

신생혈관 억제제 KJ3, Betulinic acid, Fumagillin의 혈관형성억제 및 신경모세포종에 대한 치료효과

연세의대 소아외과, 두뇌한국21 의과학사업단

최승훈 · 이정희 · 황의호

Inhibition of Tumor Growth and Angiogenesis by KJ3, Betulinic Acid, and Fumagillin in Mouse Neuroblastoma

Seung Hoon Choi, M.D., Jung Hee Lee, M.S., Eui Ho Hwang, M.D.

Division of Pediatric Surgery, Brain Korea 21 Project for Medical Science

Yonsei University College of Medicine

Seoul, Korea

The antiangiogenic effects of novel agent KJ3, Betulinic acid, and Fumagillin on the neovascularization were studied by examining ultrastructural alterations in the vasculature of synthetic gelform and mouse neuroblastoma C1300. Small pieces of gelform with 0.4 % agar were introduced subcutaneously (s.c.) in 7 week old male CH3/HeJ mice. After the LD₅₀s were determined by FACS analysis, a third of LD₅₀ of three drugs were injected either locally or intraperitoneally every other day for 14 days. A/J mice were inoculated s.c. with the C1300 neuroblastoma cell line, then either saline or three drugs were injected in the same manner. The antiangiogenic effects of three drugs were studied by measuring the histologic changes in tumors, and immunostaining for CD34, VIII/vWF, CD105, and thymidine phosphorylase. In the drug treated groups, the number of vessels in gelform experiments and C1300 neuroblastoma experiments were lower than the corresponding values in the control. The histologic findings were significantly different in drug treated groups on day 7, but these were not significant on day 14. These results imply that antiangiogenic agents were effective when the tumor burden is minimal. (J Kor Assoc Pediatr Surg 8(2):101~106), 2002.

Index Words : KJ3, Betulinic acid, Fumagillin, Antiangiogenesis, Neuroblastoma

서 론

Correspondence : Seung Hoon Choi, M.D., Ph.D., Division of Pediatric Surgery, Yonsei University College of Medicine, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-Ku, Seoul, 120-752, Korea

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제번호 : 02-PJ1-PG1-01CH04-0005).

** 본 논문의 요지는 2002년도 6월 전주에서 개최된 제18회 대한소아외과학회 춘계학술대회에서 구연되었음.

신경모세포종은 소아에서 생기는 고형종양 중 가장 많으며, 소아암으로 인한 사망원인 중 15%를 차지한다. 영유아기에 가장 흔하게 발생하며, 만 10세 이하에서 96%가 나타나는 질환이다. 이 종양은 혈관이 매우 풍부하며 악성도가 혈관의 수에 비례하기 때문에 항혈관인자에 의한 치료효과가 높을 것으로 예측되어 왔고¹, 1세 이내의 소아에서 가장 흔하게 자연소실을 보이는 종양이다. 치료효과도 불량하여 수술,

만사치치료, 항암지표를 모두 사용하여도 전체적인 5년 생존율은 30-40% 정도에 불과하다.

Folkmann에 의하여 종양혈관의 생성을 억제하여 종양의 증

식을 방해한다는 개념이 정립되면서 이 방법의 연구가 활발하게 되었다. 현재까지 50여종의 약제가 임상 1상에서 3상연구로 진행되고 있으나 실제로 타당한 효과를 보이는 약제는 별로 없는 실정이다. 이 이유 중 한가지는 대상환자를 정확

하게 선정하지 못한 것이다. 대표적인 약제로 유방암에서 Thalidomide, 전립선암에서 SU101, 신장암에서 Raxoxane, 헤

지는 신장모세포종에서 임상 1상 연구가 종료된 TNP-470

파생유도체인 Fumagillin과 betulinic acid, 그리고 국내에서 합성한 KJ3를 이용하여 신장모세포종에 대한 신생혈관 생성

대사 및 방법

사용약제

본 연구에 사용한 약제는 TNP-470 파생 유도체인 Fumagillin과 betulinic acid, 그리고 국내에서 생약성분에서 추출한 KJ3 3종이었다. 이중 Fumagillin은 Sigma에서 구입하였으며, betulinic acid와 생약성분인 KJ3는 세종대학교 생명공학과의

원호경교수로부터 공여받았다. 이를 약제는 이미 endothelial cell proliferation assay, chemoinvasion assay, tube formation assay, chorioallantoic membranc assay 등을 통하여 신생혈관 억제작용이 있음이 증명된 것이었다.

FACS를 이용한 LD₅₀ 계산

C1300 세포주는 106개씩 6-well plate (costar 3506)에 넣고 Fumagillin, betulinic acid, KJ3를 각각 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0 µg/ml 으로 처리하여 농도별로 처리한다. 약을 넣은 후 24시간 후에 세포주를 6 ml, round-bottomtube (FALCON 2052)에 모아서 2000 rpm에서 5분간 원심분리한

후 상층액을 버린다. PBS (pH 7.4)를 첨가하여 다시 원심분리한 후 150 µL의 PBS를 넣어준다. FACS분석 바로 전에 골비한 10 µg/mL PI (propidium iodide, Sigma)를 150 µL 첨가하여 10 분 정도 섞어준 뒤 분석한다. 남아있는 세포의 퍼센트를 환산하여 그래프를 그리고 이의 함수값을 구한 뒤 50%가 죽

Gelform과 Agar를 이용한 신생혈관 억제조사

5×5×7 mm 의 Gelform sponge에 0.4% agar를 주입한 뒤 4℃ PBS에 하룻밤 세우고 난 후, 상온에서 1시간 꺼내 놓으면 딱딱하게 굳으며 선회에 쓸 수 있게 된다. 7주령의 숫컷 CH3/HeJ 마우스를 두군으로 나누어 한군은 에테르로 마취시킨 후 등에 작은 전개를 가하여 Gelform을 피하조직에 위치시켰다. 절개흔은 봉합사로 바고 수술한 난을 포함하여 0.2, 4, 6, 8, 10, 12일째에 제가지 약제의 LD₅₀의 1/3에 해당하 는 양을 복강내에 주입하였다. 다른 한군은 Gelform내에 세 가지 약제의 LD₅₀의 1/3에 해당하는 분량을 주입하여 피하조직에 넣고 더 이상의 약제주입은 하지 않았다. 두군에서 모두 7일째와 14일째에 반색 회색시커서 Gelform 내로 자라 들어온 신생혈관의 수와 밀도를 II-E stain과 면역조직화학적 방법으로 조사하였다. 복강내 주입한 군과 국소주입한 군에서 모두 7일째와 14일째에 회색하여 얻은 네가지 군에서 마우스는 모두 7마리 이상이었다.

C1300 신장모세포종을 이용한 신생혈관 억제조사

7주령의 암컷 A/J 마우스에 106 개의 C1300 신장모세포종 세포주를 주입하여 종피를 얻고, 종피가 1 cm 이상 커지면 부근적인 조작으로 종피를 제거하고 이를 함께 부수어 7주령의 암컷 A/J 마우스의 피하조직에 주입함으로써 종피를 얻었다. 종피의 크기가 5 mm (90 mg) 이상 되면 선회를 시작하였다. 종피를 갖고 있는 A/J마우스는 네 군으로 나누어 선회하였는데, 실험방법은 Gelform 과 기의 같이 대조군의 실험수와 제가지 약제는 LD₅₀의 1/3에 해당하는 양을 복강내로 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 일째에 주입하였고 동시에 종피의 크기와 마우스의 무게를 측정하였다. 7일째와 14일째에 마우스를 희생시켜 종피 내로 자라 들어온 신생혈관의 수와 밀도를 H-E stain과 면역조직화학적 방법으로 조사하였다. 7일째와 14일째와 14일째에 회색하여 얻은 두 가지 군에서 마우스는 모두 7마리 이상이었다.

면역조직화학법에 의한 조사

대조군과 약물 처리군에서 얻은 종양의 파라핀 블록을 60℃에서 1시간 동안 온 후 Histoclear II를 이용하여 파라핀을 제거하였다. 100%, 95%, 85%, 75%의 알코올에서 각각 2분간 두어 침습시킨 후, 증류수에 5분간 두어 수분을 선택

Table 1. Number of Vessels in Gelform Experiments

Group*	Day 7	Day 14
Control	33-36	35-39
Fumagillin	21-25	20-26
Betulinic Acid	22-25	23-27
KJ3	20-24	19-21

* : numbers in each group, N=7

하게 하고, Citrate buffer를 3분 정도 예열한 후 slide를 넣고 마이크로웨이브 오븐에 5분 동안 두었다. 3% H_2O_2 로 10분간 처리한 후 PBS로 세척하고, 이후에 10% blocking solution으로 5분간 처리 후 알맞은 일차항체를 처리하여 wet chamber에서 4℃로 하룻밤 지새웠다. 일차항체는 CD34, VIII/vWF, CD105, thymidine phosphorylase 등 네 가지를 사용하여 비교하였다. Link antibody로 20분간 처리하고 Conjugated streptavidin-HRP를 20분간 반응시킨 후 DAB (1:50)액으로 3 - 10분 처리한후 Hematoxylin으로 35초간 대조염색하여 염색을 끝내고 200배율의 광학현미경하에서 관찰하였다. 신생혈관의 수는 현미경에서 열개의 장소에서 수를 측정하여 평균을 구하여 얻었고, 통계적 처리는 paired t test를 사용하였다.

결 과

FACS를 이용하여 얻은 LD50 는 KJ3 2.97 $\mu\text{g/mL}$, Betulinic acid 4.01 $\mu\text{g/mL}$, Fumagillin 4.9 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 이 약제들의 1/3을 각각의 실험에서 사용하였다.

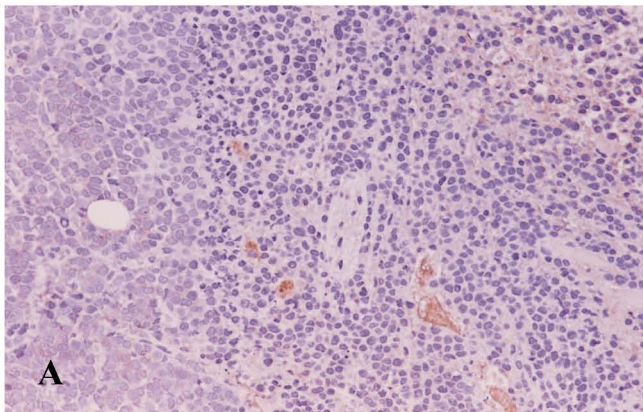


Table 2. Number of Vessels in C1300 Experiments

Group*	Day 7	Day 14
Control	12.1±2.4	31.7±4.5
Fumagillin	8.4±3.3	29.8±3.7
Betulinic Acid	7.9±2.6	30.5±4.6
KJ3 [†]	7.7±3.1	31.2±3.9

* : numbers in each group, N=7

[†]: p<0.05 compared to the control

Gelform을 이용한 실험에서 국소적으로 LD50의 1/3양을 마우스에 넣은 군에서는 세가지 약제 모두 7일, 14일에 신생혈관이 없었다. 이는 세가지 약제가 강력한 신생혈관 억제작용을 가지고 있어 국소적으로 주입할 경우에는 신생혈관이 형성되지 않음을 보였다. Gelform 주입후 이를 간격으로 약제를 복강내 주입한 실험에서는 표 1에서와 같이 세가지 약제 모두에서 감소하였으나 각 실험군에서 일곱 마리씩의 마우스를 사용하여 임상적으로 유의있는 차이는 없었다. 감소한 정도는 7일과 14일에서 모두 비슷하였다.

C1300을 피하주입한후 세가지 약제를 주입한 실험에서는 7일만에 희생시킨 군에서는 세가지 약제중 한가지를 복강내 주입한 실험군에서는 신생혈관의 숫자가 대조군에 비하여 유의있게 감소하였다 (p<0.05) (그림 1). 그러나 14일만에 희생시킨 군에서는 약제를 사용한 군과 대조군 사이에 신생혈관의 차이가 없었다 (표 2).

실험기간중 측정된 마우스의 체중은 약제투여군과 대조군 사이에 차이가 없었고, 희생시킨 후 적출한 비장의 무게도 양군간에 차이가 없어, 세가지 약제 모두 마우스에 독성이 거의 없는 것으로 관찰되었다. 종괴의 크기변화는 대조군에

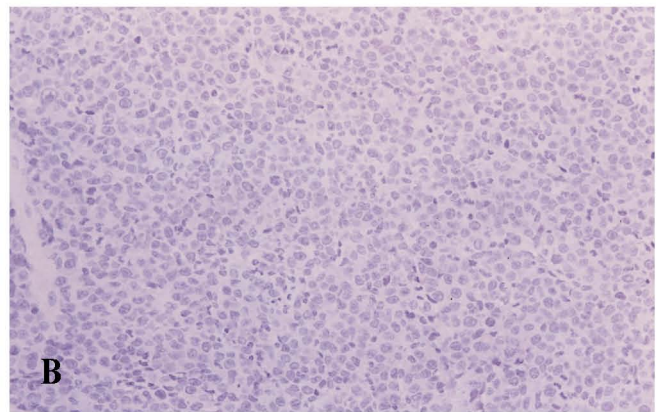


Fig. 1. Photomicrographs of the C1300 neuroblastoma in controls (A) and in the group administered KJ3 (B). Specimens were obtained on day 7, and stained with Anti-factor VIII antibody (×200).

Table 3. Changes in Relative Tumor Weight

Day	Fumagillin*	Betulinic Acid*	KJ3*	Control*
2	0.97+0.24 [†]	0.98+0.13 [†]	0.96+0.21 [†]	1.81+0.7
4	1.32±0.17 [†]	1.29±0.18 [†]	1.27±0.15 [†]	2.17±1.01
6	2.18+0.43 [†]	2.11+0.39 [†]	2.13+0.51 [†]	3.74+1.62
8	4.71+0.59	5.33+0.68	4.52+0.06	5.74+0.18
10	7.73+0.71	8.14+1.09	6.78+1.11	9.08+3.23
12	10.36±1.68	11.25±2.04	9.76±1.38	11.77±3.56

* : numbers in each group, N=7

† : p<0.05 compared to the control

비하여 세가지 약제 모두 6일까지는 유의있는 감소를 보였으나 8일 이후부터는 종괴의 크기는 작았으나 통계적인 유의는 보이지 않았다 (표 3).

고 찰

Folkman 등은 1971년에 종양에서 신생혈관이 중요한 역할을 함을 밝혔고³, 이후 많은 종양에서 신생혈관이 예후와 밀접한 관련이 있음이 밝혀졌다. 신생혈관은 기존에 있는 혈관에서 새로 생기는 혈관을 총칭하는 것으로, 종양이 자라는데는 매우 중요한 역할을 한다. 신생혈관이 없이는 종양의 크기가 2 - 3 mm³ 이상 자랄 수 없다. Folkman 의 기본적인 개념은 다음과 같이 나눌 수 있다. 1) 고형종양은 혈관이 없이 자랄 수 있는 최대의 크기가 직경 1 - 2 mm 이며 이 이상의 크기에서는 산소의 공급이 안되어 괴사한다. 2) 기존의 혈관에서 신생혈관이 종양을 향하여 자라나서 종양의 크기가 커지고, 혈관을 통한 전이가 가능하여 진다. 3) 신생혈관은 종양 혈관인자 (tumor angiogenesis factor)에 의하여 자극되어 자라게 된다. 4) 이러한 종양 혈관인자를 억제함으로써 종양의 성장을 막을 수 있다. 5) 이러한 치료는 종양을 완전히 제거할 수는 없고 직경 1 - 2 mm 이내로 작아져서 만성적인 상태에 이른다. 종양은 자체에서 신생혈관 생성 촉진인자뿐 아니라 신생혈관 생성 억제인자를 분비하는데 종양에서 신생혈관이 자라는 것은 이 두가지의 상호작용에 의하여 결정된다⁴. 신생혈관 생성 촉진인자 중 가장 대표적인 것으로는 vascular endothelial growth factor (VEGF) 가 있는데 이러한 촉진인자의 혈중농도를 재는 것은 쉽고 비침습적인 방법으로 모든 암환자에서 적용할 수 있다. 암을 신생혈관을 억제하여 치료하려는 시도는 30년전부터 있었으나 이것이 가능

하여 진 것은 VEGF의 배양과 측정이 가능해 진 10여년 전 부터이다. 혈액암에서도 신생혈관이 중요한 역할을 하는 것이 밝혀 졌다. 골수에서 신생혈관이 증가되어 있으며 bFGF, VEGF등의 신생혈관 생성촉진인자 등이 증가되어 있다⁵.

신생혈관이 생성되면 혈관내피세포의 이동과 증식, 세포 외액 간질의 소화, 튜브형성 등의 과정이 필요한데 이러한 것은 세포간질액의 압력에 영향을 받는다. 신생혈관 억제제인 TNP 470은 혈관의 생성뿐만 아니라 세포간질액의 압력을 높힘으로 혈관생성이 억제된다. 종양에서 계속적인 성장을 위해서는 적절한 혈관의 증식이 필요하다. 이런 과정은 종양 내의 혈관증식인자와 숙주의 혈관증식억제인자와의 상관관계에 의하여 결정된다⁶. Carcinoma와 sarcoma에서 신생혈관의 생성기전이 다르다. Carcinoma는 악성상피세포와 간질의 fibroblast와 myofibroblast로 구성되어 양쪽으로부터 신생혈관 억제인자와 신생혈관 촉진인자의 영향을 받는다. 이에 비하여 sarcoma는 악성 간엽조직세포로만 구성되어 있어 신생혈관 촉진인자와 신생혈관 억제인자의 영향도 한쪽에서만 받는다⁷.

신생혈관 억제제의 작용을 측정하는 방법으로 미세혈관을 준비하는 방법, Matrigel 등을 주입하여 신생혈관이 생성되는 것을 측정하는 방법, 동물을 이용한 이중이식 등이 주로 쓰인다. 본 연구에서는 Gelform을 이용하는 방법과 동물에 종양을 동종이식하는 방법을 사용하였다. 이중 동물을 이용한 방법의 문제로는 1) 종양내에서 혈관의 분포가 다양하게 다르기 때문에 많은 수의 동물이 필요하고, 2) 종양의 혈관생성이 종양마다 다르기 때문에 한 종류의 종양에서 나온 결과가 모두에게 적용되기 힘들며, 3) 종양을 적출하여 혈관을 측정해야 하기 때문에 시기적으로 계속해서 변화하는 혈관의 양상을 볼 수 없다. 또한 4) 동소이식과 이소이식은 서로

다른 결과를 보이므로 종양을 원래 장기에 이식해야 하고, 5) 이중이식된 종양이 동물에서 혈관생성을 자극할 가능성이 있다⁸. 신생혈관을 측정하는 방법중 면역조직화학법이 가장 많이 쓰이고 있는데 혈관내피에 대한 여러 가지 항체를 이용하며, 혈관을 직접 제거나 컴퓨터를 이용한 측정법이 사용된다. 본 연구에서는 CD34, factor VIII, CD105, thymidine phosphorylase 에 대한 항체를 이용하여 면역조직화학검사를 시행하였다. antifactor-VIII, anti-CD31에 비하여 anti-CD34는 새로 생긴 신생혈관에 선택적으로 착색됨을 보인다는 보고가 있다^{9, 11}.

신경모세포종에서 혈관증식인자는 MYCN이 증폭된 환자 와 빠르게 커지는 종양이 있는 환자에서 높는데, 혈관증식 억제인자를 사용하여 이러한 환자에서 신경모세포종의 증식을 억제할 수 있다⁶. 혈관증식 억제제가 Phase I, II 연구에서 효과를 보지 못했던 주된 이유는 종괴의 크기가 컸기 때문으로, 수술이나 항암요법 등으로 대부분의 종괴를 제거하고 극소의 잔여 종괴가 남았을 때 혈관증식 억제제를 사용하면 효과적일 것으로 생각된다^{12, 13}. 종양이 작을 때 TNP-470 치료를 시작하면 대조군에 비하여 유의있는 차이를 보였으나, 종양이 커진 후 TNP-470 치료를 시작하면 대조군과 차이가 없음을 보였다^{14, 15}. 본 연구 결과에서도 일주일 이내의 종양에서는 TNP-470과 구조가 비슷한 Fumagillin 이나 Betulinic acid, KJ3 등이 모두 유의있는 신생혈관 억제와 종양성장 억제를 나타냈으나 일주일 이후에는 억제 정도가 현저히 감소함을 보였다. TNP-470의 대사는 7분에서 3시간내로 이루어져 체내에서 급속히 배출되므로 자주 투여하는 것이 필요하다¹⁶. 따라서 신생혈관 억제제를 정맥을 통하여 계속 주입함으로써 좀 더 나은 효과를 기대할 수 있다.

신생혈관 억제제를 장기간 사용할 경우, 동물실험에서는 볼 수 없는 새로운 종류의 합병증이 나타날 수 있다. 그러나 신생혈관 억제제는 정상조직에 작용하기 때문에 내성이 생길 수 없다는 장점이 있다⁵.

신경모세포종에서 종양 혈관의 밀도는 전이병소, MYCN 증폭, 불량한 예후와 밀접한 연관이 있다¹. 이에 반하여 vascular parameter가 연령, 병기, 조직형, TRK-A, P-glycoprotein, MYCN 등과 전혀 관계없다는 보고도 있다⁹. 유방암에서는 암조직내에 존재하는 신생혈관의 밀도가 생존율을 예측하는데도 유용함이 밝혀졌다¹⁷. 폐암의 non-small-cell 조직형에서 신생혈관과 전이와 밀접한 관계가 있으며 소화기관 종양에서는 신생혈관의 숫자가 재발과 관련이 있었다¹⁸. 동물 실험에서는 매우 빠르게 자라는 종양을 이용하기 때문에 종

양내에 비성숙한 신생혈관이 많고, 이에 따라 신생혈관 억제제의 효과도 매우 높다. 그러나 사람에서 발생하는 종양은 이 보다 성장속도가 낮고 따라서 비성숙 신생혈관도 적어 신생혈관 억제제에 의한 효과가 적을 개연성이 있다¹⁹. 기존에 사용하는 항암제인 taxane²⁰, topoisomerase inhibitor²¹, purine analogue anti-metabolite²², radiation therapy²³ 등도 신생혈관 억제작용이 있으며, androgen을 제거하는 호르몬치료²⁴도 일부는 신생혈관 억제작용으로 작용함이 밝혀졌다. 따라서 신생혈관 억제제를 다른 치료와 병용하여 사용함으로써 종양을 효과적으로 억제할 수 있는 이론적인 근거로 사용할 수 있다.

결론

Fumagillin, Betulinic acid와 함께 신종추출 물질인 KJ3의 신생혈관 억제작용을 조사하였다. KJ3는 기존의 물질과 같이 강력한 신생혈관 억제제임을 보였으나, C1300을 이용한 동물실험에서 종양억제 작용은 종양의 크기가 작은 7일 이내에서 뚜렷하였고 7일 이후에는 약해짐을 보였다. 따라서 좀 더 강력한 항암작용을 위해서는 기존의 항암제와 병용투여 혹은 기존 항암제 치료가 끝난 후 투여하는 등의 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

참고문헌

- Meitar D, Crawford SE, Rademaker AW, Cohn SL: *Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma*. J Clin Oncol 14:405-414, 1996
- Folkman J: *How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue?* Cancer Res 46:467-473, 1986
- Folkman J: *Tumor angiogenesis: Therapeutic implications*. N Engl J Med 285:1182-1186, 1971
- Poon RT, Fan ST, Wong J: *Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients*. J Clin Oncol 19(4):1207-1225, 2001
- Kerbel RS: *Tumor angiogenesis: past, present and the near future*. Carcinogenesis 21(3):505-515, 2000
- Katzenstein HM, Rademaker AW, Senger C, Salwen HR, Nguyen NN, Thorner PS, Litsas L, Cohn SL: *Effectiveness of the angiogenesis inhibitor TNP-470 in reducing the growth of human neuroblastoma in nude*

- mice inversely correlates with tumor burden. Clin Cancer Res 5:4273-4278, 1999
7. Tomlinson J, Barsky SH, Nelson S, Singer S, Pezeshki B, Lee MC, Eilber F, Nguyen M: *Different patterns of angiogenesis in sarcomas and carcinomas*. Clin Cancer Res 5:3516-3522, 1999
 8. Miller KD, Swencny CJ, Sledge GW: *Redefining the target; Chemotherapeutics as antiangiogenics*. J Clin Oncol 9(4):1195-1206, 2001
 9. Canete A, Navarro S, Bermudez J, Pellin A, Castel V, Llombart-Bosch A: *Angiogenesis in neuroblastoma; relationship to survival and other prognostic factors in a Cohort of neuroblastoma patients*. J Clin Oncol 18(1):27-34, 2000
 10. Chalkley HW: *Method for the quantitative morphologic analysis of tissues*. J Natl Cancer Inst 4:47-53, 1943
 11. Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, Schnitt SJ: *Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast*. J Natl Cancer Inst 86:614-619, 1994
 12. Shusterman S, Grupp SA, Barr R, Carpentieri D, Zha H, Maris JM: *The angiogenesis inhibitor TNP-470 effectively inhibits human neuroblastoma xenograft growth, especially in the setting of subclinical disease*. Clin Cancer Res 7:977-984, 2001
 13. Wassberg E, Pahlman S, Westlin JE, Christofferson R: *The angiogenesis inhibitor TNP-470 reduces the growth rate of human neuroblastoma in nude rats*. Pediatr Res 41(3):327-333, 1997
 14. Niwano M, Arai S, Mori A, Ishigami S, Harada T, Mise M, Furutani M, Fujioka M, Imamura M: *Inhibition of tumor growth and microvascular angiogenesis by the potent angiogenesis inhibitor, TNP-470, in rats*. Surg today 28:915-922, 1998
 15. Sin N, Meng L, Wang MQW, Wen J, Bornmann WG, Crews CM: *The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, Met-AP-2*. Proc Natl Acad Sci 94:6099-6103, 1997
 16. Milkowski DM, Weiss RA: *Antiangiogenic agents in Cancer Therapy*. Totowa, NJ, Human Press, 1999 Pp-385-398.
 17. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA: *Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma*. Hum Pathol 23:755-761, 1992
 18. Gasparini G: *Angiogenesis research up to 1996: A commentary on the state of art and suggestions for future studies*. Eur J Cancer 32A:2379-2385, 1996
 19. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Podes D, Keshet E: *Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal*. J Clin Invest 103:159-165, 1999
 20. Belotti D, Vergani V, Drudis T, Borsotti P, Pitelli MR, Viale G, Giavazzi R, Tarabozetti G: *The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity*. Clin Cancer Res 2:1843-1849, 1996
 21. O'Leary JJ, Shapiro RL, Ren CJ, Chuang N, Cohen HW, Potmesil M: *Antiangiogenic effects of camptothecin analogues 9-amino-20(S)-camptothecin, topotecan and CPT-11 studied in the mouse cornea model*. Clin Cancer Res 5:181-187, 1999
 22. Presta M, Rusnati M, Belleri M, Morbidelli L, Ziche M, Ribatti D: *Purine analogue 6-methylmercaptopurine riboside inhibits early and late phases of the angiogenesis process*. Cancer Res 59:2417-2424, 1999
 23. Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA, Gorski DH, Staba MJ, Stellato KA, Bigelow K, Heimann R, Gately S, Dhanabal M, Soff GA, Sukhatme VP, Kufe DW, Weichselbaum RR: *Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumor therapy*. Nature 394: 287-291, 1998
 24. Jain RK, Safabakhsh N, Sckell A, Chen Y, Jiang P, Benjamin L, Yuan F, Keshet E: *Endothelial cell death, angiogenesis and microvascular function after castration in an androgen-dependent tumor: role of vascular endothelial growth factor*. Proc Natl Acad Sci USA 95:10820-10825, 1998