Weber, D., Oechsle, K., Kanz, L. and Bokemeyer, C.: *Ann Oncol*, **17**(6), 1007-13 (2006).
- 253) Graeven, U., Kremer, B., Sudhoff, T., Killing, B., Rojo, F., Weber, D., Tillner, J., Unal, C. and Schmiegel, W.: *Br J Cancer*, **94**(9), 1293-9 (2006).
- 254) Gutheil, J. C., Campbell, T. N., Pierce, P. R., Watkins, J. D., Huse, W. D., Bodkin, D. J. and Cheresch, D. A.: *Clin Cancer Res*, **6**(8), 3056-61 (2000).
- 255) Posey, J. A., Khazaeli, M. B., DelGrosso, A., Saleh, M. N., Lin, C. Y., Huse, W. and LoBuglio, A. F.: *Cancer Biother Radiopharm*, **16**(2), 125-32 (2001).
- 256) McNeel, D. G., Eickhoff, J., Lee, F. T., King, D. M., Alberti, D., Thomas, J. P., Friedl, A., Kolesar, J., Marnocha, R., Volkman, J., Zhang, J., Hammershaimb, L., Zwiebel, J. A. and Wilding, G.: *Clin Cancer Res*, **11**(21), 7851-60 (2005).
- 257) Eskens, F. A., Dumez, H., Hoekstra, R., Perschl, A., Brindley, C., Bottcher, S., Wyndaele, W., Dreves, J., Verweij, J. and van Oosterom, A. T.: *Eur J Cancer*, **39**(7), 917-26 (2003).
- 258) Friess, H., Langrehr, J. M., Oettle, H., Raedle, J., Niedergethmann, M., Dittrich, C., Hossfeld, D. K., Stoger, H., Neyns, B., Herzog, P., Piedbois, P., Dobrowolski, F., Scheithauer, W., Hawkins, R., Katz, F., et al.: *BMC Cancer*, **6**, 285 (2006).
- 259) Beerepoot, L. V., Witteveen, E. O., Groenewegen, G., Fogler, W. E., Sim, B. K., Sidor, C., Zonnenberg, B. A., Schramel, F., Gebbink, M. F. and Voest, E. E.: *Clin Cancer Res*, **9**(11), 4025-33 (2003).
- 260) Kurup, A., Lin, C. W., Murry, D. J., Dobrolecki, L., Estes, D., Yiannoutsos, C. T., Mariano, L., Sidor, C., Hickey, R. and Hanna, N.: *Ann Oncol*, **17**(1), 97-103 (2006).
- 261) Herbst, R. S., Hess, K. R., Tran, H. T., Tseng, J. E., Mullani, N. A., Charnsangavej, C., Madden, T., Davis, D. W., McConkey, D. J., O'Reilly, M. S., Ellis, L. M., Pluda, J., Hong, W. K. and Abbruzzese, J. L.: *J Clin Oncol*, **20**(18), 3792-803 (2002).
- 262) Thomas, J. P., Arzoomanian, R. Z., Alberti, D., Marnocha, R., Lee, F., Friedl, A., Tutsch, K., Dresen, A., Geiger, P., Pluda, J., Fogler, W., Schiller, J. H. and Wilding, G.: *J Clin Oncol*, **21**(2), 223-31 (2003).
- 263) Kulke, M. H., Bergsland, E. K., Ryan, D. P., Enzinger, P. C., Lynch, T. J., Zhu, A. X., Meyerhardt, J. A., Heymach, J. V., Fogler, W. E., Sidor, C., Michelini, A., Kinsella, K., Venook, A. P. and Fuchs, C. S.: *J Clin Oncol*, **24**(22), 3555-61 (2006).
- 264) Hoekstra, R., de Vos, F. Y., Eskens, F. A., Gietema, J. A., van der Gaast, A., Groen, H. J., Knight, R. A., Carr, R. A., Humerickhouse, R. A., Verweij, J. and de Vries, E. G.: *J Clin Oncol*, **23**(22), 5188-97 (2005).
- 265) Hoekstra, R., de Vos, F. Y., Eskens, F. A., de Vries, E. G., Uges, D. R., Knight, R., Carr, R. A., Humerickhouse, R., Verweij, J. and Gietema, J. A.: *Eur J Cancer*, **42**(4), 467-72 (2006).
- 266) Gietema, J. A., Hoekstra, R., de Vos, F. Y., Uges, D. R., van der Gaast, A., Groen, H. J., Loos, W. J., Knight, R. A., Carr, R. A., Humerickhouse, R. A. and Eskens, F. A.: *Ann Oncol*, **17**(8), 1320-7 (2006).
- 267) Nguyen, Q. D., Shah, S. M., Hafiz, G., Quinlan, E., Sung, J., Chu, K., Cedarbaum, J. M. and Campochiaro, P. A.: *Ophthalmology*, **113**(9), 1522 e1-1522 e14 (2006).
- 268) Faivre, S., Chieze, S., Delbaldo, C., Ady-Vago, N., Guzman, C., Lopez-Lazaro, L., Lozahic, S., Jimeno, J., Pico, F., Armand, J. P., Martin, J. A. and Raymond, E.: *J Clin*

- Oncol*, **23**(31), 7871-80 (2005).
- 269) Maroun, J. A., Belanger, K., Seymour, L., Matthews, S., Roach, J., Dionne, J., Soulières, D., Stewart, D., Goel, R., Charpentier, D., Goss, G., Tomiak, E., Yau, J., Jimeno, J. and Chiritescu, G.: *Ann Oncol*, **17**(9), 1371-8 (2006).
- 270) Winkler, F., Kozin, S. V., Tong, R. T., Chae, S. S., Booth, M. F., Garkavtsev, I., Xu, L., Hicklin, D. J., Fukumura, D., di Tomaso, E., Munn, L. L. and Jain, R. K.: *Cancer Cell*, **6**(6), 553-63 (2004).
- 271) Ansiaux, R., Baudelet, C., Jordan, B. F., Beghein, N., Sonveaux, P., De Wever, J., Martinive, P., Gregoire, V., Feron, O. and Gallez, B.: *Clin Cancer Res*, **11**(2 Pt 1), 743-50 (2005).
- 272) Miller, K. D.: *Breast Cancer Res Treat*, **75**, Suppl 1, S45-50; discussion S57-8 (2002).
- 273) Garber, K.: *Nat Biotechnol*, **20**(11), 1067-8 (2002).
- 274) Stadler, W. M., Cao, D., Vogelzang, N. J., Ryan, C. W., Hoving, K., Wright, R., Karison, T. and Vokes, E. E.: *Clin Cancer Res*, **10**(10), 3365-70 (2004).
- 275) Folkman, J.: *Apmsis*, **112**(7-8), 496-507 (2004).
- 276) Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso, E., Fukumura, D. and Jain, R. K.: *Nature*, **416**(6878), 279-80 (2002).
- 277) Kerbel, R. S. and Kamen, B. A.: *Nat Rev Cancer*, **4**(6), 423-36 (2004).
- 278) Bergsland, E. and Dickler, M. N.: *Oncologist*, **9**, Suppl 1, 36-42 (2004).
- 279) Bergers, G. and Benjamin, L. E.: *Nat Rev Cancer*, **3**(6), 401-10 (2003).
- 280) de Fraipont, F., Nicholson, A. C., Feige, J. J. and Van Meir, E. G.: *Trends Mol Med*, **7**(9), 401-7 (2001).
- 281) Yu, J. L., Rak, J. W., Coomber, B. L., Hicklin, D. J. and Kerbel, R. S.: *Science*, **295**(5559), 1526-8 (2002).
- 282) Sugimoto, H., Hamano, Y., Charytan, D., Cosgrove, D., Kieran, M., Sudhakar, A. and Kalluri, R.: *J Biol Chem*, **278**(15), 12605-8 (2003).
- 283) Kasahara, Y., Tuder, R. M., Taraseviciene-Stewart, L., Le Cras, T. D., Abman, S., Hirth, P. K., Waltenberger, J. and Voelkel, N. F.: *J Clin Invest*, **106**(11), 1311-9 (2000).
- 284) Baffert, F., Thurston, G., Rochon-Duck, M., Le, T., Brekken, R. and McDonald, D. M.: *Circ Res*, **94**(7), 984-92 (2004).
- 285) Zelzer, E., Mamluk, R., Ferrara, N., Johnson, R. S., Schipani, E. and Olsen, B. R.: *Development*, **131**(9), 2161-71 (2004).
- 286) Brewer, G. J., Dick, R. D., Grover, D. K., LeClaire, V., Tseng, M., Wicha, M., Pienta, K., Redman, B. G., Jahan, T., Sondak, V. K., Strawderman, M., LeCarpentier, G. and Merajver, S. D.: *Clin Cancer Res*, **6**(1), 1-10 (2000).
- 287) Herbst, R. S., Mullani, N. A., Davis, D. W., Hess, K. R., McConkey, D. J., Charnsangavej, C., O'Reilly, M. S., Kim, H. W., Baker, C., Roach, J., Ellis, L. M., Rashid, A., Pluda, J., Bucana, C., Madden, T. L., et al.: *J Clin Oncol*, **20**(18), 3804-14 (2002).
- 288) Eder, J. P., Jr., Supko, J. G., Clark, J. W., Puchalski, T. A., Garcia-Carbonero, R., Ryan, D. P., Shulman, L. N., Proper, J., Kirvan, M., Rattner, B., Connors, S., Keogan, M. T., Janicek, M. J., Fogler, W. E., Schnipper, L., et al.: *J Clin Oncol*, **20**(18), 3772-84 (2002).
- 289) Deplanque, G., Madhusudan, S., Jones, P. H., Wellmann, S., Christodoulos, K., Talbot, D. C., Ganesan, T. S., Blann, A. and Harris, A. L.: *Br J Cancer*, **91**(9), 1645-50 (2004).
- 290) Wulfkuhle, J., Espina, V., Liotta, L. and Petricoin, E.: *Eur J Cancer*, **40**(17), 2623-32 (2004).
- 291) Aubert, B., Barate, R., Boutigny, D., Couderc, F., Gaillard, J. M., Hicheur, A., Karyotakis, Y., Lees, J. P., Tisserand, V., Zghiche, A., Palano, A., Pompili, A., Chen, J. C., Qi, N. D., Rong, G., et al.: *Phys Rev Lett*, **92**(22), 221803 (2004).
- 292) Roy, R., Wewer, U. M., Zurakowski, D., Pories, S. E. and Moses, M. A.: *J Biol Chem*, **279**(49), 51323-30 (2004).
- 293) Chan, L. W., Moses, M. A., Goley, E., Sproull, M., Muanza, T., Coleman, C. N., Figg, W. D., Albert, P. S., Menard, C. and Camphausen, K.: *J Clin Oncol*, **22**(3), 499-506 (2004).
- 294) Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., Nakao, K. and Nishikawa, S.: *Nature*, **408**(6808), 92-6 (2000).

- 295) Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P. H. and Verfaillie, C. M.: *J Clin Invest*, **109**(3), 337-46 (2002).
- 296) Bertolini, F., Mingrone, W., Alietti, A., Ferrucci, P. F., Cocorocchio, E., Peccatori, F., Cinieri, S., Mancuso, P., Corsini, C., Burlini, A., Zucca, E. and Martinelli, G.: *Ann Oncol*, **12**(7), 987-90 (2001).
- 297) Dowlati, A., Robertson, K., Cooney, M., Petros, W. P., Stratford, M., Jesberger, J., Rafie, N., Overmoyer, B., Makkar, V., Stambler, B., Taylor, A., Waas, J., Lewin, J. S., McCrae, K. R. and Remick, S. C.: *Cancer Res*, **62**(12), 3408-16 (2002).
- 298) Stevenson, J. P., Rosen, M., Sun, W., Gallagher, M., Haller, D. G., Vaughn, D., Giantonio, B., Zimmer, R., Petros, W. P., Stratford, M., Chaplin, D., Young, S. L., Schnall, M. and O'Dwyer, P. J.: *J Clin Oncol*, **21**(23), 4428-38 (2003).

An inter-laboratory study to validate quantitative and qualitative immunoassay kits for screening test of aflatoxin B₁ in corn

Yoshiko SUGITA-KONISHI¹, Shingo NIIMI² and Kei-ichi SUGIYAMA¹

¹ Division of Microbiology, National Institute of Health Sciences
(1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

² Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences
(1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

Collaborators: Eiichi ISHIKURO³, Toshitsugu TANAKA⁴, Yoshitsugu SUGIURA⁴,
Yoshinori ITOH⁵ and Masahiro NAKAJIMA⁶

³ The Fertilizer and Feed Inspection Service
(2-1, Shinntoshin, Chuo-ku, Saitama, 330-9733, Japan)

⁴ Kobe Institute of Health
(4-6 Minatojima-Nakamachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0046, Japan)

⁵ Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Sciences
(1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

⁶ Nagoya city Public Health Research Institute
(1-11, Hagiyaama, Mizuho-ku, Nagaya 467-8615, Japan)

Summary

To validate commercial kit for screening of the presence of AFB₁ in corn, an inter-laboratory study was conducted to evaluate three quantitative and two qualitative immunoassay kits designed for the detection of aflatoxins. Four laboratories performed a screen for the presence of aflatoxin B₁ (AFB₁) in corn. As for the quantitative kits, repeatability relative standard deviation (RSD_r) and reproducibility relative standard deviation (RSD_R) were estimated. One laboratory evaluated the lot variation of each quantitative kit. All kits used in this study showed that the RSD_r and RSD_R were less than 23.3 % and 35.7 %, respectively, in spiked or naturally contaminated corn samples. As for the qualitative kits, neither false positive nor false negative results were found in corn samples (blank, spiked or naturally contaminated samples) in any laboratories. The RSDs in the lot variation of the same quantitative kit was less than 46.5 % in both two brands. The results appeared to indicate that all kits tested in this study could be validated for the screening of the presence of AFB₁ in corn, and were also available for the first step of the detection of AFB₁ at levels of more than 5 ng/g.

Key words : inter-laboratory study, immunoassay kit, aflatoxin, corn

(Received: January 15, 2007, Accepted: April 23, 2007)

Introduction

Aflatoxins (AFs: Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂) produced by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* are well-known as carcinogenic mycotoxins. Especially, Aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most frequently encountered among AFs and possesses a high toxic potential¹⁾ responsible for human liver cancer. The contamination of AFs has been found in corn, beans, peanut, tree nuts as well as in animal feed²⁾.

Many analytical methods have been conducted to detect AFs in foods and feeds^{3,4)}, however, most of them require sophisticated equipment and are time-consuming. Recently commercially available immunoassay kits were introduced for the detection of AFs. These assays are timesaving and do not use expensive instruments. The positive and negative results can be visualized directly or measured by a micro-well reader. These rapid analytical immunoassay kits for mycotoxins have been supplied from several chemical companies, and it is convenient to detect the target easily. The commercial kits are divided into two analytical types. One is a quantitative determination such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and quantitative lateral flow test. The other is a qualitative rapid detection such as rapid membrane-based enzyme immunoassay.

To estimate the efficiency of commercial immunoassay kits in screening of corn containing AFB₁, exceed the regulatory limit, we carried out four inter-laboratory studies using blank, spiked, and naturally contaminated corn. Additionally, the variation of lots in the same kit was carried out by one of the participating laboratories. Using the same samples, the assays were performed in triplicate in each lot of the kit.

Materials and Methods

Immunoassay kits Table 1 summarizes the specification of 5 commercial kits for this study with target chemicals and detectable ranges. The kits A, C and E are for total aflatoxins, while kits B and D are only for AFB₁. As commercial kits, Agra Quant Total Aflatoxin Assay 4/40 (Romer Lab.), ROSA Aflatoxin quantitative (Charm Sciences inc.), RIDASCREEN FAST aflatoxin (R-biopharm Rhone Ltd.), AFLACARD B₁ (R-biopharm Rhone Ltd., 4 ng/g Cut-off.) and AgraStrip™ Total Aflatoxin Test (Romer Lab., 4 ng/g Cut-off) were used. Due to the Food Sanitation Law of Japan that defines the guideline to regulate only AFB₁ in all foods, AFB₁ was used as a spiked aflatoxin into analytical samples throughout this inter-laboratory study.

Table 1. The specification of the kit tested in the inter-laboratory study

Kit	Quantitative/qualitative	Range for detection (ng/g)	Target for detection
Kit A	quantitative (ELISA)	1 ~ 20	total aflatoxin
Kit B	quantitative (ELISA)	0 ~ 45	aflatoxin B ₁
Kit C	quantitative (lateral-flow)	0 ~ 100	total aflatoxin
Kit D	qualitative	> 4	aflatoxin B ₁
Kit E	qualitative	> 4	total aflatoxin

Table 2-1. Interlaboratory study results for determination of AFB₁ in corn by immunoassay tests (Quantitative kit)

Laboratory No.	Laboratory 1		Laboratory 2		Laboratory 3		Laboratory 4		Results			
	Number of test	test 1 (ng/g)	test 2 (ng/g)	test 1 (ng/g)	test 2 (ng/g)	test 1 (ng/g)	test 2 (ng/g)	test 1 (ng/g)	test 2 (ng/g)	Mean (ng/g)	RSD _r (%)	RSD _R (%)
Kit A	Blank	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-
	5 ng/g spike	2.2	3.4	4.4	4.5	4.3	3.8	3.8	3.5	3.7	12.7	20.5
	10 ng/g spike	7.5	7.5	8.4	9.0	7.9	7.3	6.7	5.7	7.5	6.2	14.6
	naturally contaminated	8.9	8.2	7.1	7.4	9.2	8.7	7.1	6.6	7.9	4.8	13.3
Kit B	Blank	ND	ND	ND	ND	1.78	1.78	ND	ND	-	-	-
	5 ng/g spike	5.0	5.5	4.1	4.8	4.5	5.7	2.9	4.4	4.6	16.6	20.0
	10 ng/g spike	8.0	7.5	7.0	8.1	9.5	8.7	6.3	6.8	7.7	7.7	14.5
	naturally contaminated	8.3	7.6	3.7	7.5	11.3	11.6	9.2	8.5	8.5	16.4	30.6
Kit C	Blank	1	1	1	1	ND	ND	1	1	-	-	-
	5 ng/g spike	8	5	3	4	4	4	5	6	4.5	23.3	38
	10 ng/g spike	19	12	7	13	14	11	8	12	11.2	2.7	31.2
	naturally contaminated	12	15	5	15	10	9	7	8	9	12.2	35.7

ND: Not determined

RSD_r: repeatability relative standard deviationRSD_R: reproducibility relative standard deviationTable 2-2. Interlaboratory study results for determination of AFB₁ in corn by immunoassay tests (Qualitative kit)

Laboratory No.	Laboratory 1		Laboratory 2		Laboratory 3		Laboratory 4		
	Number of test	test 1 (ng/g)	test 2 (ng/g)	test 1 (ng/g)	test 2 (ng/g)	test 1 (ng/g)	test 2 (ng/g)	test 1 (ng/g)	test 2 (ng/g)
Kit D	Blank	-	-	-	-	-	-	-	-
	5 ng/g spike	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ng/g spike	+	+	+	+	+	+	+	+
	naturally contaminated	+	+	+	+	+	+	+	+
Kit E	Blank	-	-	-	-	-	-	-	-
	5 ng/g spike	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ng/g spike	+	+	+	+	+	+	+	+
	naturally contaminated	+	+	+	+	+	+	+	+

ND: Not determined

RSD_r: repeatability relative standard deviationRSD_R: reproducibility relative standard deviation

RSD of corns spiked with 5 ng/g, 10 ng/g, and naturally contaminated corn was 24 %, 46.5 %, and 4.4 %, respectively. In the kits D and E, no positive result appeared in blank sample and no negative result was recognized in corn spiked with 5 ng/g, 10 ng/g or naturally contaminated (data not shown). As for kit B, the manufacturing company supplies only one lot for this study.

In the quantitative assay, the results suggested that kits A and B were more robust than kit C, but they needed a more complicate procedure than kit C. Taking the performance of these kits into account, the users have to choose a kit which is suitable for their own purpose.

Sample preparation and test procedure Blank corn kernels, which contained less than 1 ng/g of AFB₁, were obtained from the Fertilizer and Feed Inspection Service, Japan. The corn kernels were ground in a grinder to a mesh size of 1 mm. Two spiked samples were prepared by adding an appropriate volume of AFB₁ (1 µg/ml) dissolved in acetonitrile to 10 g of blank material. Final concentrations of AFB₁ were adjusted to 5 ng/g and 10 ng/g. Natural contaminated corn containing 10.7 ± 2.2 ng/g of AFB₁ alone was purchased from R-biopharm Rhone Ltd. as a standard material.

Sample extraction and test procedures were carried out according to the manufacturer's instruction in each kit.

Inter-laboratory study This study has been performed by four laboratories, National Institute of Health Sciences (division of microbiology, division of biological chemistry and biologicals, and division of biomedical food research), Kobe Institute of Health, Nagoya city Public Health Research Institute and Japan Food Research Laboratories. National Institute of Health Sciences (division of microbiology and division of biological chemistry and biologicals) conducted the study containing preparation of all samples and protocols and others were participants. Kits and samples (blank or naturally contaminated corn) were stored at 2-8 °C after being received. Test samples were measured with their own micro-well reader at suitable wavelength in the quantitative assay, and the interpretation of the results was visually determined in the qualitative assay. In these experiments, duplicate analyses were performed for each kit.

Statistics Parameters of precision, which are the inter-laboratory means, RSD_r, RSD_R, were deduced using an analysis of variances according to the AOAC guideline⁵⁾.

Results and Discussion

The aim of this study was to evaluate whether these kits are suitable for the screening of AFB₁-contaminated corn at levels of more than 10 ng/g. Taking account the unexpected errors in the steps of extraction and analytical practice, the cut-off value of the results was set at around 5 ng/g. Therefore in all kits validated in this study, the range for detection covered 5 ng/g.

In Table 2-1, the RSD_r of two quantitative kits (A and B) showed that the RSD_r was 12.7 and 16.6 % for 5 ng/g of AFB₁ spiked sample, 6.2 and 7.4 % for 10 ng/g spiked, and 4.8 and 16.4 % for naturally contaminated samples, respectively, while the RSD_R of kit A and kit B were 20.5 and 20.0 %, 14.6 and 14.5 %, and 13.3 and 30.6 %, respectively. The correlation coefficients of kits A and B in four laboratories were 0.982-1.0 and 0.995-0.996, respectively. Kit C, which is a quantitative lamina flow kit, showed that RSD_r and RSD_R were less than 23.3 % and 35.7 %, respectively. The data indicated that the RSD_r and RSD_R values of kit C were higher than those of kits A and B. In the qualitative kits, shown in Table 2-2, kits D and E showed neither false positive in blank corn nor false negative in spiked or naturally contaminated samples. The results obtained here demonstrated that the quantitative and qualitative kits tested in this study were successfully utilized for the detection of AFB₁ in aflatoxin-contaminated corn.

In Table 3, the results of the variation between different lots of the same kit are shown. The RSD between lots of the kit A was 11.4 % for the spiked corn with 5 ng/g AFB₁, 3.5 % for the spiked corn with 10 ng/g AFB₁, and 10.9 % for naturally contaminated corn. In kit C of the lateral flow method, the

Taken together, 5 commercially available immunoassay kits were subjected to an inter-laboratory study involving 4 participants, and the results obtained in the present study validated the accuracy and reproducibility of the quantitative kits for AFB₁ in corn, showing that all kits are also able to screen the presence of AFB₁ in corn.

Table 3. The lot variation of quantitative kits

Kit	Sample	Mean (ng/g)	RSD (%)
Kit A	Blank	–	–
	5 ng/g spike	4.1	11.4
	10 ng/g spike	7.9	3.5
	naturally contaminated	9.5	10.9
Kit C	Blank	–	–
	5 ng/g spike	5.5	24.1
	10 ng/g spike	15.0	46.5
	naturally contaminated	8.8	4.4

RSD: relative standard deviation

References

- 1) IARC: "IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans", pp. 245-395 (1993), World Health Organization /International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- 2) JECFA: Aflatoxins, WHO Food Additives Series, **40**, pp. 359-468, (1998). World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 3) Jaimez, J., Fente, C.A., Vazquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., Mahuzier, G., Prognon, P.: *J. Chromatogr. A*, **882**, 1-10 (2000)
- 4) Scott, P.M.: *Food Addit. Contam.*, **12**, 395-403 (1995)
- 5) Youden, W.J., Steiner, E.H.: "Statistical analysis" (eds. Youden, W.J., Steiner E.H.), pp. 72-83 (1975), Association of Official Analytical Chemists, Arlington, USA.