

ファージディスプレイ法を用いた腫瘍組織血管抗体の創製

山下琢矢,^{*,a,b,c} 宇都口直樹,^a 鈴木 亮,^a 長野一也,^b
角田慎一,^{b,d} 堤 康央,^{b,c,d} 丸山一雄^a

Development of Anti-tumor Blood Vessel Antibodies by Phage Display Method

Takuya YAMASHITA,^{*,a,b,c} Naoki UTOGUCHI,^a Ryo SUZUKI,^a Kazuya NAGANO,^b
Shin-ichi TSUNODA,^{b,d} Yasuo TSUTSUMI,^{b,c,d} and Kazuo MARUYAMA^a

^aDepartment of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Suarashi1091-1, Sagamiko, Sagamihara, Kanagawa 229-0195, Japan, ^bLaboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan, ^cThe Department of Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, and ^dThe Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received August 31, 2009)

Tumor blood vessels are essential for tumor growth. Therefore, these blood vessels are potential targets for anti-cancer therapy. The purpose of this study is to develop anti-tumor endothelial cell (TEC) antibodies for delivering anti-cancer agents or drugs. To achieve this goal, we utilized the phage antibody display library method to create monoclonal antibodies *in vitro*. Accordingly, we developed anti-TEC antibodies from a single chain Fv fragment (scFv) phage display library prepared using the Fv genes amplified from the mRNAs isolated from the TEC-immunized mice. The size of the phage antibody library prepared from the mRNA of the TEC-immunized mice was approximately 1.3×10^7 CFU. To select and enrich for the phages displaying the anti-TEC antibodies, cell panning was performed first using the TEC followed by subtractive panning using the normal endothelial cell. After five cycles of panning, the affinity of bound phage clones increased approximately 10 000 folds. Subsequently, clones isolated from the post-panning output library were tested for their antigen-specificity by ELISA and western blotting. One of the scFv phage clones showing antigen-specificity recognized only TEC *in vitro*, and when injected into the Colon26 bearing mice, this clone accumulated more on the tumor tissue than the wild type phage. These results suggest that the isolated antibody and this clone's target molecule could be potentially useful for novel anti-tumor therapies.

Key words—tumor endothelial cell; phage display; antibody

1. はじめに

医療技術の進歩に伴い、各種疾患の治療成績は年々向上している一方で、「悪性新生物：がん」は1981年にわが国における死因の第1位となつて以来、その死亡者は年々増加し、現在では死因全体の約3割を占めている。このように、「がん」を克服

できていない現状から、新たながん治療法、診断法の確立が待望されている。

腫瘍組織は、その体積が1 mm³を超えて増大する際、血管より最も離れた中心部位は低酸素状態にある。¹⁻³⁾そして、HIF等を介してその低酸素シグナルは腫瘍細胞に伝わり、腫瘍細胞がVEGF、b-FGF等の血管新生誘導因子を産生し、新たな血管を既存の血管より誘導してることが知られている。⁴⁻⁷⁾この腫瘍により誘導された血管は、腫瘍細胞への酸素・栄養の供給、腫瘍細胞からの老廃物の除去という腫瘍にとってまさにライフラインとも言うべき機能をしており、腫瘍組織の維持、増大に必要不可欠である。^{8,9)}さらに、この腫瘍組織血管の誘導は腫瘍の増大だけでなく、腫瘍血行性転移の経路

^a帝京大学薬学部生物薬剤学教室 (〒229-0195 神奈川県相模原市相模湖町 1091-1), ^b独立行政法人医薬基盤研究所基盤の研究部創薬プロテオミクスプロジェクト (〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8), ^c大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6), ^d大阪大学臨床医工学融合研究教育センター (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2)

*e-mail: t-yamashita@nibio.go.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムGS6で発表したものを中心に記述したものである。

としても機能している。このように腫瘍組織血管は腫瘍組織にとって必要不可欠な存在であるため、腫瘍組織血管に対して傷害を誘導することは腫瘍組織に致命的なダメージを与えることになり、腫瘍の退縮及び、転移の抑制が期待できる。このような背景も相まって、現在、この腫瘍組織血管を標的とするような分子標的医薬品の開発が盛んに進められている。

近年、疾患関連分子に対する分子標的治療を可能とするモノクローナル抗体が脚光を浴びている。その優れた抗原特異性から、モノクローナル抗体は診断薬¹⁰⁻¹⁴⁾として、さらには最近、抗体医薬として応用が非常に注目され、研究、臨床開発が盛んに行われており、現在、基礎研究段階のものを含めれば、約400以上もの抗体医薬品の研究開発が進められているとされている。¹⁵⁻²⁰⁾ また、2007年の抗体医薬品の世界市場は約263億3800万ドル(約2兆3800億円)で、2013年には約490億5500万ドル(約4兆4300億円)まで拡大すると予想され、まさに熾烈な研究合戦が世界規模で展開中である。本邦においても、乳がんにおいて過剰発現が認められる *erbB2* を標的とする *Trastuzumab* (*Herceptin*®),²¹⁻²³⁾ がんの血管新生をターゲットとした抗 *VEGF* 中和抗体である *Bevacizumab* (*Avastin*®)^{24,25)} を始め、徐々に抗体医薬品が承認・上市されつつある。

腫瘍組織血管は正常組織血管と異なった性質を有している^{26,27)} ため、その細胞膜表面若しくは、分泌タンパク質に特異的なタンパク質、いわゆるバイオマーカーが存在している可能性が考えられるが、腫瘍組織血管特異的なバイオマーカー、及びその抗体については世界的に認められる分子はいまだに発見されていないというのが現状である。腫瘍組織血管特異的ではないが、唯一の重要な指標となっているのは血管新生において非常に重要なシグナル系である *VEGF* ファミリーの *VEGFR1* (*Flt-1*), *VEGFR2* (*Flk-1/KDR*) の発現上昇のみである。²⁸⁻³⁰⁾ そこで本研究では、新規がん治療薬、腫瘍組織血管特異バイオマーカー探索の強力なツールとなり得る、腫瘍組織血管特異タンパク質に対する抗体の創製を従来のハイブリドーマ法と比較して画期的な抗体創製法であるファージディスプレイ法を用いて試みた。

2. ファージディスプレイ法

ファージディスプレイ法は1985年に *Smith* らに

よって報告され、³¹⁾ バクテリオファージ内に存在するファージミッドベクターへ外来遺伝子(ペプチド・タンパク質・抗体等)を導入することで、バクテリオファージ表面に目的分子を発現させることを可能とする技術であり、その分子はバクテリオファージのコートタンパク質(*g3p*)と融合した形態で発現している。抗体作製への応用は1990年に *Mcafferty* らが抗体機能ドメインを提示したファージディスプレイ法をハイブリドーマ法に代わる新しいモノクローナル抗体作製技術として報告したことに始まる。³²⁾ 1991年には *Marks* らが免疫していないヒトの末梢血リンパ球を出発材料に構築したファージ抗体ライブラリから、ヒト生体成分や、ターキー卵白アルブミン、ウシ血清アルブミンなど異種動物の抗原に対するファージ抗体の分離を報告した。³³⁾

繊維状ファージ *M13* は環状の一本鎖ゲノムDNAを持ち、そのまわりに5つのコートタンパク質(*g3p*, *g6p*, *g7p*, *g8p*, *g9p*)が連結した細長い筒状の構造をしており、大腸菌に感染して増殖するウイルスである。ファージディスプレイは、これらのファージコートタンパクと外来ポリペプチドを融合した形で発現させることでファージ表面にディスプレイさせる方法である。

ファージディスプレイ法の特徴は、① 任意の外来分子をファージ表面に提示できること、② 1個の宿主菌に1個のファージしか感染しないため(*pDNA incompatibility* に寄与する)、各ファージ内の外来遺伝子とファージ表面に提示された外来遺伝子産物が一致していること、③ 種々の外来遺伝子産物を提示したファージを数億種類以上の多様性を有するライブラリとして容易に、かつ短期間(1週間以内)で調製できること、④ 宿主菌に感染させることで簡便に特定のファージを増幅できることにある。^{34,35)}

外来遺伝子として一本鎖抗体(*single chain variable fragment: scFv*)遺伝子を用いるファージ抗体ライブラリは、ファージ表面に数十万から数億以上のレパートリーを有する抗体機能性ドメインである *VL* 領域と *VH* 領域をリンカーで連結した *scFv* 抗体を発現させるものである(*Fig. 1*)。このライブラリから標的タンパク質へ特異的に結合するクローンを選択・回収し、増幅する操作(パンニング)を繰り返すことによって、標的タンパク質に結合する

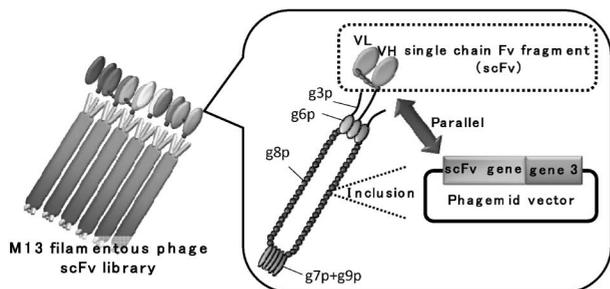


Fig. 1. The scFv Phage Display System

scFv 抗体分子を表面提示したファージをスクリーニングすることが可能である。^{36,37)} しかも得られたファージは目的抗体をコードする遺伝子を内封しているため、抗体の遺伝子配列も同時に獲得することが可能である。このように、ファージディスプレイ抗体ライブラリは *in vitro* で生体内の抗体産生系を模倣し、さらに生体の免疫系から独立した抗原の種類を選ばない優れた抗体創製システムとして、抗体医薬開発に大きく貢献している。

3. 抗腫瘍組織血管抗体の創製

3-1. 腫瘍組織血管内皮細胞モデル 抗腫瘍組織血管抗体を創製するためには、腫瘍組織血管内皮細胞を獲得しなければならないが、腫瘍組織血管内皮細胞のみを生体内腫瘍組織から単離することは非常に困難である。そこで筆者らはがん細胞の培養上清 (Conditioned Medium: CM) を用いることで、*in vivo* の腫瘍組織血管内皮細胞を模倣した腫瘍組織血管内皮細胞モデルを *in vitro* の系で再構築し、このモデル細胞から抗原タンパク質を調製後、これを用いて抗体創製を試みた。本検討ではマウス結腸がん細胞 (Colon26) の CM で培養したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を腫瘍組織血管内皮細胞モデル (Colon26 CM-HUVEC) とした (Fig. 2)。

この腫瘍組織血管内皮細胞モデルは、生体内腫瘍組織血管内皮細胞に特徴的な性質である細胞間透過性の亢進を示し、³⁸⁾ また腫瘍組織血管内皮細胞モデルの膜抗原を樹状細胞にパルス後、この樹状細胞をマウスに免疫したところ、*in vivo* において、副作用を引き起こすことなく腫瘍組織血管特異的な傷害性が誘導され、それに伴う抗腫瘍効果が観察された (未発表データ)。さらには、2 次元電気泳動解析により、その特異的抗原タンパク質の存在が明らかとなった (未発表データ)。

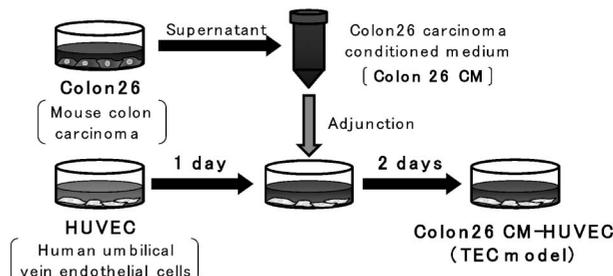


Fig. 2. Development of the Tumor Endothelial Cell Model
Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultured in Colon26 carcinoma-conditioned medium (Colon26 CM-HUVEC) were used as model TECs.

これらのことから、この腫瘍組織血管内皮細胞モデルは生体内の腫瘍組織血管内皮細胞と全く同じ特異的抗原タンパク質を発現している可能性が非常に高いと考えられる。

3-2. 腫瘍組織血管内皮細胞モデル免疫抗体ライブラリの作製 現在、ファージ抗体ライブラリとしては、免疫していない動物や健常人の B 細胞を由来とした「ナイーブファージ抗体ライブラリ」^{39,40)} と免疫した動物や疾患患者の B 細胞を由来とした「免疫ファージ抗体ライブラリ」⁴¹⁾ の 2 種類が主に用いられている。各ライブラリにはそれぞれ長所・短所があり、「ナイーブファージ抗体ライブラリ」は抗体遺伝子に偏りのない多様性に富んだ抗体ライブラリを獲得できるという長所を持つ一方で、抗原結合力の強い抗体を得ることが困難であるという短所も持ち合わせている。また、「免疫ファージ抗体ライブラリ」は抗原結合力の強い抗体を得ることができるという長所を持つ一方で、免疫状態に偏りがあるため、「ナイーブファージ抗体ライブラリ」と比較して得られる抗体ライブラリは多様性に乏しいという短所を持つ。このように両ライブラリは一長一短であるため、目的に合わせて使い分ける必要がある。

本検討では最終的に獲得した抗体を抗原探索・解析のツールとしてだけでなく、ドラッグデリバリーのツールとして用いる狙いがあるため、より強力な結合力を有する抗体を獲得可能な「免疫ファージ抗体ライブラリ」を作製した。

免疫原として腫瘍血管内皮細胞モデルである Colon 26 CM-HUVEC を BALB/c マウスに一週間おきに 2 回免疫を行った。次に、マウスの Colon26 CM-HUVEC に対する抗体価を測定後、脾臓を回収

し、mRNAを回収した。続いて、このmRNAをテンプレートにcDNAを作製し、PCRにより抗体のVL、VH領域のDNAの増幅を行った。さらに、増幅したVL、VH領域のDNAを連結させるassembly PCRを行い、scFv DNAを作製した。そして、このscFv DNAをファージミドベクター (pCANTAB5E) へクローニングした。最後にクローニング後のファージミドベクターを大腸菌 (TG1) へエレクトロポレーションにより導入した。構築したライブラリのライブラリサイズは大腸菌の形質転換効率より算出した。その結果、構築した抗体ライブラリは 1.3×10^7 CFU という抗体多様性を保持していた (Fig. 3)。

3-3. 抗腫瘍組織血管抗体のスクリーニング

機能性分子を獲得するためのスクリーニング系の設計はファージディスプレイ法のみならず、ディスプレイ技術を駆使する場合のキーテクノロジーとして重要視される。精製抗原が入手可能な場合は、固層化法 (パンニング) やビオチン化抗原とストレプトアビジン固定化担体を用いたスクリーニング方法が主要な選択系として用いられている。しかし、各スクリーニングを効率よく行うためには、対照抗原の目的エピトープを被覆、あるいは変性させない工夫が必要であり、さらには反応温度や洗浄条件、塩濃度など複数の要因が影響する。

今回、われわれは精製された抗原タンパク質を獲得しているため、抗体ライブラリから抗腫瘍組織血管抗体を選別するスクリーニング系として簡便なパ

ンニングを選択した。パンニングはファージ抗体ライブラリ内から、固層化した標的タンパク質へ特異的に結合するクローンを選択・回収し、増幅する操作であり、このパンニングを繰り返すことによって、標的タンパク質に結合するscFv抗体分子を表面提示したファージを選別・濃縮することが可能である (Fig. 4)。

近年、臨床で用いられている抗体医薬品は細胞膜表面の膜タンパク質、若しくは血中に遊離している機能性タンパク質 (レセプターアゴニスト等) を認識する抗体である。今回創製する抗体の将来的な展望として、創出した抗体をドラッグデリバリー、また診断のツールとして使用することを目的としているため、創製する抗体は細胞内タンパク質ではなく、細胞外表面上の膜タンパク質を認識する抗体であることが必須条件であると考えられる。このことから、われわれはパンニングにより抗体を選別する際に用いる標的抗原には、調製時に破壊された細胞の細胞内タンパク質が混入する恐れのある、細胞抽出抗原タンパク質 (細胞ライセート、ブタノール抽出膜抗原タンパク質等) を用いるのではなく、生細胞をそのまま標的抗原として用いることが最適であると考えた。

さらに、抗腫瘍組織血管抗体を創製するにあたって、われわれが非常に重要であると考えていることは、いかに副作用の少ない抗体を選別するかである。腫瘍組織血管は正常組織血管内皮細胞が腫瘍細胞の産出する液性因子 (サイトカイン、ケモカイン

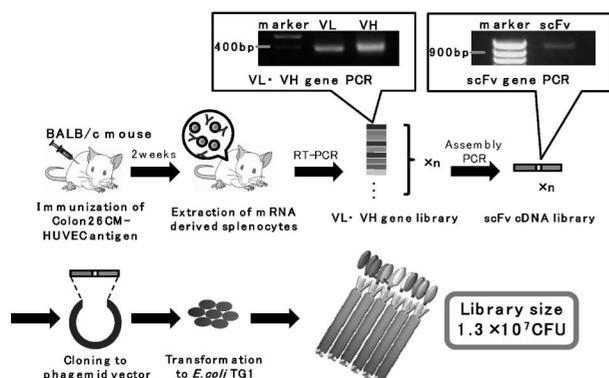


Fig. 3. Development of the Tumor Endothelial Cell Immune Antibody Library

The single chain antibody fragment variable (scFv) phage display library was prepared by amplifying the Fv genes from the mRNA derived from the TEC-immunized murine splenocytes.

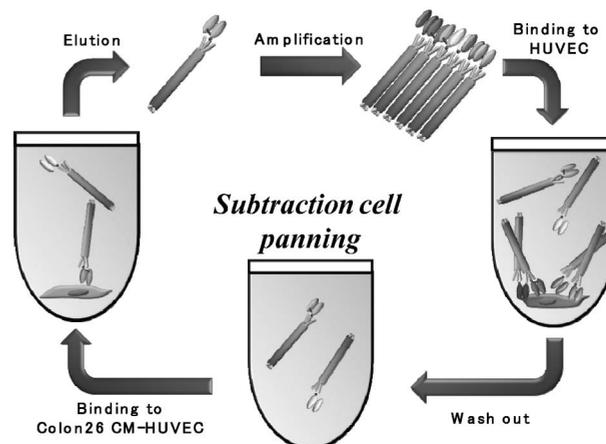


Fig. 4. Antibody Selection by Subtraction Cell Panning

Anti-TEC antibodies were selected by cell panning against Colon26 CM-HUVEC with subtractive panning against normal HUVEC.

ン、増殖因子等)により腫瘍組織へ誘導され、増殖することで、形成されると考えられている。このため、腫瘍組織血管内皮細胞は正常組織血管内皮細胞と構成タンパク質の大部分が類似していると考えられる。事実、われわれが構築した腫瘍組織血管内皮細胞モデルにおいても、2D-DIGE 比較解析の結果、正常組織血管内皮細胞と構成タンパク質の大部分が類似していた。このことから、パニングの際、腫瘍組織血管内皮細胞モデルのみを用いてしまうと、正常組織血管内皮細胞と交差性を持つ抗体が選別されてくる可能性が非常に高い。そこで、腫瘍組織血管内皮細胞モデルと抗体ライブラリファージを結合させる前に、正常組織血管内皮細胞と結合させるサブトラクションセルパニングを行うことで腫瘍組織血管内皮細胞モデル特異抗体の選別・濃縮を図った (Fig. 4)。

まず、抗体ライブラリファージを HUVEC と結合させ、正常組織血管と結合する抗体ファージを除去し、遊離している抗体ファージを Colon26 CM-HUVEC と結合させた。非特異的結合ファージを洗浄後、Colon26 CM-HUVEC 結合抗体ファージを回収し、大腸菌に感染させ、増幅した。このサブトラクションパニングを計 5 回行った結果、パニング前のファージ抗体ライブラリ (input ファージ) とパニングにより回収されたファージ (output ファージ) の比率は、5th パニング時では、1st パニング時と比較して、約 10000 倍という高い比率を示したことから、Colon26 CM-HUVEC 特異的に結合する抗体ファージの選別・濃縮に成功したと推測される (Fig. 5)。

さらに、抗体アミノ酸配列を確認するため、各パニングラウンドのファージ抗体をモノクローン化後、インサート PCR を行い、scFv DNA の増幅が確認されたクローンの scFv アミノ酸シーケンスを解析した。その結果、2 種類の scFv のアミノ酸シーケンス解析に成功した (未発表データ)。獲得した 2 種類の scFv は抗体の抗原認識性を決定する上で非常に重要である 3 ヶ所の相補性決定領域 (complementarity-determining regions: CDR1, CDR2, CDR3) を保有し、最も多様性に富むとされている CDR3 領域の中で特に、VH の CDR3 領域においては、アミノ酸の種類、数ともに全く異なっていた。

3-4. 獲得抗体の特性評価 獲得抗体の *in vitro*

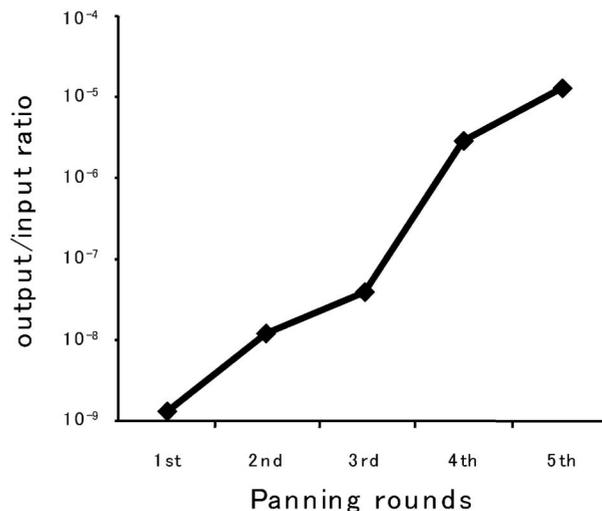


Fig. 5. Enrichment of Antibodies to Tumor Endothelial Cell Model by Subtraction Cell Panning

における抗体特性評価として、ELISA, western blotting による抗原結合性評価、及び抗原分子量の探索を行った (Fig. 6)。

ELISA による抗原結合性評価の結果、Clone 1 ファージ抗体は、Colon26 へは結合性は示さない一方で、Colon26 CM-HUVEC へは HUVEC への結合性と比較して約 2 倍の抗原結合性を示した。さらにこのファージ抗体の抗原分子量を探索するため、Clone 1 ファージ抗体を用いて western blotting を行った。

Western blotting の結果、Clone 1 ファージ抗体は分子量約 45000 Da のタンパク質に対して結合性を示し、そのバンドの発光強度は ELISA での結果とほぼ相関していた。また、この抗原タンパク質は腫瘍組織血管に高発現しているとされている VEGFR2 とは異なる分子量を示していたことから、VEGFR2 以外の新規腫瘍組織血管マーカーである可能性がある。

さらに獲得抗体の *in vivo* での腫瘍組織集積性を評価するため、獲得ファージ抗体を担がんマウスへ静注し、全身灌流後、腫瘍組織を摘出した。その腫瘍組織内のファージ titer を計測することで獲得抗体の腫瘍組織集積能を評価した。*In vitro* における Colon26 CM-HUVEC への抗原結合性を示した Clone 1 ファージ抗体を担がんマウスへ投与したところ、有意差は得られなかった ($p=0.08$) が Clone 1 ファージ抗体は野生型ファージと比べて約

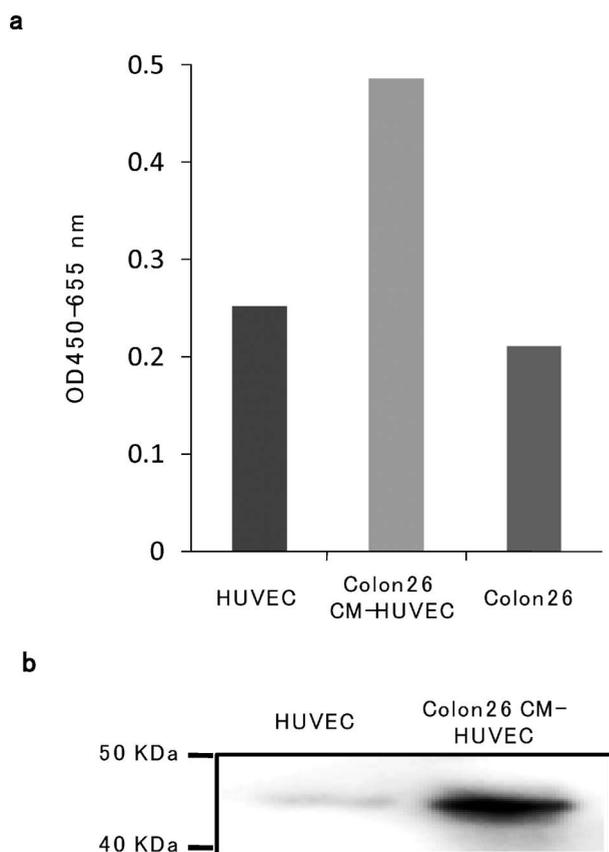


Fig. 6. Evaluation of Antibody Binding Activity *in Vitro* (a: ELISA, b: Western blot). The binding specificities of the phage antibodies were assessed *in vitro* by using ELISA and Western blotting.

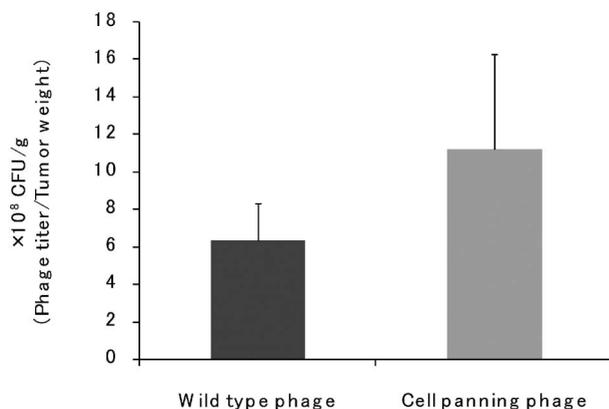


Fig. 7. Evaluation of Antibody Binding Activity in a Pilot Study *in Vivo*

The binding specificities of the phage antibodies were assessed *in vivo* by analyzing their accumulation on the tumor tissue. $n=3$, $p=0.08$.

1.8 倍の腫瘍集積性を示す傾向にあった (Fig. 7)。この有意差が得られなかった原因は、抗体をファージ上に提示した状態で用いていることから、ファージが持つ非特異的吸着性の影響を受け、本来得られ

べき差異がマスクされてしまったためとわれわれは推測している。そこで今後、より詳細に獲得した抗体の抗原認識性を評価するため、得られた Clone 1 の遺伝子をもとに、抗体のみを精製し、再検討する予定である。なお、Clone 2 に関しても現在、同様に特性評価を行っている。

4. おわりに

本研究の結果、抗腫瘍組織血管抗体の創製に成功した。今後は免疫沈降法、質量分析法を駆使して各抗体の抗原タンパク質を同定し、それら抗原タンパク質の機能、生体分布評価を行う予定である。将来的に本研究により創製した抗体、その抗原が、がん治療、診断及び腫瘍組織血管研究の進展に大きく貢献することを期待している。

REFERENCES

- 1) Semenza G. L., *J. Clin. Invest.*, **106**, 809–812 (2000).
- 2) Yu J. L., Rak J. W., Coomber B. L., Hicklin D. J., Kerbel R. S., *Science*, **295**, 1526–1528 (2002).
- 3) Blagosklonny M. V., *Cancer Cell*, **5**, 13–17 (2004).
- 4) Klagsbrun M., Sasse J., Sullivan R., Smith J. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2448–2452 (1986).
- 5) Montesano R., Vassalli J. D., Baird A., Guillemin R., Orci L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7297–7301 (1986).
- 6) Frater-Shroder M., Risau W., Hallmann R., Gautschi P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5277–5281 (1987).
- 7) Carmeliet P., *Nat. Med.*, **6**, 389–395 (2000).
- 8) Folkman J., *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 4–6 (1990).
- 9) Keller R., Pratt B. M., Furthmary H., Madri J. A., *Am. J. Pathol.*, **128**, 299–306 (1987).
- 10) Aburatani H., *J. Gastroenterol.*, **40** (Suppl. 16), 1–6 (2005).
- 11) Mume E., Orlova A., Malmström P.-U., Lundqvist H., Sjöberg S., Tolmachev V., *Nucl. Med. Biol.*, **32**, 613–622 (2005).
- 12) Peknicova J., Chladek D., Hozak P., *Am. J. Reprod. Immunol.*, **53**, 42–49 (2005).
- 13) Andresen H., Grötzinger C., Zarse K., Kreuzer O. J., Ehrentreich-Förster E., Bier F. F.,

- Proteomics*, **6**, 1376–1384 (2006).
- 14) Miyata T., Jige M., Nakaminami T., Uragami T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 1190–1193 (2006).
 - 15) O'Mahony D., Bishop M. R., *Front. Biosci.*, **11**, 1620–1635 (2006).
 - 16) Schulze-Koops H., Lipsky P. E., *Curr. Dir. Autoimmun.*, **2**, 24–49 (2000).
 - 17) Bhattacharya-Chatterjee M., Chatterjee S. K., Foon K. A., *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **2**, 869–881 (2002).
 - 18) Takeshita A., *Rinsho Byori*, **52**, 917–923 (2004).
 - 19) González E., Gutiérrez E., Hernández Y., Roselló G., Gutiérrez M. J., Gutiérrez Martínez E., Manzanera M. J., García J. A., Praga M., Morales J. M., Andrés A., *Transplant. Proc.*, **37**, 3736–3737 (2005).
 - 20) Cheson B. D., *Cancer Immunol. Immunother.*, **55**, 188–196 (2006).
 - 21) Bohme C., *Eur. J. Oncol. Nurs.*, **4**, 30–36 (2000).
 - 22) Carter P., Fendly B. M., Lewis G. D., Sliwkowski M. X., *Breast Dis.*, **11**, 103–111 (2000).
 - 23) Murray S., *CMAJ*, **174**, 36–37 (2006).
 - 24) Kim K. J., Li B., Winter J., Armanini M., Gillett N., Phillips H. S., Ferrara N., *Nature*, **362**, 841–844 (1993).
 - 25) Presta L. G., Chen H., O'Connor S. J., Chisholm V., Meng Y. G., Krummen L., Winkler M., Ferrara N., *Cancer Res.*, **57**, 4593–4599 (1997).
 - 26) Wu N., Klitzman B., Dodge R., Dewhirst M. W., *Cancer Res.*, **52**, 4265–4268 (1992).
 - 27) Matsumura Y., Maeda H., *Cancer Res.*, **46**, 6387–6392 (1986).
 - 28) Risau W., *Nature*, **386**, 671–674 (1997).
 - 29) Ferrara N., Davis-Smyth T., *Endocr. Rev.*, **18**, 4–25 (1997).
 - 30) Shibuya M., Claesson-Welsh L., *Exp. Cell Res.*, **312**, 549–560 (2006).
 - 31) Smith G. P., *Science*, **228**, 1315–1317 (1985).
 - 32) McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G., Chiswell D. J., *Nature*, **348**, 552–554 (1990).
 - 33) Marks J. D., Hoogenboom H. R., Bonnert T. P., McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G., *J. Mol. Biol.*, **222**, 581–597 (1991).
 - 34) Barbas C. F. 3rd, Kang A. S., Lerner R. A., Benkovic S. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7978–7982 (1991).
 - 35) Vaughan T. J., Williams A. J., Pritchard K., Osbourn J. K., Pope A. R., Earnshaw J. C., McCafferty J., Hodits R. A., Wilton J., Johnson K. S., *Nat. Biotechnol.*, **14**, 309–314 (1996).
 - 36) Coomber D. W., *Methods. Mol. Biol.*, **178**, 133–145 (2002).
 - 37) Goletz S., Christensen P. A., Kristensen P., Blohm D., Tomlinson I., Winter G., Karsten U., *J. Mol. Biol.*, **315**, 1087–1097 (2002).
 - 38) Utoguchi N., Mizuguchi H., Saeki K., Ikeda K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Cancer Lett.*, **89**, 7–14 (1995).
 - 39) Okamoto T., Mukai Y., Yoshioka Y., Shibata H., Kawamura M., Yamamoto Y., Nakagawa S., Kamada H., Hayakawa T., Mayumi T., Tsutsumi Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**, 583–591 (2004).
 - 40) Rojas G., Almagro J. C., Acevedo B., Gavilondo J. V., *J. Biotechnol.*, **94**, 287–298 (2002).
 - 41) Zhang Z. C., Hu X. J., Yang Q., *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, **3**, 77–81 (2004).