

# VEGF 제어의약품의 효능 평가법 개발

<sup>1</sup>강원대학교 BT특성화대학 분자생명과학과, <sup>2</sup>강원대학교 혈관연구센터

남은희<sup>1</sup> · 전성현<sup>1</sup> · 이화정<sup>1</sup> · 서동완<sup>1</sup> · 김평현<sup>1,2</sup>

## Development of Evaluating Ways for the Efficacy of Anti-VEGF Biopharmaceuticals

Eun-Hee Nam<sup>1</sup>, Seong-Hyun Jeon<sup>1</sup>, Wha-Jung Lee<sup>1</sup>, Dong-Wan Seo<sup>1</sup> and Pyeung-Hyeun Kim<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Bioscience, School of Bioscience & Biotechnology, <sup>2</sup>Vascular System Research Center, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

### ABSTRACT

**Background:** Angiogenesis mediated by VEGF constitutes a new target for anti-cancer therapy which has explored through different ways of intervention aiming at the blocking of the tumoral angiogenesis. In the present study, we developed the assays by which efficacies of anti-VEGF inhibitor candidates are evaluated at the various levels. **Methods & Results:** First, we developed two sandwich ELISAs using coated anti-VEGF Ab and soluble Flt-1 receptor fusion protein (sFlt-1/Fc). As low as 200 pg/ml of hVEGF diluted in human sera was detectable by these assays. In addition, we found that VEGF inhibitors (2  $\mu$ g/ml of either anti-VEGF Ab or sFlt-1/Fc) completely block 5 ng/ml VEGF in these ELISAs. Subsequently, two bioassays, wound healing and HUVEC tube formation assays, revealed that anti-VEGF Ab (1  $\mu$ g/ml) & sFlt-1/Fc Ab (1  $\mu$ g/ml), or SU5416 (VEGFR tyrosine kinase inhibitor, 1  $\mu$ M) prevents the activity of VEGF (1~10 ng/ml). Finally, secretion of MMP-9 by VEGF-stimulated macrophages was abolished by treatment of anti-VEGF Ab (1  $\mu$ g/ml) in gelatin zymography. **Conclusion:** ELISAs together with bioassays developed in this study are appropriate for evaluation of the efficacy of inhibitors of VEGF. (*Immune Network* 2007;7(4):203-208)

**Key Words:** VEGF, angiogenesis, HUVEC, ELISA, tube formation, wound healing, zymography

### 서 론

신생혈관형성이란 기존의 혈관으로부터 새로운 모세혈관이 형성되는 과정을 말하며, 이러한 과정이 종양의 성장 및 전이에 중요하다고 알려지면서, 신생혈관형성 제어 의약품을 개발하고 평가할 필요성이 대두되었다(1). Vascular endothelial growth factor (VEGF)는 신생혈관 촉진인자로서, 내피세포의 이동, 증식 등에 관여하고(2), 혈관 내피세포막에 존재하는 VEGF

receptor (VEGFR)의 활성화를 통해 작용한다고 알려져 있다(3,4).

VEGF/VEGFR 신호억제는 항암치료를 위한 대표적인 전략으로 주목 받고 있다. 대표적인 예로 Bevacizumab는 2004년 미국 식품의약국(FDA)으로부터 혈관신생 제어기작에 의한 항암제로 승인받은 anti-VEGF 단클론항체로서 대장암(5), 폐암(6) 치료에 사용되고 있으며, VEGFR 신호전달을 방해하는 multikinase inhibitor인 sorafenib와 sunitinib는 신장암 치료(2006년 FDA 승인)에 효과적인 것으로 보고되었다(7,8). 최근에는 경구용 VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitor인 AZD2171은 전이된 말기암 환자에 대해 임상 효과가 있다고 보고되었다(9). 이와 같은 맥락에서 수용성 VEGFR을 사용하여 폐암 세포의 증식을 억제할 수 있음이 밝혀진

책임저자 : 김평현, 강원대학교 BT특성화대학 분자생명과학과  
☎ 200-701, 강원도 춘천시 효자2동 192-1  
Tel: 033-250-8546, Fax: 033-241-4627  
E-mail: phkim@kangwon.ac.kr

이 논문은 대한민국 식품의약품안전청 용역연구사업(07102Biotechnology398)으로 수행되었음.

바도 있다(10). 이와 같이 VEGF의 발현 억제를 통해 항암 작용을 증대시키는 전임상적, 임상적 연구가 활발히 진행되고 있으나, 현재 이 의약품들의 효능을 체계적으로 검증할 수 있는 표준 가이드라인이 확립되어 있지 않은 실정이다.

본 연구에서는 항암 치료 목표로 개발 중인 VEGF의 작용 제어 의약품을 개발하는데 필요한 효능 평가를 위해 VEGF를 정량하고 VEGF inhibitor 의약품을 평가하는 적절한 방법을 개발하고자 하였다. 본 연구를 통해 anti-VEGF 단클론항체, 수용성 VEGF receptor, 그리고 tyrosine kinase inhibitor의 효능을 검증하는 면역화학정량법과 바이오정량법을 성공적으로 개발하였다.

**재료 및 방법**

**항체 및 시약.** 재조합 사람 VEGF 165, anti-human VEGF mAb, 재조합 사람 VEGF 수용체인 수용성 Flt-1/Fc chimera, biotinylated anti-human VEGF Ab는 R&D system (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고, SU5416 (kinase inhibitor)은 Sigma (St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 세포 및 세포 배양 조건. 마우스 monocyte cell line인 WEHI3와 마우스 melanoma cell line인 B16-F1의 증식 및 유지를 위한 기본 배양액으로 10% FBS, penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100 µg/ml)을 포함하는 DMEM을 사용하였으며 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 95% 습도가 유지되도록 하였다. Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)은 제대혈로부터 collagenase를 처리하여 분리하였으며(11), 2~7 계대 내피세포만을 실험에 사용하

였다. 이들은 기본 배양액으로 20% FBS, penicillin (100 U/ml)/streptomycin(100 µg/ml), 3 ng/ml bFGF (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), 5 unit/ml heparin을 포함하는 M199 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 95% 습도가 유지되도록 하였다.

**VEGF ELISA.** 사람 VEGF의 양을 측정하기 위하여 ELISA 방법을 정착시켰다. 첫 단계로 sodium bicarbonate buffer (PH 9.2)에 anti-human VEGF Ab (3 µg/ml) 또는 soluble Flt-1/Fc (sFlt-1/Fc, 2 µg/ml)을 희석하여 96-well U bottomed polyvinyl plate (Falcon, Becton Dickinson & Co., Oxnard, CA)에 50 µl 씩 코팅한 후 4°C에서 overnight시켰다. 0.01 M PBS+0.05% Tween 20 (PBST)로 세 번 세척한 후 1% gelatin 100 µl로 37°C에서 1시간 동안 blocking시켰다. 다시 PBST로 세 번 세척한 후, 재조합 사람 VEGF 표준용액과 각 시료를 0.5% gelatin에 희석하여 well당 50 µl씩 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBST로 세 번 세척한 후, 0.5% gelatin에 biotinylated anti-human VEGF Ab를 0.5 µg/ml로 희석하여 well 당 50 µl씩 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 세 번 세척하여 horseradish peroxidase conjugated avidin을 1 : 2000으로 희석한 후 well 당 50 µl씩 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 세 번, 3차 증류수로 세 번 세척한 후, 기질인 0.2 mM 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonic acid (ABTS)를 50 µl씩 넣고 약 10~30분간 반응시킨 후, ELISA reader VERSAmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 405 nm 파장에서 흡광도를 측

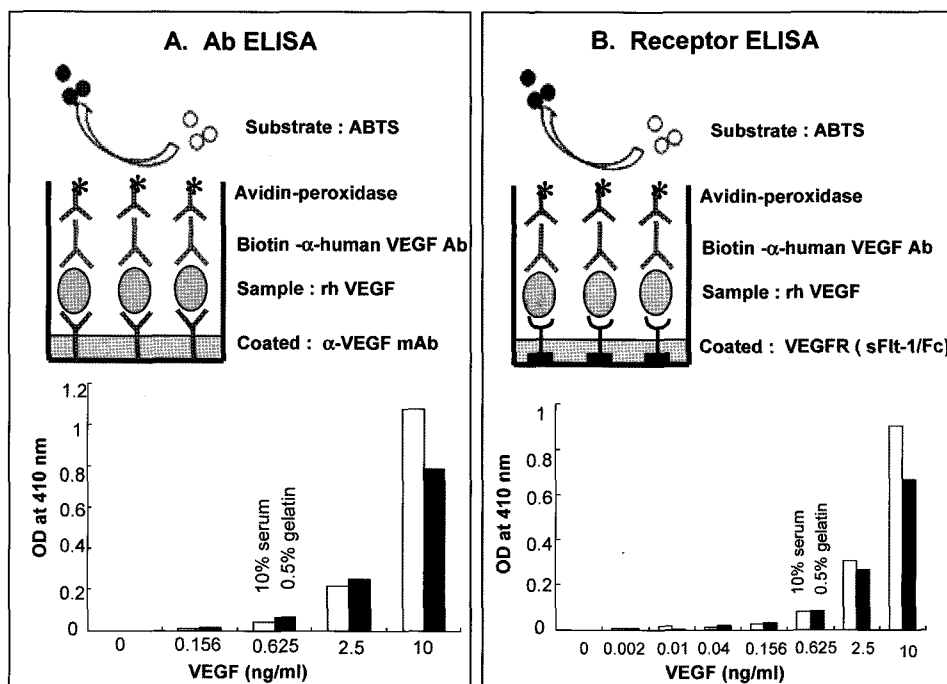


Figure 1. Detection of human VEGF by developed ELISAs. (A) Plates were coated with anti-VEGF mAb (3 µg/ml) in sodium bicarbonate buffer (pH 9.2). VEGF was diluted in 10% human serum or 0.5% gelatin. Biotin-labeled anti-hVEGF Ab (0.5 µg/ml) was used as the detecting Ab. This ELISA named Ab ELISA. (B) Plates were coated with soluble Flt-1/Fc (2 µg/ml) in sodium bicarbonate buffer. The rest of steps were the same as those described in Panel A. This ELISA named receptor ELISA. Data are averages of duplicate samples.

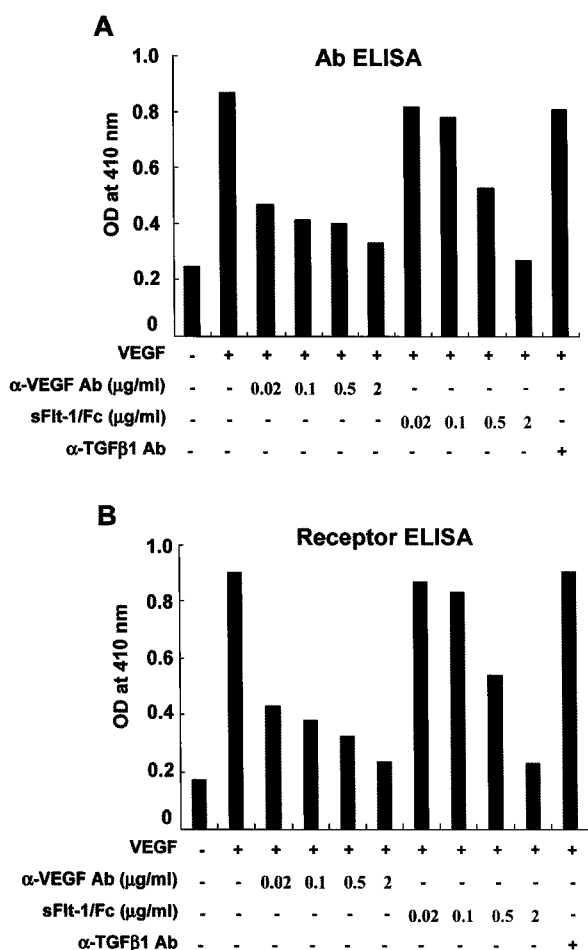


Figure 2. Evaluation of efficacy of VEGF inhibitors by developed ELISAs. General protocols for Ab ELISA (A) and receptor ELISA (B) were as described in Figure 1. VEGF (5 ng/ml) was pre-incubated with either anti-VEGF Ab or sFlt-1/Fc at the concentrations of 0.02, 0.1, 0.5, and 2  $\mu$ g/ml prior to adding to plates. In this, anti-TGF- $\beta$ 1 Ab (1  $\mu$ g/ml) was prepared for Ab negative control.

정하였다.

**상처 치유법(Wound healing).** 기본적인 방법은 본 연구실에서 정착된 방법에 따랐다(12). 마우스 melanoma cell line인 B16-F1 세포를  $3 \times 10^5$  cells/well의 농도로 24-well plate (Becton Dickinson, San Jose, CA)에 배양하였다. 세포가 전면을 덮었을 때 1000  $\mu$ l tip으로 긁어 상처를 낸 후 PBS로 2번 세척하여 떨어진 세포들을 제거하였다. 시료(rhVEGF, anti-human VEGF Ab, sFlt-1, SU5416)가 혼합된 1% FBS DMEM 배지를 세포에 넣어 준 후 2~3일간 배양하였고, 매일 새로운 배지로 교체해 주었다. 배양이 끝난 후 광학 현미경( $\times 100$ )으로 상처가 치유되는 정도를 관찰하였다.

**관 형성 정량법(Tube formation assay).** HUVEC을 1% FBS가 포함된 M199 배지로 교체하여 6시간 동안 starvation 시키고, 24-well plate에 ice-cold Matrigel (BD Bioscience)을 250  $\mu$ l씩 넣은 후 37°C에서 30분간 굳혔다. Starvation이 끝난 후에  $1 \times 10^5$  cells/well로 세포의 농도를 맞추고, 시료(rhVEGF, anti-human VEGF Ab, sFlt-1, SU5416)가 혼합된 1% FBS M199 배지를 넣어주었다. 12시간 동안 배양한 뒤 광학 현미경( $\times 100$ )으로 관 형성 정도를 관찰하였다.

**Gelatin zymography.** WEHI3 세포를  $2 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 6-well plate에 넣어주고, 시료(VEGF, anti-human VEGF Ab)가 혼합된 1% FBS DMEM 배지에서 48시간 배양하였다. 세포 배양액을 거두어 substrate gel sample buffer와 혼합한 후 1~1.5% gelatin이 포함된 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하였다. Gel을 2.5% Triton X-100으로 세척하고, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.15 M NaCl, 50 mM Tris (PH 7.5), 0.02% NaN<sub>3</sub> (w/v)를 포함하고 있는 배양 완충액에 넣고 37°C에서 12~24시간 배양하였다. Coomassie Blue로 30분~1시간 염색한 후 20% ethanol, 5% acetic acid를 포함하는 탈색 완충액으

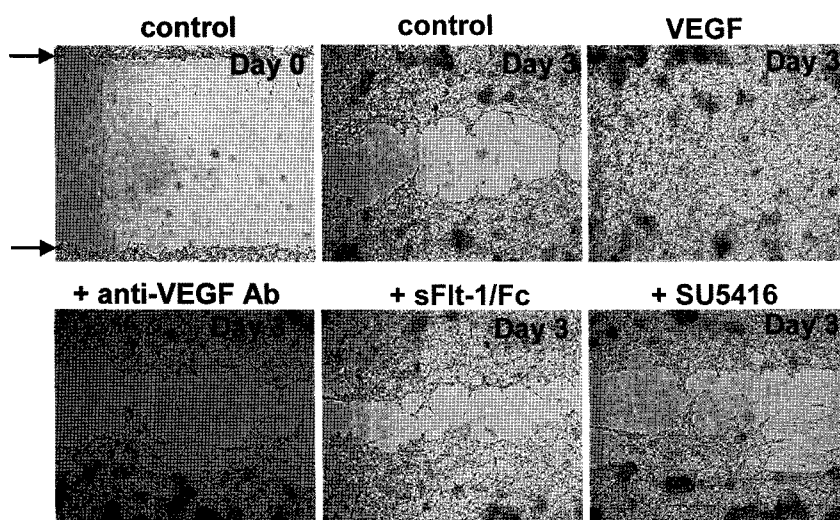


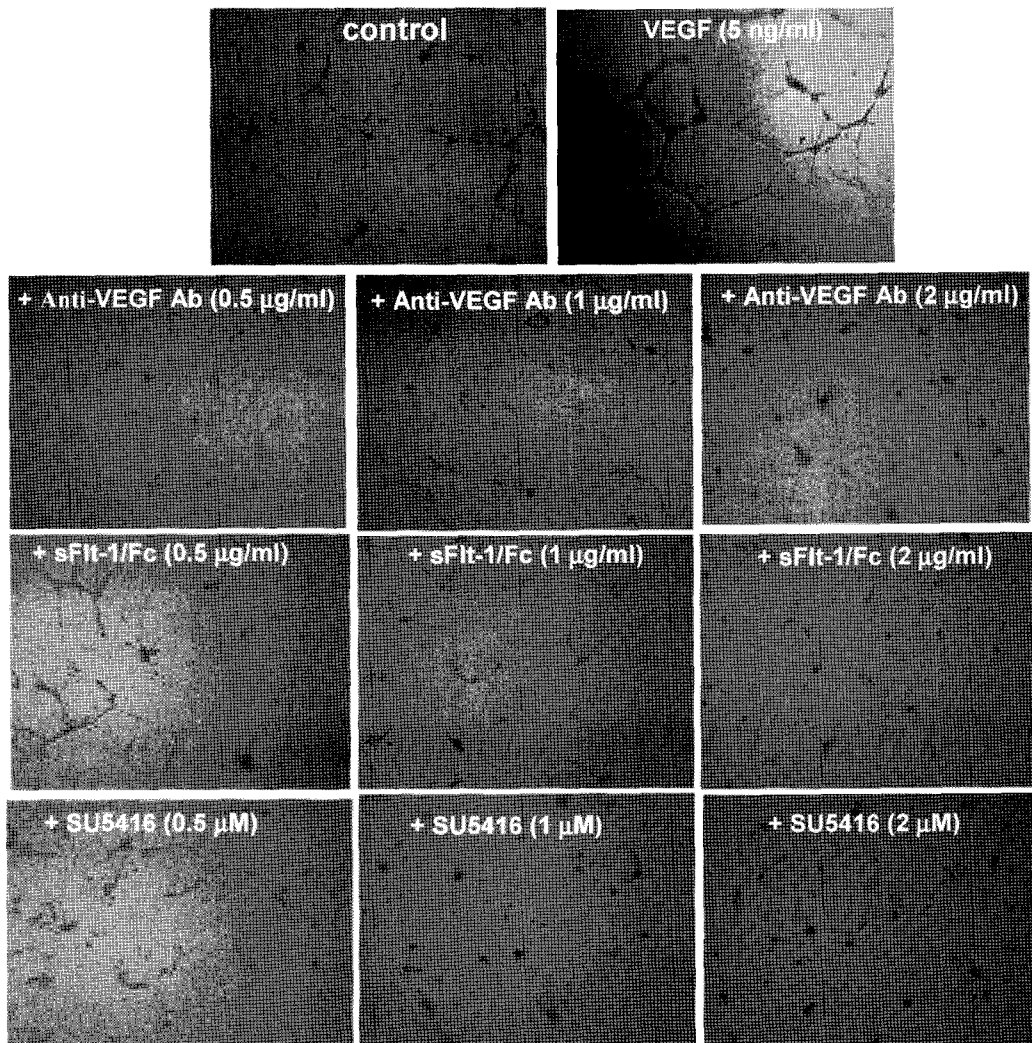
Figure 3. Effects of VEGF inhibitors on VEGF-induced wound healing activity. Wound healing assay was performed using B16-F1 cell line. Cells ( $3 \times 10^5$  /well) were incubated with VEGF (10 ng/ml), anti-VEGF Ab (1  $\mu$ g/ml), sFlt-1/Fc (1  $\mu$ g/ml), and SU5416 (1  $\mu$ M) in 24-well plates as indicated. Wound healing was determined with a light microscope ( $\times 100$ ) after 3 day incubation. Arrows indicate start line.

로 처리한 후 밴드를 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

**VEGF ELISA 개발 및 평가.** 본 연구에서는 신생혈관형성 억제제에 대한 효능 평가법을 개발하고자 하였다. 앞으로 시판될 신생혈관형성 억제제는 종양의 종류에 상관없이 적용성이 있고, 또한 신생혈관 형성 관련 질병에도 적용할 수 있기 때문에 이에 대한 적절한 효능 검사법이 필요한 실정이다. 먼저 본 연구에서는 신생혈관형성에 지대한 영향을 미치는 VEGF를 민감하고 간편하게 정량할 수 있는 항체 코팅 ELISA를 개발하였다(이하 Ab ELISA라 지칭). 최종적으로 sandwich 방식으로 정착된 ELISA의 모식도는 Fig. 1A에 나타났다. 이 Ab ELISA는 200 pg/ml 정도의 민감도를 보

였다. 실제로 VEGF를 정량할 때 사람의 혈청에 포함된 VEGF 양을 정량하여야 함으로 본 연구에서는 10% 혈청에 희석된 VEGF를 측정하였다. 그 결과, 일반적으로 사용하는 0.5% 젤라틴 희석액을 사용한 경우와 유사한 민감도로 VEGF가 검출되었다. 따라서 개발된 Ab ELISA는 실제 시료 속에 존재하는 VEGF를 민감하게 정량할 수 있음을 보여준다. 본 연구진은 활성화된 대식세포에서 500 pg/ml 정도의 VEGF가 분비됨을 관찰한 바 있다(12). 그러므로 본 연구에서 개발된 Ab ELISA는 생리적으로 분비되는 VEGF를 측정할 수 있는 민감도를 갖추었다고 여겨진다. 다음은 좀더 생리학적으로 의미있게 VEGF를 정량하기 위해 코팅 항체 대신에 수용성 VEGF 수용체로 코팅한 ELISA (이하 receptor ELISA라 지칭)를 개발하였다. 이에 대한 정량과



**Figure 4.** Effects of VEGF and VEGF inhibitors on tube formation by HUVECs. Cells ( $3 \times 10^5$  /well) were seeded in 24-well plates coated with Matrigel and treated with VEGF (5 ng/ml). Tube formation was determined with a light microscope ( $\times 100$ ) after 12 h incubation. To neutralize VEGF, different doses of inhibitors as indicated were pre-incubated with VEGF for 1 h at 37°C.

정 모식도는 Fig. 1B에 제시하였다. 최종적으로 정착시킨 receptor ELISA는 Ab ELISA와 비슷한 민감도( $\approx 200$  pg/ml)를 보였다(Fig. 1B). 10% 혈청 희석액에 포함된 VEGF 양도 0.5% 젤라틴 희석액을 사용한 경우와 유사하게 검출되었다. Receptor ELISA는 VEGF 수용체 (Flt-1)에 결합한 VEGF를 측정하므로 Ab ELISA보다 좀 더 효용성이 있다고 볼 수 있다.

다음 단계에서는 실제로 본 연구에서 평가하고자 하는 신생혈관형성 억제제인 anti-VEGF Ab와 수용성 VEGF 수용체(sFlt-1/Fc)의 VEGF의 제어 효과를 위에서 개발된 두 가지의 ELISA로 조사하였다. Fig. 2A에서 나타낸 바와 같이 anti-VEGF Ab의 사용 농도가 증가함에 따라 Ab ELISA 값(410 nm에서의 흡광도 값)이 더욱 떨어졌다. 특기할 점은 20 ng/ml의 anti-VEGF Ab도 의미있게 VEGF에 의한 흡광도를 낮추었다는 사실이다(약 46% 감소시켰음). 병행하여 실시한 sFlt-1/Fc도 사용농도가 증가함에 따라 VEGF에 의한 흡광도가 점점 낮아졌다(Fig. 2A). 그런데 이 경우, 0.5  $\mu$ g/ml의 농도에서 흡광도를 40% 정도 감소시켰다. 이와 같은 결과는 똑 같은 양의 VEGF를 중화시키기 위해서는 anti-VEGF Ab보다 훨씬 많은 양의 수용성 VEGF 수용체가 요구됨을 보여준다. 한편, receptor ELISA에 대해 똑 같은 실험을 실시한 바 Ab ELISA 결과와 일치하는 유형의 결과를 획득하였다(Fig. 2B). 이상의 결과는, VEGF 억제제의 효능 평가에 receptor ELISA가 적합함을 다시 한번 보여준다.

바이오정량법을 통한 VEGF 억제제 평가. 위에서 개발되어 정착된 ELISA, 특히 receptor ELISA는 간편성, 경제성, 높은 민감도 등 VEGF 억제제의 효능을 평가하는데 장점을 갖고 있다. 그러나 이 방법 만으로는 생체 내에서 실제로 내피세포에 영향을 미치는 VEGF 억제제의 효능을 완벽하게 평가했다고 볼 수 없다. 왜냐하면 이미 언급한 바와 같이 receptor ELISA에서는 개선된 면이 있지만 근본적으로 ELISA는 VEGF의 생물학적인 작용이 아니라 면역화학적 반응을 확인하는 방법이기 때문이다. 따라서 VEGF의 생물학적인 작용을 조사하여 ELISA 결과와의 상관관계를 밝힐 필요가 있다. 본 연구에서는 몇 가지 바이오정량법을 통해 이와 같은 관점에 대해 구체적으로 살펴보았다.

VEGF는 상처치유(wound healing) 과정의 여러 단계에서 광범위하게 발현되어 이 과정을 촉진시킨다고 알려져 있다(13). 먼저 본 연구에서는 상처치유에 대한 VEGF 효과를 앞서 보고된 방법으로 조사하였다(14). Fig. 3에서 보듯, VEGF (10 ng/ml)을 처리한 경우 3일 후에 세포가 제거된 공간이 완벽하게 복구되었다. 이 때 VEGF 억제제로 사용된 anti-VEGF Ab (1  $\mu$ g/ml), sFlt-1/Fc (1  $\mu$ g/ml), and SU5416 (receptor kinase

inhibitor, 1  $\mu$ M)는 거의 VEGF를 처리하지 않은 control 수준으로 상처치유를 억제하였다. 나아가, VEGF의 대표적인 생물학적인 기능인 관 형성(tube formation)에 대해 조사한 바, 5 ng/ml의 VEGF는 관 형성 현상을 보였으며, VEGF 억제제로 사용된 anti-VEGF Ab, sFlt-1/Fc, 그리고 SU5416는 이 관 형성을 억제하였다(Fig. 4). 구체적으로 보면, anti-VEGF Ab의 경우 0.5  $\mu$ g/ml 농도에서, sFlt-1/Fc의 경우 1  $\mu$ g/ml 농도에서, 그리고 SU5416의 경우 0.5  $\mu$ M 농도에서 VEGF를 처리하지 않은 control 수준의 관 형성 정도를 보였다. 이상의 두 가지 바이오정량법을 통한 조사를 통해 사용된 VEGF 억제제가 VEGF의 생물학적인 기능을 제어할 수 있음을 확인하였고, 그 억제 유형은 ELISA 결과와 비슷함을 알 수 있었다. 그러나, 두 가지 바이오정량법의 경우 VEGF 검출 민감도는 ELISA 보다 훨씬 낮았다(VEGF 민감도, Ab ELISA vs. bioassays : 0.1~0.6 ng/ml vs. 5~10 ng/ml). 따라서 VEGF 양을 진단 목적으로 사용한다면 bioassay 보다는 ELISA가 10배 정도 민감도가 우수함을 보여준다. 마지막으로 마우스 대식세포주에 대한 VEGF의 영향을 조사하였다. 대식세포는 신생혈관형성에 관여하는 MMP-9를 발현하며(15), 또한 본 연구진도 최근에 TGF- $\beta$ 1과 VEGF로 마우스 대식세포주인 WEHI3를 자극하였을 때 MMP-9이 분비됨을 관찰한 바 있다(12). 이 시스템을 사용하여 anti-VEGF Ab의 중화효과를 조사한 바, 1  $\mu$ g/ml 농도에서 활성화형의 MMP-9 단백질의 발현을 억제하였다(Fig. 5). 이와 같은 결과는 앞에서 기술한 두 가지 바이오정량법의 결과와 일치한다. 따라서, VEGF에 의한 대식세포주의 MMP-9의 발현과 이에 대한 anti-VEGF Ab의 중화효과는 실제로 VEGF의 작용을 제어하였을 때 생체 내에서 신생혈관형성을 억제하는 한 가지 기작을 보여준다고 볼 수 있다.

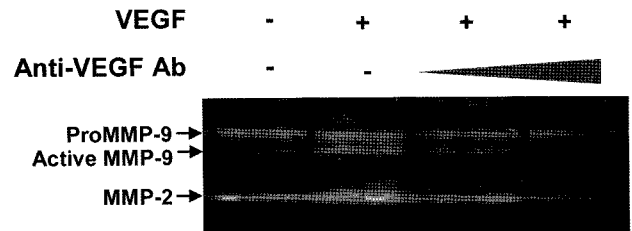


Figure 5. Effect of VEGF and VEGF inhibitors on MMP-9 expression by WEHI3 cells. Cells ( $2 \times 10^6$ ) were incubated with VEGF (10 ng/ml) for 48 h. The conditioned media were collected and MMP-9 activity was analyzed by gelatin zymography. To neutralize VEGF, anti-VEGF Ab (0.5 and 1  $\mu$ g/ml) was pre-incubated with VEGF for 1 h at 37°C.

## 결 론

본 연구를 통해 현재 임상실험 또는 시판 중인 3가지 유형의 신생혈관형성 억제제의 효능을 평가할 수 있는 방법을 제시하였다. 즉, 본 연구에서는 신생혈관형성 억제제의 임상적인 효능에 대해 조사하고자 한 것이 아니고, 면역화학적 방법과 바이오정량법을 통해 개발 중인 신생혈관형성 억제제의 효능을 평가할 수 있는 방법론을 모색하였다. 특히 본 연구에서 고유하게 개발된 receptor ELISA는 기존의 Ab ELISA에 버금가는 민감도와 재현성, 그리고 바이오정량법의 장점을 일부 갖고 있다. 이 방법을 상처치유, 관형성 등의 바이오정량법과 병행한다면 항암 또는 신생혈관형성 관련 질병 치료 의약품 개발에 중요한 도구로 사용될 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구를 위한 실험은 강원대학교 혈관연구센터와 생명공학연구소의 시설을 사용하여 수행하였음. 또한 2단계 BK21 사업으로부터 대학원생 인력을 지원 받았음.

## 참 고 문 헌

- Ferrara N: VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2;795-803, 2002
- Jain RK: Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9;685-693, 2003
- Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N: Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 276;3222-3230, 2001
- Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, Dehio C: A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *Embo J* 18;363-374, 1999
- 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, Kabbinavar F: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350;2335-2342, 2004
- Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, Langer CJ, DeVore RF, Gaudreault 3rd J, Darnico LA, Holmgren E, Kabbinavar F: Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 22;2184-2191, 2004
- Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, Ginsberg MS, Kim ST, Baum CM, DePrimo SE, Li JZ, Bello CL, Theuer CP, George DJ, Rini BI: Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24;16-24, 2006
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM: Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356;125-134, 2007
- Dreys J, Siegert P, Medinger M, Mross K, Strecker R, Zirrgiebel U, Harder J, Blum H, Robertson J, Jurgensmeier JM, Puchalski TA, Young H, Saunders O, Unger C: Phase I clinical study of AZD2171, an oral vascular endothelial growth factor signaling inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 25;3045-3054, 2007
- Ogawa T, Takayama K, Takakura N, Kitano S, Ueno H: Anti-tumor angiogenesis therapy using soluble receptors: enhanced inhibition of tumor growth when soluble fibroblast growth factor receptor-1 is used with soluble vascular endothelial growth factor receptor. *Cancer Gene Ther* 9;633-640, 2002
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52;2745-2756, 1973
- Jeon SH, Chae BC, Kim HA, Seo GY, Seo DW, Chun GT, Kim NS, Yie SW, Byeon WH, Eom SH, Ha KS, Kim YM, PH Kim: Mechanisms underlying TGF- $\beta$ 1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis. *J Leukoc Biol* 81;557-566, 2007
- Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S: Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 580;2879-2887, 2006
- Jeon SH, Chae BC, Kim HA, Seo GY, Seo DW, Chun GT, Yie SW, Eom SH, Kim PH: The PKA/CREB pathway is closely involved in VEGF expression in mouse macrophages. *Mol Cells* 23;23-29, 2007
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D: Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2;737-744, 2000