

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5219513号
(P5219513)

(45) 発行日 平成25年6月26日(2013.6.26)

(24) 登録日 平成25年3月15日(2013.3.15)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 19/00	(2006.01)	C07K 19/00
C07K 14/47	(2006.01)	C07K 14/47 Z N A
C07K 14/765	(2006.01)	C07K 14/765
A61K 38/00	(2006.01)	A61K 37/02
A61P 43/00	(2006.01)	A61P 43/00 1 1 1

請求項の数 26 (全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-533653 (P2007-533653)
 (86) (22) 出願日 平成17年9月23日 (2005.9.23)
 (65) 公表番号 特表2008-514618 (P2008-514618A)
 (43) 公表日 平成20年5月8日 (2008.5.8)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2005/034176
 (87) 國際公開番号 WO2006/034455
 (87) 國際公開日 平成18年3月30日 (2006.3.30)
 審査請求日 平成20年9月4日 (2008.9.4)
 (31) 優先権主張番号 60/612,488
 (32) 優先日 平成16年9月23日 (2004.9.23)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 509257020
 バスジーン セラピューティクス, インコ
 ーポレイテッド
 VASGENE THERAPEUTIC
 S, INC.
 アメリカ合衆国 19079 ベンシルベニア
 州シャロン・ヒル、エルムウッド・アベニ
 ュー 501
 501 Elmwood Avenue,
 Sharon Hill, PA 1907
 9 U. S. A.
 (74) 代理人 110000523
 アクシス国際特許業務法人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】血管形成及び腫瘍増殖阻害用ポリペプチド化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

EphB4蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有し、ヒト血清アルブミンタンパク質と融合され、単離された可溶性ポリペプチドであって、該ポリペプチドは単量体であってエフリンB2ポリペプチドに特異的に結合し、しかも該ポリペプチドはEphB4とエフリンB2の間の相互作用から生じるシグナリングを阻害するポリペプチド。

【請求項 2】

EphB4蛋白質の球状領域か、又はEphB4蛋白質の球状領域に少なくとも90%は同一である配列を含有する請求項1のポリペプチド。

【請求項 3】

EphB4蛋白質の前記細胞外領域が、図65 (SEQ ID NO:10)により特定されるアミノ酸配列の残基29~197と少なくとも90%は同一である配列を含有する請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 4】

EphB4蛋白質の前記細胞外領域が、図65 (SEQ ID NO:10)により特定されるアミノ酸配列の残基29~526と少なくとも90%は同一である配列を含有する請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記ヒト血清アルブミンタンパク質が成熟型である請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

10

20

前記ポリペプチドの生体内における血清中半減期は非修飾EphB4ポリペプチドのそれよりも少なくとも50%長い請求項1～5何れか一項記載のポリペプチド。

【請求項7】

前記ポリペプチドの生体内における血清中半減期は非修飾EphB4ポリペプチドのそれよりも少なくとも100%長い請求項1～5何れか一項記載のポリペプチド。

【請求項8】

前記ポリペプチドは下記：

- (a) エフリンB2活性の阻害；
- (b) エフリンB2キナーゼ活性の阻害；
- (c) EphB4キナーゼ活性の阻害；
- (d) エフリンB2のクラスター化の阻害；及び
- (e) EphB4のクラスター化の阻害；

から選択される1又は2以上の活性を有する請求項1～5何れか一項記載のポリペプチド。

【請求項9】

請求項1～5の何れか一項記載のポリペプチド及び製薬上許容し得る担体を含有する医薬組成物。

【請求項10】

エフリンB2 / EphB4を介したシグナルを阻害するのに使用する薬剤を調製するための請求項1～5何れか一項記載のポリペプチドの使用。

【請求項11】

腫瘍の増殖速度を減少させるのに使用する薬剤を調製するための請求項1～5何れか一項記載のポリペプチドの使用。

【請求項12】

患者の癌を治療するのに使用する薬剤を調製するための請求項1～5何れか一項記載のポリペプチドの使用。

【請求項13】

患者の血管形成を阻害するのに使用する薬剤を調製するための請求項1～5何れか一項記載のポリペプチドの使用。

【請求項14】

血管形成に関連した疾病に罹患した患者を治療するのに使用する薬剤を調製するための請求項1～5何れか一項記載のポリペプチドの使用。

【請求項15】

1個以上の修飾アミノ酸残基を含有する請求項1～5何れか一項記載のポリペプチド。

【請求項16】

請求項1～5何れか一項記載のポリペプチド及び製薬上許容し得る担体を含有する化粧組成物。

【請求項17】

前記癌は、同等組織の非癌化細胞よりも高いレベルでエフリンB2及び／又はEphB4を発現する癌細胞を含む請求項1～2記載の使用。

【請求項18】

前記癌は転移性癌である請求項1～2記載の使用。

【請求項19】

前記腫瘍が結腸癌、乳癌、中皮腫、前立腺腫瘍、扁平上皮細胞癌、カボジ肉腫、及び白血病から選択される請求項1～2記載の使用。

【請求項20】

前記癌が血管形成に依存する癌である請求項1～2記載の使用。

【請求項21】

前記癌が血管形成に依存しない癌である請求項1～2記載の使用。

【請求項22】

10

20

30

40

50

EphB4蛋白質のフィプロネクチンタイプ3領域のアミノ酸配列を含有し、ヒト血清アルブミンタンパク質と融合され、単離された可溶性ポリペプチドであって、該ポリペプチドは癌のマウス異種移植モデルにおいて腫瘍増殖を阻害するポリペプチドであり、しかも該ポリペプチドは単量体であり、EphB4とエフリンB2の間の相互作用から生じるシグナリングを阻害するポリペプチド。

【請求項23】

エフリンB2に結合しない請求項22記載のポリペプチド。

【請求項24】

EphB4蛋白質の球状領域の部分を含まない請求項22記載のポリペプチド。

【請求項25】

図65(SEQ ID NO:10)の配列の324～526のアミノ酸配列を含有する請求項22記載のポリペプチド。

10

【請求項26】

前記ヒト血清アルブミンタンパク質が成熟型である請求項22に記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、米国仮出願番号第60/612,488号(2004年9月23日出願)の出願日の利益を主張し、その全開示を本明細書に援用する。

【背景技術】

20

【0002】

血管形成、すなわち予め存在している脈管構造の内皮からの新血管の発生は、ホスト内での充実性腫瘍の増殖、プログレッション、及び転移において重要なプロセスである。生理学的に正常な血管形成の間は、血管内皮とその周囲の間質成分とのオートクリン、パラクリン、及びアンフィクリン相互作用は、空間的及び時間的に緊密に調整される。更に、血管新生促進及び血管新生阻害サイトカイン並びに増殖因子のレベル及び活性はバランスが保たれている。反対に、活発な腫瘍増殖に必要な病理学上の血管形成は保持されて持続し、正常な血管形成システムの調節不全を示す。充実性腫瘍及び造血腫瘍種は高レベルの異常な血管形成に特に関係する。

【0003】

30

一般的に腫瘍の発生は、急成長する潜在能力を有する自律性クローンの発生を引き起こす連続的で且つ相関性のあるステップから構成されると考えられる。これらのステップは持続的な成長及び制限のない自己複製を含む。腫瘍中の細胞母集団は、一般的に成長シグナルの自給自足、成長抑制シグナルへの低い感応性、及び耐アポトーシス性に特徴付けられる。異常な成長を開始する遺伝子的又は細胞遺伝学的事象は、アポトーシスを防止することにより細胞を長期の「準備」状態に維持する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、血管形成及び腫瘍増殖阻害用の薬剤及び治療的処置を提供することを目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の概要

ある観点において、本発明はEphB4又はエフリンB2で仲介される機能を阻害するポリペプチド薬であり、EphB4及びエフリンB2蛋白質のモノマー性リガンド結合部を含むものを提供する。本明細書において示すように、EphB4及びエフリンB2は癌及び望ましくない又は過度の血管形成に関連した病気を含む種々の病状に関与する。従って、本発明の特定のポリペプチド薬は、これらの病気を治療するために使用できる。更なる観点において、本発明はEphB4及び/又はエフリンB2が、しばしば高レベルで、種々の腫瘍中で発現される

50

という発見に基づく。従って、EphB4又はエフリンB2機能をダウンレギュレートするポリペプチド薬は、腫瘍細胞への直接的効果及び腫瘍が採用する血管形成プロセスへの間接的効果により腫瘍へ影響を与える。ある実施形態において、本発明はEphB4又はエフリンB2の機能をダウンレギュレートする薬剤を用いた治療に特に適した腫瘍種を特定する。好ましい実施形態において、本明細書に開示するポリペプチドは生体内での血清中半減期が長くなるように修飾される。

【 0 0 0 6 】

ある観点において、本発明はEphB4蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性EphB4ポリペプチドを提供する。この可溶性EphB4ポリペプチドは特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する。用語「可溶性」は単に、これらのポリペプチドが膜貫通領域を含有しないか、又は生理食塩水中のポリペプチドの溶解度を損なうのに充分な膜貫通領域部分を含有しないことを表すために使用される。可溶性ポリペプチドは単量体として調製されるのが好ましく、エフリンB2等のリガンドへ結合するEphB4と競合し、EphB4の活性化で引き起こされるシグナルを阻害する。随意的に、可溶性ポリペプチドは、例えばFc融合蛋白質として発現することにより、又は別の多量体形成領域と融合することにより、多量体の形態で調製してもよい。これら多量体の形態は、文脈に応じてアゴニスト的又はアンタゴニスト的効果を有する複合的活性を有する。ある実施形態においては、可溶性EphB4ポリペプチドはEphB4蛋白質の球状領域を含有する。可溶性EphB4ポリペプチドは、図65(SEQ ID NO:10)により特定されるアミノ酸配列の残基1～522と少なくとも90%は同一の配列を含有し得る。可溶性EphB4ポリペプチドは、図65(SEQ ID NO:10)により特定されるアミノ酸配列の残基1～412と少なくとも90%は同一の配列を含有し得る。可溶性EphB4ポリペプチドは、図65(SEQ ID NO:10)により特定されるアミノ酸配列の残基1～312と少なくとも90%は同一の配列を含有し得る。可溶性EphB4ポリペプチドは球状(G)領域(図65のアミノ酸29-197, SEQ ID NO:10)を包含する配列を含有することができ、随意的に追加的領域、例えばシステインリッチな領域(図65のアミノ酸239-321, SEQ ID NO:10)、第一のフィプロネクチンタイプ3領域(図65のアミノ酸324-429, SEQ ID NO:10)及び第二のフィプロネクチンタイプ3領域(図65のアミノ酸434-526, SEQ ID NO:10)を含有することができる。本明細書に記載され、リガンド結合活性をもつとして示された好ましいポリペプチとしては図65(SEQ ID NO:10)に示すアミノ酸配列の1-537, 1-427及び1-326それぞれに対応するポリペプチドが挙げられる。可溶性EphB4ポリペプチドは図1又は2(SEQ ID Nos. 1又は2)に記載の配列を含有することができる。斯界で周知のように、HEK293T細胞系といった適切な細胞内で該EphB4ポリペプチドが発現するとリーダーペプチドが切断される。該切断は常に完全であるわけでも、単一部位での完璧な一貫性があるわけでもないが、EphB4は図65(SEQ ID NO:10)に示される配列の最初の15個のアミノ酸を除去するように切断される傾向にあることが知られている。従って、具体例として、本発明はエフリンB2に結合し、そして次の群(番号は図65のSEQ ID NO:10に対応): 1-197, 29-197, 1-312, 29-132, 1-321, 29-321, 1-326, 29-326, 1-412, 29-412, 1-427, 29-427, 1-429, 29-429, 1-526, 29-526, 1-537及び29-537から選択されるアミノ酸配列を含有するプロセシングを受けていない可溶性EphB4ポリペプチドを提供する。更に、異種のリーダーペプチドが内発的リーダー配列に取って代わることもできる。ポリペプチドは次の群(番号は図65のSEQ ID NO:10に対応): 16-197, 16-312, 16-321, 16-326, 16-412, 16-427, 16-429, 16-526及び16-537から選択される予測アミノ酸配列を有するプロセシングを受けた形態で使用してもよい。更に、可溶性EphB4ポリペプチドは、エフリンB2結合活性を保持しつつ、先行するアミノ酸配列の何れかに少なくとも90%(随意に95%又は99%)は同一であるアミノ酸配列を含有するものとすることができる。好ましくは、図65(SEQ ID NO:10)に示される配列からのアミノ酸配列の変異は何れも1, 2, 3, 4又は5個以下のアミノ酸の保存的変化又は欠失であり、とりわけ表面ループ部位での変異である。ある実施形態においては、可溶性EphB4ポリペプチドは、エフリンB2とEphB4の間の相互作用を阻害し得る。可溶性EphB4ポリペプチドは、エフリンB2又はEphB4のクラスター化又はリン酸化を阻害し得る。エフリンB2又はEphB4のリン酸化

10

20

30

40

50

は一般的にこれらの蛋白質により調節される細胞内シグナル経路を刺激する初期事象の一つであると考えられる。上述したように、可溶性EphB4ポリペプチドは単量体又は多量体融合蛋白質として調製し得る。可溶性ポリペプチドは1以上の修飾アミノ酸を含有してもよい。これらアミノ酸はプロテアーゼ消化耐性の増加等の望ましい性質に寄与し得る。

【0007】

本発明はエフリンB2結合活性を保持しつつ、血清中半減期を長くする追加的成分を有する可溶性EphB4ポリペプチドを提供する。ある実施形態においては、可溶性EphB4ポリペプチドは単量体であり、1又は2以上のポリオキシアルキレン基（例：ポリエチレン、ポリプロピレン）、好ましくはポリエチレングリコール（PEG）基に共有結合する。従って、本発明は一観点において、修飾がポリペプチドに共有結合した単一のポリエチレングリコール基を含む修飾EphB4ポリペプチドを提供する。別の観点においては、本発明は1、2、3又は4以上のポリエチレングリコール基に共有結合した修飾EphB4ポリペプチドを提供する。

【0008】

1又は2以上のPEGは約1kDa～約100kDa、好ましくは約10kDa～約60kDa又は約10kDa～約40kDaの分子量を有し得る。PEG基は直鎖状PEG及び分枝鎖状PEGであってよい。好ましい実施形態においては、可溶性で単量体のEphB4共役体は約10kDa～約40kDa又は約15kDa～30kDaのPEG基に、好ましくはEphB4リジンの-N-アミノ基又はN末端アミノ基を介して、共有結合した1つのEphB4ポリペプチド（モノPEG化EphB4）を含む。最も好ましくは、EphB4はEphB4リジンの-N-アミノ基及びN末端アミノ基からなる群からの1つのアミノ基のところでランダムにPEG化される。

【0009】

一実施形態において、本発明により提供されるPEG化ポリペプチドは生体内における血清中半減期が非修飾EphB4ポリペプチドよりも少なくとも50%、75%、100%、150%又は200%長い。別の一実施形態において、本発明により提供されるPEG化ポリペプチドはエフリンB2の活性を阻害する。特定の実施形態において、本発明により提供されるPEG化ポリペプチドはエフリンB2受容体のクラスター化、エフリンB2のリン酸化及び/又はエフリンB2キナーゼ活性を阻害する。

【0010】

驚くべきことに、本発明に係るモノPEG化EphB4は非修飾の可溶性EphB4ポリペプチド及びポリPEG化EphB4よりも治療上の利用性に対して優れた特性をもつことを見出した。但し、本発明ではPEGを2箇所以上有するポリPEG化EphB4も提供する。そのようなポリPEG化した形態も非修飾の形態よりは血清中半減期が向上する。

【0011】

ある実施形態において、可溶性EphB4ポリペプチドはEphrinB2結合性を実質的に減ずることなく半減期を向上させる第二の安定化ポリペプチドに安定的に結合する。安定化ポリペプチドは好ましくはヒト患者（又は獣医学的使用が企図される場合には動物患者）と免疫適合性のあるものであり、有意な生物学的活性がほとんど又は全くないものである。

【0012】

好ましい実施形態においては、安定化ポリペプチドはヒト血清アルブミン又はその一部である。ヒト血清アルブミンはEphB4ポリペプチドと安定的に共有結合又は非共有結合する。共有結合はヒト血清アルブミンとの同時翻訳融合体としてEphB4ポリペプチドが発現することで達成され得る。アルブミンの配列は可溶性EphB4ポリペプチドにおけるN末端、C末端又は非破壊的な内部位置で融合することができる。EphB4の露出したループはアルブミンの配列を挿入するのに適切な位置であろう。アルブミンは、例えば化学的架橋によって、EphB4ポリペプチドの翻訳後に結合してもよい。また、EphB4ポリペプチドは2以上のアルブミンポリペプチドと安定的に結合することもできる。ある実施形態においては、アルブミンはヒト血清アルブミン（HSA）及びウシ血清アルブミン（BSA）よりなる群から選択される。他の実施形態においては、アルブミンは自然に生じる変異体である

10

20

30

40

50

。好ましい実施形態においては、EphB4 - HSA融合体はエフリンB2及びEphB4の間の相互作用、エフリンB2又はEphB4のクラスター化、エフリンB2又はEphB4のリン酸化、或いはこれらの組合せを阻害する。別の一実施形態においては、EphB4 - HSA融合体は非修飾野生型ポリペプチドよりも生体内での安定性が高い。

【0013】

ある観点において、本発明はエフリンB2蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性エフリンB2ポリペプチドを提供する。該可溶性エフリンB2ポリペプチドはEphB4ポリペプチドに特異的に結合する。用語「可溶性」は単に、これらのポリペプチドが膜貫通領域を含有しないか、又は生理食塩水中のポリペプチドの溶解度を損なうのに充分な膜貫通領域の部分を含有しないことを表すために使用される。可溶性ポリペプチドは単量体として調製されるのが好ましく、EphB4等のリガンドへ結合するエフリンB2と競合し、エフリンB2の活性化で引き起こされるシグナルを阻害する。随意的に、可溶性ポリペプチドは、例えばFc融合蛋白質として発現することにより、又は別の多量体形成領域と融合することにより、多量体の形態で調製してもよい。これら多量体の形態は、文脈に応じてアゴニスト的又はアンタゴニスト的効果を有する複合的活性を有する。可溶性エフリンB2ポリペプチドは図66 (SEQ ID NO:11) により特定されるアミノ酸配列の残基1~225を有し得る。可溶性エフリンB2ポリペプチドは図3によって特定される配列を有し得る。斯界で周知のように、HEK293Tのような適切な細胞内で該エフリンB2ポリペプチドを発現するとリーダーペプチドを切断することになる。該切断は常に完全というわけでも、单一部位のところで完璧に一致するわけでもないが、エフリンB2は図66 (SEQ ID NO:11) に示す配列の最初の26個のアミノ酸を除去するように切断される傾向があることが知られている。従って、具体例として、本発明はEphB4に結合し、図66 (SEQ ID NO:11) のアミノ酸1~225に対応するアミノ酸配列を含有するプロセシングを受けていない可溶性エフリンB2ポリペプチドを提供する。該ポリペプチドは次の群(番号は図66のSEQ ID N 0:11に対応) : 26~225から選択される予測アミノ酸配列を有するプロセシングを受けた形態で使用してもよい。ある実施形態においては、可溶性エフリンB2ポリペプチドは、エフリンB2とEphB4の間の相互作用を阻害し得る。可溶性エフリンB2ポリペプチドは、エフリンB2又はEphB4のクラスター化又はリン酸化を阻害し得る。上述したように、可溶性エフリンB2ポリペプチドは単量体又は多量体融合蛋白質として調製し得る。可溶性ポリペプチドは1以上の修飾アミノ酸を含有してもよい。これらアミノ酸はプロテアーゼ消化耐性の増加等の望ましい性質に寄与し得る。10
20
30

【0014】

ある観点において、本発明はポリペプチド薬及び製薬上許容し得る担体を含有する医薬処方物を提供する。ポリペプチド薬は、例えば可溶性EphB4又はエフリンB2ポリペプチドを含めて、本明細書に記載の何れともすることができる。更なる処方物としては化粧組成物及び診断用キットが挙げられる。

【0015】

ある観点において、本発明は、細胞内でエフリンB2 / EphB4経路を通るシグナルの阻害方法を提供する。上記方法は、細胞を有効量のポリペプチド薬と接触させるステップを含む。ポリペプチド薬としては例えば(a) EphB4蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド(但し、上記EphB4ポリペプチドは単量体であり、エフリンB2ポリペプチドへ特異的に結合する); (b) エフリンB2蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド(但し、上記可溶性エフリンB2ポリペプチドは単量体であり、EphB4ポリペプチドへ高親和性で結合する)が挙げられる。40

【0016】

ある観点において、本発明は腫瘍の増殖速度を減少させるのに充分な量のポリペプチド薬を投与することを含む腫瘍の増殖速度を減少させる方法である。ポリペプチド薬は:(a) EphB4蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド(但し、上記EphB4ポリペプチドは単量体であってエフリンB2ポリペプチドへ特異的に結合する)。随意的に、上記EphB4ポリペプチドは血清中半減期を長くするためのPEG化、血清アル50

ブミン又はその両方といった追加的修飾を含有する。) ;

(b) エフリンB2蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド(但し、上記可溶性エフリンB2ポリペプチドは単量体であり、EphB4ポリペプチドへ高親和性で結合する。) ;

よりなる群から選択することができる。

隨意的に、腫瘍は同等組織の非癌化細胞よりも高いレベルでエフリンB2及び/又はEphB4を発現する細胞を含む。

【0017】

ある観点において、本発明は癌患者を治療する方法を提供する。上記方法はポリペプチド薬を患者へ投与することを含む。ポリペプチド薬は：

10

(a) EphB4蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド(但し、上記EphB4ポリペプチドは単量体であってエフリンB2ポリペプチドへ特異的に結合する。

隨意的に、上記EphB4ポリペプチドは血清中半減期を長くするためのPEG化、血清アルブミン又はその両方といった追加的修飾を含有する。) ;

(b) エフリンB2蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド(但し、上記可溶性エフリンB2ポリペプチドは単量体であり、EphB4ポリペプチドへ高親和性で結合する。) ;

よりなる群から選択することができる。

隨意的に、癌は同等組織の非癌化細胞よりも高いレベルでエフリンB2及び/又はEphB4を発現する癌細胞を含む。癌は転移性癌でもよい。癌は結腸癌、乳癌、中皮腫、前立腺腫瘍、扁平上皮細胞癌、カポジ肉腫及び白血病よりなる群から選択され得る。隨意的に、上記癌は血管形成に依存する癌又は血管形成に依存しない癌である。本発明で使用されるポリペプチド薬は、エフリンB2又はEphB4のクラスター化又はリン酸化を阻害し得る。ポリペプチド薬は、ポリペプチド薬と付加的又は相乗的に癌細胞を抑制する1種以上の追加的抗癌化学療法薬と共に投与してもよい。

20

【0018】

ある観点において、本発明は血管形成阻害方法を提供する。上記方法は血管形成の阻害に充分な量のポリペプチド薬と細胞を接触させるステップを含む。ポリペプチド薬は：

(a) EphB4蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド(但し、上記EphB4ポリペプチドは単量体であってエフリンB2ポリペプチドへ特異的に結合する。

30

隨意的に、上記EphB4ポリペプチドは血清中半減期を長くするためのPEG化、血清アルブミン又はその両方といった追加的修飾を含有する。) ;

(b) エフリンB2蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド(但し、上記可溶性エフリンB2ポリペプチドは単量体であり、EphB4ポリペプチドへ高親和性で結合する。) ;

よりなる群から選択することができる。

【0019】

ある観点において、本発明はポリペプチド薬を患者へ投与するステップを含む血管形成関連疾患の患者を治療する方法を提供する。ポリペプチド薬は：

(a) EphB4蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド(但し、上記EphB4ポリペプチドは単量体であってエフリンB2ポリペプチドへ特異的に結合する。

40

隨意的に、上記EphB4ポリペプチドは血清中半減期を長くするためのPEG化、血清アルブミン又はその両方といった追加的修飾を含有する。) ;

(b) エフリンB2蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド(但し、上記可溶性エフリンB2ポリペプチドは単量体であり、EphB4ポリペプチドへ高親和性で結合する。) ;

よりなる群から選択することができる。可溶性ポリペプチドは製薬上許容し得る担体と共に処方することができる。血管形成関連疾患又は望ましくない血管形成関連プロセスは血管形成依存性癌、良性腫瘍、炎症性障害、慢性関節リューマチ及び乾癬、眼性血管形成病、オスマーウェバー症候群、心筋性血管形成、プラーク新生血管形成、毛細血管拡張症、

50

血友病性関節、纖維血管腫、毛細血管拡張乾癬強皮症、化膿性肉芽腫、ルベオーシス、関節炎、糖尿病性新生血管形成及び脈管形成よりなる群から選択され得る。ポリペプチド薬は可溶性ポリペプチドと追加的又は相乗的に血管形成を抑制する少なくとも1種の追加的抗血管形成薬と共に投与してもよい。

【0020】

ある観点においては、本発明は癌又は血管形成関連障害の治療薬の製造におけるポリペプチド薬の使用を提供する。ポリペプチド薬は：

(a) EphB4蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド（但し、上記EphB4ポリペプチドは単量体であってエフリンB2ポリペプチドへ特異的に結合する。隨意的に、上記EphB4ポリペプチドは血清中半減期を長くするためのPEG化、血清アルブミン又はその両方といった追加的修飾を含有する。）；

(b) エフリンB2蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド（但し、上記可溶性エフリンB2ポリペプチドは単量体であり、EphB4ポリペプチドへ高親和性で結合する。）；

よりなる群から選択することができる。

【0021】

ある観点においては、本発明は下記：

(a) 患者中のEphB4及び/又はエフリンB2を発現する複数の癌細胞を有する腫瘍を特定するステップ；並びに

(b) ポリペプチド薬を患者へ投与するステップ；

を含有する。

ポリペプチド薬は：

(a) EphB4蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド（但し、上記EphB4ポリペプチドは単量体であってエフリンB2ポリペプチドへ特異的に結合する。隨意的に、上記EphB4ポリペプチドは血清中半減期を長くするためのPEG化、血清アルブミン又はその両方といった追加的修飾を含有する。）；

(b) エフリンB2蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を含有する可溶性ポリペプチド（但し、上記可溶性エフリンB2ポリペプチドは単量体であり、EphB4ポリペプチドへ高親和性で結合する。）；

よりなる群から選択することができる。

【0022】

ある観点においては、本発明はエフリンB2又はEphB4アンタゴニストでの治療が適切である腫瘍を特定する方法を提供する。上記方法は、腫瘍細胞中に1以上の下記特徴を検出する方法を含有してもよい：(a) EphB4蛋白質及び/又はmRNAの発現；(b) エフリンB2蛋白質及び/又はmRNAの発現；(c) EphB4遺伝子の遺伝子増幅（例：遺伝子複製数の増加）；又は(d) エフリンB2遺伝子の遺伝子増幅。上記特徴(a)～(d)の1以上を有する腫瘍細胞は、本発明のポリペプチド薬等の、エフリンB2又はEphB4アンタゴニストでの治療が適切であろう。

【0023】

驚くべきことに、本発明者は球状領域を欠失したEphB4ポリペプチドが異種移植モデル内の腫瘍増殖を実際に阻害し、血管内皮細胞の管形成を阻害し、及びエフリンB2によって活性化されるEphB4の自己リン酸化蛋白質(autokinase)活性を阻害することができるを見出した。如何なる作用機構にも拘束されることを望まないが、該ポリペプチドはEphB4の凝集を予防するか又は原形質膜からのEphB4の排除を（例：エンドサイトーシスにより）刺激すると予測される。しかして、本発明はEphB4蛋白質のフィプロネクチンタイプ3領域のアミノ酸配列を含有する単離された可溶性ポリペプチドを提供する。該ポリペプチドは好ましくはEphB4又はエフリンB2蛋白質の活性（例：凝集やキナーゼ活性）を阻害するような、とりわけヒト又は癌のマウス異種移植モデル中の腫瘍増殖を阻害するような生物学的活性を有する。該ポリペプチドは生体内又は細胞ベースのアッセイ系で脈管形成を阻害することもできる。該ポリペプチドはエフリンB2には結合せずに、EphB4蛋白質の

10

20

30

40

50

球状領域の全て又は機能性（例：エフリンB2結合性）部分を特異的に排除する場合がある。該ポリペプチドは好ましくは図65（SEQ ID NO:10）の配列のアミノ酸324-429及び／又は434-526に対応するアミノ酸、或いはこれと少なくとも90%、95%、98%、99%は同一の配列を含有する。該ポリペプチドの一例をSEQ ID NO:15に示す。該ポリペプチドは本明細書に記載の任意の方法で修飾してもよく、単量体として又は2以上のポリペプチドを含有する二量体若しくは多量体（例えばFc融合コンストラクト）として製造してもよい。二量体又は多量体が該ポリペプチドの効果を高めるのに望ましいであろう。該ポリペプチドを製造及び使用するための方法の全てはその他のEphB4ポリペプチドに関して本明細書で記載する方法と同様である。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0024】

I. 概説

本発明の一部は、エフリン／エフリンレセプター（エフリン/eph）経路を経由するシグナルが腫瘍生成に貢献することを発見したことに基づいている。発明者らは、腫瘍組織中のエフリンB2及びEphB4の発現を検出し、エフリン／エフリンレセプターを経由するシグナルをロックする抗腫瘍治療薬を開発した。更に、本発明は、EphB4及び／又はエフリンB2のポリペプチド-ベースの機能阻害のためのポリペプチド治療薬及び方法を提供する。従って、本発明はある観点において、癌並びに血管形成関連障害及び望ましくない血管形成関連プロセスを治療するために使用できる数多くのポリペプチド化合物（薬）を提供する。本発明者は修飾された形態のエフリンB2及びEphB4ポリペプチドを作り出し、該修飾形態が薬物動態学を顕著に向上させることを実証した。従って、本発明はある観点において、癌並びに血管形成関連障害及び望ましくない血管形成関連プロセスを治療するために使用できる数多くのポリペプチド化合物（薬）を提供する。

20

【0025】

ここで使用される用語「エフリン」及び「Eph」は、それぞれリガンド及びレセプターを指すものとして使用される。それらは種々の動物（例えば、ほ乳類／非ほ乳類、脊椎動物／非脊椎動物、ヒト等）のいずれかからでも得られる。この分野の命名法は急速に変化しており、ここで使用される用語法は、Eph命名法委員会による作業の結果として提案されたものであり、以前使用されていた名前と共にウェップサイト<http://www.eph-nomenclature.com>でアクセスできる。

30

【0026】

本発明の研究は、とりわけ実施例中では、エフリンB2及びEphB4に関する。しかし、本発明は、腫瘍中で発現されるそれぞれのファミリー中のエフリンリガンド及び／又はEphレセプターのいずれかを意図する。エフリン（リガンド）は2種の構造的タイプからなり、それは配列関係を基礎として、及び機能的にはそれらが2種の対応するレセプターサブグループを示す選択的結合を基礎として更に分けられる。構造的に、2種のエフリンが存在する。即ち、グリセロホスファチジルイノシトール（GPI）リンクエージにより膜結合するものと、膜貫通領域を通して結合するものである。従来リガンドは、選択的にEph Aレセプターへ結合するGPI-結合された蛋白質であるエフリン-Aサブクラス、及び一般的に選択的にEph Bレセプターへ結合する膜貫通蛋白質であるエフリン-Bサブクラスへ分割されている。

40

【0027】

Ephファミリーレセプターは、レセプター蛋白質-チロシンキナーゼのファミリーであり、それはエリスロポエチン-生産ヒト肝細胞性癌細胞系中でのその発現のために命名されたEphに関係する。それらはこれらの細胞外領域配列の関連性及びそれらのエフリン-A蛋白質又はエフリン-B蛋白質へ選択的に結合する能力を基礎として2個のサブグループへ分離される。エフリン-A蛋白質と選択的に相互作用するレセプターは、Eph Aレセプターであり、エフリン-B蛋白質と選択的に相互作用するものはEph Bレセプターである。

【0028】

Ephレセプターは、リガンド結合球状領域、その次に一対のフィブロネクチンタイプIII

50

リピートが続くシステインリッチ領域から構成される細胞外領域を有する（例えば、図16参照）。細胞質領域は、2種の蛋白質チロシンキナーゼ領域、即ち無菌性-Mチーフ(SAM)及びPDZ-領域結合モチーフの保存されたチロシン残基を含有する膜近傍(juxtamembrane)領域から構成される。EphB4は膜結合性リガンドエフリンB2に対して特異的である(Sakano, S.ら1996; Brambilla R.ら1995)。エフリンB2は、膜貫通領域及び5個の保存されたチロシン残基及びPDZ領域を有する細胞質領域を有するEphリガンドの種類に属する。Ephレセプターは、クラスター化され、膜へ結合したエフリンの結合により活性化され(Davis S.ら、1994)、レセプターを発現している細胞及びリガンドを発現している細胞間を接触することがEph活性化に要求されることを示す。

【0029】

10

リガンド結合において、Ephレセプターは二量体化し、自己リン酸化して膜近傍チロシン残基を完全活性化させる(Kalo MSら、1999; BinnsKS、2000)。更にEphレセプターを経由するシグナルに加えて、リバースシグナルがエフリンBsを経由して発生できる。エフリンのEph結合(engagement)は、保存された細胞内チロシンの急速なリン酸化を生じ(Bruckner K、1997)、PDZ結合蛋白質のレクルートメントをいくらか遅延させる(Palmer A 2002)。近年、いくつかの研究でEph/エフリンの高い発現は腫瘍増殖、腫瘍原性、及び転移の可能性の増大に関係することが示された(Easty DJ、1999; Kiyokawa E、1994; Tang XX、1999; Vogt T、1998; Liu W、2002; Stephenson SA、2001; Steube KG 1999; Bercia G、1996)。

【0030】

20

ある実施形態において、本発明はエフリンB2、EphB4、又は両方の活性を阻害するポリペプチド治療薬を提供する。ここで使用される用語「ポリペプチド治療薬」又は「ポリペプチド薬」は、エフリンB2/EphB4経路を経由するシグナルをブロックするいずれのポリペプチドをも含む総称名である。本発明の好ましいポリペプチド治療薬は、エフリンB2又はEphB4の可溶性ポリペプチドである。本発明の別の好ましいポリペプチド治療薬は、エフリンB2又はEphB4へ結合するアンタゴニスト抗体である。例えば、これらポリペプチド治療薬は、エフリンB2又はEphB4の機能を阻害でき、エフリンB2及びEphB4間の相互作用を阻害でき、エフリンB2又はEphB4のリン酸化を阻害でき、又はエフリンB2のEphB4への結合に対する下流シグナルイベントのいずれかを阻害できる。そのようなポリペプチドには、例えばPEG化により又は血清アルブミン蛋白質と安定に結合することにより、血清中半減期を改善するように修飾されているEphB4又はエフリンB2を挙げることができる。

【0031】

30

II. 可溶性ポリペプチド

ある観点において、本発明はエフリンB2蛋白質の細胞外領域を含有する可溶性ポリペプチド（ここでエフリンB2可溶性ポリペプチドと言う）又はEphB4蛋白質の細胞外領域を含有する可溶性ポリペプチド（ここでEphB4可溶性ポリペプチドと言う）に関する。好ましくは、本発明の可溶性ポリペプチドは単量体であり、高親和でエフリンB2又はEphB4へ結合できる。特に、本発明のEphB4可溶性ポリペプチドは、EphB4蛋白質の球状領域を含有する。一例としてEphB4可溶性ポリペプチドを図1、2及び15に示す。エフリンB2可溶性ポリペプチドの一例は図3及び14に示す。

40

【0032】

ここで使用される本発明の可溶性ポリペプチドは、EphB4可溶性ポリペプチド又はエフリンB2可溶性ポリペプチドのフラグメント、機能的変異体及び修飾体を含む。これらの本発明の可溶性ポリペプチドのフラグメント、機能的変異体及び修飾体は、EphB4、エフリンB2又は両方の機能をアンタゴナイズする。

【0033】

ある実施形態において、本発明の可溶性ポリペプチドの単離されたフラグメントは、EphB4又はエフリンB2可溶性ポリペプチドをエンコードする核酸の対応するフラグメントから組み換え的に生産されるポリペプチドのスクリーニングにより得ることができる。更に、フラグメントは、従来のMerrifield固体相(合成法)f-Moc又はt-Boc化学等の

50

公知の技術を使用して化学的に合成できる。フラグメントは（組み換えるに又は化学合成により）生産され、EphB4又はエフリンB2の機能を阻害するように働くことのできるそれらのペプチジルフラグメントを特定するために、例えば血管形成又は腫瘍増殖を阻害するフラグメントの能力の試験により試験されてもよい。

【0034】

ある実施形態において、EphB4可溶性ポリペプチドの機能的変異体は、図65 (SEQ ID NO:10) によって特定されるアミノ酸配列の残基1-197, 29-197, 1-312, 29-132, 1-321, 29-321, 1-326, 29-326, 1-412, 29-412, 1-427, 29-427, 1-429, 29-429, 1-526, 29-526, 1-537及び29-537に少なくとも90%、95%、97%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含有する。該ポリペプチドはプロセシングを受けた形態であってもよく、従って、ある実施形態においては、EphB4可溶性ポリペプチドは図65 (SEQ ID NO:10) によって特定されるアミノ酸配列の残基16-197, 16-312, 16-321, 16-326, 16-412, 16-427, 16-429, 16-526及び16-537に少なくとも90%、95%、97%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含有する。
10

【0035】

別の実施形態においては、エフリンB2可溶性ポリペプチドの機能的変異体は、図66 (SEQ ID NO:11) によって特定されるアミノ酸配列の残基1-225に少なくとも90%、95%、97%、99%又は100%同一である配列を含有するか、或いは、図66 (SEQ ID NO:11) によって特定されるアミノ酸配列の残基26-225に少なくとも90%、95%、97%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含有するようなプロセシングを受けた形態である。
20

【0036】

ある実施形態において、本発明は治療用若しくは予防的効能、又は安定性（例えば、ex vivoでの貯蔵寿命及びin vivoでの耐蛋白質分解性変質（degradation））の強化を目的として、本発明の可溶性ポリペプチドの構造を改質することによる機能的変異体の製造も意図する。これら改質可溶性ポリペプチドは天然EphB4又はエフリンB2可溶性ポリペプチドの機能的均等物と考えられる。改質可溶性ポリペプチドは、例えばアミノ酸の置換、欠失又は添加により生産できる。本発明では、例えばロイシンをイソロイシン又はバリンと、アスパルテートをグルタメートと、スレオニンをセリンとの単離された置換、又はそのアミノ酸と構造的に関係するアミノ酸との同様な置換（例えば、保存的突然変異）は分子を生じる生物学的活性へ大きな影響を及ぼさないと理解することは当然である。保存的置換とは、それらの側鎖に関係するアミノ酸のファミリー内で置換することである。
30

【0037】

本発明は更に、EphB4又はエフリンB2可溶性ポリペプチドの一連の組み合わせ突然変異体の製造方法、並びに突然変異体のトランケーション方法、機能的変異体配列の特定に特に有用である方法を意図する。組み合わせライブラリー等のスクリーニングの目的は、例えば、EphB4、EphB2又は両方のアンタゴニストとして作用する可溶性ポリペプチド変異体の製造にある。それは、組み合わせ由来の変異体が天然可溶性ポリペプチドに関する選択的能力を有するように生成できる。これら変異体蛋白質は、組み換え型DNA構築物から発現された場合、遺伝子治療法プロトコル中に使用できる。同様に、突然変異誘発は、対応する野生型可溶性ポリペプチドとは劇的に異なる細胞内半減期を有する変異体を生み出すことが出来る。例えば、変異した蛋白質は、蛋白質分解性変質又は本発明の蛋白質（例えば、可溶性ポリペプチド）の分解さもなければ活性化を生じる他の細胞性プロセスに対してより安定又はより不安定のいずれにも設定できる。これら変異体、及びそれらをエンコードする遺伝子は、それらの半減期の調整により本発明の可溶性ポリペプチドレベルを変えるために使用できる。例えば、短い半減期は、より一時的な生物学的効果を生じ、誘導可能な発現システムの一部である場合には、細胞中の組み換え型可溶性ポリペプチドレベルのより精密なコントロールを可能にする。上記のように、これら蛋白質、及び好ましくはそれらの組み換え型核酸構築物は、遺伝子治療プロトコル中で使用できる。
40

【0038】

能力のある (potential) ホモログのライブラリーが縮重 (degenerate) オリゴヌクレオチド配列からの生成可能である方法が多く知られている。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動DNA合成機中で実施でき、及び合成遺伝子は次に発現用の適切な遺伝子へライゲートされる。遺伝子の縮重セットの目的は、1の混合物中に能力のある可溶性ポリペプチド配列の目的とするセットをエンコードする全ての配列を提供することである。縮重オリゴヌクレオチドの合成法は当分野で公知である（例えば、Narang、SA (1983) *tetrahedron* 39:3; Itakuraら、(1981) 組み換え型DNA、*Proc.第3回クリープランドシンポジウム*、Macromolecules、A G Walton編、アムステルダム:Elsevier pp273-289; Itakuraら、(1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakuraら、(1984) *Science* 198: 1056; Ikeら、(1983) 「核酸」Res. 11:477参照）。これら技術は、他の蛋白質の直接的発展に使用されてきた（例えば、Scottら、(1990) *Science*、249:386-390; Robertsら、(1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlinら、(1990) *Science*、249:404-406; Cwirlaら、(1990) *PNAS USA* 87:6378-6382; 並びに米国特許番号第5223409号、5198346号、及び5096815号参照）。

【0039】

又、他の突然変異誘発の形も、組み合わせライブラリーを生成するために使用出来る。例えば、可溶性ポリペプチド変異体（例えば、アンタゴニスト体）は、合成してライブラリーから下記方法により単離できる：例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発等を使用したスクリーニング (Rufら、(1994) *Biochemistry* 33: 1565-1572; Wangら、(1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balintら、(1993) *Gene* 137: 109-118; Grodbergら、(1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashimaら、(1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowmanら、(1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; 及びCunninghamら、(1989) *Science* 244:1081-1085); リンカースキャニング突然変異誘発 (Gustinら、(1993) *Virology* 193:653-660; Brownら、(1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnightら、(1982) *Science* 232:316); 飽和突然変異誘発 (Meyersら、(1986) *Science* 232:613); PCR突然変異誘発 (Leungら、(1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); 又は化学突然変異誘発等のランダム突然変異誘発 (Millerら、(1992) 「細菌遺伝子学短期コース」CSHL出版、コールドスプリングハーバー、NY; 及びGreenerら、(1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34) 合成できる。リンカースキャニング突然変異誘発は、好ましくは組み合わせ的設定で、本発明の可溶性ポリペプチドの短縮された（生物活性な）形を特定するために魅力的な方法である。

【0040】

点突然変異及びトランケーションにより構築された（遺伝子）組み合わせライブラリーの遺伝子生成物のスクリーニング、詳しくは所定の性質を有する遺伝子生成物用のcDNAライブラリーのスクリーニング用には広い範囲の技術が当分野で公知である。これら技術は、本発明の可溶性ポリペプチドの組み合わせ突然変異誘発により作成された遺伝子ライブラリーの素早いスクリーニングに一般的に適用できる。最も広く使用されている巨大遺伝子ライブラリーのスクリーニング技術として一般的には、遺伝子ライブラリーの複製可能な発現ベクターへのクローニング、ベクターのライブラリーを生じる適切な細胞の形質変換、及び、目的とする活性の検出がその生成物が検出される遺伝子をエンコードするベクターの比較的容易な単離を促進する条件下での組み合わせ的遺伝子の発現が挙げられる。組み合わせ突然変異誘発技術により作成された大量の縮重配列をスクリーンするために必要な、それぞれの下記例示的アッセイが、高スループット分析に適している

【0041】

ある実施形態において、本発明の可溶性ポリペプチドは、ペプチド及びペプチドミメティック等の小分子を含む。ここで使用される用語「ペプチドミメティック」は、化学的に改質ペプチド及び非天然アミノ酸、ペプトイド等を含むペプチド様分子を包含する。ペプチドミメティックは、元のペプチドへ被験者へ投与された際に強化された安定性を含む種々の利点を与える。ペプチドミメティックの特定方法は当分野で公知であり、能力のあるペプチドミメティックのライブラリーを含むデータベースのスクリーニングを含む。例えば、ケンブリッジ構造データベースは、公知の結晶構造を有する300000を超える化

合物のコレクションを含む (Allenら、Acta Crystallogr.セクションB、35:2331 (1979))。ターゲット分子の非結晶構造が可能な場合、ある構造は例えばプログラムCONCORD (商標) (Rusinkoら、J.Chem.Inf.Comput.Sci.29:251 (1989))を使用して製造できる。別のデータベース、「Available Chemicals Directory」(Molecular Design Limited社製、情報システム；サンレアンドロ カリフォルニア)は、市販されている約100000の化合物を含有し、それらも又、EphB4又はエフリンB2可溶性ポリペプチドの能力のあるペプチドミメティックを特定できる。

【0042】

ある実施形態において、本発明の可溶性ポリペプチドは、更に翻訳後修飾を含有してもよい。翻訳後の蛋白質修飾の例にはリン酸化、アセチル化、メチル化、ADP-リボシル化、ユビキチン化、グリコシル化、カルボニル化、SUMO化、ビオチニル化、又はポリペプチド側鎖若しくは疎水性基の付加が挙げられる。その結果、修飾された可溶性ポリペプチドは脂質、多糖若しくは单糖、及びリン酸等の非アミノ酸要素を含有してもよい。これら非アミノ酸要素が可溶性ポリペプチドの機能に与える効果については、EphB4又はエフリンB2機能でのそのアンタゴナイス的性質、例えばそれが阻害的に血管形成又は腫瘍増殖に影響するか、を試験することができる。

【0043】

本発明の一具体例において、主題の可溶性ポリペプチドの修飾形態は主題の可溶性ポリペプチドに結合した非蛋白質性ポリマーを含有する。一具体例においては、該ポリマーは米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号又は同第4,179,337号に記載のような、ポリエチレン glycol ("PEG")、ポリプロピレン glycol、又はポリオキシアルキレンである。本発明の修飾ポリペプチドの例にはPEG化された可溶性エフリンB2及びPEG化された可溶性EphB4が挙げられる。

【0044】

PEGは周知の水溶性ポリマーであって、商業的に入手可能であり又は斯界に周知の方法 (Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161) によってエチレン glycol の開環重合により調製可能である。用語 "PEG" は、PEGの末端における大きさや修飾に関係なく、任意のポリプロピレン glycol 分子を包含するように広く使用され、次式：

$X-O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH$ (1) (式中、nは20~2300であり、XはH又は末端修飾 (例: C₁₋₄アルキル) である。一実施形態において、本発明のPEGは一端がヒドロキシ若しくはメトキシ、すなわち、H又はCH₃ ("メトキシ" PEG) で終了する。PEGは結合反応に必要な化学基 (分子の化学合成によるもの又は分子の部分に最適距離を与えるためのスペーサー) を更に含有することができる。加えて、PEGは相互に結合した1又は2以上のPEG側鎖から構成されることができる。分枝状PEGは例えばポリエチレンオキシドを種々のポリオール、例えばグリセロール、ペンタエリスリトール及びソルビトールに付加することで調製可能である。分枝状PEGは例えばEP-A 0 473 084及び米国特許第5,932,462号に記載されている。PEGの一形態としては、二つのPEG側鎖 (PEG2) がリジンの第1級アミノ基を介して結合しているものが挙げられる (Monfardini, C, et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69)。

【0045】

ペプチド又は蛋白質へのPEG共役は一般にPEGの活性化と、活性化されたPEG中間体の目標となる蛋白質 / ペプチドへの直接的な連結又はリンカー (リンカーはその後活性化されて目標となる蛋白質 / ペプチドへ連結する) への連結を伴う (Abuchowski, A. et al., J. Biol. Chem., 252, 3571 (1977) and J. Biol. Chem., 252, 3582 (1977), Zalipsky, et al., and Harris et. al., in: Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications; (J. M. Harris ed.) Plenum Press: New York, 1992; Chap.21 and 22参照)。PEG含有EphB4は共役蛋白質としても知られているが、結合PEG分子を欠いている蛋白質は非共役と呼ぶことができるに注意されたい。

10

20

30

40

50

【0046】

任意の分子量のPEGを実用上望ましいように使用することができ、例えば約1,000ダルトン(Da)~100,000Da(nは20~2300)として、可溶性EphB4又はエフリンB2ペプチドに共役させることができる。PEG中の反復単位“n”はダルトンで表された分子量に対する近似である。活性化されたリンカー上のPEGの連結分子量は医薬用途に適している。従って、一実施形態においては、PEG分子の分子量は100,000Daを超えない。例えば、リンカーにPEG分子が三つ結合しているとき、各PEG分子の分子量が同じ12,000Da(各nは約270)である場合は、リンカー上のPEGの全分子量は約36,000Da(nの合計は約820)である。リンカーに結合したPEGの分子量は異なる可能性もあり、例えば、リンカー上の三分子のうち、二つのPEG分子がそれぞれ5,000Da(各nは約110)で、一つのPEG分子が12,000Da(nは約270)となり得る。

【0047】

本発明の具体例では、EphB4ポリペプチドは次式： $-CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$ で表される一つのポリ(エチレンギリコール)基に共有結合し、ポリ(エチレンギリコール)基の-CO(カルボニル)はEphB4のアミノ基の一つとアミド結合を形成する。ここで、Rは低級アルキルであり、xは2又は3であり、mは約450~約950であり、n及びmは共役体の分子量からEphB4蛋白質の分子量を引いた値が約10~40kDaとなるように選択される。一実施形態においては、EphB4におけるリジンの-Amino基が利用可能な(遊離)アミノ基である。

【0048】

上記共役体はより具体的には次式(I)： $P-NHCO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$ (I)で表すことができる。式中、Pは本明細書に記載のEphB4蛋白質(すなわち、式(I)に示すカルボニルとアミド結合を形成する1又は2以上のアミノ基が存在しないもの)の基であり、Rは低級アルキルであり、xは2又は3であり、mは約450~約950であって、共役体の分子量からEphB4蛋白質の分子量を引いた値が約10~40kDaとなるように選択される。本明細書においては、所与の範囲の“m”は配向性に関する意味を有する。“m”的範囲は何れの場合もPEG基の分子量によって正確に測定される。

PEG化したEphB4をどのように治療上使用するのか、望まれる投薬量、循環時間、タンパク質加水分解に対する耐性、免疫原性及び他の考慮事項に基づき、当業者であればPEGの適切な分子量を選択することができる。PEGについての議論及び蛋白質の特性を高めるためのPEGの使用に関しては、「N. V. Katre, Advanced Drug Delivery Reviews 10: 91-114 (1993)」を参照されたい。

【0049】

本発明の一実施形態においては、PEG分子は活性化されてEphB4上のアミノ基、例えばリジンと反応することができる(Bencham C. O. et al., Anal. Biochem., 131, 25 (1983); Veronese, F. M. et al., Appl. Biochem., 11, 141 (1985).; Zalipsky, S. et al., Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, adrs 9-110 ACS Symposium Series 469 (1999); Zalipsky, S. et al., Europ. Polym. J., 19, 1177-1183 (1983); Delgado, C. et al., Biotechnology and Applied Biochemistry, 12, 119-128 (1990)).

【0050】

一具体例では、PEGの炭酸エステルを使用してPEG-EphB4蛋白質の共役体を形成することができる。PEGとの反応にN,N'-ジスクシンイミジルカーボネート(DSC)を使用して活性なPEG-スクシンイミジルカーボネート混合物を形成し、次いでリンカーノの求核性基又はEphB4のアミノ基と反応させることができる(米国特許第5,281,698号及び米国特許第5,932,462号)。類似の反応において、1,1'-(ジベンゾトリアゾリル)カーボネート及びジ(2-ピリジル)カーボネートをPEGと反応させてPEG-ベンゾトリアゾリル及びPEG-ピリジルが混合したカーボネートを形成することができる(米国特許第5,382,657)。

【0051】

10

20

30

40

50

一実施形態においては、1又は2以上のリジン残基を導入する部位特異的突然変異誘発の導入によって、PEG化のための追加部位が導入される。例えば、1又は2以上のアルギニン残基をリジン残基に突然変異させてもよい。別の実施形態においては、EphB4上のアミノ酸を修飾することによって追加的なPEG化部位を化学的に導入する。一具体例では、EphB4内のカルボキシル基をジアミノブタンと共に、カルボキシルをアミド化する(Li et al., Anal Biochem. 2004;330(2):264-71)。この反応は水溶性カルボジイミドである1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドが触媒することができる。その後、得られるアミドをPEGと共に作用させることができる。

【0052】

EphB4のPEG化は公知の方法に従って、例えばEphB4と親電子的活性PEG(供給元: Shearwater Corp., USA, www.shearwatercorp.com)の反応により、行うことができる。
本発明の好ましいPEG試薬は例えばN-ヒドロキシスクシンイミジルプロピオネート(PEG-SPA)、ブタノアート(PEG-SBA)、PEG-スクシンイミジルプロピオナート又は分枝状N-ヒドロキシスクシンイミド、例えばmPEG2-NHS(Monfardini, C, et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69)である。該方法を使用することで、EphB4のリジンのアミノ基又はEphB4のN末端アミノ基のところでPEG化することができる。

【0053】

別の実施形態においては、PEG分子はEphB4上のスルフヒドリル基に結合し得る(Sartore, L., et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 27, 45 (1991); Morpurgo et al., Biocon. Chem., 7, 363-368 (1996); Goodson et al., Bio/Technology (1990) 8, 343; U.S. Patent No. 5,766,897)。米国特許第6,610,281号及び同第5,766,897号はスルフヒドリル基に結合可能な反応性PEG類の例を記載している。

【0054】

PEG分子がEphB4上のシステイン残基に共役する場合、ある実施形態においてはシステイン残基はEphB4に元々存在する一方で、他の実施形態においては、1又は2以上のシステイン残基がEphB4内に構築される。EphB4をコードする配列内に突然変異を導入することによってシステイン残基を生じさせてもよい。例えば、1又は2以上のアミノ酸残基をシステインに突然変異させることによって達成され得る。システイン残基に突然変異させるのに好ましいアミノ酸としてはセリン、スレオニン、アラニン及びその他の親水性残基が挙げられる。好ましくは、システインに突然変異されるべき残基は表面に露出した残基である。蛋白質の一次配列に基づいて残基の表面アクセス性を予測するためのアルゴリズムは斯界で周知である。或いは、表面残基はEphB4及びEphB2のアミノ酸配列を比較することによって予測することができる。EphB2の結晶構造は解明されており(Himanen et al., Nature. (2001) 20-27;414(6866):933-8)、表面露出残基が特定されたためである。一実施形態においては、システイン残基をN-及び/又はC-末端のところ若しくはその近傍で、又はループ領域内でEphB4内に導入する。ループ領域はEphB4とEphB2の配列を比較することで特定することができる。

【0055】

ある実施形態においては、PEG化したEphB4はN末端アミノ酸のアミノ基に共有結合したPEG分子を含有する。部位特異的なN末端還元的アミノ化が「Pepinsky et al., (2001) JPET, 297,1059」及び米国特許第5,824,784号に記載されている。他の利用可能な求核性アミノ基を利用した蛋白質の還元的アミノ化のためのPEG-アルデヒドの使用が米国特許第4,002,531号、「Wieder et al., (1979) J. Biol. Chem. 254,12579」及び「Chamow et al., (1994) Bioconjugate Chem. 5, 133」に記載されている。

【0056】

別の実施形態においては、PEG化したEphB4では、1又は2以上のPEG分子がリンカーに共有結合しており、リンカーはEphB4のN末端のところでアミノ酸残基のアミノ基に結合している。該方法が米国特許出願公開第2002/0044921号及びW094/01451に開示されている。

10

20

30

40

50

【0057】

一実施形態においては、EphB4はC末端のところでPEG化される。一具体例では、C末端アジド - メチオニンの導入及びその後のシュタウディンガー反応を介したメチル - PEG - トリアリールホスフィン化合物の共役により蛋白質がC末端のところでPEG化される。このC末端共役法は「Cazalis et al., C-Terminal Site-Specific PEGylation of a Truncated Thrombomodulin Mutant with Retention of Full Bioactivity, Bioconjug Chem. 2004; 15(5):1005-1009」に記載されている。

【0058】

EphB4のモノPEG化はW094/01451に記載の一般的方法に従って行うことができる。W094/01451は修飾された末端アミノ酸の炭素の反応性基をもつ組み換えポリペプチドを調製する方法を記載している。該方法は、組み換えポリペプチドを形成し、これをN末端アミン及びC末端カルボキシルのところで生物学的に付加された1又は2以上の保護基により保護する工程を含む。次いで、該ポリペプチドを化学的保護剤と反応させることで選択的に反応性側鎖基を保護し、これによって側鎖基が修飾されるのを防止する。次いで、該ポリペプチドを生物学的保護基に特異的な切断試薬を用いて切断し、保護されていない末端アミノ酸の炭素の反応性基を形成する。この保護されていない末端アミノ酸の炭素の反応性基を化学的修飾剤で修飾する。この保護された側鎖をもつ修飾された單一コピーポリペプチドを側鎖基のところで脱保護し、末端修飾された組み換え型の單一コピーポリペプチドを形成する。該方法における工程の数及び順序を変更し、ポリペプチドのN及び/又はC末端アミノ酸のところで選択的な修飾を行うことができる。

【0059】

共役反応において、活性化されたPEGに対するEphB4(又はエフリンB2)の比率は約1:0.5~1:50、約1:1~1:30又は約1:5~1:15とすることができます。本方法においてはEphB4へのpEGの共有付加を触媒するために種々の水性緩衝剤を使用することができる。一実施形態においては、使用する緩衝剤のpHは約7.0~9.0である。別の一実施形態では、pHは僅かに塩基性であり、例えば約7.5~8.5である。中性のpHに近いpKaをもつ緩衝剤を使用してもよい(例:リン酸塩緩衝剤)。

【0060】

一実施形態においては、モノ-PEG-EphB4を調製するための温度範囲は約4~40、約18~25である。別の一実施形態では、温度は室温である。

【0061】

PEG化反応は3~48時間、又は10~24時間続けることができる。反応はEphB4、モノ-PEG-EphB4及びポリ-PEG-EphB4を区別するためにSE-HPLCを使用してモニタリングするモノ-PEG-EphB4はジ-PEG-EphB4の前に形成されることに注意すべきである。モノ-PEG-EphB4濃度が横ばい状態に達したとき、未反応のPEGと反応する冷却剤を添加することにより反応を終了させることができる。ある実施形態では、冷却剤はグリシン、システイン又はリジンのような遊離アミノ酸である。

【0062】

斯界に公知の慣例的な分離及び精製技術、例えばサイズ排除(例:ゲルfiltration)及びイオン交換クロマトグラフィを使用することでPEG化されたEphB4又はエフリンB2生成物を精製することができる。生成物はSDS-PAGEを用いて分離してもよい。分離され得る生成物にはモノ-、ジ-、トリ-、ポリ-、及び未-PEG化EphB4、並びに遊離PEGが含まれる。モノ-PEG共役体の約90%は収率と活性の良好なバランスを示す。例えば共役体の少なくとも92%又は少なくとも96%モノ-PEG種である組成物が望ましいであろう。本発明の一実施形態においては、モノ-PEG共役体のパーセンテージは90~96%である。

【0063】

一実施形態においては、本発明のPEG化されたEphB4蛋白質は1、2又は3以上のPEG部分を含有する。一実施形態においては、PEG部分は蛋白質の表面上にある及び/又はエフリンB2に接触する表面から離れているアミノ酸残基に結合する。一実施形態においては、PEG-EphB4内にあるPEGの合算又は全体分子量は約3,000Da~60,000Daであり、

10

20

30

40

50

随意的に約10,000Da～36,000Daである。一実施形態においては、PEG化されたEphB4内にあるPEGは実質的に線状で直鎖のPEGである。

【0064】

本発明の一実施形態においては、PEG化されたEphB4又はエフリンB2内のPEGは、ヒドロキシアミンでアッセイ（例えば、450mMのヒドロキシルアミン（pH 6.5）で8～16時間室温）しても、PEG化したアミノ酸残基から加水分解せず、安定である。一実施形態においては、組成物の80%超、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%が安定なモノ-PEG-EphB4である。

【0065】

別の一実施形態においては、本発明のPEG化したEphB4蛋白質は非修飾の蛋白質nに対して好ましくは少なくとも25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%の生物学的活性を保持することとなるだろう。一実施形態においては、生物学的活性とはエフリンB2に結合する能力を指す。一具体例では、PEG化したEphB4蛋白質はPEG化していないEphB4蛋白質に対してエフリンB2への結合性が上昇する。

【0066】

好ましい実施形態においては、PEG-EphB4は非修飾蛋白質に対して半減期($t_{1/2}$)が長くなる。好ましくは、PEG-EphB4の半減期は少なくとも10%，20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%，100%，125%，150%，175%，200%，250%，300%，400%又は500%，又は更には1000%向上する。ある実施形態においては、蛋白質の半減期は緩衝塩溶液又は血清中のようなin vitroで決定される。他の実施形態においては、蛋白質の半減期は、動物の血清又はその他の体液中での蛋白質の半減期のような、生体内での半減期である。

【0067】

ある観点において、主題の可溶性ポリペプチドの機能的変異体又は修飾形態には、可溶性ポリペプチドの少なくとも一部及び1又は2以上の融合領域の部分を有する融合蛋白質が含まれる。融合領域の周知例には、限定的ではないが、ポリヒスチジン、Glu-Glu、グルタチオンS転移酵素(GST)、チオレドキシン、プロテインA、プロテインG、及び免疫グロブリン重鎖定常領域(Fc)、マルトース結合蛋白質(MBP)が挙げられ、これらは親和性クロマトグラフィによる融合蛋白質の単離に特に有用である。アフィニティー精製のために、親和性クロマトグラフィ用の関連するマトリックス、例えばグルタチオン-、アミラーゼ-、及びニッケル-又はコバルト-共役樹脂が使用される。斯界で周知の他の融合領域は緑色蛍光蛋白質(GFP)である。また、融合領域は特定の抗体が利用できる短いペプチド配列である“エピトープ標識”を含有する。特定のモノクローナル抗体が容易に利用できる周知のエピトープ標識にはFLAG、インフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)、及びc-myc標識が挙げられる。あるケースでは、融合領域はファクターXaやトロンビンといったプロテアーゼ切断部位を有し、これによって関連するプロテアーゼは融合蛋白質を部分的に消化することが可能となり、組み換え蛋白質をそこから遊離する。その後、遊離された蛋白質はクロマトグラフ分離により融合領域から単離することができる。

【0068】

ある実施形態においては、本発明の可溶性ポリペプチドは可溶性ポリペプチドを安定化することが可能な1又は2以上の修飾を含有する。例えば、該修飾によって可溶性ポリペプチドのin vitroでの半減期が向上し、可溶性ポリペプチドの循環系半減期が向上し、又は可溶性ポリペプチドの蛋白分解劣化が減少する。

【0069】

更なる実施形態においては、本発明の可溶性ポリペプチドは細胞毒性薬に融合する。この方法では、融合体は細胞毒性薬が特定の組織又は細胞（例：腫瘍組織又は細胞）を標的とするように作用し、罹患細胞の数を減少させる。斯かる方法により癌及び血管形成関連障害に伴う症状を減少することができる。細胞毒性薬には、限定的ではないが、ジフテリアA鎖、外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、クルシン、クロチン、フェノマイシン、エノマイシン等、及び放射性化学物質が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0070】

ある実施形態においては、本発明の可溶性ポリペプチドはその他の治療用蛋白質に融合してもよく、又は薬物動態学的目的のためにFc若しくは血清アルブミンのような別の蛋白質に融合してもよい。例えば、米国特許第5,766,883号及び同第5,876,969号を参照のこと（これら両方を本明細書に援用する。）。ある実施形態においては、本発明の可溶性ポリペプチドFc変異体に融合する。一具体例においては、可溶性ポリペプチドは同質二量体化しないFc（例えば他のFc鎖とシステイン結合を形成するシステイン残基が欠失したもの）に融合する。

【0071】

ある実施形態においては、本発明の修飾されたポリペプチドは免疫グロブリンのFc領域をもつ融合蛋白質を含有する。知られていることだが、各免疫グロブリンの重鎖不变領域は4又は5つのドメインを有する。該ドメインは順に、CH1-ヒンジ-CH2-CH3（-CH4）と名付けられている。重鎖ドメインのDNA配列は免疫グロブリンのクラス間で交差相同性を有する。例えば、IgGのCH2ドメインはIgA及びIgDのCH2ドメインと、そしてIgM及びIgEのCH3ドメインと相同性がある。本明細書では、用語“免疫グロブリンFc領域”とは、免疫グロブリン鎖不变領域のカルボキシル末端部分、好ましくは免疫グロブリン重鎖不变領域、又はその一部を意味するものとして理解される。例えば、免疫グロブリンFc領域は、1) CH1ドメイン、CH2ドメイン及びCH3ドメイン、2) CH1ドメイン及びCH2ドメイン、3) CH1ドメイン及びCH3ドメイン、4) CH2ドメイン及びCH3ドメイン、又は5) 2以上のドメインの組合せ及び免疫グロブリンヒンジ領域を含有し得る。好ましい実施形態においては、免疫グロブリンFc領域は免疫グロブリンヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインを少なくとも含有し、好ましくはCH1ドメインを欠くものである。

10

20

【0072】

一実施形態においては、重鎖不变領域が誘導される免疫グロブリンのクラスはIgG(Ig)(サブクラス1, 2, 3又は4)である。ヒトFcガンマ-1のヌクレオチド及びアミノ酸配列がSEQ ID NOS:5及び6に記載されている。マウスFcガンマ-2aのヌクレオチド及びアミノ酸配列がSEQ ID NOS:7及び8に記載されている。免疫グロブリンのその他のクラスであるIgA(Ig), IgD(Ig), IgE(Ige)及びIgM(Igm)を使用してもよい。適切な免疫グロブリン重鎖不变領域の選択について、詳細が米国特許第5,541,087号及び同第5,726,044号に記載されている。特定の結果を達成するために幾つかの免疫グロブリンのクラス及びサブクラスから特定の免疫グロブリン重鎖不变領域を選択することは当業者であれば可能であると考えられる。免疫グロブリンFc領域をコード化するDNAコンストラクトの部分は好ましくはヒンジ領域の少なくとも一部を含有し、好ましくはIgA、IgD、IgE又はIgMの何れかのFcのCH3ドメイン又はその相同性ドメインの少なくとも一部を含有する。

30

【0073】

更に、免疫グロブリン重鎖不变領域内にあるアミノ酸が置換又は欠失すると本発明の実施に有益であると考えられる。一例は上部CH2領域内でアミノ酸を置換してFc受容体に対する親和性の低いFc変異体を作り出すことであろう(Cole et al. (1997) J. IMMUNOL. 159:3613)。当業者であれば周知の分子生物学に関する技術を使用することで斯かるコンストラクトを調製することができる。

40

【0074】

本発明の一具体例においては、主題の可溶性ポリペプチドの修飾された形態は、可溶性ポリペプチド（例：エフリンB2又はEphB4の細胞外ドメイン）の少なくとも一部及びアルブミンのような安定化ドメインを有する融合蛋白質である。本明細書において、“アルブミン”とはアルブミンの蛋白質若しくはアミノ酸配列か、或いはアルブミンの1又は2以上の機能的活性を示すアルブミンの断片若しくは変異体を集合的に指す。とりわけ、“アルブミン”とはヒトのアルブミン又はその断片(EP 201 239, EP 322 094, WO 97/24445

50

, WO95/23857を参照)、特にヒトの成熟型アルブミン、又は他の脊椎動物のアルブミン若しくはその断片、又は上記分子若しくはその断片の類似体若しくは変異体を指す。

【0075】

本発明では該融合蛋白質は対応する野生型可溶性蛋白質に比べて安定であることを記述する。例えば、主題の可溶性ポリペプチド(例:エフフィンB2又はEphB4の細胞外ドメイン)がヒト血清アルブミン(HSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、又は安定化活性をもつアルブミン蛋白質の任意の断片と融合することができる。そのような安定化ドメインにはヒト血清アルブミン(HSA)及びウシ血清アルブミン(BSA)が挙げられる。

【0076】

とりわけ、本発明のアルブミン融合蛋白質にはヒトアルブミンの自然界で生じる多型性変異体及びヒトアルブミンの断片が挙げられ(WO95/23857)、例えばEP 322 094に記載の断片(すなわちHA(Pn)、nは369~419)が挙げられる。アルブミンは任意の脊椎動物、特に任意の哺乳動物、例えばヒト、ウシ、ヒツジ又はブタ由来のものとしてよい。非哺乳動物のアルブミンとしては、限定的ではないが、メンドリ及びサケが挙げられる。アルブミン融合蛋白質のアルブミン部分はEphB4と異なる動物由来であってよい。

【0077】

ある実施形態においては、アルブミン融合蛋白質のアルブミン蛋白質部分は血清アルブミンの断片に相当する。血清アルブミンポリペプチドの断片としては、1又は2以上の残基がアミノ末端又はC末端から欠失したポリペプチドが挙げられる。一般に、HA断片又は変異体は少なくとも100のアミノ酸長、好ましくは少なくとも150のアミノ酸長であろう。HA変異体はHAの少なくとも一つの全体ドメインから成るか又はこれを含む。米国特許出願公開2004/0171123に記載のSEQ ID NOS: 18に対するドメインは:ドメイン1(アミノ酸1-194), ドメイン2(アミノ酸195-387), ドメイン3(アミノ酸388-585), 1+2(1-87), 2+3(195-585)又は1+3(アミノ酸1-194+アミノ酸388-585)である。各ドメインそれ自体は、Lys 106~Glu 119, Glu 292~Val 315及びGlu 492~Ala 511を有する柔軟性のあるサブドメイン間リンカー領域をもつ、相同性のある二つのサブドメイン、すなわち1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491及び512-585で構成されている。

【0078】

一実施形態においては、EphB4-HSA融合体は一つのHSA分子に連結した一つのEphB4可溶性ポリペプチドを有するが、その他の形態も本発明の範囲内である。例えば、EphB4-HSA融合蛋白質は:R₁-L-R₂; R₂-L-R₁; R₁-L-R₂-L-R₁; 又はR₂-L-R₁-L-R₂; R₁-R₂; R₂-R₁; R₁-R₂-R₁; 又はR₂-R₁-R₂の何れを有することもできる。ここで、R₁は可溶性ポリペプチドの配列であり、R₂はHSAであり、Lはペプチドリンカーの配列である。

【0079】

一具体例では、EphB4及びHSAのドメインは、好ましくはリンカー配列を介して、互いに連結している。リンカー配列はEphB4及びHSAのドメインを、各ドメインが適切に折りたたまれて2次及び3次構造を確実に形成するのに充分な距離だけ、分離する。好ましいリンカー配列は(1)柔軟な伸長構造を有するべきであり、(2)機能的なEphB4及びHSAのドメインと相互作用し得る秩序だった二次構造を発達させる傾向を示さないべきであり、(3)機能的蛋白質のドメインとの相互作用を促進し得る疎水性又は荷電性は最小限とすべきである。柔軟な蛋白質領域内の典型的な表面アミノ酸としてはGly、Asn及びSerが挙げられる。Gly、Asn及びSerを含有するアミノ酸配列の順列はリンカー配列に対する上記基準を満足することが期待される。Thr及びAlaといったその他の中性に近いアミノ酸もリンカー配列内に使用することができる。

【0080】

一具体例では、機能性蛋白質のドメイン間に適度な分離を与えるためにリンカー配列の長さが約20であるアミノ酸を使用することができる。但し、より長い又は短いリンカー配列も使用可能である。EphB4及びHSAを分離するリンカー配列の長さはアミノ酸長5~500、好ましくはアミノ酸長5~100とすることができる。好ましくは、リンカー配列はアミノ酸長が約5~30である。好ましい実施形態では、リンカー配列はアミノ酸長が

10

20

30

40

50

約5～約20であり、有利にはアミノ酸長が約10～約20である。EphB4及びHSAのリンカーレジオナーブルとして有用なアミノ酸配列には、限定的ではないが、(SerGly₄)_y(式中、yは8以上)又はGly₄SerGly₅Serが挙げられる。好ましいリンカーレジオナーブルは(SerGly₄)₄の式を有する。別の好ましいリンカーレジオナーブルは((Ser-Ser-Ser-Ser-Gly)₃-Ser-Pro)の配列を有する。

【0081】

一実施形態においては、本発明のポリペプチド及びHSA蛋白質はリンカーレジオナーブルなしで直接融合する。好ましい実施形態では、可溶性EphB4ポリペプチドのC末端はHSAのN末端に直接融合することができ、又はHSAのC末端は可溶性EphB4のN末端に直接融合することができる。

10

【0082】

ある実施形態においては、米国特許出願公開2003/0166877に記載のように、融合蛋白質をつなぐ接合領域内のT細胞エピトープの候補を特定し、接合領域内にあるアミノ酸を変化させることによって、HSA及びEphB4間の融合接合部の免疫原性を減少させることができる。

【0083】

ある実施形態においては、本発明の(未改質又は改質)可溶性ポリペプチドは、当分野の種々の公知技術により製造できる。例えば、これら可溶性ポリペプチドは、Bodansky、M.「ペプチド合成原則」Springer Verlag、ベルリン(1993)及びGrant G.A.編「合成ペプチド」、「使用者ガイド」W.H.Freeman and Company、ニューヨーク(1992)等に記載された標準的な蛋白質化学技術を使用して合成できる。更に、自動化ペプチド合成機は市販されている(例えば、Advanced Chem Techモデル396;Milligen/Bioscience社9600)。又、可溶性ポリペプチド、フラグメント又はそれらの変異体は、公知の種々の発現系を使用して組み換える生産してもよい(同様に下記参照)。

20

【0084】

III. 可溶性ポリペプチドをエンコードする核酸

ある観点においては、本発明はEphB4又はエフリンB2可溶性ポリペプチドをエンコードする単離された及び/又は組み換え型核酸に関する。本発明の核酸は、単鎖又は二重鎖、DNA又はRNA分子でもよい。これらの核酸は治療薬として有用である。例えば、これらの核酸は、治療用として細胞又は患者へ投与された組み換え型可溶性ポリペプチドの製造に有用である。又、これら核酸は、遺伝子治療法等の治療用として細胞又は患者へ直接に投与できる。

30

【0085】

ある実施形態において、本発明は、SEQ ID番号6-9に示されたヌクレオチド配列の領域と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%又は100%同一である単離型又は組み換え型核酸配列を提供する。当業者は、本発明の核酸と相補的な核酸配列及び本発明の核酸の変異体も又本発明の範囲内であることを理解できる。更に、本発明の核酸配列は、単離され、組み換えられ、及び/又は非相同的のヌクレオチド配列と融合されてもよく、DNAライブラリ中のものでもよい。

【0086】

他の実施形態において、本発明の核酸は又、高い緊縮条件下で図6-9中に示されたヌクレオチド配列、又はそれらの相補配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。上記のように、当業者はDNAハイブリダイゼーションを促進する適切な緊縮条件は変化できることが容易に理解できる。例えば、6.0×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)約4.5でハイブリダイゼーションを行い、次に2.0×SSCで5.0で洗浄してもよい。例えば、洗浄ステップ中の塩濃度は約2.0×SSCで5.0の低い緊縮から約0.2×SSCの5.0での高い緊縮まで選択出来る。更に、洗浄ステップ中の温度は、室温(約22)での低い緊縮条件から、約65での高い緊縮条件へ増加できる。温度及び塩の両方は変化してもよく、又温度若しくは塩濃度は他の変更可能な因子が変化する間一定に保持されてもよい。例えば、本発明は6×SSC室温での低い緊縮条件下

40

50

でハイブリダイズされ、次に 2 × S S C 室温で洗浄される核酸も提供する。

【 0 0 8 7 】

遺伝暗号中の縮重を原因とする目的の核酸とは異なる単離された核酸も又本発明の範囲内である。例えば、多くのアミノ酸が 1 を超えるトリプレットにより指定される。同一のアミノ酸を特定するコドン又はそのシノニム（例えば、C A U 及び C A C はヒスチジンに対するシノニムである）は、蛋白質のアミノ酸配列に作用しない「沈黙」突然変異を生じる。しかし、本発明の蛋白質のアミノ酸配列中の変化へ導く D N A 配列多型性はほ乳類細胞間に存在することが予測されている。当業者は、特別な蛋白質をエンコードする核酸の 1 以上のヌクレオチド（約 3 ~ 5 %までのヌクレオチド）中のこれらの変異は、天然対立遺伝子的変異により所定の種の被験体間に存在することを理解できる。これらヌクレオチド変異及び得られるアミノ酸多型性のいずれか及び全ては本発明の範囲内である。10

【 0 0 8 8 】

ある実施形態において、本発明の組み換え型核酸は、発現構築物中の 1 以上の調節ヌクレオチド配列へ作動可能なように結合されてもよい。調節ヌクレオチド配列は、発現に使用されるホスト細胞として一般的に適切である。数多くの種類の適切な発現ベクター及び適切な調節配列が、種々のホスト細胞用に当分野で公知である。通常、上記 1 以上の調節ヌクレオチド配列として、本発明を限定するものではないが、プロモーター配列、リーダー配列又はシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始及び停止配列、翻訳開始及び停止配列、並びにエンハンサー又は活性化配列が挙げられる。20

【 0 0 8 9 】

当分野で公知の構成成分となる又は誘導可能なプロモーターも本発明では意図される。プロモーターは、天然プロモーター又は 1 を超えるプロモーターの要素を組み合わせるハイブリッドプロモーターのいずれでもよい。発現構築物はプラスミド等のエピソーム上の細胞中に存在しても良く、発現構築物は染色体中に挿入されてもよい。好ましくは、発現ベクターは形質変換されたホスト細胞の選択を可能とするため選択可能なマーカー遺伝子を含有する。選択可能なマーカー遺伝子は当分野で公知であり、使用されるホスト細胞に応じて変化できる。20

【 0 0 9 0 】

本発明のある観点において、核酸は、EphB4 又はエフリンB2可溶性ポリペプチドをエンコードし、作動可能なように少なくとも 1 の調節配列へ結合されたヌクレオチド配列を含有する発現ベクター中に提供される。調節配列は当分野で認識され、可溶性ポリペプチドの直接的発現のために選択される。従って、用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現調節要素を含有する。例示的調節配列は、Goeddel「遺伝子発現技術：酵素学的方法」Academic Press、サンディエゴ、C A (1 9 9 0)」に記載されている。例えば、動作可能なように結合された場合に D N A 配列の発現を調節する広い範囲の種々の発現調節配列のいずれでも、可溶性ポリペプチドをエンコードする D N A 配列を発現するためにこれらのベクター中に使用できる。これら有用な発現調節配列として例えば、S V 4 0 の上流 (early) 及び下流 (late) プロモーター、t e t プロモーター、アデノウィルス又はサイトメガロウィルス直前プロモーター、I a c システム、t r p システム、T A C 又は T R C システム、その発現は T 7 R N A ポリメラーゼにより誘導される T 7 プロモーター、ファージラムダの主要オペレーター及びプロモーター領域、f d 被覆蛋白質用調節領域、3 - ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の解糖酵素用プロモーター、P h o 5 等の酸ホスファターゼのプロモーター、酵母 - 接合因子のプロモーター、バキュロウイルスシステムの多面体プロモーター及び原核細胞若しくは真核細胞又はそれらのウイルスの遺伝子の発現を調節することが知られている他の配列、並びにこれらの種々の組み合わせが挙げられる。発現ベクターの設計は、形質変換されるホスト細胞、及び / 又は発現されることを目的とする蛋白質の種類等の選択の因子に依存すると考えられる。更に、ベクターのコピー数、コピー数調節能力及び抗生物質マーカー等のベクターによりエンコードされる他の蛋白質の発現を調節する能力も又考慮される必要がある。40

【 0 0 9 1 】

50

本発明は又、1以上の本発明の可溶性ポリペプチドのためのコーディング配列を含有する組み換え型遺伝子でトランスフェクトされたホスト細胞に関する。ホスト細胞は、原核細胞でも真核細胞でもよい。例えば、本発明の可溶性ポリペプチドは、E.coli等の細菌細胞、昆虫細胞（例えばバキュロウィルス発現系を使用）、酵母、又はほ乳類細胞中で発現される。他の適切なホスト細胞も当業者に公知である。

【0092】

又、本発明は更に本発明の可溶性ポリペプチドの製造方法に関する。例えば、EphB4可溶性ポリペプチドをエンコードする発現ベクターでトランスフェクトされたホスト細胞は、適切な条件下で培養され、EphB4可溶性ポリペプチドの発現を行うことができる。EphB4可溶性ポリペプチドは、細胞及び可溶性ポリペプチドを含有する培地の混合物から分泌されて単離される。可溶性ポリペプチドは細胞質中又は膜フラクション中に保持され、細胞が採取され、溶解され蛋白質が単離される。細胞培養物はホスト細胞、培地及び他の副成物を含む。細胞培養物用の適切な培地は当分野で公知である。可溶性ポリペプチドは、蛋白質精製用の公知技術を使用して、細胞培養培地、ホスト細胞又はそれら両方から単離できる。その技術としてイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、超ろ過、電気泳動、及び可溶性ポリペプチドの特別なエピトープに特異的な抗体との免疫親和性精製等が挙げられる。好ましくは、可溶性ポリペプチドは、その精製を容易にする領域を含有する融合蛋白質である。

【0093】

本発明の組み換え型核酸は、原核細胞、真核細胞（酵母、鳥類、昆虫又はほ乳類）又はそれら両方のいずれか中で発現に適切なベクター中にクローンされた遺伝子又はそれらの一部をライゲートすることにより生産できる。組み換え型可溶性ポリペプチドの作成用の発現ビヒクルとして、プラスミド及び他のベクターが挙げられる。例えば、適切なベクターとして下記種類のプラスミドが挙げられる：E.coli等の原核細胞中の発現用の、p B R 3 2 2 由来プラスミド、p E M B L 由来プラスミド、p E X 由来プラスミド、p B T a c 由来プラスミド及びp U C 由来プラスミド。

【0094】

好ましいほ乳類発現ベクターは、細菌中のベクターの増殖を促進する原核配列及び真核細胞中で発現された1以上の真核転写単位の両方を含む。p c D N A I / a m p 、p c D N A I / n e o 、p R c / C M V 、p S V 2 g p t 、p S V 2 n e o 、p S V 2 - d h f r 、p T k 2 、p R S V n e o 、p M S G 、p S V T 7 、p k o - n e o 及びp H y g 由来ベクターは、真核細胞のトランスフェクションに適切なほ乳類発現ベクターの例である。これらのベクターのいくつかはp B R 3 2 2 等の細菌性プラスミドからの配列で改質されて、原核及び真核細胞の両方での複製及び耐薬品性選択を促進してもよい。又、ウシパピローマウィルス（B P V - 1 ）、又はエプスタイン-バーウィルス（p H E B o 、p R E P 由来及びp 2 0 5 由来）等のウィルス誘導体は、真核細胞中の蛋白質の一時的発現に使用出来る。他のウィルス性（レトロウィルスを含む）発現システムの例は、下記遺伝子治療デリバリーシステムの記載中に示す。プラスミドの作成及びホスト有機体の形質転換で使用される種々の方法は、当分野で公知である。原核及び真核細胞の両方について、他の適切な発現システム並びに一般的組み換え型手順は、分子クローニング「実験マニュアル」第2版、Sambrook、Fritsch及びManiatis編（コールドスプリングハーバー研究所出版、1989）16及び17章が参照できる。例えば、バキュロウィルス発現システムの使用により組み換え型S L C 5 A 8 ポリペプチドを発現することも好ましい。これらバキュロウィルス発現システムの例として、p V L 由来ベクター（p V L 1 3 9 2 、p V L 1 3 9 3 及びp V L 9 4 1 等）、p A c U W 由来ベクター（p A c U W 1 等）、並びにp B I u e B a c 由来ベクター（p B l u e B a c III 含有 - g a l 等）が挙げられる。

【0095】

融合遺伝子作成技術は公知である。本質的に、異なるポリペプチド配列をコードする種々のDNAフラグメントの結合は、従来技術に従い行うことができ、例えばライゲーション用のプラントエンド末端又は相補末端（s t a g g e r - e n d e d ）の採用、適切な

10

20

30

40

50

末端を得るための制限酵素消化、適切な付着末端の補完、目的外の結合を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、及び酵素的ライゲーションが挙げられる。又、融合遺伝子は自動化DNA合成機等の従来の技術により合成できる。又、遺伝子フラグメントのPCR増幅は、2個の連続する遺伝子フラグメント間に相補的オーバーハングを生じるアンカープライマーを使用して実施でき、それは次にキメラ遺伝子配列を生成するためにアニールできる（例えば、「分子生物学の現在のプロトコル」Ausubelら編、John Wiley&Sons:1992）。

【0096】

IV. ドラッグスクリーニングアッセイ

ポリペプチド治療薬を、EphB4、エフリンB2又は両方のアンタゴニストとしてスクリーニングする数多くのアプローチがある。例えば、化合物又は分子の高スループットスクリーニングが、血管形成を阻害するか腫瘍増殖を阻害する試薬又はドラッグを特定するために実施できる。試験試薬は、（化学）合成的に製造され、組み換え型技術により製造され、又は天然原料から単離されたいずれの化学製品（元素、分子、化合物、ドラッグ）でもよい。例えば、試験試薬はペプチド、ポリペプチド、ペプトイド、糖類、ホルモン類、又は核酸分子でもよい。更に、試験試薬は、小分子又は化学的組み合わせにより、例えばライプラリへ組み込まれて製造されたより大きい複合体でもよい。これらのライプラリーとして、例えば、アルコール、アルキルハライド、アミン、アミド、エステル、アルデヒド、エーテル及び他の有機的化合物種が挙げられる。試験試薬も又、溶解産物又は細胞の増殖培地（細菌性、動物又は植物性）から単離された天然物若しくは遺伝子的に設計された製品、又は細胞溶解産物若しくは増殖培地自身でもよい。試験系への試験化合物の形態は、単離体又は、特に初期スクリーニングステップ中では、化合物の混合物のいずれでもよい。

10

【0097】

例えば、アッセイは、エフリンB2（リガンド）のEphB4（レセプター）への結合又はその反対の結合を特異的に阻害する化合物のスクリーンを、例えば、標識化リガンド-又はレセプター-Fc融合蛋白質の不死化細胞への結合の阻害により実施できる。このスクリーニングで特定された化合物は次に、それらのin vivoでの抗血管形成又は抗腫瘍活性を評価するために動物中で試験される。

20

【0098】

2個の細胞表面分子（例えば、エフリンB2及びEphB4）の相互作用を妨害する物質を特定するアッセイの一具体例として、ある種の細胞表面分子を発現する細胞のサンプル（例えば、EphB4）は、標識化リガンド（例えば、エフリンB2若しくはその可溶性部分、又は細胞外領域及びIgGのFc領域の融合等の融合蛋白質）又は標識化リガンドプラス試験化合物（若しくは試験化合物群）のいずれかと接触させる。細胞へ結合した標識化リガンドの量が測定される。（標識が例えば、放射性同位体、蛍光性又は比色分析用標識の場合）試験化合物と接触したサンプル中の標識量がより少なくても、試験化合物が結合を阻害することが示される。リガンド（例えば、エフリンB2リガンド又はその可溶体）を発現する細胞を使用した相互アッセイは、Ephレセプター又はその可溶性部分の結合に影響する物質を試験するために使用できる。

30

【0099】

Ephレセプター及びエフリン間の相互作用に影響する物質を特定するアッセイは、試験化合物と競合しない成分（例えば、細胞、融合蛋白質及び結合活性部位を含む精製蛋白質）を使用して、固体担持体へ結合されて行うことが出来る。固体担持体は、いずれの適切な固体相又はマトリックスでもよく、例えばビーズ、プレート壁又は他の適切な表面等（例えば、マイクロタイタープレートのウェル）、カラム多孔質ガラス（CPG）又はウェルの溶液中に浸漬されるピンが挙げられる。細胞又は精製蛋白質の固体担持体への結合は、直接的でも1以上のリンク分子を介してもよい。

40

【0100】

一実施形態において、単離され又は精製された蛋白質（例えば、Ephレセプター又はエ

50

フリン)は、化学架橋の標準技術により、又は単離され又は精製された蛋白質に対して生じる抗体を介して、適切な親和性マトリックス上に固定化され、固体担持体へ結合されてもよい。マトリックスはカラム又は他の適切な容器中に充填され、1以上の試験用化合物(例えば、混合物)とその化合物の蛋白質への結合に適切な条件下で接触させられる。例えば、化合物含有溶液はマトリックスを通過するようにも調製できる。マトリックスは、結合していない化合物、非特異的に結合した化合物を除去するために、適切な洗浄バッファで洗浄されてもよい。結合を保持する化合物は、適切な溶離バッファにより溶離される。例えば、溶離バッファのイオン強度又はpHの変化は化合物の溶離を引き起こす。又、溶離バッファは、溶離成分又は化合物の結合を切断するように設計された成分(例えば、1以上のリガンド若しくはレセプター、適切な場合にはそれらのアナログであって、結合を切断できるか、試験化合物の蛋白質への結合を競合的に阻害できるもの)を含有してもよい。

10

【0101】

その性質上、その蛋白質中で発生しない第二成分へ結合された蛋白質(例えば、Ephレセプター又はエフリン)の全て又は一部を含有する融合蛋白質も、本発明の方法で使用するため作成できる。この目的のために適切な融合蛋白質は、第二成分が親和性リガンド(例えば、酵素、抗原、エピトープ)を含有するようなものを含む。融合蛋白質は、蛋白質(例えば、Ephレセプター又はエフリン)又はその一部を、親和性リガンドをエンコードする適切な発現ベクター中へ挿入することにより作成できる。発現ベクターは、適切な発現用ホスト細胞中へ導入できる。ホスト細胞は破壊され、融合蛋白質を含有する細胞材料は、融合蛋白質の親和性リガンド部位が親和性マトリックスへ結合するのに適切な条件下で、細胞材料を親和性マトリックスと接触させることにより、適切な親和性マトリックスへ結合できる。

20

【0102】

本実施形態の一観点では、融合蛋白質は融合蛋白質の親和性リガンド部位がマトリックスへ結合するのに適切な条件下で適切な親和性マトリックス上に固定化され、その化合物が結合された融合蛋白質のレセプター又はリガンド蛋白質部位へ結合するために適切な条件下で1以上の試験用化合物(例えば混合物)と接触させられる。次に、結合された融合蛋白質を有する親和性マトリックスは、適切な洗浄バッファで洗浄され、特異的に結合された化合物の結合を非常に破壊せずに、結合していない化合物及び非特異的に結合された化合物を除去してもよい。結合を保持する化合物は、それへ結合している融合蛋白質を有する親和性マトリックスを適切な溶離バッファ(化合物溶離バッファ)へ接触させることにより溶離出来る。この見地から、化合物溶離バッファは親和性マトリックスによる融合蛋白質の保持を可能とするようにも配合できるが、試験する化合物の、融合蛋白質のレセプター又はリガンド蛋白質部位への結合を阻害するように配合してもよい。例えば、溶離バッファのイオン強度又はpHの変化は化合物の溶離を引き起こしてもよく、溶離バッファは溶離成分又は化合物の融合蛋白質のレセプター又はリガンド蛋白質部位への結合を破壊するために設計された成分(例えば、化合物の融合蛋白質のレセプター又はリガンド蛋白質部位への結合を破壊できる、1以上のリガンド又はレセプター又はそれらのアナログ)を含有してもよい。固定化は、融合蛋白質を化合物と接触させる前、同時、又は後に隨時行っても良い。本発明の方法は、試験される化合物、選択された親和性マトリックス、及び溶離バッファ配合等の因子に依存して、種々の順序の変更が可能である。例えば、洗浄ステップ後、それに結合した化合物を有する融合蛋白質は、親和性マトリックスから適切な溶離バッファ(マトリックス溶離バッファ)により溶離されてもよい。融合蛋白質がトロンビン切断部位等の開裂可能なリンカーを含有する場合、親和性リガンドからの開裂はそれへ結合した化合物との融合物の一部を溶離できる。結合された化合物は、次に融合蛋白質又はその開裂生成物から抽出等の適切な方法により溶離できる。

30

【0103】

V. 治療方法

ある実施形態において、本発明は血管形成阻害方法及び血管形成関連障害治療方法を提

40

50

供する。又、例えば、本発明は腫瘍増殖阻害又は減少方法及び癌患者治療方法を提供する。これらの方法は、治療的有効量の1以上の上記ポリペプチド治療薬を患者への投与を含む。これらの方法は好ましくは動物、更に好ましくはヒトの治療用及び予防的処置を目的とする。

【0104】

ここで示される血管形成関連障害は、本発明を限定するものではないが、下記が挙げられる；充実性腫瘍等の血管形成依存性癌、白血病等の血液性腫瘍、及び腫瘍転移；良性腫瘍、例えば血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トロコーマ、及び化膿性肉芽腫；免疫及び非免疫性炎症等の炎症性障害；慢性間接リューマチ及び乾癬；眼性血管形成病、例えば糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、黄斑改質、角膜移植拒絶、新血管の緑内症、後水晶体纖維増殖症、ルベオーシス；オスマーラー・ウェバー症候群；心筋性血管形成；ブラーク新生血管形成；毛細血管拡張症；血友病性関節；纖維血管腫；毛細血管拡張乾癬強皮症、化膿性肉芽腫、ルベオーシス、関節炎、糖尿病性新生血管形成、脈管形成、血液新生。10

【0105】

本発明の方法及び組成物は又、いずれの血管形成独立性癌（腫瘍）を治療するためにも有用である。ここで使用される用語「血管形成独立性癌」とは、腫瘍組織中に新生血管形成がないかほんの僅かである癌（腫瘍）を言う。

特に、本発明のポリペプチド治療薬は癌（腫瘍）の治療又は防止に有用であり、その例として本発明を限定するものではないが、腸癌、乳癌、中皮腫、前立腺癌、膀胱癌、頭部癌及び頸部癌等の扁平上皮細胞癌（HNSCC）、カポジ肉腫、及び白血病が挙げられる20。

【0106】

該方法のある実施形態においては、1以上のポリペプチド治療薬は、一緒（同時）に又は異なる時（逐次的）に投与できる。更に、本発明のポリペプチド治療薬は、別の種類の癌治療用又は血管形成阻害用化合物とともに投与できる。

ある実施形態において、本発明の方法は単独で実施できる。又、本発明の方法は、増殖性障害（例えば、腫瘍）の治療又は防止を目的とする他の従来の抗癌治療用アプローチと組み合わせても使用できる。例えば、これら方法は、予防的癌防止、外科手術後の癌再発及び癌転移の防止、及び他の従来の癌治療法の補強剤（adjuvant）として使用できる。本発明では従来の癌治療法（例えば、化学療法、放射線治療法、光線療法、免疫療法、及び外科的治療）の有効性が本発明のポリペプチド治療薬の使用により強化されることを認識できる。30

【0107】

広い範囲の従来の化合物が抗新生物性活性を有することが示された。これらの化合物は、化学療法中で充実性腫瘍を縮小させ、転移及び更なる増殖を防止し、又は白血病又は骨髄悪性腫瘍での悪性細胞数を減少させるための医薬的試薬として使用されてきている。化学療法は種々の悪性疾患種の治療に効果的ではあるが、多くの抗新生物性化合物は望ましくない副次的効果を誘起する。2以上の異なる治療が組み合わされた場合に、それらの治療は相乗的に作用してそれぞれの治療の投薬量を減少させることを可能とすることが示され、その結果より高い投薬量ではそれぞれの化合物が発生させる有害な副作用効果を減少させる。又例えば、治療困難な悪性疾患でも2以上の異なる治療の併合治療法が効果を示す場合がある。40

【0108】

本発明のポリペプチド治療薬が別の従来の抗新生物性試薬と組み合わせて、併合して又は逐次的に投与される場合、これら治療薬は、抗新生物性試薬の治療的効果を強化するかこれら抗新生物性試薬への細胞の耐性を克服することを示す。これは抗新生物性試薬の投薬の減少を可能とし、その結果目的としない副次的効果を減少させ、耐性細胞中の抗新生物性試薬の効果を回復する。

【0109】

組み合わせ的抗腫瘍治療法に使用できる医薬的化合物として、単に例示のためであるが50

下記が挙げられる：アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アスパラギナーゼ、b c g、ビカルタミド、ブレオマイシン、ブセレリン、ブスルファン、カンプトテシン (campothecin)、カペシタピン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシリ、シスプラチン、クラドリビン、クロドロネット、コルヒチン、シクロホスファミド、シプロテロン、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、エストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エキセメスタン、フィルグラスチム、フルダラビン、フルドロコルチゾン、フルオロウラシル、フルオロキシメステロン、フルタミド、ゲムシタピン、ゲニステイン、ゴセレリン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、イマチニブ、インターフェロン、イリノテカン、イロノテカン (ironotecan)、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、レバミゾール、ロムスチン、メクロレタミン、メドロキシプロゲステロン、メゲストロール、メルファラン、メルカブトプリン、メスナ、メトレキサート、マイトマイシン、ミトーテン、ミトキサントロン、ニルタミド、ノコダゾール、オクトレオチド、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネット、ペントスタチン、プリカマイシン、ポルフィマー、プロカルバジン、ラルチトレキセド、リツキシマブ、ストレプトゾシン、スラミン、タモキシフェン、テモゾロマイド、テニポシド、テストステロン、チオグアニン、チオテパ、チタノセンジクロリド、トポテカン、トラスツヅマブ、トレチノイン、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン及びビノレルビン。

【0110】

これらの化学療法の抗腫瘍化合物は、それらの作用機構により、例えば下記グループに分類できる：ピリミジンアナログ (5-フルオロウラシル、フロクスウリジン、カペシタピン、ゲムシタピン及びシタラピン) 及びプリンアナログ、葉酸アンタゴニスト並びに関連する抑制剤 (メルカブトプリン、チオグアニン、ペントスタチン及び2-クロロデオキシアデノシン (クラドリビン)) 等の代謝拮抗物質 / 抗癌試薬；ビンカアルカロイド (ビンプラスチン、ビンクリスチン及びビノレルビン) 等の天然生成物、タキサン (パクリタキセル、ドセタキセル)、ビンクリスチン、ビンプラスチン、ノコダゾール、エポチロン及びナベルビン等の微少管破壊剤、エピジ (epidi) ポドフィロトキシン系 (エトポシド、テニポシド)、DNA 損傷剤 (アクチノマイシン、アムサクリン、アンスラサイクリン系、ブレオマイシン、ブスルファン、カンプトセシン、カルボプラチン、クロラムブシリ、シスプラチン、シクロホスファミド、サイトキサン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、ヘキサメチルメラミンオキサリプラチン、イフオスファミド、メルファラン、merchlorehtamine、マイトマイシン、ミトキサントロン、ニトロソウレア、プリカマイシン、プロカルバジン、タキソール、タキソテール、テニポシド、トリエチレンチオホスホルアミド及びエトポシド (VP 16)) 等の抗増殖性 / 細胞分裂抑制剤；ダクチノマイシン (アクチノマイシンD)、ダウノルビシン、ドキソルビシン (アドリアマイシン)、イダルビシン、アンスラサイクリン系、ミトキサントロン、ブレオマイシン、プリカマイシン (ミトラマイシン) 及びマイトマイシン等の抗生物質；酵素 (L-アスパラギンを全身的に新陳代謝させ、それら自身アスパラギンの合成能力を有さない細胞を除去する L-アスパラギナーゼ)；抗血小板試薬；窒素マスター (メクロレタミン、シクロホスファミド及びアナログ、メルファラン、クロラムブシリ)、エチレンイミン類及びメチルメラミン類 (ヘキサメチルメラミン及びチオテパ)、アルキルスルホネット-ブスルファン、ニトロソウレア類 (カルムスチン (BCNU) 及びアナログ、ストレプトゾシン)、トランゼン-ダカルバジニン (DTIC) 等の抗増殖性 / 細胞分裂抑制アルキル化試薬；葉酸アナログ (メトレキサート) 等の抗増殖性 / 細胞分裂抑制代謝拮抗物質；白金配位錯体 (シスプラチン、カルボプラチン)、プロカルバジン、ヒドロキシウレア、ミトーテン、アミノグルテチミド；ホルモン類、ホルモンアナログ (エストロゲン、タモキシフェン、ゴセレリン、ビカルタミド、ニルタミド) 及びアロマターゼ阻害薬 (レトロゾール、アナストロゾール)；抗凝血剤 (ヘパリン、合成ヘパリン塩及び他のトロンビン阻害薬)；フィブリン溶解性試薬 (組織プラスミノゲン活性化剤、ストレプトキ

10

20

30

40

50

ナーゼ及びウロキナーゼ等)、アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ；抗遊走性試薬；抗分泌性試薬(breveldin)；免疫抑制剤(シクロスボリン、タクロリムス(FK-506)、シロリムス(ラパマイシン)、アザチオプリン、ミコフェノレート・モフェチル)；抗血管形成化合物(TNP-470、ゲニステイン)及び増殖因子抑制剤(血管の内皮性増殖因子(VEGF)抑制剤、纖維芽細胞増殖因子(FGF)抑制剤)；アンギオテンシンレセプターブロッカー；一酸化窒素ドナー類；アンチセンスオリゴヌクレオチド；抗体(トラスツヅマブ)；細胞周期停止剤及び分化誘起剤(トレチノイン)；mTOR抑制剤、トポイソメラーゼ抑制剤(ドキソルビシン(アドリアマイシン)、アムサクリン、カンプトセシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、エニボシド(eniposide)、エビルビシン、エトボシド、イダルビシン及びミトキサントロン、トポテカン、イリノテカン)、コルチコステロイド類(コーチゾン、デキサメタゾン、ハイドロコーチゾン、メチルペドニソロン、プレドニゾン及びプレニソロン)；増殖因子シグナル変換キナーゼ抑制剤；ミトコンドリア性機能障害誘起剤及びカスパー活性化剤；及びクロマチンかく乱剤。

【0111】

ある実施形態においては、組み合わせ抗血管形成治療法に使用できる医薬的化合物として下記が挙げられる。(1)bFGF(基本的纖維芽細胞増殖因子)等の「血管形成分子」の放出抑制剤；(2)抗bFGF抗体等の血管形成分子中和剤；並びに(3)コラゲナーゼ阻害剤、基底膜代謝回転抑制剤、血管新生阻害ステロイド、菌由来血管形成抑制剤、血小板因子4、トロンボスポンジン、D-ペニシルアミン及びチオリンゴ酸金塩等の関節炎薬、ビタミンD₃アナログ、-インターフェロン等の血管形成刺激への内皮細胞応答抑制剤。更に血管形成抑制剤として、Bloodら、Bioch.Biophys.Acta、1032:89-118(1990)、Mosesら、Science、248:1408-1410(1990)、Ingberら、Lab.Invest.59:44-51(1988)、及び米国特許番号第5092885号、5112946号、5192744号、5202352号、及び6573256号に記載されているものが挙げられる。更に、血管形成を阻害するために使用できる広い範囲の化合物があり、下記に例示される：VEGF-仲介された血管形成経路をブロックするペプチド又は試薬、エンドスタチン蛋白質又は誘導体、アンギオスタチンのリシン結合フラグメント、メラニン又はメラニン-促進化合物、プラスミノゲンフラグメント(例えばプラスミノゲンのクリングル1～3)、トロポイントropoinサブユニット、ビトロネクチン_{v3}のアンタゴニスト、サポシンB由来ペプチド、抗生物質又はアナログ(例えば、テトラサイクリン又はネオマイシン)、ジエノゲスト含有組成物、ペプチドへ連結されたMetAP-2阻害コアを含有する化合物、化合物EM-138、カルコン及びそのアナログ、並びにnuclear adenosine抑制剤。例えば、米国特許番号第6395718号、6462075号、6465431号、6475784号、6482802号、6482810号、6500431号、6500924号、6518298号、6521439号、6525019号、6538103号、6544758号、6544947号、6548477号、6559126号、及び6569845号参照。

【0112】

組み合わせ治療法の性質に応じて、本発明のポリペプチド治療薬の投与は、他の治療法の実施中及び/又はその後に続けられてもよい。このポリペプチド治療薬の投与は、単回投与でも複数回投与でもよい。例えば、本発明のポリペプチド治療薬の投与は、従来の治療法の少なくとも数日前に開始されてもよく、又その投与は従来の治療法の直前又はその投与時のいずれかで開始されてもよい。

【0113】

VI. 投与方法及び医薬的組成物

ある実施形態において、本発明のポリペプチド治療薬(例えば、可溶性ポリペプチド又は抗体)は、医薬的に適用可能なキャリアと共に配合できる。これら治療薬は、単体として又は医薬的配合物(組成物)の成分として投与できる。化合物は、ヒトへの使用又は動物用医薬に適した方法で投与するために配合できる。ドデシル硫酸ナトリウム及びステア

10

20

30

40

50

リン酸マグネシウム等の、湿潤剤、乳化剤及び潤滑剤、並びに着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、矯味剤及び香料、保存薬及び抗酸化剤も又本発明の組成物中に存在できる。

【0114】

本発明のポリペプチド治療薬の配合物には、経口／経鼻、局所的、非経口（腸管外）、直腸内、及び／又は腔内投与へ適切なものが含まれる。配合物は単位剤形の形で便利に提供でき、製薬分野で公知の方法により調製できる。単一剤形を生産するためにキャリア材料へ組み合わせできる活性成分量は、治療されるホスト、特別な投与モードに応じて変化できる。単一剤形を生産するためにキャリア材料へ組み合わせできる活性成分量は、一般的に治療的效果を得られる化合物量である。

10

【0115】

例えば、本発明の配合物又は組成物の調製方法として、異なる種類の抗腫瘍薬又は抗血管形成治療薬及びキャリア、任意で1以上の補助成分を組み合わせてもよい。一般的に、配合物は液体キャリア、又は微細粉碎固体キャリア、又は両方と共に調製し、次に必要な場合には成形して製品化してもよい。

【0116】

経口投与用配合物は、カプセル、カシェ剤、丸薬、錠剤、ロゼンジ（香料ベース、通常スクロース及びアカシア又はトラガカントを使用）、粉剤、粒剤の形状でもよく、水性若しくは非水性液体の溶液若しくは懸濁液、水中油型若しくは油中水型の液体エマルジョン、エリキシル剤若しくはシロップ、又は香錠（ゼラチン及びグリセリン、又はスクロース及びアカシア等の不活性基材を使用）及び／又は口内洗浄剤等の形状としてもよく、それぞれ活性成分として所定量の本発明のポリペプチド治療薬を含有する。

20

【0117】

経口投与用固体剤形（カプセル、錠剤、丸薬、糖衣錠、粉剤、粒剤等）として、本発明の1以上のポリペプチド治療薬は、クエン酸ナトリウム又はリン酸二カルシウム等の1以上の医薬的に適用可能なキャリア及び／又は下記いずれかと混合してもよい：（1）デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール及び／又はケイ酸等の充填剤又は增量剤；（2）カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース及び／又はアカシア等の結合剤；（3）グリセロール等の湿潤剤；（4）寒天、炭酸カルシウム、ポテト又はタピオカデンプン、アルギン酸、所定のケイ酸塩及び炭酸ナトリウム等の崩壊剤；（5）パラフィン等の溶解遅延剤；（6）第四級アンモニウム化合物等の吸収促進剤；（7）セチルアルコール、グリセロールモノステアラート等の湿潤剤；（8）カオリン及びベントナイトクレイ等の吸着担体；（9）タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチルグリコール、ドデシル硫酸ナトリウム及びそれらの混合物等の吸収剤；並びに（10）着色剤。カプセル、錠剤及び丸薬の場合、本発明の医薬的組成物は又、緩衝剤を含有してもよい。類似種の固体組成物も又、ラクトース又は乳糖類、並びに高分子量ポリエチレングリコール等の賦形剤を使用した、軟質及び硬質充填ゼラチンカプセル中の充填剤として採用できる。

30

【0118】

経口投与用液体剤形として、医薬学的に適用可能なエマルジョン、ミクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ及びエリキシル剤が挙げられる。活性成分に加え、液体剤形は、当分野で通常使用される不活性希釈剤を含有してもよく、その例として、水又は、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、ベンジルベンゾアート、プロピレングリコール、1，3-ブチレングリコール、オイル（特に、綿実油、ピーナッツ油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ひまし油及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル、並びにそれらの混合物等の他の溶剤、可溶化剤及び乳化剤が挙げられる。一方、不活性希釈剤、経口組成物も又湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、甘味剤、矯味剤、着色剤、香料及び保存薬等の添加剤を含有してもよい。

40

50

【0119】

懸濁液は活性化合物に加え、エトキシリ化イソステアリアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール及びソルビタンエステル、微結晶性セルロース、アルミニウムメタハイドロオキシド、ベントナイト、寒天及びトラガカント並びにそれらの混合物等の懸濁剤を含有してもよい。

【0120】

特に、本発明の方法は、局所的に、（子宮）頸部及び腔上の皮膚又は粘膜のいずれか上にも投与できる。これは、腫瘍へ直接的に投薬する最も大きな機会であり、かつ副次的効果を誘導する最も低い機会を与える。この局部用配合物は、皮膚に効果的であり、角質層浸透強化剤として公知の、1以上の種々の試薬を更に含有してもよい。これらの例として、2-ピロリドン、N-メチル-2-ピロリドン、ジメチルアセトタミド、ジメチルホルムアミド、プロピレングリコール、メチルアルコール又はイソプロピルアルコール、ジメチルスルホキシド及びアゾン(azone)が挙げられる。追加的試薬は、配合物を化粧品として適用可能とするためにも更に含有できる。これらの例として、脂肪、ワックス、オイル、染料、香料、保存薬、安定剤及び表面活性な試薬が挙げられる。当分野で公知の角質溶解剤も又含有できる。その例示としてサリチル酸及びイオウが挙げられる。

10

【0121】

局所的又は経皮的投与用の剤形として、粉剤、スプレー、軟膏、ペースト、スプレー、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ及び吸入剤が挙げられる。本発明のポリペプチド治療薬は、無菌性条件下で医薬的に適用可能なキャリアと、及び必要ないいずれかの保存薬、バッファ又は噴射剤と混合されてもよい。軟膏、ペースト、クリーム及びゲルは、本発明のポリペプチド薬へ加え更に、動物性及び植物性脂肪、オイル、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン樹脂、ベントナイト、ケイ酸、タルク及び酸化亜鉛又はそれらの混合物等の賦形剤を含有してもよい。

20

【0122】

粉剤及びスプレーは、本発明のポリペプチド治療薬に加え更に、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム及びポリアミド粉、又はこれらの物質の混合物等の賦形剤を含有してもよい。スプレーは更にクロロフルオロ炭化水素並びにブタン及びプロパン等の揮発性非置換炭化水素等の通常の噴射剤を含有できる。

30

【0123】

非経口(腸管外)投与用に適切な医薬的組成物は、1以上の医薬学的に適用可能な無菌性等張水又は非水性溶液、分散体、懸濁液若しくはエマルジョン、又は使用直前に無菌性注射用溶液又は分散体内で再構成される無菌性粉剤と組み合わせた1以上のポリペプチド治療薬を含有してもよく、それは抗酸化剤、バッファ、静菌薬、対象とするレシピエントの血液と等張な配合物とする溶質、又は懸濁剤若しくは増粘剤を含有してもよい。本発明の医薬的組成物で使用できる適切な水性及び非水性キャリアの例として、水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)及びそれらの適切な混合物、オリーブオイル等の植物性オイル、並びに、エチルオレアート等の注射用有機的エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチン等のコーティング材料の使用、分散体の場合必要な粒子径の維持及び界面活性剤の使用を行うことにより維持できる。

40

【0124】

本発明の組成物は又、保存薬、湿潤剤、乳化剤及び分散剤等の添加剤を含有してもよい。微生物の活動防止は、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸等の種々の抗細菌性及び抗真菌剤の含有により確保できる。糖類、塩化ナトリウム等の等張性試薬を本発明の組成物中に含有させることも又好ましい。更に、注射可能な医薬形態の長期間吸収は、アルミニウムモノステアレート及びゼラチン等の吸収遅延剤の包含により達成できる。

【0125】

50

注射可能な貯蔵体は、ポリラクチド-ポリグリコリド等の生分解性ポリマー中の1以上のポリペプチド治療薬のマイクロカプセル化マトリックスを形成することにより製造できる。薬のポリマーに対する割合及び使用される所定のポリマーの性質に依存して、薬放出速度が制御できる。他の生分解性ポリマーの例として、ポリ(オルソエステル)及びポリ(アンハイドライド)が挙げられる。注射可能な配合貯蔵体は又、リポソーム中又は体組織適合性のあるミクロエマルジョン中にドラッグを捕捉することにより調製できる。

【0126】

腔内又は直腸内投与用配合物は、1以上の本発明の化合物を1以上の適切な非刺激性賦形剤又はキャリアと混合して製造される座薬として提供できる。上記賦形剤等として例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール、座薬ワックス又はサリチラートが挙げられ、それらは室温で固体であるが体温で液体であるため、直腸内又は腔腔内で溶解して活性化合物を放出する。

【0127】

他の実施形態において、本発明のポリペプチド治療薬は、真核プロモーターから細胞内で発現できる。例えば、EphB4又はエフリンB2の可溶性ポリペプチドは、適切なベクターから真核細胞中で発現できる。ベクターは好ましくはDNAプラスミド又はウィルス性ベクターである。ウィルス性ベクターは本発明を限定するものではないが、アデノ関連ウィルス、レトロウィルス、アデノウィルス、又はアルファウィルスをベースとして構成できる。好ましくは、ベクターは確実にターゲット細胞中に導入されその中で存続する。又、ウィルス性ベクターは一時的発現を起こすためにも使用できる。これらのベクターは必要に応じて繰り返して投与できる。本発明のポリペプチド治療薬をエンコードするベクターのデリバリーは、静脈内又は筋肉内投与により全身的に行える。それは、患者から外植されたターゲット細胞内へ導入してから患者中へ再投入することにより、又は目的とするターゲット細胞を導入することを可能とする他の手段により行える(Coutureら、1996、TIG、12、510参照)。

【実施例】

【0128】

本発明を上記概説したが、下記実施例により更に容易に理解できる。下記実施例は単に本発明の例示を目的として記載されており、本発明を限定するものではない。

【0129】

実施例1(ヒトエフリンB2及びEphB4蛋白質の細胞外領域の可溶性誘導体)

ヒトエフリンB2及びEphB4蛋白質の細胞外領域の可溶性誘導体は、予測される短縮された完全長のエフリンB2(B4ECv3、B2EC)の細胞外領域、又はその領域とB2EC-Fc、B4ECv2-Fc及びB4ECv3-Fc等のヒト免疫グロブリンの定常領域(IgG1Fcフラグメント)との翻訳上の(translational)融合のいずれかを表す。代表的ヒトエフリンB2構築物及びヒトEphB4構築物を図14及び図15に示す。

【0130】

これらの組み換え型蛋白質をエンコードするcDNAフラグメントは、材料及び方法段落に詳細に記載されるように(下記参照)、ほ乳類発現ベクターへサブクローンされ、一時的に発現するか、ほ乳類細胞系を確実にトランスフェクトして、精製されて均質となつた。蛋白質の推定アミノ酸配列を図1~図5に示す。高純度の単離された蛋白質及びそれらの認識を、対応する抗エフリンB2及び抗EphB4モノクローナル又はポリクローナル抗体により確認した。組み換え型蛋白質は、予測される高親和性結合、結合競合及びそれらの対応する結合パートナーとの特異性性質を示し、それらは生物化学的アッセイにより確認された(例えば図6~8参照)。

【0131】

これら可溶性誘導体蛋白質ヒトエフリンB2及びEphB4は、数個の細胞-ベースアッセイ及び血管形成又は抗癌活性を測定するin vivoアッセイによる生物学的活性の能力を示し、従ってそれは抗血管形成及び抗癌治療用の将来性のあるドラッグ候補である。B4ECv3並びにB2EC及びB2EC-Fc蛋白質は、ヒト内皮細胞の走化性をブロックし(へ

10

20

30

40

50

その緒及び肝臓性 A E C 又は V E C で試験した)、細胞外マトリックス(マトリゲル、商標)の変質の減少及び増殖因子刺激に対する応答における移動を減少させた(図9~11)。B4E C v 3 及び B2E C - F C 蛋白質はそれらの内皮細胞管形成阻害により示される抗血管形成効果の能力を有する(図12~13)。

【0132】

本実施例についての材料及び方法の詳細な説明は米国特許出願公開第20050084873号に見出すことができる。

【0133】

球状領域 + Cys リッチ領域(B4EC-GC)、前駆蛋白質の配列は(SEQ ID NO:12) :
 MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWTVPQVDGQWEELSGLDE EQHSVRTYEVCEVQRAPGQ AHWLRTG 10
 WVPRRGAVHVVATLRFTMLECLSLPRAG RSCketFTVFYYESDADTATLTPAWMENPYIKVDTVAEEHLTRKRPGAEAT
 TGKV NVKTLRLGPLSKAGFYLAFAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRE LVVPVAGSCVVDAVPAPGP
 SPSLYCREDGQWAEQPVTGCSCAPGFEAAEGNTKCR ACAQGTFKPLSGEGSCQPCPANSHSNTIGSAVCQCRVGYFRAR
 TDPRGAPCTTPPS AHHHHHHH

である。

【0134】

治療用途を含む多くの用途に対して、リーダー配列(最初の15アミノ酸、プロセシングを受けた形ではLeu-Glu-Gluで始まるように)及びC末端ヘキサヒスチジンタグを除去又は省略することができる。

【0135】

GCF前駆蛋白質の配列(SEQ ID NO:13) :
 MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWTVPQVDGQWEELSGLDE EQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGW 20
 VPRRGAVHVVATLRFTMLECLSLPRAG RSCketFTVFYYESDADTATLTPAWMENPYIKVDTVAEEHLTRKRPGAEAT
 GKV NVKTLRLGPLSKAGFYLAFAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRE LVVPVAGSCVVDAVPAPGPS
 PSLYCREDGQWAEQPVTGCSCAPGFEAAEGNTKRCR ACAQGTFKPLSGEGSCQPCPANSHSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDP
 RGAPCTTPPSAPR SVVSRLNGSSLHLEWSAPLESGGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGGDLTFDPGPR DLVEPWVVV
 RGLRPDFTYTFEVTA NGVSSLATGPVPFEPVN VHHHHHH

【0136】

治療用途を含む多くの用途に対して、リーダー配列(最初の15アミノ酸、プロセシングを受けた形ではLeu-Glu-Gluで始まるように)及びC末端ヘキサヒスチジンタグを除去又は省略することができる。

【0137】

コード化されたFL-hB4EC前駆体のアミノ酸配列(Hisタグ有り)(SEQ ID:14) :
 MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWTVPQVDGQWEELSGLDE EQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGW
 VPRRGAVHVVATLRFTMLECLSLPRAG RSCketFTVFYYESDADTATLTPAWMENPYIKVDTVAEEHLTRKRPGAEAT
 GKV NVKTLRLGPLSKAGFYLAFAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRE LVVPVAGSCVVDAVPAPGPS
 PSLYCREDGQWAEQPVTGCSCAPGFEAAEGNTKCR ACAQGTFKPLSGEGSCQPCPANSHSNTIGSAVCQCRVGYFRART
 DPRGAPCTTPPS APRSVSRLNGSSLHLEWSAPLESGGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGGDLTFDP GPRDLVEPW
 VVRGLRPDFTYTFEVTA NGVSSLATGPVPFEPVN VTTDREVPPAV SDIRVTRSSPSSL SLAWAVPRAPSGAWLDYEVK
 YHEKGAEGPSSVRFLKTSENRAE LRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHHHSQTQLDESEG WREQGSKRA ILQIEG 40
 KPIPNPLLGLDSTRTGHHHHHH

【0138】

治療用途を含む多くの用途に対して、リーダー配列(最初の15アミノ酸、プロセシングを受けた形ではLeu-Glu-Gluで始まるように)及びC末端ヘキサヒスチジンタグを除去又は省略することができる。

【0139】

EphB4 CF2蛋白質、先駆体(SEQ ID NO:15) :
 MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETQLTVNLTRFPETVPREL VVPVAGS CVVDAVPAPGPSPSLYCREDGQWAEQ 50
 PVTGCSCAPGFEAAEGNTKCRACAQGTFK PLSGEGSCQPCPANSHSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAP
 RSVVSRL NGSSLHLEWSAPLESGGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGGDLTFDPGPRDLVEPW VVVRGLRPDFTYTF

VTALNGVSSLATGPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSP SSLSLAWAVPRAPSGAWLDYEVKYHEKGAEGPSSVRF LKTSSENRAELRGLKRGAS YLVQVRARSEAGYGPFGQEHHHSQTQLDESEGWRQQGRSSLEGPRLFEGKP IPNPLL GLDS TRTGHHHHH

【 0 1 4 0 】

好ましいIGCF2蛋白質 (GCF2Fともいう) の前駆配列は (SEQ ID NO:16) :

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWTVPQVDGQWEELSGLDEEQHS VRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGW VPRRGAVHVYATLRFTMLECLSLPRAGRSCK ETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAEEHLTRKRPGAEAT GKVNVK T LRLGPLSKAGFYLAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVPPV AGSCVVDAVPAPGPS PSLYCREDGQWAEQPVTCAPGFEAAEGNTKRACAQG TFKPLSCEGSCQCPANSHNTIGSAVCQCRCVGYFRART DPRGAPCTTAPSAPRSVV SRLNGSSLHLEWSAPLESGGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGGDLTFDPGPRDLV EPWV VVRGLRPDFTYTFEVTLNGVSSLATGPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVT RSSPSSLSLAWAVPRAPSGAWLDYEVK YHEKGAEGPSSVRFKTSSENRAELRGLKR GASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHHHSQTQLDESEGWRQ 10

【 0 1 4 1 】

プロセシングを受けた配列は (SEQ ID NO:17) :

LEETLLNTKLETADLKWTVPQVDGQWEELSGLDEEQHS VRTYEVCEVQR APGQAHWLRTGWVPRRGAVHVYATLRF TMLECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESD ADTATALTPAWMENPYIKVDTVAEEHLTRKRPGAEATGKVNKTLLGPLSK AGF YLAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVPPVAGSCVVDAVP APGPSPSLYCREDGQWAEQP VTGCSCAPGFEAAEGNTKRACAQGTFKPLSCEGCS QCPANSHNTIGSAVCQCRCVGYFRARTDPRGAPCTTAPSAPR SWSRLNGSSLHL EWSAPLESGGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGGDLTFDPGPRDLVEPWVVRGL RPDFTYTFEV ALNGVSSLATGPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSA WAVPRAPSGAWLDYEVKYHEKGAEGPSSVRFK 20 TSENRAELRGLKRGASYLVQV RARSEAGYGPFGQEHHHSQTQLDESEGWRQ

【 0 1 4 2 】

生物化学的アッセイ ;

A . 結合アッセイ :

10 μl の Ni - NTA - アガロースをマイクロ遠心機用試験管中で、結合バッファ B B (20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl、0.1% ウシ血清アルブミン pH 8) 中で稀釀した 50 μl 表示量の B 4 E C v 3 を使用してインキュベートした。振とう台上でのインキュベーション 30 分後、Ni - NTA ビーズを 1.4 ml の B B で 2 回洗浄し、次に 50 μl の B 2 - A P を使用して最終濃度 50 nM とした。結合を 30 分間振とう台上で行い、次に試験管を遠心分離し、1.4 ml の B B で 1 回洗浄した。沈降した A P 量を P N P P 処理後に比色分析で測定した。 30

【 0 1 4 3 】

B . 阻害アッセイ :

(溶液中の阻害)

50 μl の B B 中に稀釀された異なる量の B 4 E C v 3 を、50 μl の 5 nM B 2 E C - A P 試薬で予備インキュベートした (エフリンB2外部ドメインの胎盤性アルカリホスファターゼとの蛋白質融合) 。 1 時間インキュベーション後、結合していない B 2 E C - A P を膜結合した完全長EphB4を発現する H E K 2 9 3 細胞 5 0 0 0 と共に 20 分間沈降させた。結合反応を 1.2 ml の B B で希釈して停止し、次に 10 分間遠心分離した。上澄みを廃棄し、採取された細胞に関するアルカリホスファターゼ活性をパラ - ニトロフェニルホスフェート (P N P P) 基質を添加して測定した。 40

【 0 1 4 4 】

(細胞ベースの阻害)

B 4 E C v 3 を 20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl、0.1% B S A 、pH 8 中で順に稀釀し、膜結合した完全長エフリンB2を発現する H E K 2 9 3 細胞 5 0 0 0 と混合した。インキュベーション 1 時間後、50 μl の 5 nM B 4 E C - A P 試薬 (EphB4 外部ドメインと胎盤性アルカリホスファターゼとの蛋白質融合) をそれぞれの試験管中へ 30 分間添加し、未結合のエフリンB2結合部位を検出した。結合反応を 1.2 ml の B B での希釈により停止し、遠心分離した。細胞 - 沈降した A P の比色分析的反応を P N P P 基質で展開した。

【0145】

C . B 4 E C - F C 結合アッセイ :

(プロテインA-アガロースベースアッセイ) 10 μlのプロテインA-アガロースをエップendorフ型試験管中で、結合バッファ BB (20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl、0.1% BSA、pH 8) 中に稀釀した50 μlの表示量のB4EC-FCと共にインキュベートした。振とう台上でインキュベーション30分間後、プロテインAアガロースビーズを1.4mlのBBで2回洗浄し、次に50 μlのB2ECA-P試薬を適用して最終濃度50 nMとした。結合を30分間振とう台上で行い、次に試験管を遠心分離し、1.4mlのBBで1回洗浄した。沈降したAPの比色分析的反応をPNPPの適用後に測定した(図6)。

10

【0146】

(ニトロセルロースベースのアッセイ) B4EC-FCを順に20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl、50 μg/ml BSA、pH 8中に稀釀した。2 μlのそれぞれのフラクションをニトロセルロースストリップ上に適用し、スポットを3分間乾燥させた。ニトロセルロースストリップを5%無脂肪乳で30分間ブロックし、次に5 nM B2ECA-P試薬でインキュベーションした。結合用インキュベーション45分後、ニトロセルロースを20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl、50 μg/ml BSA、pH 8で2回洗浄し、アルカリホスファターゼ基質シグマFast(シグマ社製)を適用して色を展開した。

20

【0147】

D . B 4 E C - F C 阻害アッセイ :

(溶液中阻害) B4ECv3について記載した上記参照。結果を図7に示す。

(細胞ベースの阻害) B4ECv3について記載した上記参照。

E . B 2 E C - F C 結合アッセイ :

(プロテインA-アガロースベースアッセイ) B4EC-FCについて記載した上記参照。結果を図8に示す。

(ニトロセルロースベースのアッセイ) B4EC-FCについて記載した上記参照。

【0148】

6) 細胞-ベースのアッセイ ;

A . 増殖阻害アッセイ :

30

ヒトヘその緒静脈内皮細胞(HUVEC)(1.5 × 10³)を100 μlのEBM-2(Clontech社製、番号CC3162)を含む96-ウェルプレート中にプレートする。24時間後(第0日)、試験用組み換え型蛋白質(100 μl)をそれぞれのウェルへEBM-2培地中に2×目的濃度(5~7濃度レベル)で添加する。第0日に、1のプレートを20%メタノール中0.5%クリスタルバイオレットで10分間染色し、水で洗浄し、空気乾燥する。残っているプレートを72時間37℃でインキュベートする。72時間後、プレートを20%メタノール中0.5%クリスタルバイオレットで染色し、水で洗浄し、空気乾燥する。染色は、エタノール:0.1 M クエン酸ナトリウム1:1溶液で溶離し(第0日プレートを含む)、吸光度540 nmでELISAリーダー(Dynatechラボラトリーズ社製)を使用して測定する。第0日吸光度を72時間プレート結果から減じ、データをコントロール増殖(ビヒクル処理した細胞)割合としてプロットする。IC₅₀(50%阻害を発生する薬剤濃度)をプロットしたデータから算出する。

40

【0149】

B . コード形成アッセイ(内皮細胞管形成アッセイ) :

マトリゲル(商標)(60 μlの10 mg/ml; Collaborative Lab社製、番号35423)を氷冷96-ウェルプレートのそれぞれのウェル中に配置した。プレートを室温で15分間放置し、次に37℃30分間インキュベートし、マトリゲルをポリマー化した。その間に、HUVECをEGM-2(Clontech社製、番号CC3162)中に濃度2 × 10⁵細胞/mlで調製する。試験化合物を2×目的濃度(5濃度レベル)で同一の培地中に調製する。細胞(500 μl)及び2×ドラッグ(500 μl)を混合し、200 μlの

50

この懸濁液をポリマー化したマトリゲル上で複製配置する。インキュベーション24時間後、三個の試験画像をBioquant画像分析システムを使用してそれぞれの濃度で得る。未処理のコントロールと比較した薬剤効果($I C_{50}$)を、形成されたコードの長さ及び結合数を測定して評価する。

【0150】

C. 細胞移動アッセイ：

移動を、48-ウェルボイデンチャンバー(商標)及び8 μm 孔径のコラーゲン被覆された(10 $\mu g/ml$ ラット尾コラーゲン; Collaborative Lab社製)ポリカーボネートフィルター(Osmonics, Inc.)を使用して評価する。底部チャンバー-ウェルに27~29 μl のD M E M培地のみ(ベースライン)又は化学走性誘因物質含有培地(b F G F、V E G F又はスイス3 T 3細胞条件付け培地)を配置する。上部チャンバーに試験化合物を含む又は含まないD M E M + 1% B S A中で調製される45 μl のH U V E C細胞懸濁液(1 \times 10⁶細胞/ml)を配する。37で5時間インキュベーション後、膜をP B S中で洗浄し、Diff-Q uick溶液中に固定化して染色する。フィルターをガラススライド上に、移動した細胞を下向きに配置し、上部の細胞をK i m w i p e(商標)を使用して除去する。試験は4~6複製物及びそれぞれのウェルからの5視野を計測して行う。陰性無刺激コントロール値を刺激されたコントロール及びドラッグ処理した値から除き、データを平均移動細胞±S.D.としてプロットする。 $I C_{50}$ をプロットしたデータから算出する。

【0151】

実施例2(EphB4レセプターの細胞外領域フラグメントは、血管形成及び腫瘍増殖を阻害する。)

A. EphB4の球状領域が内皮性管形成アッセイ中で、エフリンB2結合のために、及びEphB4由来の可溶性蛋白質活性を測定するために必要である。

レセプターの可溶性組み換え型誘導体の抗血管形成活性に必要十分なEphB4の異所性部位のサブドメインを特定するために、EphB4 E Cの4種の組み換え型欠失変異体を生産し、試験した(図16)。EphB4の細胞外部位は、Eph B及びEph Aレセプターファミリーの他の構成員と同様に、N-末端リガンド結合球状領域、次にシステイン-リッチ領域及び2個のフィブロネクチン型IIIリピート(F N III)を含有する。EphB4の完全異所性部位を含有する組み換え型B 4 - G C F 2蛋白質に加え、球状領域及びC y s -リッチ領域(B 4 - G C)を含有するEphB4 E Cの3個の欠失変異体を構築した；即ち、球状、C y s -リッチ及び第一のF N III領域(G C F 1)並びに削除された球状領域(C F 2)を有するE C D変異体。球状領域のみを含有する短縮されたEphB4 E C蛋白質の数個のバージョンを生産するための試みは成功せず、その理由はこれら全ての構築物から発現した蛋白質の分泌の欠如、及び細胞内で発現された組み換え型蛋白質により結合されたリガンドの不存在であった。更に、B 4 - G C F 2の非標識化体(G C F 2 - Fという)は、追加的に融合されたアミノ酸を有さないEphB4の完全な細胞外領域を含有するものであり、発現され、精製され、ここで記載される実験の幾つかで使用された。

【0152】

4個全てのC末端6×H i s標識化組み換え型蛋白質を一時的にトランスフェクトされた培養ホモ細胞中で予備的に発現し、条件付けした増殖培地からN i ²⁺キレート樹脂上のクロマトグラフィーを使用して親和性精製して均質化した(図17)。明らかにこれらのグリコシル化を原因として、この蛋白質は34.7 kDa(G C)、41.5(C F 2)、45.6 kDa(G C F 1)及び57.8 kDa(G C F 2)のそれらの予測分子量により示唆されるよりもいくらか高くS D S - P A A G上を移動する。ヒトEphB4の細胞外領域の配列は、C y s -リッチ領域中の、第一フィブロネクチン型IIIリピート中にあり第一及び第二フィブロネクチンリピート間に位置する、3個の予測N-グリコシル化部位(N X S / T)を含有する。

【0153】

エフリンB2へ結合される精製された組み換え型蛋白質の能力を確定するために、それら

20

30

40

50

を *in vitro* 結合アッセイで試験した。予測されるように、C F 2 ではなく G C 、 G C F 1 及び G C F 2 は同系のリガンドエフリンB2を結合し、それはエフリンB2-アルカリホスファターゼ(エフリンB2-A P)融合蛋白質と N i²⁺樹脂又はニトロセルロース膜上に固定化された B 4 蛋白質との相互作用により確認される(図17)。

【0154】

4個全ての蛋白質も又、それらの、リガンド-依存性二量体化、及びP C 3 細胞中のEph B4レセプター-キナーゼの活性化をブロックする能力も試験された。P C 3 ヒト前立腺癌細胞系は、上昇したレベルのヒトEphB4を発現することは公知である。P C 3 細胞のエフリンB2IgG Fc融合蛋白質による刺激は、レセプターのチロシンリン酸化の急速な誘導を導く。しかし、リガンドのC F 2 ではなく G C F 2 、 G C F 1 又は G C 蛋白質とのプレインキュベーションは、その次に続くEphB4自動リン酸化を抑制する。蛋白質単独のP C 3 細胞への添加又は細胞の蛋白質とのプレインキュベーション及び次の培地交換及びリガンド添加は、EphB4リン酸化段階に作用しない。
10

更に、EphB4の球状領域は、内皮性管形成アッセイ中のEphB4由来の可溶性蛋白質の活性に必要であることが発見された。

【0155】

B . H U V / A E C の可溶性EphB4の *in vitro* 効果；

可溶性EphB4が血管形成経路中の主要な3段階に作用したか否かを決定するために、初期実験を行った。これらは、H U V / A E C による *in vitro* の移動/侵潤、増殖及び細管形成への可溶性EphB4の効果を確定することにより実施した。可溶性EphB4への曝露は、投薬量依存性拳動でのボイデンチャンバー(商標)アッセイ中のb F G F 及びV E G F -両方の誘起移動を非常に阻害し、n Mでの重要性を確定した(図18)。マトリゲル(商標)被覆されたウェル上の、H U V / A E C S による細管形成は、b F G F 及びV E G F の不存在及び存在のいずれでも可溶性EphB4により投薬量依存性拳動で非常に阻害された(図19)。又 *in vitro* で可溶性EphB4のn MはH U V E C S へ細胞毒性であったか否かを評価した。
20

M T S アッセイで評価したように、可溶性EphB4のこれらの投薬量では細胞毒性効果が検出されなかった(図20)。

【0156】

C . 可溶性EphB4レセプターは、マトリゲル(商標)プラグの *in vivo* 血管形成を抑制する
30 ;

可溶性EphB4が *in vivo* 血管形成を直接に阻害することを示すために、ネズミマトリゲルプラグ実験を行った。b F G F 及びV E G F を可溶性EphB4の存在又は非存在下で補充したマトリゲル(商標)をBalb/C nu/nuマウスへs . c . 注射し、半固体プラグを6日間で形成した。増殖因子無しのプラグは、6日後に実質的に血管形成又は脈管構造が生じなかつた(図21)。反対に、b F G F 及びV E G F を補充されたプラグは、プラグ全体に充分な血管形成及び脈管を生じた。μ g の可溶性EphB4で処理したマウスから取り出されたプラグでは、増殖因子なしのプラグと比較してプラグの血管形成が顕著に減少した(図21)。更に、プラグの組織試験は脈管染色が減少したことを示した(図21)。
40

【0157】

μ g / 投薬量での治療は、コントロールと比較してマトリゲルプラグ中への湿潤を非常に阻害した(図21)。可溶性EphB4-処理した細胞からの溶解産物及びリン酸(phosphor)-チロシンに対する抗体を使用してウェスタンプロット法分析を実施して、H U V E C 中のEphB4レセプター-リン酸化を試験した。血清-飢餓状態にしたH U V E C の可溶性EphB4処理は、エフリンB2Fc、EphB4リガンド二量体の存在下で、リン酸化EphB4のレベルの急速及び一時的な減少を刺激した。可溶性EphB4蛋白質なしのエフリンB2Fcは、EphB4レセプターのリン酸化を誘起した(図22)。

【0158】

D . 腫瘍増殖に対する可溶性EphB4の *in vitro* 効果；

可溶性EphB4はBalb/C Nu/Nuマウス中のS C C 1 5 腫瘍の増殖を抑制することが発見さ
50

れた（図23）。

E. 可溶性EphB4は角膜新生血管形成を阻害した；

可溶性EphB4のin vivo抗血管形成活性を更に検討するために、bFGFで誘起されたマウス角膜中の新生血管形成に対する可溶性EphB4投与の阻害的效果を試験した。角膜マイクロポケット中へ移植されたHydron（商標）ペレットは、通常の血管面積中の血管形成を増殖因子の存在下で誘起できる。マウス角膜中の血管形成応答は中程度であり、血管芽の発生は遅れ、新しい毛細血管はまばらでゆっくりとしか成長しなかった。コントロールグループと比べて、移植7日目に、bFGFによりマウス角膜中で誘起された新生血管形成は、可溶性EphB4-処理したグループ中で顕著に阻害された（図24）。

【0159】

F. 腫瘍増殖に対する可溶性EphB4のin vivo効果；

同一のモデルを、可溶性EphB4のin vivo効果を決定するために使用した。SCC15腫瘍をマトリゲルと共に増殖因子有り又は無しでプレインキュベートして皮下移植し、又sc単独で移植し、マウスを一日1～5ugの可溶性EphB4でsc又はip処理して実験した。

【0160】

コントロールグループ中の腫瘍は、処理期間中連続して着実に増殖し、最終腫瘍体積mm³に達した。しかし、可溶性EphB4を注射した動物では増殖速度が非常に（p < 0.0/）減少し、最終腫瘍体積はたったmm³であった（図25）。類似の結果が更に2個のこれら腫瘍保持マウスの集団でも得られた。可溶性EphB4の投与は、動物の体重又は一般的健康に対する非常な効果を示さないでin vivoで耐薬物性に優れることができ明らかになった（昏睡、断続的な背中の曲げ、震え又は不安定な呼吸パターンの不存在により決定された）。

【0161】

G. 腫瘍組織に対する可溶性EphB4の効果；

組織分析は、通常腫瘍細胞の生存縁部um幅で囲まれている、全SCC15腫瘍中の壊死の中心面積の存在を明らかにした。中心壊死面積はしばしば大きく接触性（confluent）であり、細胞詳細部の喪失を示した。腫瘍断片面積の割合として評価した壊死は、可溶性EphB4-処理したグループで非常に（p < 0.02）多かった（コントロールに対する処理体の%壊死）。可溶性EphB4処理した腫瘍体積の減少はこの蛋白質の腫瘍血管供給に対する効果によるのか否かを決定するために、血管中の内皮細胞を、腫瘍断片中で抗血小板細胞付着分子（PECAM-1；CD31）抗体を使用した免疫染色法を使用して特定し、微細血管の密度を評価した（図26）。微細血管密度は、コントロール中及び可溶性EphB4-処理した腫瘍中の、腫瘍細胞の外側の生存縁部（よく区別される核を有する腫瘍の周辺部へ隣接する細胞の均一層）と類似した。微細血管密度は非常に内側にあり、コントロール腫瘍より可溶性EphB4-処理した壊死性中心面積に接触する腫瘍細胞の生存領域がより少なかった。マッソン社製トリクローム（商標）染色で特定されるように、纖維素沈着はコントロール腫瘍より、内側生存縁部中の血管中及び周囲並びに可溶性EphB4処理した中心壊死性コアで増加した。可溶性EphB4処理した腫瘍の生存縁部の外側では、脈管管腔は空腔を保持し、赤血細胞を含有するが、纖維素沈着は多くの脈管周囲で顕著であった。可溶性EphB4は、試験された正常組織（肺、肝臓及び腎臓）中の内皮に対してはこれらの効果が無いことが発見された。

【0162】

H. 材料及び方法；

本実施例の材料及び方法の詳細な説明は米国特許出願公開第20050084873号明細書に見出すことができる。

【0163】

細胞-ベースのEphB4チロシンキナーゼアッセイ；

ヒト前立腺癌細胞系PC3細胞を10%半透膜ろ過したウシ胎仔血清及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン/ネオマイシン抗生物質混合物と共に RPMI培地中で維持した

10

20

30

40

50

。細胞を 5 % C O₂ / 95 % 空気湿生霧囲気下 37 ℃ で保持した。通常、細胞を接触するまで 60 mm ディッシュ中で増殖し、10 分間 1 μg / ml の RPMI 中でマウスエフリン B2-Fc 融合で処理して EphB4 レセプター活性化するか、コントロールとして単純 (plain) 培地で処理した。EphB4 レセプター活性化に対する可溶性 EphB4 ECD 蛋白質の異なる誘導体の効果を試験するために、3 セットの細胞を使用した。第一のセットで、細胞を種々の蛋白質 (5 蛋白質 ; G C、GCF1、GCF2、GCF2-F、CF2) で 5 μg / ml 20 分間処理した。第二セットの細胞では、適用前に、蛋白質を 1 : 5 (EphB4 蛋白質 : B2-Fc) モル比でエフリン B2-Fc と予備混合し、20 分間インキュベートし、細胞上に 10 分間適用した。第三セットの細胞では、細胞を最初に蛋白質と 20 分間 5 μg / ml で処理し、培地を 1 μg / ml のエフリン B2-Fc を含有する新しい培地で置換し、更に 10 分間 10 インキュベートした。

【 0164 】

刺激後、細胞を直ちに、20 mM Tris-HCl、pH 7.4、150 mM NaCl、1% (v/v) Triton X100 (商標)、1 mM の EDTA、1 mM の PMSF、1 mM バナジン酸ナトリウムを含有する蛋白質抽出バッファで採取した。蛋白質抽出物を、14000 rpm、20 分間 4 ℃ 遠心分離で清澄化した。清澄化蛋白質サンプルを抗 EphB4 モノクローナル抗体予備コートされたプロテイン A/G 結合したアガロースビーズと共に一晩インキュベートした。IP 複合体を同じ 0.1% Triton X100 (商標) を含有する抽出バッファで 2 回洗浄した。免疫沈降した蛋白質を 1X SDS-PAGE サンプルローディングバッファ中で可溶化し、10% SDS-PAGE で分離した。EphB4 レセプター活性化試験のために、電気プロッティングした膜を 1 : 1000 希釈の抗 pTyr 特異的抗体 4G10、次に 1 : 5000 希釈のプロテイン G-HRP 複合体でプローブした。

【 0165 】

内皮細胞管形成アッセイ :

マトリゲル (商標) (60 μl の 10 mg / ml; Collaborative Lab 社製、カタログ番号 35423) を氷冷 96 - ウェルプレートのそれぞれのウェル中に設置した。プレートを室温で 15 分間放置し、次に 37 ℃ で 30 分間インキュベートしてマトリゲル (商標) をポリマー化した。その間に、ヒトヘその緒の静脈内皮細胞を、EGM-2 (Clonetic 社製、カタログ番号 CC3162) 中、濃度 2 × 10⁵ 細胞 / ml で調製した。試験蛋白質を同じ培地中の 2 × 目的濃度 (5 濃度レベル) で調製した。細胞 (500 μl) 及び 2 × 蛋白質 (500 μl) を混合し、200 μl のこの懸濁液をポリマー化したマトリゲル (商標) の複製物中に加えた。インキュベーション 24 時間後、三個の試験画像をそれぞれの濃度で Bioquant (商標) 画像分析システムを使用して取った。蛋白質添加効果 (IC₅₀) を形成されたコード長さ及び結合数を測定して、未処理のコントロールと比較して評価した。

【 0166 】

細胞移動アッセイ :

H U V E C の V E G F への走化性を、modified ボイデンチャンバー (商標、マトリゲルでコートしたトランスウェル膜フィルターインサート ; 24 ウェルプレート、6.5 mm 直径、8 μm 孔径、10 μm 厚ポリカーボネート膜 (BD Biosciences 社製)) を使用して評価した。200 μl の EBM 中の H U V E C 細胞の懸濁液 (2 × 10⁵ 細胞 / ml) を、上室チャンバーに接種し、可溶性 EphB4 蛋白質を刺激剤 (VEGF 又は bFGF) と同時にチャンバーの下室へ添加し、100 nM ~ 1 μM 試験化合物の存在又は非存在下で 10 ~ 20 ng / ml の VEGF に応答してポリカーボネートフィルターを通過するそれらの移動を測定した。37 ℃ で 4 ~ 24 時間インキュベーション後、フィルターの上部表面を綿棒でスクレープし、フィルターを固定して Diff Quick (商標) で染色した。200 × 倍率で 10 のランダム視野を計測し、結果を視野当たりの平均数として示した。刺激されたコントロール及び蛋白質処理したサンプル値から陰性無刺激コントロール値を除き、データを平均移動した細胞 ± S.D. としてプロットした。IC₅₀ をプロットしたデータから算出した。

【0167】

増殖阻害アッセイ：

H U V E C (1.5×10^3 細胞) を $100 \mu l$ の E B M - 2 (Clonetic 社製、カタログ番号 C C 3 1 6 2) を含む 96 - ウェルプレート中にプレートした。24 時間後 (第 0 日) 、試験用組み換え型蛋白質 ($100 \mu l$) をそれぞれのウェルへ E B M - 2 培地中に 2 \times 目的濃度 (5 ~ 7 濃度レベル) で添加した。第 0 日に、1 のプレートを 20 % メタノール中 0 . 5 % クリスタルバイオレットで 10 分間染色し、水で洗浄し、空気乾燥した。残っているプレートを 72 時間 37 °C でインキュベートした。72 時間後、プレートを 20 % メタノール中 0 . 5 % クリスタルバイオレットで染色し、水で洗浄し、空気乾燥した。染色は、エタノール : 0 . 1 M クエン酸ナトリウム 1 : 1 溶液で溶離し (第 0 日プレートを含む) 、吸光度 540 nm で E L I S A リーダー (Dynatech ラボラトリーズ社製) を使用して測定した。第 0 日吸光度を 72 時間プレート結果から減じ、データをコントロール増殖 (ピヒクル処理した細胞) 割合としてプロットした。I C₅₀ 値をプロットしたデータから算出した。10

【0168】

ネズミマトリゲル (商標) プラグ血管形成アッセイ：

In vivo 血管形成をマウス中の皮下組織からマトリゲルプラグ含有試験サンプル中への血管の成長としてアッセイした。マトリゲル (商標) は急速に体温で固体ゲルを形成し、因子をトラップして除放及び周囲の組織への長期間の曝露を可能とする。4 °C で液状のマトリゲル (商標) (8 . 13 mg / ml, 0 . 5 ml) を内皮細胞成長補充物 (E C G S) 、試験蛋白質プラス E C G S 又はマトリゲル (商標) プラスピヒクル単独 (P B S 含有 0 . 25 % B S A) と混合した。マトリゲル (商標) (0 . 5 ml) をメス nu/nu マウス (6 週齢) の腹部皮下組織へ腹膜中心線に沿って注射した。それぞれのグループに 3 マウスを使用した。動物は、慣習及び N I H ガイドラインに従って取り扱った。6 日目に、マウスを犠牲にし、プラグを回収し、組織を処理した。通常表面の皮膚を除去し、ゲルをサポート用に腹膜ライニングを保持したまま取り出し、10 % 緩衝ホルマリンの P B S 溶液中で固定化してパラフィン中に包埋した。3 μm の断片に切断し、H & E 又はマッソン社製トリクローム (商標) 染色で染色し、光学顕微鏡で試験した。20

【0169】

マウス角膜マイクロポケットアッセイ：

マウス角膜マイクロポケットアッセイを K e n y o n ら、1996 の詳細に従い行った。簡潔には、90 ng の b F G F (R & D) 又は 180 ng の V E G F (R & D システムズ社製、ミネアポリス、M N 、米国) のいずれか及び 40 μg のスクロース硫酸アルミニウム (シグマ社製) を含有する hydron ベレット (ポリヒドロキシエチルメタクリレート [ポリ H E M A] 、 Interferon Sciences 社製、ニューブランズウィック、N J 、米国) を作成した。手術用顕微鏡を使用して、間質性直線状角膜切開を外科用ブレード (商標、B a rd-Parker 社製、no. 15) を使用して麻酔した動物の外側直筋の挿入物と平行に行なった。基質内のマイクロポケットを、改良フォングレーフェ刀 (2 ' 30 mm) を使用して切開した。1 個のベレットを移植し、一時的 (temporal) 角膜輪部 (b F G F ベレット用に $0 \pm 7 \pm 1 \pm 0$ mm 及び V E G F ベレット用に 0 ± 5 mm 内) に対して進め、それぞれの増殖因子用のベレット位置内での相違は、このモデル内で V E G F の比較的弱い血管形成刺激を生じるために必要であるように決定された。次に抗生物質軟膏 (エリスロマイシン) を手術した目へ適用し、感染を防止し表面不規則性を減少させた。次に角膜輪部脈管構造からベレットに向かって延びる血管の応答を測定した。ここで示される新生血管形成の隣接した外周部のデータ及び臨床性写真はベレット移植後 6 日目に得られ、その日は最大血管形成応答日であることが明らかになった。3040

【0170】

In vitro 侵潤アッセイ：

「マトリゲル (商標) 」マトリックス被覆された 9 - mm 細胞培養インサート (孔径 8 μm ; ベクトンディッキンソン社製、フランクリンレイクス、N J) を 24 - ウェルプレートに用意した。

ート中に配置した。H U V E C 細胞を密度 5×10^3 / ウェル細胞で培養インサートの上層中に接種し、24時間EphB4 E C D の存在下で血清フリーE B Mで培養した。コントロールグループと同じ培地中にEphB4無しに培養した。次に0.5mlのヒトS C C 1 5 細胞系、条件付け培地を、培養インサートの下層中に化学走性誘因物質として充填した。細胞を24時間インキュベートし、次に上層中に残っている細胞を綿棒でかきとり下層中の通過した細胞を5%グルタルアルデヒドで固定化し、Diff Quick（商標）で染色した。マトリゲル（商標）マトリックス及びそれぞれの8 μm 孔径の培養インサートを通過した細胞合計数を光学的顕微鏡を使用して測定し、侵潤インデックスとして規定した（細胞数 / 面積）。

【0171】

10

マウス中のS C C 1 5 腫瘍の成長；

対数的に増殖するS C C 1 5（頭部及び頸部扁平上皮細胞癌細胞系）を 5×10^6 細胞密度で、EphB4 E C D の存在又は非存在下で、ヒトb F G F の存在又は非存在下で、胸腺欠損マウスBalb/cヌードマウス中に、マトリゲル（商標、BD Biosciences社製）合成基底膜（1：1 v / v）と共に皮下注射し、2週間腫瘍を検査した。EphB4 E C D グループ中の腫瘍体積は、ビヒクルグループ中のそれよりも移植後の増殖因子の存在及び不存在で3倍小さかった。グループ間に体重の違いはなかった。切除された腫瘍の横断面の免疫組織化学試験及びT U N E L -陽性アポトーシス又は壊死、C D 3 4 免疫染色法、及びBrdU増殖速度試験を、脱パラフィン化後、再水和し、内因性ペルオキシダーゼ活性のためにクエンチし、プロテアーゼKでの透過化処理で10分後行った。血管密度の量的評価も又行った。局部的腫瘍内デリバリー又はEphB4 E C D のI V デリバリーも又、週2回行った。

20

【0172】

30胸腺欠損ヌードマウス、B A L B / c (nu/nu)へ、0.1mlマトリゲルと混合した0.1mlP B S 中の 1×10^6 B 1 6 黒色腫細胞をそれぞれ注射し、又は200 μl のD M E M 血清フリー培地中に再懸濁した 1.5×10^6 S C C 1 5 細胞を0日目にマウスの右肩領域へ皮下注射した。蛋白質を、開始1日目にローディング投薬量4 $\mu\text{g} / \text{mg}$ で腫瘍周囲に静脈内又は皮下注射し、2 $\mu\text{g} / \text{mg}$ の注射を週間毎に行い（10 $\mu\text{g} / \text{g}$ 、50 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ ）、接種後2週間検査した。マウスは14日目に犠牲にされた。コントロールマウスはP B S 5 0 μl を毎日投与された。

30

【0173】

ヌードマウス中の腫瘍形成；

全動物は動物愛護協会組織に承認されたプロトコルに従って取り扱った。癌細胞（ 5×10^6 ）をヌードマウスの背中皮膚に皮下接種した。腫瘍が約 100 mm^3 の大きさまで増殖した時に（通常12日かかった）、s EphB4を腹膜内又は皮下に1回 / 日注射し、腫瘍発生を2週間監視した。腫瘍体積を式 $a^2 \times b$ に従って算出した、但し a 及び b はそれぞれ最小及び最大直径である。スチューデントt試験を腫瘍体積を比較するために使用し、 $P < 0.05$ は優位であるとみなした。

【0174】

40

微細血管密度の定量化；

腫瘍を4%ホルムアルデヒド中に固定化し、パラフィン中に包埋し、5 μm に断片化し、ヘマトキシリソエオシンで染色した。脈管密度をコンピュータベースの画像分析機を使用して半定量化した（それぞれのグループのマウス3頭からの断片当たり5視野）。

【0175】

実施例3（EphB4は、アップレギュレートされて前立腺癌に成長促進を付与する。）

A. 前立腺癌細胞系中のEphB4の発現；

最初にウェスタンプロット法により種々の前立腺癌細胞系中でEphB4蛋白質の発現について試験した。前立腺癌細胞系は顕著な変異体を120kD EphB4中に豊富に示すことが見いだされた。レベルはP C 3 中で比較的高く、P C 3 M (P C 3 の転移性クローニ) でさえ高い。一方、正常前立腺由来の細胞系 (M L C) はEphB4の発現を僅か又は全く示さない（図27A）。次にP C 3 細胞中のEphB4の活性化段階をリン酸化試験により確認し

50

た。正常培養条件下でさえ、EphB4はそのリガンド、エフリンB2により更に誘起されるにもかかわらず、ホスホリル化されることが明らかになった（図27B）。

【0176】

B . 臨床性前立腺癌サンプル中のEphB4の発現；

EphB4が臨床性前立腺サンプル中で発現したか否かを決定するために、前立腺癌外科的標本からの腫瘍組織及び隣接した正常組織を試験した。前立腺標本中のEphB4の組織的分布を免疫組織化学法により決定した。明らかに、EphB4発現は新生物性上皮に限定され（図28、左上）、間質性及び正常前立腺上皮では存在しない（図28、右上）。前立腺組織アレイ中、試験された32前立腺癌の24が陽性であった。量的RT-PCRによりEphB4 mRNAは、臨床性サンプルの正常及び腫瘍組織の両方で発現したことが明らかになった。しかし、腫瘍EphB4 mRNAレベルは、このケースでは正常な場合よりも少なくとも3倍高かった（図28、右下）。

10

【0177】

C . p53及びPTENはPC3細胞中のEphB4の発現を阻害した；

PC3細胞は、PTEN発現（Davisら、1994、Science.266:816-819）及び野生型p53機能（Galeら、1997、Cell Tissue Res.290:227-241）を欠如することは当分野で公知である。EphB4の比較的高い発現はp53及び/又はPTENに関係するか否かを、野生型p53及び/又はPTENのPC3細胞の再導入により検討した。トランスフェクション効率及び希釈効果を補填するために、トランスフェクトされた細胞は共トランスフェクトされた短縮されたCD4マーカーについて分類された。PC3細胞中のEphB4の発現は、野生型p53又はPTENのいずれかの再導入により減少した。p53及びPTENの共トランスフェクションは、EphB4の発現を更に阻害しなかった（図29A）。

20

【0178】

D . レチノイドXレセプター（RXR）はEphB4の発現をレギュレートする；

発明者らは以前にRXRは前立腺癌細胞系中でダウンレギュレーションされることを発見したが（Zhangら、2003、Cancer Biol Ther.2:179-184）、EphB4発現は、「正常」前立腺（MLC）、前立腺癌（PC3）及び転移性前立腺癌（PC3M）を検討した時には逆の発現パターンを有することを今回発見し（図27A）、RXRはEphB4の発現をレギュレートするのではないかと考えた。この関係を確認するために、EphB4の発現を構成的にRXRを発現するCWWR22R及びCWWR22R-RXR間で比較した。RXR過発現細胞系でのEphB4発現の適度な減少が発見された一方、FGF8はEphB4発現に効果がなかった。初期結果に適合するように、EphB4は「正常」良性前立腺肥大性細胞系BPH-1中に発見されなかった（図29B）。

30

【0179】

E . EGF-R及びIGF-1Rの増殖因子シグナル経路はEphB4発現をレギュレートする；

EGFR及びIGF-1Rは両方共PC3細胞増殖に対するオートクリン及びパラクリン作用を有することを示した。EphB4発現はより悪性の細胞系ではより高いために、EphB4発現はこれらのprr-生存増殖因子と相關関係を有することが予測された。独立してEGFR及びIGF-1Rシグナルをブロッキングすることによりその関係を試験した。EphB4は、EGFRキナーゼ阻害剤AG1478を使用したEGFRシグナルのブロッキング後（図30A）又はIGF-1R中和抗体を使用したIGF-1Rシグナル経路のブロックにおいて（図30B）ダウンレギュレーションされた。

40

【0180】

F . EphB4 siRNA及びアンチセンスODNはPC3細胞生存能力を阻害する；

前立腺癌モデル中のこのEphB4過発現の有意性を確定するために、比較的高いEphB4の発現を示すPC3細胞に研究を集中した。EphB4発現を減少させる2つのアプローチは、siRNA及びAS-ODNであった。EphB4コーディング領域の異なるセグメントを相補する多くの異なるホスホリチオアート-改質AS-ODNについて、EphB4阻害の特異性及び効率を試験した。完全長EphB4発現ベクターAS-10で一時的にトランスフェクトされた293細胞を使用すると、最も効果的であることが発見された（図31B）。類似のアプローチ

50

を特異的siRNAの選択へ適用した。EphB4 siRNA 472は、EphB4蛋白質発現を効果的にノックダウンした(図31A)。siRNA 472及びアンチセンスAS-10ODNの両方は、投薬量依存性拳動でPC3細胞の生存能力を減少した(図31C、D)。関係のないsiRNA又はセンスオリゴヌクレオチドは生存能力に効果がなかった。

【0181】

G . EphB4 siRNA及びアンチセンスODNはPC3細胞の移動性を阻害する；

PC3細胞は、マウス内へ同所的に注射した場合に局部的に進行的に増殖し、リンパ節転移を形成できる。PC3細胞のIn vitro移動に対するEphB4の機能を検討するために創傷治癒アッセイを行った。創傷がPC3細胞の単層中に導入された場合、次の20時間のコースで、細胞はクリアな領域中へ進行的に移動した。しかし、細胞がsiRNA 472でトランスクレオチドされ、創傷が導入された場合、この移動は非常に阻害された(図31E)。PC3細胞の10μMのEphB4 AS-10による12時間の予備処理は、同じ効果を生じた(図31F)。更に、siRNA 472を有するPC3細胞中EphB4発現のノックダウンは、コントロールsiRNAと比べてこれらの細胞のマトリゲル(商標)侵入能力を激しく減少させたことがダブル-チャンバー侵潤アッセイにより評価された(図31G)。

【0182】

H . EphB4 siRNAは、PC3細胞中で細胞周期停止及びアポトーシスを誘起する；

EphB4のノックダウンは細胞生存能力減少を生じたために(図31C)、これが細胞周期に対する効果に起因するのかを検討した。コントロールsiRNAトランスクレオチドした細胞との比較において、siRNA 472はコントロールsiRNA処理した細胞と比べてサブG0及びS期フラクション中の細胞の蓄積を生じた。コントロールsiRNA処理した細胞と比べてsiRNA 472処理細胞中で、サブG0フラクションは1%から7.9%へ増加し、S期フラクションは14.9%から20.8%へ増加した(図32A)。サブG0及びG2での細胞周期停止はアポトーシスを表す。EphB4ノックダウンの結果としてのアポトーシスは、ELISAアッセイにより確認された。アポトーシスの投薬量依存性増加は、PC3細胞がコントロールsiRNAではなくsiRNA472でトランスクレオチドされた場合に確認された(図32B)。100nMで、siRNA 472トランスクレオチドされた細胞中ではコントロールsiRNAトランスクレオチドされたPC3細胞中よりも15倍多くアポトーシスを生じた。

【0183】

I . 材料及び方法；

本実施例の材料及び方法の詳細な説明は米国特許出願公開第20050084873号明細書に見出すことができる。

【0184】

実施例4 (中皮腫中のEphB4の発現：治療のターゲット候補)

悪性中皮腫(MM)は、稀な新生物であり、最もしばしば胸膜性及び腹腔性漿液表面から生じる。胸膜腔は、最もしばしば患部となる部位であり(>90%)、次が腹膜である(6~10%)(Carboneら、2002、Semin Oncol. 29: 2-17)。これはアスペスト暴露とは強い関連性があり、約80%の悪性中皮腫病はアスペストを摂取又は吸入した患者に生じる。この腫瘍は、現在に至るまで従来の治療法ではあまり効き目がなく、これらの患者の予後は非常に不良である(Leeら、2000、Curr Opin Pulm Med. 6: 267-74)。

悪性中皮腫の診断及び処理に関するいくつかの臨床性問題は、未だ解決されていない。胸膜又は腹部流体からの中皮腫の診断は非常に困難であり、しばしば胸腔鏡又は腹腔鏡又は開胸バイオプシー並びにこの腫瘍に選択的に発現するmeosthelin等の所定のマーカー用の免疫組織化学染色法を必要とする。現在まで、攻撃的な化学療法養生法及び長期間の放射線治療法であっても介入が治療効果のあるものとは証明されていない。多くのケースで生存平均値は、診断後たったの12~18月である。

新規な診断用マーカー及び新しい診断用及び治療用アプローチに使用される標的を特定するために、中皮腫細胞及び臨床性サンプル系中のEphB4及びそのリガンドエフリンB2の発現を評価した。

【0185】

10

20

30

40

50

A . EphB4及びエフリンB2は中皮腫細胞系中で発現した；

悪性中皮腫細胞系中のエフリンB2及びEphB4の発現を、種々の方法によりRNA及び蛋白質レベルで決定した。RT-PCRは全ての4個の細胞系はエフリンB2及びEphB4を発現することを示した（図33A）。これらの細胞系中の蛋白質発現をウェスタンプロット法により決定した。EphB4の特異的バンドは120KDに見られた。更に、エフリンB2を、ウェスタンプロット法で試験された全細胞系中に37kDバンドとして検出した（図33B）。エフリンB2の特異的バンドは、陰性コントロールとして試験された293ヒト胎児腎臓細胞中に観察されなかった。

中皮腫細胞中のEphB4転写の存在を確認するために、in situハイブリダイゼーションをチャンバースライド上で培養されたNCI-H28細胞系に対して実施した。EphB4に対する特異的シグナルをアンチセンスプローブを使用して検出した。エフリンB2転写物も又同じ細胞系中に検出した。EphB4及びエフリンB2両方用のセンスプローブは陰性コントロールとして働き、細胞とハイブリダイズしなかった（図34）。EphB4及びエフリンB2蛋白質の発現は、免疫蛍光分析により細胞系中に確認された（図35）。3個の細胞系は強いEphB4の発現を示し、一方エフリンB2の発現はH28及びH2052中に存在し、H2373中では弱く検出可能であった。

【0186】

B . 臨床性サンプル中のEphB4及びエフリンB2の発現の証拠；

胸膜の悪性中皮腫と診断された患者の胸水から培養された腫瘍細胞を単離し、パッセージ1でEphB4及びエフリンB2の両方について陽性染色を示した（図35、最下層）。これらの結果は、中皮腫細胞系中のEphB4及びエフリンB2の共発現を確認する。腫瘍細胞系中で見られるこれらの結果が、病状において発現を真に反映するかどうかを決定するために、腫瘍バイオプシーサンプルをEphB4及びエフリンB2のために免疫組織化学染色した。両方の蛋白質に対する抗体は、腫瘍細胞中で陽性染色を示した。代表的データを図36に示す。

【0187】

C . EphB4は中皮腫の細胞増殖及び移動に関係する；

EphB4の細胞増殖中の作用を、EphB4特異的消毒（antisepses）オリゴヌクレオチド及びsiRNAを使用して試験した。培養されたH28のEphB4アンチセンスによる処理は、細胞生存能力を減少した。最も有効なEphB4発現阻害剤は、EphB4 AS-10（図37A）であった。EphB4 siRNA 472のトランスフェクションは、同じ効果を生じた（図37B）。

MMは局部的に進行する病気であり、しばしば拡張し胸壁、心臓及び食道等の隣接する重要器官中へ成長する。このin vitroプロセスを研究する試みにおいて、発明者らは以前に記載した技術を使用して創傷治癒アッセイを実施した（3:36）。創傷がサブ接触性H28細胞中へ導入された場合に、次の28時間の間、細胞は創傷範囲内へ進行的に移動する。しかし、細胞をEphB4 AS-10で24時間予備処理してから創傷が導入された場合、この移動は実質的に完全に防止される（図38A）。ボイデンチャンバー（商標）アッセイによりEphB4 siRNAを使用した移動研究は、EphB4発現の阻害と共に細胞移動が非常に阻害されたことを示した（図38B）。

【0188】

D . 材料及び方法；

本実施例の材料及び方法の詳細な説明は米国特許出願公開第20050084873号明細書に見出すことができる。

【0189】

実施例5（EphB4は頭部癌及び頸部癌の扁平上皮細胞癌中で発現した：表皮増殖因子シグナル経路によるレギュレーション及び成長効果）

頭部癌及び頸部癌の扁平上皮細胞癌（HN SCC）は、世界で最も頻度の高い第6位の癌であり、毎年900000病例が診断されると見積もられる。それはいくつかの発展途上国では全悪性疾患のほとんど50%である。米国では、50000人の新患者及び8000人の死亡が毎年報告されている。タバコ発癌物質は、重要因子としてアルコール消費

10

20

30

40

50

、年齢、性別及び民族的背景と共にこの病気の主要な病因性要因であると考えられる。

【0190】

上部気管消化管の正常上皮及びその組織から生じる癌細胞間の相違は、特定の遺伝子中の突然変異及びそれらの発現の変更の結果である。これらの遺伝子は、DNA修復、増殖、不死化、アポトーシス、侵潤及び血管形成を調節する。頭部癌及び頸部癌に関して、3個のシグナル経路の変更は充分な頻度で発生し、この病気の決定的な形質変換事由であると考えられる劇的な表現型変化を生じる。これらの変化として、p53腫瘍サプレッサーの突然変異、表皮増殖因子レセプター(EGFR)の過発現及びサイクリン依存性キナーゼインヒビターp16の不活性化が挙げられる。他の変化として、Rb突然変異、ras活性化、サイクリンD増幅、及びmyc過発現等は、HNSCC中ではより頻度が低い。
10 高いEphB4の発現は血液性悪性疾患、乳癌、子宮内膜癌及び腸癌中で報告されているが、EphB4蛋白質レベルに対しては限られたデータしかなく、HNSCC等のこの蛋白質の腫瘍生物学に対する生物学的有意性データは完全に欠落している。

【0191】

A. HNSCC腫瘍はEphB4を発現する；

免疫組織化学法(in situハイブリダイゼーション)及びウェスタンプロット法によりヒト腫瘍組織中でEphB4の発現を研究した。20個の採取された有望な腫瘍組織を、IRB認定に従って、EphB及びEphAファミリーの他の構成員と反応しない特異的EphB4モノクローナル抗体と評価した。EphB4発現を染色強度を変化させて全ケースで観察する。図39A(左上)は代表的ケースを示し、H&E腫瘍構造で明らかのように、EphB4は腫瘍領域中のみで発現したことを示す(図39A左下)。ストロマ中のEphB4の着色がないことに注目すべきである。第二に、リンパ節中の転移性腫瘍部位は陽性染色法を示し、一方リンパ節の残りの部分は陰性のままである(図39A、右上)。
20

【0192】

In situハイブリダイゼーションを、腫瘍組織中のEphB4転写物の存在及び位置を決定するために実施した。EphB4特異的アンチセンスプローブに対する強いシグナルは、転写物の存在の表示を検出した(図39B、左上)。腫瘍構造を示すH&E染色(図39B、左下)との比較は、シグナルが腫瘍細胞に局在化し、間質性領域には存在しないことを示す。エフリンB2転写物も又、EphB4と共に腫瘍サンプル中に検出され、そのシグナルは腫瘍細胞に局在化した(図39B、右上)。EphB4又はエフリンB2センスプローブのいずれも、断片に対してハイブリッドせず、シグナルの特異性を示した。
30

【0193】

B. HNSCCの主要な転移性部位での高いEphB4の発現；

主要な腫瘍(リンパ節転移)からの組織及び包含されていない組織のウェスタンプロット法を実施して、これらの部位中のEphB4発現の相対的なレベルを決定した。20症例の腫瘍及び正常な隣接組織を採取し、陽性腫瘍のリンパ節でこれらの20症例中の9例を採取した。代表的症例を図39Cに示す。EphB4発現をそれぞれの腫瘍サンプルで観察した。同様に、全腫瘍陽性リンパ節は主要な腫瘍以上のEphB4発現を示した。正常な隣接組織中には発現は無いか最小で観察された。

【0194】

C. HNSCC細胞系中のEGFR活性によるEphB4発現及びレギュレーション；

腫瘍細胞に限定されるEphB4の発現を示した後、次にHNSCC中のEphB4発現のin vitroモデルがあるかどうかの決定を試みた。6個のHNSCC細胞系をEphB4蛋白質発現についてウェスタンプロット法により検討した(図40A)。これらの大部分は強いEphB4発現を示し、その結果次の研究の基礎を確立した。EGFRは強くHNSCCと関係するために、EphB4発現はEGFRの活性化と関係するかを検討した。EGFR陽性細胞系であるSCC-15でのパイロット実験は、最適時間は24時間であり濃度1mMの特異的EGFRキナーゼ阻害剤AG1478(図40B)がEphB4の発現を阻害することを確認した。全細胞系を試験して、全体で活発なEGFR発現があるが、SCC-4では検出可能であるが強くないことをが示された(図40C、上段)。EGFR阻害剤AG1478
40 50

への応答において、EphB4合計量の顕著な損失が所定の細胞系（S C C - 1 5 及び S C C - 2 5 ）で観察された一方、他では効果は観察されなかった（S C C - 9 、 - 1 2 、 - 1 3 及び - 7 1 ）。従って、S C C - 1 5 及び - 2 5 は、E G F R 活性によりレギュレートされるEphB4のモデルとして使用できる一方、S C C - 9 、 - 1 2 、 - 1 3 及び - 7 1 は、E G F R 活性とは関係のないH N S C C 中のEphB4のレギュレーションのモデルであり、その場合、p 5 3 、 P T E N 、 I L - 6 等の他の因子からインプットされてもよい、又、試験された全ての細胞系中でEphB4のリガンド、即ちエフリンB2の発現を表した。いくつかの系でEph B4と共に、エフリンB2発現はE G F R 活性によりレギュレートされる一方、それは他の細胞系とは関係ないことを示した。

【 0 1 9 5 】

10

明らかに、構成的E G F R シグナルの阻害はS C C 1 5 細胞中のEphB4レベルを抑制した。次にE G F はEphB4を誘起できるかを試験した。その結果、図4 1 B に示すようにEph B4レベルは、1 0 n g / m l E G F での2 4 時間処理の前に2 4 時間血清飢餓状態にされたS C C 1 5 細胞中で誘起された（列1及び2）。図4 1 A に示されるE G F R 活性化用に公知の下流シグナル経路（参考としてYarden & Slikowski 2001参照）について、次にE G F 仲介されたEphB4の誘導へのそれらのインプットを検討した。特異的キナーゼ抑制剤U 7 3 1 2 2 、S H - 5 及びS P 6 0 0 1 2 5 での、P L C g 、A K T 及びJ N K リン酸化のブロッキングはそれぞれ基底レベルを減少し、E G F 刺激されたEphB4の誘導をブロックした（図4 1 B 、列3～8）。反対に、E R K 1 / 2 のP D 0 9 8 0 9 5 での阻害及びP 1 3 - K のL Y 2 9 4 0 0 2 又はウォルトマニンでの阻害は、EphB4レベルのE G F 誘導に対する検出可能な効果を示さなかった。しかし、E R K 1 / 2 リン酸化が阻害された時に、EphB4基底レベルは減少した。興味深いことには、S B 2 0 3 5 8 0 でのp 3 8 M A P K 活性の阻害は基底を増加したが、E G F はEphB4レベルを誘起しなかった。類似の結果がS C C 2 5 細胞系でも見られた（データは記載しない）。

20

【 0 1 9 6 】

D . 高発現細胞系中のEphB4の阻害は生存能力を減少させ細胞周期停止を生じる；

次に、s i R N A 又はA S - O D N 法を使用して発現除去効果を検討して、H N S C C におけるEphB4発現作用を研究した。EphB4配列への数個のs i R N A を展開し、それは、図4 2 A で表示したように程度を変化させるEphB4発現をノックダウンした。s i R N A 5 0 及び4 7 2 でトランスフェクトされたS C C - 1 5 、 - 2 5 及び - 7 1 細胞系で、生存能力は減少し、それはEphB4発現のブロッキングに最も効果的であった（図4 2 B ）。EphB4 s i R N A 1 5 6 2 及び2 3 0 2 又はエフリンB2s i R N A 2 5 4 では生存能力への影響はほとんど観察されなかつた。EphB4を発現しないS C C - 4 中では（参照図4 0 A ）、細胞生存能力の減少は生じなかつた。s i R N A 5 0 及び4 7 2 処理で見られた細胞生存能力減少はサブG 0 での細胞の蓄積のせいであり、アポトーシスを示す。この効果は、時間及び投薬量両方に依存する（図4 2 C 及び表1 ）。反対に、EphB4レベルを減少するのに効果的でなく、生存能力にわずかな影響しか示さなかつたs i R N A 2 3 0 2 は、m o c k リポフェクタミン2 0 0 0 （商標）トランスフェクションと比べて細胞周期中の変化を全く生じなかつた。

30

【 0 1 9 7 】

本実施例のs i R N A コンストラクトの詳細な説明は米国特許出願公開第2 0 0 5 0 0 8 4 8 7 3 号明細書に見出すことができる。

40

【 0 1 9 8 】

異なるEphB4のs i R N A が細胞周期に対して与える影響

【表1】

Treatment	Sub G0	G1	S	G2
<hr/>				
36hr				
Lipo alone	1.9	39.7	21.3	31.8
100 nM 2302	2.0	39.3	21.2	31.2
100 nM 50	18.1	31.7	19.7	24.4
100 nM 472	80.2	10.9	5.2	2.1
<hr/>				
16hr				
Lipo alone	7.8	55.7	15.2	18.5
100 nM 2302	8.4	57.3	14.3	17.3
10 nM 50	10.4	53.2	15.7	17.7
100 nM 50	27.7	31.3	18.1	19.6
10 nM 472	13.3	50.2	15.8	17.5
100 nM 472	30.7	31.9	16.4	18.0

【0199】

更に、ヒトEphB4コーディング配列へ相補的な5'0を超えるホスホロチオアートAS-O DNを合成し、完全長EphB4発現プラスミドで一時的にトランスフェクトされた293細胞中でそれらのEphB4発現阻害能力を試験した。図43Aは、これらAS-ODNのいくつかのEphB4発現に対する効果の代表的例を示す。AS-10で発現は完全に阻止され、AS-11はわずかな効果のみを示したことは重要である。SCC15細胞中の細胞生存能力への効果は、図43Bに示されるようにEphB4発現の阻害に最も効果的であるAS-ODNで最も顕著であった。AS-10用のIC₅₀は約1μMであった一方、10μMのAS-11でさえ生存能力の50%減少を達成するためには充分ではなかった。AS-10が細胞周期に対して有する効果を検討すると、サブG0フラクションは未処理細胞と比較して1.9%から10.5%まで増加してアポトーシスを示したことが明らかになった(図43C)。

【0200】

E. EphB4は細胞移動をレギュレートする;

次にEphB4がHNSCCの移動に作用するかを決定しようとした。

移動への寄与は、成長及び転移と関係する。移動は、創傷治癒/スクレープアッセイを使用して評価した。接触性SCC15及びSCC25培養物を、無菌性プラスチックパストールピペットを使用した単回スクレープにより創傷し、境界を明確に定める3mm帯を残した。試験化合物の存在下での細胞の清澄化領域中の移動を、24、48及び72時間後に評価して定量化した。図43Dに示されるように、細胞移動はEphB4発現をプロックするAS-10へ応答して顕著に減少した一方、不活性化合物のAS-1及びスクランブルされたODNは効果が無いかほとんどなかった。AS-10による移動の阻害も又ボイデンダブルチャンバー(商標)アッセイを使用して示された(図43E)。

10

20

30

40

50

【0201】

F . EphB4 AS-10 の in vivo 抗腫瘍活性 ;

細胞生存能力及び運動性を減少する EphB4 AS-10 の効果を、Balb/Cヌードマウス中の S C C 15 腫瘍異種移植で決定した。マウスへ毎日 20 mg / kg AS-10 、センス O D N 又は同体積の P B S を I . P . 注射する処理を、腫瘍細胞移植の翌日から開始した。AS-10 を投与されるマウス中の腫瘍の成長は、センス O D N 又は P B S 希釀剤単独のいずれかを投与されるマウスと比較して非常に遅滞した(図 44)。センス O D N 処理した及び P B S 処理したグループ間に相違がないため、O D N を原因とする非特異的効果は観察されなかった。

【0202】

10

G . 材料及び方法 ;

本実施例の材料及び方法の詳細な説明は米国特許出願公開第 20050084873 号明細書に見出すことができる。

【0203】

20

実施例 6 (カポジ肉腫中でのエフリンB2発現はヒトヘルペスウィルスタイプ8により誘起される：静脈性から動脈性内皮へのフェノタイプ変換)

カポジ肉腫(K S)は多病巣性血管増殖性病として、最も通常は皮膚及び粘膜に現れ、次に内蔵器官への拡大する(1)。この病気の典型的特徴は、血管形成、水腫、リンパ単球核細胞の湿潤及び紡錘体内皮細胞(腫瘍細胞)の成長である。病理学上の、確立された障害は、スリット状空間の高密度の血管網を示す。K S 血管網は、その基底膜の欠損及びこれらの脈管内部を覆う異常な紡錘体内皮細胞(腫瘍細胞)により正常な脈管からは明らかに区別できる。不良な脈管構造は、障害中のアルブミン、赤血球及び単核細胞を含む血液成分の蓄積を生じる(1)。K S 腫瘍は内皮性起源であり；腫瘍細胞は多くの内皮性マーカーを発現し、マーカーとして例えば、「Ulex europeaus」凝集素-1(U E A - 1)用レクチン結合部位、C D 34 、E N - 4 、P A L - E (2)、及び内皮細胞特異的チロシンキナーゼセプター、V E G F R - 1 (F l t - 1)、V E G F R - 2 (F l k - 1 / K D R)、V E G F R - 3 (F l t - 4)、T i e - 1 及び T i e - 2 (3 、R M & P S G 未公開データ)が挙げられる。K S 細胞は L Y V E 及びポドプラニン等のリンパ性内皮細胞関係蛋白質と共に発現する(4)。

【0204】

30

ヘルペスウィルス H H V - 8 はこの病気の病因性要因であると考えられている。この新しいヘルペスウィルス中の 1994 配列が K S 腫瘍組織中で特定され(5)、それに続き分子-疫学研究によりほとんど全 K S 腫瘍がウィルス性ゲノムを含有することが示された。血清疫学研究は、K S で H I V 感染した患者は最高の H H V - 8 有病率を有すること、及び第二に H I V 感染しているが K S に罹患していない患者は、同様に H H V - 8 血清陽性である場合、それ以降の数年にわたり K S 発生のリスクが増加することを示した(6)。H H V - 8 の K S への作用の直接的証拠は、H H V - 8 感染後の骨髄内皮細胞の形質転換(改質)である(7)。多くの H H V - 8 エンコードする遺伝子は、細胞性形質転換(改質)をもたらす(8 参照)。しかし、最大の証拠は、この役割における G プロテイン結合セプター(v G P C R)について蓄積された(9)。

40

K S 腫瘍細胞は動脈性又は静脈性内皮由来かを検討した。更に、H H V - 8 は K S モデル中で動脈性又は静脈性マーカーの発現に対して効果を有するかを検討した。K S 腫瘍細胞は、エフリンB2動脈性マーカーを発現することが発見された。更に、エフリンB2発現は、K S 及び内皮細胞系中の H H V - 8 v G P C R により誘起された。エフリンB2は、エフリンB2発現又はシグナルの阻害は、K S 細胞の生存能力及び機能に有害であるため、K S 処理用の可能なターゲットである。

【0205】

A . K S 腫瘍は、EphB4ではなくエフリンB2を発現する；

K S 障害の非常な血管関連性及び腫瘍細胞の可能性のある内皮細胞起源は、それぞれ静脈性及び動脈性内皮細胞のマーカーである、EphB4及びエフリンB2の発現の検討に寄与し

50

た。EphB4転写物ではなくエフリンB2は、K Sバイオプシーの腫瘍細胞中にin situハイブリダイゼーションにより検出された（図45A）。エフリンB2アンチセンスプローブ及びH & E染色で示される腫瘍細胞との陽性シグナルの比較は、エフリンB2発現は腫瘍細胞を含有するバイオプシーの面積に限られていることを示す。EphB4アンチセンスプローブでのK S中のシグナルの欠如は、プローブの欠陥のせいではなく、この蛋白質を発現することが示されてた扁平上皮細胞癌中の転写物を検出したせいである（18）。K S腫瘍組織中のエフリンB2の発現の追加的証拠は、FITC複合抗ヒトFc抗体により検出された、EphB4 / Fcシグナルの腫瘍細胞への局在化により与えられる。エフリンB2はEphB4用のたった一つのリガンドであるために、この試薬はエフリンB2の発現に特異的である（図45B、左）。第二試薬のみで処理した隣接する断片は、特異的シグナルを示さない。二色共焦点顕微鏡は、エフリンB2陽性細胞中にHHV-8潜伏蛋白質LANA1の存在を表し（図45C、左）、それは腫瘍細胞であり、腫瘍脈管ではなくこの動脈性マーカーを発現していることを示した。腫瘍バイオプシーのPECAM-1抗体での染色は、この腫瘍の高度な血管的性質を明らかにした（図45C、右）。K Sバイオプシーに対するエフリンB2及びEphB4発現パターンの有病率のパイロット研究はRT-PCR分析により行った。6例のサンプル全部がエフリンB2に陽性であった一方、ただ2例がEphB4に弱陽性であった（データは記載しない）。

【0206】

B. 静脈性内皮細胞のHHV-8での感染は動脈性マーカーへのフェノタイプ変換を生じる；

次にK Sの病因性要因と思われるHHV-8は、それ自身で内皮細胞中でのエフリンB2の発現を誘起しEphB4発現を抑制できるかを検討した。H U V E C及びHHV-8と有効感染させたB C - 1リンパ腫細胞の共培養は、内皮細胞の効果的感染を生じた（16）。充分な洗浄後に残っている内皮細胞の付着単層を、エフリンB2及びEphB4についてRT-PCR及び免疫蛍光により試験した。H U V E Cは、EphB4静脈性マーカーをRNAレベルで強く発現したが、エフリンB2は発現しなかった（図46B）。反対に、HHV-8感染させた培養物（H U V E C / B C - 1及びH U V E C / B C - 3）はエフリンB2を発現する一方、EphB4転写物はほとんど見られなかった。

【0207】

H U V E C及びH U V E C / HHV-8の培養物の、動脈／静脈マーカー及びウィルス性蛋白質についての免疫蛍光分析を、RNA中に見られるものを反映する蛋白質発現中に変化があるかを決定するために行つた。更に、蛋白質の細胞性局在化も決定できた。RT-PCRデータに適合するように、H U V E CはエフリンB2陰性及びEphB4陽性であった（図46A（a & m））。予測されるように、それらは核抗原（LANA1）と関連するHHV-8潜伏を全く発現しなかった（図46A（b、n））。HHV-8で有効に感染させたB C - 1細胞の共培養は、ウィルス性蛋白質LANA1及びORF59の存在で示されるようにH U V E Cの感染を生じた（図46A（f、r））。HHV-8感染させたH U V E Cは、今やエフリンB2を発現するがEphB4を発現しない（図46Aそれぞれ（e、q、u））。エフリンB2及びLANA1共クラスターの発現は、併合画像中に黄色シグナルで示される（図46A（h））。エフリンB2陽性でEphB4陰性のHHV-8感染させたH U V E Cは、同様に動脈性マーカーCD148を発現する（19）（図46A（j、v））。エフリンB2及びCD148共クラスターの発現は、併合画像中に黄色シグナルで示される（図46A（l））。未感染の、EphB4発現H U V E CはCD148に陰性であった（記載せず）。

【0208】

C. HHV-8 v G P C RはエフリンB2発現を誘起する；

個々のウィルス性蛋白質は全体のウィルスで観察されるエフリンB2の発現を誘起できるかを試験するために、K S-S L K細胞をHHV-8 LAN A、又はLANA-440又はv G P C Rで確実にトランスフェクトした。安定なクローンのウェスタンプロット法で、v G P C RでトランスフェクトされたK S-S L K中では、S L K-L A N A又はS L K-

10

20

30

40

50

L A N A 440と比較してエフリンB2が5倍誘導されることが明らかになった(図47A)。ベクター単独(pCEF-L)でトランسفェクトされたSLKを、コントロールとして使用した。SLK-vGPCR及びSLK-pCEF-L細胞も又、一時的にトランسفェクトされたKS-SLK細胞中で、エフリンB2及びEphB4発現を免疫蛍光により試験した。図47Bは、SLK-pCEF-Lと比較してSLK-vGPCR細胞中でより高いエフリンB2発現を示す。SLK-pCEF-Lと比較してSLK-vGPCR中ではEphB4について変化は観察されなかった。これは明らかにSLK-vGPCR細胞はSLK-pCEF-L細胞と比較して高レベルのエフリンB2を発現したことを示す。これは、HHV-8のvGPCRは、KS中でエフリンB2の誘導及び動脈性フェノタイプ変換に直接含まれることを唆す。HHV-8はHVEC中のエフリンB2の発現を誘起することは上記に示されているので、次にこれは、転写的効果により仲介されるかどうかを試験した。エフリンB25'-フランキングDNA-ルシフェラーゼレポータープラスミドは、下記「材料及び方法」欄に示されるように構成され、HVEC中に一時的にトランسفェクトされた。エフリンB25'-フランキングDNA配列-2491/-11は、HVEC細胞中で最小活性を有する(図47C)。これは、エフリンB2は動脈性であり静脈性マーカーではないことに適合する。しかし、培養物中のHVECはいくつかのエフリンB2をRNAレベルで発現することが示された。HHV-8 vGPCRの共トランسفエクションは、コントロール発現ベクター pCEF-Lと比較してエフリンB2転写を約10倍誘起する。だいたい同等な誘導がエフリンB2配列-2491/-11、-1242/-11、又は-577/-11で観察され、それは、最大活性は-1242/-11ルシフェラーゼ構築物で観察されるにもかかわらず、-577及び-11間の要素がvGPCRへの応答を媒介するのに充分であることを表す。
10
20

【0209】

D. エフリンB2の発現はVEGF及びVEGF-Cによりレギュレートされる；

次に公知のKS増殖因子はエフリンB2発現のvGPCR-仲介された誘導中に含まれるかを検討した。SLK-vGPCR細胞をオンコスタチン-M、IL-6、IL-8、VEGF又はVEGF-Cの中和抗体で36時間処理した。図48Aは、VEGFの中和は、SLK-vGPCR細胞中でエフリンB2の発現を完全にブロックしたことを示す。より少ないが、非常なエフリンB2の減少も、VEGF-C及びIL-8の中和で観察された。オンコスタチン-M又はIL-6の中和で測定可能な効果は観察されなかった。VEGF及びVEGF-CはエフリンB2発現の誘導に必須であることを確認するために、HVECをVEGF、VEGF-C又はEGFで処理した。HVECは、2種の異なる濃度の個々の増殖因子(10ng、100ng/ml)を有する5%FBSを含有するEBM-2培地中で48時間増殖した。VEGF-A又はVEGF-Cのみが投薬量依存性拳動でエフリンB2発現を誘起した(図48B)。反対に、EGFはエフリンB2の発現に効果がなかった。
30

【0210】

E. エフリンB2siRNAはKS中のエフリンB2発現を抑制する；

3個のエフリンB2siRNAを「方法」段落記載のように合成した。KS-SLK細胞をsiRNAでトランسفェクトして48時間後、エフリンB2発現をウェスタンプロット法により決定した。エフリンB2siRNA137又は254は、siRNA EphB4-50又はsiRNAGFP等のコントロールsiRNAと比較して、エフリンB2発現を約70%阻害した。エフリンB2-63siRNAは、上記2種のsiRNAエフリンB2よりも効果が低かった(図49A)。
40

【0211】

F. エフリンB2は完全KS及びEC生存能力、コード形成及びin vivo血管形成活性に必要である；

最も効果的エフリンB2siRNA(254)を、次にエフリンB2の発現阻害がKS-SLK又はHVEC細胞の成長に効果を及ぼすかを決定するために使用した。KS-SLK細胞の生存能力は、エフリンB2蛋白質レベルを阻害するのと同じsiRNAにより減少した(図49B)。KS-SLKは高レベルのエフリンB2を発現し、その結果、エフリンB2発現の維持はこの設定では細胞生存能力に必須であることが示された。図48Bに示されるように
50

、H U V E C は V E G F により刺激された場合以外はエフリンB2を発現しない。エフリンB2 siRNA 2 6 4 は、単独の増殖因子として V E G F と共に培養された H U V E C の成長を劇的に減少した。反対に、H U V E C を I G F 、E G F 及び b F G F と共に培養した場合は、顕著な効果を示さなかった。コントロールとして EphB4 siRNA 5 0 は、どちらの培養条件下でも H U V E C へ有害な効果を示さなかった(図 4 9 C)。K S 及び主要な内皮細胞の生存能力の阻害に加えて、EphB4- E C D は H U V E C 及び K S - S L K 中のコード形成及びマトリゲルプラグ(商標)アッセイ中の in vivo 血管形成を抑制する(図 5 0)。

【0212】

G. 材料及び方法；

本実施例の材料及び方法の詳細な説明は米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 0 8 4 8 7 3 号明細書に見出すことができる。

【0213】

実施例 7 (膀胱癌中の EphB4 の発現 : 本発明の治療法の候補ターゲット)

図 5 1 は膀胱癌細胞系中での EphB4 の発現 (A) 及び E G F R シグナル経路による EphB4 発現のレギュレーション (B) を示す。

図 5 2 は、p 5 3 のトランスフェクションは 5 6 3 7 細胞中の EphB4 の発現を阻害することを示す。

図 5 3 は EphB4 siRNA 4 7 2 での処理による膀胱癌細胞系 (5 6 3 7) の増殖阻害を示す。

図 5 4 は EphB4 siRNA 4 7 2 でトランスフェクトされた 5 6 3 7 細胞のアポトーシス研究の結果を示す。

図 5 5 は EphB4 アンチセンスプローブの細胞移動に対する効果を示す。5 6 3 7 細胞は、EphB4 AS- 1 0 (1 0 μM) で処理された。

図 5 6 は、EphB4 siRNA の細胞侵潤に対する効果を示す。5 6 3 7 細胞は siRNA 4 7 2 又はコントロール siRNA でトランスフェクトされた。

【0214】

実施例 8 (EphB4 アンチセンスプローブ及び RNA i プローブによる EphB4 遺伝子発現の阻害)

EphB4 を発現する細胞系を合成ホスホチオアート改質オリゴヌクレオチドで処理し、2 4 時間後に採取した。細胞溶解産物を調製し、ウェスタンプロット法分析により、EphB4 の相対的量を未処理のコントロール細胞と比較してプローブした。

細胞増殖の阻害に関する研究は、発現 EphB4 発現を特徴とする H N S C C 細胞系中で行った。細胞生存能力の損失は、EphB4 発現のノックダウンにより示された。細胞は in vitro 处理され、4 8 - ウェルプレート中で培養され、1 0 0 0 0 細胞 / ウェルで接種された。試験化合物を添加し、細胞生存能力を 3 日目に試験した。EphB4 アンチセンスプローブに対する結果を下記表 6 にまとめた。EphB4 RNA i プローブに対する結果を下記表 7 にまとめた。

【0215】

本実施例のアンチセンス及び siRNA コンストラクトの詳細な説明は米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 0 8 4 8 7 3 号明細書に見出すことができる。

【0216】

実施例 9 (エフリンB2 アンチセンスプローブ及び RNA i プローブによるエフリンB2 の遺伝子発現阻害)

K S - S L K ; 内因性高レベルのエフリンB2を発現する細胞系。細胞生存能力を、一定の投薬量のそれぞれのオリゴヌクレオチド (5 μM) を使用して試験した。遺伝子発現ダウンレギュレーションを、完全長エフリンB2を安定して発現するように設計された細胞系 2 9 3 を使用して行った。エフリンB2を発現する K S - S L K も又一定の投薬量 5 0 n M で試験された RNA i プローブへの応答である生存能力を試験するために使用した。蛋白質発現レベルを完全長エフリンB2を安定して発現する 2 9 3 細胞を使用して、一定の (fixed) 5 0 n M の RNA i プローブで 2 4 時間処理後の細胞溶解産物中で測定した。

10

20

30

40

50

エフリンB2アンチセンスプローブについての結果は、下記表8にまとめた。エフリンB2RNAプローブについての結果は、下記表9にまとめた。

【0217】

本実施例のアンチセンス及びsingle RNAコンストラクトの詳細な説明は米国特許出願公開第20050084873号明細書に見出すことができる。

【0218】

実施例10(EphB4抗体は腫瘍増殖を阻害する。)

図57は、G250及びブルダウンアッセイによるEphB4モノクローナル抗体の比較結果を示す。

図58は、EphB4抗体はマトリゲル及び増殖因子の存在下でSCC15細胞のin vivo腫瘍増殖を阻害することを示す。

BaIbCヌードマウスへ 2.5×10^6 の生存腫瘍細胞SCC15を皮下注射した。SCC15は、頭部及び頸部扁平上皮細胞癌系である。腫瘍は、nu/nuマウス中に、マトリゲル及び増殖因子並びにAb'を予備混合した $2.5 \sim 5 \times 10^6$ 細胞を皮下注射して開始され、腫瘍異種移植が開始された。マウスを注射14日後に解剖した。SCC15は頭部及び頸部扁平上皮細胞癌系であり、B16は黒色腫細胞系であり、MCF-7は乳癌系である。これらの処理に対する腫瘍の応答を、PBS注射を受けたコントロールマウスと比較した。動物の腫瘍増殖を毎日観察し、皮下腫瘍をカリパスを使用して毎2日に測定した。抗体番号1及び23は、コントロールと比較して、特に追加的増殖因子添加なしのコントロールではSCC15腫瘍サイズの顕著な退縮を示した。

図59は、EphB4抗体は、SCC15頭部癌及び頸部癌腫瘍種の、アポトーシス、壊死及び血管形成減少を引き起こすことを示す。

【0219】

血管形成をCD-31免疫組織化学法により評価した。処理及び未処理のマウスからの腫瘍組織断片をCD31用に染色した。アポトーシスを免疫組織化学TUNNEL法により評価し、BrdUアッセイにより増殖した。外科的除去に続き、腫瘍を標準手順に従い直ちに2mm連続断片へスライスし、パラフィン中に包埋した。パラフィン包埋した組織を5μmへ断片化し、ワックスを除去し、組織を再水和した。再水和した組織に、抗原賦活(retrieval)液中でマイクロ波を照射した。スライドをPBSで洗浄し、TUNNEL法反応混合物(末端デオキシヌクレオチジルトランスクレオチド溶液)及びBrdUを完全に光を遮断した湿性チャンバー中に加えた。次にTUNNEL及びBrdU反応混合物を除去し、スライドを洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼと結合している抗フルオレセイン抗体を添加した。インキュベーション及び洗浄後、3,3'-ジアミノベンジジンを添加した。マッソン社製トリクローム(商標)及びヘマトキシリソニアシンも又スライドを染色して形態を画像化するために使用した。マッソン社製トリクローム(商標)は、壊死及び線維症の画像化を可能とした。腫瘍は腫瘍/皮膚、筋肉境界から血液サポートを得た。腫瘍が成長するに従い、内側領域は栄養が欠乏した。これは壊死(細胞死)を、好ましくは腫瘍中央で導く。細胞死後、(腫瘍)組織は、纖維芽細胞組織で置換される。スライドを、得られたデジタル画像を20倍拡大して画像化した。SCC腫瘍の、投与された抗体それぞれで異なる形態が得られた。Ab番号1は、アポトーシスではなく壊死及び線維症の増加部分を示した。Ab番号23は、アポトーシス、壊死及び線維症の増加及び脈管湿潤物の減少を示した。Ab番号35は、壊死及び線維症の増加、並びにアポトーシスのわずかな増加並びに脈管湿潤物の減少を示した。Ab番号79はアポトーシス、ネクローシス及び線維症の大きな増加を示した。Ab番号91は、アポトーシスに変化は無く、増殖の増加を示した。Ab番号138は、アポトーシス、壊死、線維症の増加並びに増殖及び脈管湿潤物の減少を示した。コントロールPBSで処理した腫瘍は、高い腫瘍密度及び活発な血管形成応答を示した。EphB4抗体で処理した腫瘍は、生存腫瘍細胞の領域中の腫瘍細胞密度の減少及び腫瘍血管形成の顕著な阻害、並びに腫瘍壊死及びアポトーシスを示した。

【0220】

10

20

30

40

50

図60は、異種移植における抗体の全身的投与は、異種移植でのS C C 1 5腫瘍の腫瘍退縮を導くことを示す。

又、EphB4モノクローナル抗体又はコントロールとして同体積のP B Sでの隔日治療は、第4日、腫瘍が確立された後に開始して14日間連続した。IP又はSCのいずれかの全身的投与を投与したが顕著な違いは無かった。全実験を実験者の先入観を除くためにダブル-ブラインド手順で実施した。マウスを2週間の治療期間終結時に犠牲にした。腫瘍を死後直ちに採取し、固定化し、免疫組織化学的に処理した。EphB4抗体40mg/kg体重を投与した。EphB4抗体での処理は、コントロール処理マウスと比べてヒトS C C腫瘍の増殖を非常に阻害した($p < 0.05$)。EphB4抗体での処理は、コントロール処理マウスと比べて腫瘍重量を非常に阻害した($p < 0.05$)。

10

【0221】

実施例11(HSA-EphB4細胞外領域融合及びPEG修飾EphB4細胞外領域)

A. H S A - EphB 4 細胞外領域融合の発生

XbaI-NotI形のヒト血清アルブミン断片をGCF2との融合体を作りだすためにPCR增幅し、TAクローニングしてpEF6に導入した。次いで、得られたベクターをXbaIで切断(部分消化)し、HSA断片(1.8kb)をクローニングしてpEF6-GCF2-XbaのXbaIサイトに導入し、融合体発現ベクターを作り出した。得られたベクターは、成熟蛋白質の4位がCからTへの(ThrからIleへの変異を導く)点突然変異を有していた。これをpEF6-GCF2-HSAmutと呼んだ。次のクローニング工程において、該突然変異は該突然変異部分をpEF6-GCF2-IF(ベクター片及びGCF2のN末端部分を含有)からの野生型KpnI断片に置換することによって除去した。この最終的なベクターをpEF6-GCF2と呼んだ。pEF6-GCF2のDNA配列を確認した。

20

【0222】

HSA-EphB4前駆体蛋白質の予測されるアミノ酸は(SEQ ID NO:18):

MELRVLLCWASLAALEETLLNTKLETADLKWTFPQVDGQWEELSGLDEEQHS VRTYEVCDVQRAPGQAHWLRTGW
VPRRGAVHVYATLRFTMLECLSLPRAGRSCK ETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAEEHLTRKRPGAEAT
GKVNVKT LRLGPLSKAGFYLAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVPV AGSCWDAVPAPGPSP
SLYCREDGQWAEQPVTGSCAPGFEAAEGNTKCRACAQG TFKPLSGEGSCQPCPANSHSNTIGSAVCQCRVGYFRARTD
PRGAPCTTPPSAPRSW SRLNGSSLHLEWSAPLESGGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGGDLTFDPGPRDLV EPWVWR
GLRPDFTYTFEVTLNGVSSLATGPVPFEPNVTTDREVPPAVSDIRVT RSSPSSLSLAWAVPRAPSGAVLDYEVKYHE
KGAEGPSSVRFLKTSENRAELRGLKR GASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHHQSQTQLDESEGWREQSRDAHKSEVAHRFKD
L GEENFKALVLIAFAAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLF GDKLCTVATLRETYGEMADCC
AKQEPEPERNECFLQHKODNPNLPRLRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPFYAPELLFFAKRYKAAFFTECCQ
AADKAACLLP KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWARLQRFPKAFAEVSKLV TDLTKVHTECCHG
DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE VENDEMPADLPSLAADFVESKDVKCKNYAEAKDVFL
GMFLYEYARRHPDYSWLL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYK FQNA
LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSWL NQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRP
CFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKE
TCF A EEGKKLVAASQAALGLである。

30

【0223】

成熟型HSA-EphB4蛋白質の予測されるアミノ酸は(SEQ ID NO:19):

40

LEETLLNTKLETADLKWTFPQVDGQWEELSGLDEEQHS VRTYEVCDVQRAPGQ AHWLRTGWVPRRGAVHVYATLRF
TMLECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDADTAT ALTPAWMENPYIKVDTVAEEHLTRKRPGAEATGKVNKTRLGPLSK
AGFYLAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPREL WPVAGSCWDAVPAPGPSPSLYCREDGQWAEQPVT
GCSCAPGFEAAEGNTKCRACAQGTFKPLSGEGSCQPCP ANSHSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPRSW
SRLNGSSLHLEWSA PLESGGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGGDLTFDPGPRDLVEPWWVRGLRPDFT YTFEVTALN
GVSSLATGPVPFEPNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLAWAVPR APSGAVLDYEVKYHEKGAEGPSSVRFLKTSE
NRAELRGLKRGASYLVQVRARSEA GYGPFGQEHHQSQTQLDESEGWREQSRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQ
YLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLF GDKLCTVATLRETY GEMADCCAKQEPEPERNECFLQHKD
DNPNLPRLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKY LYEAARRHPFYAPELLFFAKRYKAAFFTECCQAADKAACLLPKLDEL
DEGKASSA KQRLKCASLQKFGERAFAKAWARLQRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYI 50

CENQDSISSLKKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVFGLMFLYEYARRHPDYSV
VLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKVP QVSTP
TLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSWLNQLCVLHEKTPVSD RVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKE
FNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA LVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGL

である。

【 0 2 2 4 】

GGCCGGCTACGGGCCCTCGGCCAGGAACATCACAGCCAGACCCAACCT GGATGAGAGCAGGGCTGGCGGGAGCAGtct
agaGATGCACACAAGAGTGAGGTT GCTCATCGGTTAAAGATTGGAGAAGAAAATTCAAAGCCTTGGTGTGATT
GCCCTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTGAAGATCATGTAAAATTAGTG AATGAAGTAACTGAATTGCAAAAA
CATGTGTAGCTGATGAGTCAGCTGAAAA TTGTGACAAATCACTCATACCCCTTTGGAGACAAATTATGCACAGTGC
AAC TCTCGTGAACACCTATGGTGAATGGCTGACTGCTGTGAAAACAAGAACCTG AGAGAAATGAATGCTCTTGCA
ACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCGA TTGGTGAAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGACTGCTTTCATGACAAT
GAAGAG ACATTTTGAAAAAATACTTATGAAATTGCCAGAACATCCTTACTTTAT GCCCCGGAACCTCTTTTC
TTGCTAAAAGGTATAAGCTGCTTTACAGAATGT TGCAAGCTGCTGATAAGCTGCTGCCTGTTGCCAAAGCTCG
ATGAACTTCGG GATGAAGGGAAAGGCTTCGTCTGCCAACAGAGACTCAAATGTGCCAGTCTCCA AAAATTGGAGAAA
GAGCTTCAAAGCATGGCAGTGGCTCGCTGAGCCAGA GATTCCCAAAGCTGAGTTGCAGAAGTTCCAAGTTAGT
GACAGATCTTACCA AAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTGATGACAGG GCGGACCTTG
CAAGTATATCTGTGAAATCAGGATTGATCTCCAGTAACTG AAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTTGGAAAAATCC
CACTGCATTGCCAGT GGAAAATGATGAGATGCCGTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTGTTGA AAGTAAG
GATGTTGCAAAAACATGCTGAGGCAAAGGATGTCTCCTGGCA TGTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTG
ATTACTCTGCGTGTGCTGCT GAGACTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGTGCCGCTGCAG ATC
CTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTGATGAATTAAACCTCTTGGAAAG AGCCTCAGAATTAACTCAAACAAAATG
TGAGCTTTAAGCAGCTGGAGAGT ACAAAATTCCAGAACATGCGTATTAGTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTG
T CAACTCCAACCTTGTAGAGTCTCAAGAACCTAGGAAAAGTGGCAGCAA TGTGTAACATCCTGAAGCAAA
AGAATGCCCTGTGAGAACACTATCTATCC GTGGTCTGAAACAGCTTATGTGTGATGAGAAAACGCCAGTAAGTG
ACAG AGTCACAAAATGCTGCACAGAGTCTTGGTAACAGGCACCATGCTTCAGC TCTGGAAGTCGATGAAACAT
ACGTTCCCAAAGAGTTAATGCTGAAACATTAC CTTCCATGCAAGATATGACACACTTCTGAGAAGGAGAGACAAAT
CAAGAAC AAACTCACCTGTTGAGCTTGAAACACAAGCCCAGGCAACAAAGAGCAA CTGAAAGCTGTTATGGA
TGATTTCGCAGCTTGTAGAGAAGTGTGCAAGGCT GACGATAAGGAGACCTGCTTGCGAGGAGGGTAAAAACCT
GTTGCTGCAAG TCAAGCTGCCCTAGGTTATAAtagccgcgttaaggcaattctgcagatatccagcacagtggc
gccgc tcgagtctagagggcccggttcgaaggttaaggctatccctaaccctccctcggtctcgatttacgcgtac
cggtcatcatcacc atcaccatttaggttaaacccgtatcagcctcgactgtgccttctagttccagccatcttt
gtttgcctccccgtgccttgcctt gacctgaaagggtgcactcccactgtccttccctaataaaatgagggaaattg
catcgatgtctgagtaggtgtcattctatctggg gggtggtgggtggggcaggacagcaagggggaggattggaaaga
caatagcaggcatgtgggatgcggtggtctatggctt ctgaggcggaaaagaaccagctgggtctaggggttat
ccccacgcgcctgttagccgcattaaaggccgggtgtggg gttacgcgcagcgtgaccgtacacttgcgcgc
ccctagccgccttcgttgccttcccttcgtccacgttcgcgg ctttccctgtcaagctctaaatcg
gggcattcccttagggttccgatttagtgccttacggcacctcgacccaaaaacttgcatttaggg tgcattgcgc
agtggccatgcgcctgatagacggtttcgccttgacgtggagtcacgttcttaatagtggactttgttcc
aaactggaaacaacactcaaccctatctcggtctattctttgattataaggatttgggatttccgcctatggta
aaaaatgagctg atttaacaaaaatttaacgcgaatttaattctgtggatgtgtcagttagggtgtggaaagtcccc
aggctccccaggcaggcagaa gtatgcaagcatgcattcaattgtcagcaaccagggtgtggaaagtccccaggc
cccaggcaggcagaagtatgcaaaagcat gcattcaattgtcagcaaccatagtccgcgcctaaactccgcgcattcccc
ccccctaaactccgcgcattccgcgcattccgcgc catggctgactaattttttatgtcagaggccgaggcc
ccctgcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggag gcctaggctttgcacaaagctccgggagc
ttgtatatccatttcggatctgatcagcacgtttgacaattatcatcgcatagtat atcggcatagtataatacg
acaagggtgaggaactaaaccatggccaaggcttgcattcaagaagaatccaccctcatgtaaagagca acggctacaat
caacagcatccccatctctgaagactacagcgtgcgcaggcgcaggctctctagcgcacggccgcatttcactgg
aatgtatatcatttactggggacccttgcagaactcgtgggtgtggcactgctgctgcggcagctggcaacct
gactt gtatcgtcgcatcgaaatgagaacaggccatcttgcggccatcttgcggccatcttgcggccatcttgc
ctgcattctggg atcaaagcatagtgaaggacagtgatggacagccgcaggcagttgggattcgtgaattgtgc
ctggattatgtgtggaggg ctaagcactcgtggccgaggaggcaggactgacacgtgctcagagattcgattccacc
ccgccttctatgaaagggtggctcg gaatcgtttccggacgcggcgtggatgcattccgcgggatctcat
gctggagttctcgcgcaccctacttgcattttatgc gcttataatggttacaatggcaatgcacaaattt
acaatggcaatggatttttcactgcattcttagttgtgtttgcacaaactc atcaatgtatcttatcatgtctgtat
cqtcqacactctaqctqaqcttgcqtaatcatqgtcatqgtttccctqgtqaaattgttat ccqctcacaattcc

acacaacatacgagccgaaagcataaagtgtaaagcctgggtgcctaattgagtgactaacatcacattaatt gcgttg
 cgctactgccccgtttccagtcgggaaacctgtcgccagctgcattaatgaatcgccaaacgcgcggggagaggcg
 gttgcgtattggcgcttccgcctccgcactgactcgctgcgcgcgttcggctgcggcagcgttatca
 gctcactca aaggcggtaatacggttatccacagaatcagggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaaggccagc
 aaaaggccaggaa cctaaaaaggccgcgttgctggcgtttccataggctcgccccctgacgagcatcacaaaaa
 tcgacgctcaagttaggatggcggatccataggctccgcgttccgccttccgcgttccGcctggaagctccctcg
 cgctccctgttccgaccctgccccta ccggataccgtccgccttccgcgttccgcgttccgcgttccgc
 gctcagcgttaggtatctcagttcggtaggtcgltc gctccaagctggctgtgtgcacgaaccccccgttccgc
 cgaccgcgtgcgccttatccgtaactatcgttgcgttgcacgaaaccttgcggacttgcggcagcagcc
 actggtaacaggattagcagagcggatgttaggcgggtgtacagagtccgt aagtggggcctaactacggctaca
 cttagaggacagtatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 caaaacaaaccaccgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gatcccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 aaa aaggatcttacccatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tctgacagttaccaatg cttaatcagtgaggcacctatctcagcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tcccgctcgtagataactacgatacgg gagggttaccatctggcccgagtgtcaatgataccgcgagaccac
 ctccaccggctccagattatcagcaataaccagcc agccgaaaggccgagcgcagaagtggtcctgcaacttgc
 gctccatccagttatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ccattgcgtacaggcatcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 agttacatgatccccatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ctggtagtactcaaccaagtcattgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 aataccg cggccatagcagaactttaaaagtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 taccgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ctcttccttttc

である。

【0225】

B . 細胞培養及びトランスフェクション

ヒト胎児腎細胞系（293T細胞）を10%の透析ウシ胎仔血清及び1%のペニシリン
 /ストレプトマイシン/ネオマイシン抗体と共にD M E M中に保持した。細胞を5%CO₂/95%空気の加湿した大気中にて37℃で保持した。

【0226】

EphB4細胞外領域、その断片及びEphB4-HSA融合体をコード化するプラスミドのトランスフェクションを、与えられたプロトコルに従ってリポフェクタミン2000試薬（インビトロゲン社）を用いて実施した。トランスフェクションの前日に、トランスフェクション時に80%のコンフルエンスに達するように293T細胞を高密度で接種した。プラスミドDNA及びリポフェクタミン試薬を1:3の比率としてOpti-MEM Iの血清低減培地（インビトロゲン社）中で5分間希釈して混合し、DNA-リポフェクタミン複合体を形成した。各10cm培養皿に対して、10μgのプラスミドDNAを使用した。20分後、上記複合体を培地中の細胞に直接添加した。トランスフェクションから16時間後に、培地を吸引し、無血清D M E Mで一度洗浄し、そして無血清D M E Mに取り替えた。分泌された蛋白質を48時間後に条件培地を回収することにより採取した。条件培地は10,000gで20分間遠心分離することにより浄化し、0.2μmのフィルターで濾過し、精製に使用した。

【0227】

C . EphB4細胞外領域及びEphB4細胞外領域 - H S A 融合体のクロマトグラフィ分離

H S Aに融合したEphB4細胞外領域は以下のように精製した。無血清培地中で増殖した一時的にトランスフェクトされた293細胞から700mLの培地を採取し、最終的な体積である120mLに濃縮した[膜：（オメガ、76mm）、50kDa C/O]。濃

縮後、サンプルの pH を 6 mL の 1 M NaAc (pH 5.5) を加えることにより調節した。次いで、サンプルを開始用緩衝剤 (SB) : 20 mM NaAc, 20 mM NaCl, pH 5.5 (O/N) で透析した。5 mL の SP - セファロースを SB で平衡させてサンプルを搭載した。洗浄：100 mL の SB。NaCl 溶出：12 mL / 画分及び 20 mM の增加。エフリン B2 結合活性の大部分は 100 mM 及び 120 mM 画分中に溶出した。

【0228】

エフリン B2 結合活性アッセイで活性な画分 (SP クロマトグラフィ、画分 100 - 120 mM 参照) を第二ステップである Q カラム上での精製に使用した。取り出した画分を開始用緩衝剤 #2 (SB2) : 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8 (O/N) で透析し、2 mL の Q セファロース上に搭載した。20 mL の SB2 で洗浄した後、吸収された蛋白質を NaCl で溶出した (3 mL / 画分、25 mM の濃度増加)。得られた画分を PAGE 及びエフリン B2 結合アッセイで分析した。200 mM 及び 225 mM の画分が最も多くの蛋白質及び最も高い B2 結合活性を有していた。

【0229】

可溶性 EphB4 細胞外領域蛋白質を以下のように精製した。300 mL の条件培地 (「細胞培養及びトランスフェクション」参照) を、30 kDa C/O の限外濾過膜を用いて、最終体積である 100 mL に濃縮した。濃縮後、サンプルの pH を 5 mL の 1 M 酢酸 Na (pH 5.5) を加えることにより調節した。次いで、サンプルを開始用緩衝剤 (StB) : 20 mM 酢酸 Na, 20 mM NaCl, pH 5.5 (O/N) で透析した。5 mL の SP - セファロースを SB で平衡させてサンプルを搭載した。20 mL の StB でカラムを洗浄した後、吸収された蛋白質を線形濃度勾配の NaCl で溶出した (20 ~ 250 mM、全溶出体積は 20 カラムの体積)。蛋白質の純度を PAGE により分析した。

【0230】

D. sB4 及び sB4 - HSA 融合蛋白質のビオチン化

溶解性 EphB4 細胞外領域蛋白質 (sB4) 及び HSA に融合した EphB4 細胞外領域 (HSA - sB4) の両方を、メーカーのプロトコルに従い、酸化剤としてのメタ - 過ヨウ素酸ナトリウム及び EZ-Link Biotin Hydrazide (PIERCE 社, Cat. # 21339) を用いてビオチン標識化した。ビオチン化 sB4 蛋白質の In vitro 安定性を、40 μL のマウス血清を用いて 2.0×10^{-9} を 37 度 0, 0.5, 1, 2 及び 3 日間インキュベートすることにより試験した。2 μL の磁性ビーズ及び B2-AP を加えて更に 1 時間室温置いた。緩衝剤で 2 度洗浄した後、pNPP を加えて 1 時間置いた。ビオチン化した sB4 蛋白質は 3 日間にわたり非常に安定であり、この期間内で B2 結合活性は 10 % 未満しか失われなかった。

【0231】

E. B4 - HSA のエフリン B2 結合特性

B4 - HSA 融合体蛋白質がエフリン B2 へ結合するための EphB4 細胞外領域の能力を保持しているかどうかを試験するため、精製した B4 - HSA 融合体の能力を GCF2F, GCF2, GC, CF 及び B4-Fc 融合体 (実施例 1 に記載のように hIgG1 に融合した B4 の細胞外領域を含有) のそれと比較した。ビオチン化又は His タグ化した蛋白質のサンプルを対応するアフィニティ磁性ビーズ及び B2-AP に 1 時間室温で接種した後、PnPP を加えた。結合アッセイの結果を図 67 に示す。B4 - HSA はエフリン B2 に対する結合活性の大部分を保持することが分かった。驚くべきことに、B4 - HSA 蛋白質はエフリン B2 に対する結合性が B4 - Fc 融合体よりも優れていた。

HSA の C 末端への EphB4 細胞外領域の融合も生じ、これはエフリン B2 へ結合する能力を保持すること、及び EphB4 細胞外領域にわたって生体内での安定性が向上することが分かった。

【0232】

F. マウス中での B4 - HSA 及び sB4 の安定性

精製したビオチン化 sB4 及び sB4 - HSA の生体内での安定性をアッセイした。各蛋白質をマウス当たり 0.5 nMol の量でマウスの尾に静脈内注射した。15 分 (0 日) 、1, 2, 3 及び 6 日の時間枠で各マウスの眼から血液を採取した。得られた血清の 10

mLを使用して、エフリンB2-アルカリホスファターゼ融合蛋白質及び固相としてのストレプトアビシン被覆磁性ビーズを用いた結合アッセイを行った。これら2種の蛋白質の安定性を図68に示す。sB4-HSAはsB4よりも優れた安定性を示すことが分かった。例えば、注射から1日後では、マウス血液中のsB4-HSAのレベルはsB4の5倍であった。

【0233】

G. ビオチン化したsB4のPEG化

PEG化する前に、上述したビオチン化sB4蛋白質を30kDaのMWCO限外膜を用いて最終濃度2mg/mLまで濃縮した。サンプルをカップリング緩衝剤：30mMリン酸塩、75mMのNaCl、pH8.00でO/N透析した。特に断りのない限り、PEGへの結合は反応性の直鎖状PEGを10倍モル過剰として4で18時間行った。使用した反応性PEGはPEG-スクシンイミジルプロピオナート（分子量：約20kDa）であった。分枝鎖状PEG（例えば10kDa、20kDa又は40kDa）を用いてPEGへの結合を同様に行ってもよい。10又は40kDaの他の直鎖状PEG分子を使用してもよい。

【0234】

PEG化後、EphB4細胞外領域を含有する蛋白質のサンプルをSMBでO/N透析した。3mLのSP-セファロースをSMBで平衡化し、サンプルを搭載した。一点の変更：全容出量は40カラム体積であることを除いて、吸収した蛋白質の洗浄及び溶出を上記（「可溶性EphB4細胞外領域及びそのHSAへの融合体の精製」参照）と同様に実施した。
図69はSP-セファロースカラム上におけるEphB4蛋白質のPEG誘導体のクロマトグラフィ分離を示す。PEG修飾EphB4蛋白質の純度をSDS-PAGEにより分析した。

【0235】

二重修飾（PEG化及びビオチン化）したsB4をイオン交換クロマトグラフィにかけて非PEG化、モノPEG化及びポリPEG化蛋白質をそれぞれ分離した。PEG化したサンプルを20mMの酢酸Na、20mMのNaCl、pH5.5でO/N透析して2mLのSP-セファロース上に搭載した。10mLの緩衝剤で洗浄した後、吸収された蛋白質をNaClで徐々に溶出する（3mL/画分、25mMのNaClの増加）ことによって分離した。得られた画分をPAGE及びエフリンB2結合アッセイで分析した。

【0236】

H. PEG化条件がsB4のエフリンB2結合性に与える影響

異なるpH条件下でビオチン化sB4をPEG化する影響を測定した。sB4をpH6, 7又は8でPEG化し、PEG化した産物に対してエフリンB2への結合性を試験した（図69）。エフリンB2結合活性はPEG化をpH6及びpH7で行ったときは保持されたが、pH8で行ったときは部分的に失われた。

【0237】

温度、pH、sB4に対するPEG化剤のモル比、及びPEG化反応の産物のエフリンB2への結合能力を含めたパラメータの追加的な組み合わせを試験した。最適化実験の結果を図70に示す。これらの結果から塩基性pHではB2結合活性が徐々に低下することが確認される。

【0238】

I. PEG化sB4種の精製

ビオチン化sB4蛋白質を30kDaのMWCO限外膜を用いて最終濃度2mg/mLまで濃縮した。サンプルをカップリング緩衝剤：30mMのリン酸塩、75mMのNaCl、pH8.00でO/N透析した。PEGへの結合は反応性PEGを10倍モル過剰として4で18時間行った。二重修飾（PEG化及びビオチン化）したsB4をイオン交換クロマトグラフィにかけて非PEG化、モノPEG化及びポリPEG化蛋白質をそれぞれ分離した。サンプルを20mMの酢酸Na、20mMのNaCl、pH5.5でO/N透析して2mLのSP-セファロース上に搭載した。10mLの緩衝剤で洗浄した後、吸収された蛋白質をNaClで徐々に溶出する（3mL/画分、25mMのNaClの増加）

ことによって分離した。図71に示すように、得られた画分をPAGEで分析した。画分1, 2及び3がポリPEG化、モノPEG化及び未PEG化のビオチン化sB4に対応することが分かった。

【0239】

J . PEG化したEphB4誘導体のIn vitro特性

S Pカラム精製からのビオチン化及びPEG化したsB4の画分1, 2及び3(ポリPEG化、モノPEG化及び未PEG化のビオチン化sB4に対応)のエフリンB2への結合能力を標準的なアッセイを用いて試験した。本実験の結果を図72に示す。結合活性の順は未PEG > モノPEG > ポリPEGであることが分かった。

【0240】

画分のin vitroでの安定性も試験した。マウス血清中にて37℃で3日間インキュベートした後のエフリンB2への結合活性の保持について画分を試験した。本実験の結果を図73に示す。In vitro安定性の順はモノPEG > 未PEG > ポリPEGであることが分かった。

【0241】

K . マウス中におけるEphB4細胞外領域のPEG化誘導体の生体内安定性分析

S Pカラム精製からのビオチン化及びPEG化したsB4の画分1, 2及び3(ポリPEG化、モノPEG化及び未PEG化のビオチン化sB4に対応)を静脈内注射によってマウス内に0.5nモル/マウスの量で導入した。10分、1、2及び3日の時間枠で各マウスから血液を採取した。得られた血清の10mLを使用して、エフリンB2-アルカリホスファターゼ融合蛋白質及び固相としてのストレプトアビシン被覆磁性ビーズを用いた結合アッセイを行った。10分のときに得られたシグナルを100%とした。各蛋白質に対する2匹のマウスは異なる血統とした。結果を図74に示す。PEG化は未PEG化のEphB4よりも生体内でのEphB4の安定性を増加させることができた。

【0242】

援用

ここで挙げた全ての刊行物及び特許は、それぞれの刊行物又は特許がまるで個別具体的に援用されることが指示されているかのように、それらの全部を本明細書に援用する。

本発明の具体例について議論してきたが、上記説明は例示のためであり本発明を限定するためではない。特許請求の範囲及び明細書の記載を基にして、本発明の多くの変形が当業者には理解できるだろう。本発明の範囲は特許請求の範囲(全ての均等物を含む)及び明細書(上記変形も含む)を参照することにより決定されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0243】

【図1】B4ECv3蛋白質のアミノ酸配列を示す(非切断EphB4リーダーペプチドを含む前駆体の推定配列を示す; SEQ ID NO:1)。

【図2】B4ECv3NT蛋白質のアミノ酸配列を示す(非開裂EphB4リーダーペプチドを含む前駆体の推定配列を示す; SEQ ID NO:2)。

【図3】B2EC蛋白質のアミノ酸配列を示す(非開裂エフリンB2リーダーペプチドを含む前駆体の推定配列を示す; SEQ ID NO:3)。

【図4】B4ECv3-Fc蛋白質のアミノ酸配列を示す(非開裂EphB4リーダーペプチドを含む前駆体の推定配列を示す; SEQ ID NO:4)。

【図5】B2EC-Fc蛋白質のアミノ酸配列を示す(非開裂エフリンB2リーダーペプチドを含む前駆体の推定配列を示す; SEQ ID NO:5)。

【図6】B4EC-Fc結合アッセイ(プロテインA-アガロースベース)を示す。

【図7】B4EC-Fc阻害アッセイ(溶液中阻害)を示す。

【図8】B2EC-Fc結合アッセイ(プロテインA-アガロースベースアッセイ)を示す。

【図9】B4Ec v3に応答するHUACE走化性を示す。

【図10】B2EC-Fcに応答するHHECの走化性を示す。

【図11】B2ECに応答するHHAECEの走化性を示す。

【図12】HUAECE細管形成に対するB4EcV3の効果を示す。

【図13】HUAECE細管形成に対するB2EC-Fcの効果を示す。

【図14】ヒトエフリンB2コンストラクトの概略図である。

【図15】ヒトEphB4コンストラクトの概略図である。

【図16】組み換え型可溶性EphB4EC蛋白質のドメイン構造を示す。ドメインの表示は下記の通りである：L = リーダーペプチド、G = 球状（リガンド-結合領域）、C = Cy Sリッチ領域、F1、F2 = フィブロネクチン型IIIリピート、H = 6 × HISタグ。

【図17A】EphB4EC蛋白質の精製及びリガンド結合性を示す。精製されたEphB4由来の組み換え型可溶性蛋白質のSDS-PAGEゲル電気泳動を示す（クマシ染色）。 10

【図17B】Ni-NTA-アガロースビーズ上に固定化したEphB4由来の組み換え型蛋白質へのエフリンB2-AP融合体の結合性を示す。三個の独立した試験結果をそれぞれの蛋白質ごとに示す。縦軸は420nmでの光学密度。

【図18】EphB4v3が走化性を抑制することを示す。

【図19A】EphB4v3がマトリゲル（商標）上の細管形成を抑制することを示す。代表的試験でのB4v3による細管形成の強い阻害を示す。

【図19B】蛋白質なしの細胞と比較において、B4v3の濃度を増加させたときに得られる管長の減少及び接合数の減少量を示す。結果は、2ウェルを用いる三つの独立した試験から得られる平均値±S.D.（標準偏差）で示される。

【図20】可溶性EphB4は、MTSアッセイで評価して細胞毒性効果は検出されなかったことを示す。 20

【図21】マトリゲル（商標）アッセイにおいて、B4v3は内皮細胞による侵潤及び細管形成を阻害することを示す。全ての侵潤細胞を検出するために、個々の切片を、トリクローム（商標、マッソン社製）で染色して合計侵潤細胞を検出して倍率20倍で画像をとった。AB左上はGFなしのマトリゲルプラグの切片を示し、Aの右上はGFを含むB4IgGを有する切片を示し、左下の区域はGFを含有し、右下はB4v3の存在下でのGFを示す。内皮細胞の顕著な侵潤はGF含有マトリゲルのみで観察された。右上はB4IgGにより誘起され侵潤された多数の細胞を有する領域を示し、B4v3の二量体を表す。各写真の左上部はマトリゲルプラグ周囲に形成された細胞層に対応し、そこから細胞が右下隅の方向に位置するプラグの中央に向かって侵潤する。区域に分けたマトリゲルプラグの全細胞はScion Imageソフトウェア（商標）で定量化した。二つのプラグを用いた試験を2度行って得られた結果を、平均値±S.D.として示す。 30

【図22】EphB4由来の組み換え型可溶性蛋白質の存在下又はその非存在下で、エフリンB2-Fc融合体を用いた刺激に応答する、PC3細胞中のEphB4レセプターのチロシンリン酸化を示す。

【図23A】生存率及び細胞周期に対する可溶性EphB4ECの効果を示す。2種類のHN SCC細胞系に対する3日間の細胞生存率アッセイを示す。

【図23B】Aと同様に処理されたHN SCC-15細胞中の細胞周期のFACS分析を示す。細胞を処理した結果、矢印により示されるようにサブG0/G1及びS/G2期の蓄積を生じた。 40

【図24】B4v3はネズミ角膜hydron（商標）マイクロポケットアッセイにおいて血管内応答を阻害することを示す。

【図25】マトリゲル及び増殖因子の存在下でSCC15、B16及びMCF-7をsB4v3と共に注射すると、これらの細胞の生体内での腫瘍増殖が抑制されることを示す。

【図26】可溶性EphB4は、三種の腫瘍種：B16（黒色腫）、SCC15（頭部癌及び頸部癌）及びMCF-7（乳癌）において、アポトーシス及び壞死を引き起こし、血管形成を減少させたことを示す。腫瘍はマトリゲル（商標）プラス増殖因子及び可溶性EphB4と予備混合して皮下注射される。10～14日後、マウスにFITC-レクチン（緑）を静脈注射して血管灌流を評価した。コントロール用のPBSで処理された腫瘍は、高い腫瘍密度及び活発な血管形成応答を示した。sEphB4で処理された腫瘍は、腫瘍細胞密度の 50

減少及び生存腫瘍細胞領域での腫瘍血管形成の顕著な阻害、並びに腫瘍壊死及びアポトーシスを示した。

【図27A】前立腺細胞系でのEphB4の発現を示す。種々の前立腺癌細胞系、正常前立腺由来の細胞系（M L C）及びEphB4モノクローナル抗体でプロープした急性骨髄芽球性リンパ腫細胞（A M L）の全細胞溶解産物のウェスタンプロットを示す。

【図27B】ウェスタンプロット法により決定されるP C 3細胞中のEphB4のリン酸化を示す。

【図28】前立腺癌組織中のEphB4の発現を示す。代表的前立腺癌凍結切片をEphB4モノクローナル抗体（左上）又はアイソタイプ特異的コントロール（左下）で染色した。隣接するB P H組織はEphB4モノクローナル抗体で染色した（右上）。陽性シグナルは、腫瘍細胞中で茶色である。ストロマ及び正常上皮は陰性である。腫瘍組織において染色の膜局在化は、EphB4の膜貫通局在化と整合することに注意すべきである。右下グラフは、癌標本及び隣接するB P H組織から抽出されたR N Aの代表的Q R T - P C Rを示す。
10

【図29】腫瘍抑制剤による前立腺癌細胞中のEphB4のダウンレギュレーション及びR X R発現を示す。P C 3細胞は短縮（truncated）されたC D 4及びp 5 3若しくはP T E N又はベクターのみで共トランスフェクトした（図29A）。24時間後、C D 4-分類された細胞を採取し、溶解し、ウェスタンプロット法でEphB4及び、標準蛋白質として-アクチンの発現を順に分析した。図29Bは種々の安定な細胞系に対する上記（A）のウェスタンプロットを示す。L N C a P - F G FはF G F - 8の安定なトランスフェクションクローニングであり、一方C W R 2 2 R - R X RはR X Rレセプターを安定して発現する。B
20 P H - 1は、良性肥大性前立腺上皮から確立した。

【図30】E G F R及びI G F R - 1による前立腺癌細胞中のEphB4のダウンレギュレーションを示す。図30AはE G F Rの特異的阻害剤であるA G 1 4 7 8（1 n M）で36時間処理したとき又は処理しなかったときのP C 3細胞のウェスタンプロットを示す。EphB4シグナルの減少がA G 1 4 7 8処理後に観察された。膜をストリップし、影響を受けていない-アクチンで再プロープした。図30BはI G F R - 1を特異的に中和する抗体M A B 3 9 1で（2 μ g / ml；一晩）処理したとき又は処理しなかったときのP C 3細胞の3個の複製サンプルに対するウェスタンプロットを示す。膜をEphB4、I G F R - 1及び-アクチン抗体で順にプロープした。I G F R - 1シグナルは、M A B 3 9 1処理によって予測されるシグナルの抑制を示す。
30

【図31A】発現及び前立腺細胞機能に対する特異的EphB4 A S - O D N及びsiRNAの効果を示す。EphB4の完全長コンストラクトを安定して発現する293細胞を使用してsiRNA 4 7 2がEphB4発現を阻害する能力を評価した。細胞をリポフェクタミン2000（商標）を使用して50 n MのR N A iでトランスフェクトした。コントロール用のsiRNA（緑蛍光蛋白質；G F P siRNA）又はEphB4 siRNA 4 7 2でトランスフェクションしてから40時間後、EphB4モノクローナル抗体でプロープし、ストリップし、-アクチンモノクローナル抗体で再プロープした細胞溶解産物のウェスタンプロットを示す。

【図31B】完全長EphB4を一時的に発現する293中での発現に対するEphB4 AS - 1 0の効果を示す。細胞をA S - 1 0又はセンスO D Nへ6時間曝露し、（A）と同様にウェスタンプロット法により分析した。
40

【図31C】方法セクションに記載のようにsiRNAで処理されたP C 3細胞の48時間生存率アッセイを示す。三個の複製サンプルの平均±s.e.m.を示す。

【図31D】方法セクションに記載のようにO D Nで処理したP C 3細胞の5日間生存率アッセイを示す。三個の複製サンプルの平均±s.e.m.を示す。

【図31E】（A）と同様に50 n MのsiRNAの存在下でトランスフェクトされたP C 3細胞の移動のスクレープアッセイを示す。スクレープが単層で作られた直後（0 h）及び20時間の連続培養後に得られた代表的な20倍の顕微鏡写真を示す。コントロール用のsiRNAの場合には20時間後のスクレープに多数の細胞が充填されたが、EphB4 siRNA 4 7 2では充填されなかった。

【図31F】A S - 1 0又はセンスO D N（両方とも10 μ M）で処理した細胞に対する

10

20

30

40

50

同様のアッセイを示す。

【図31G】方法セクションに記載のようにsiRNA又はコントロール用のsiRNAでトランスフェクトしたPC3細胞のマトリゲル(商標)侵潤アッセイを示す。下室チャンバー中で5mg/mlフィブロネクチンに応答するマトリゲル(商標)被覆されたインサートの下側への細胞移動を固定化し、ギムザ染色した。コントロール用siRNA及びsiRNA472で処理した細胞の代表的顕微鏡写真を示す。細胞数を高倍率視野で五箇所計測し、その平均±s.e.m.をグラフに示した(右下)。

【図32A】細胞周期及びアポトーシスに関するEphB4 siRNA472の効果を示す。方法セクションに記載のフローサイトメトリーにより、siRNAでトランスフェクトしたPC3細胞を上記トランスフェクションの24時間後に細胞周期段階について分析した。ヨー化プロピジウム蛍光強度に対する細胞数のプロットを示す。siRNA472で処理した場合には7.9%の細胞母集団がアポトーシス性(サブG0ピーク中)であるのに対し、コントロール用のsiRNAでは1%がアポトーシス性であった。

【図32B】方法セクションに記載の細胞死検出ELISAプラスキットにより検出されたPC3細胞のアポトーシスを示す。405nmでの吸光度は、無核細胞断片中のヒストン及びDNA-POD量に比例して増加した。siRNA472及びGFP siRNA(コントロール)の表示濃度における三個のサンプルの平均±s.e.m.を示す。

【図33】EphB4及びエフリンB2が中皮腫細胞系中で発現されたことをRT-PCR(図33A)及びウェスタンプロット法(図33B)によって示す。

【図34】中皮腫細胞中でのin situハイブリダイゼーションによるエフリンB2及びEphB4の発現を示す。チャンバースライド中で培養されたNCI-H28中皮腫細胞系は、エフリンB2又はEphB4へのアンチセンスプローブでハイブリッド化された(上列)。それぞれのハイブリダイゼーションに対するコントロールはセンスである(下列)。陽性反応は暗青の細胞質染色である。

【図35】中皮腫培養物中のEphB4及びエフリンB2の細胞性発現を示す。悪性中皮腫患者の胸水由来の初代細胞単離体、並びに細胞系NCI-H28、NCI-H2373、及びNCI-H2052のエフリンB2及びEphB4に対する免疫蛍光染色法である。緑色は、FITCで標識化された二次抗体の陽性シグナルである。免疫蛍光染色法の特異性は一次抗体が無い場合シグナルの欠落により示される(第一列)。細胞核はDAPI(青色)で対比染色され、全細胞の位置が明らかになった。DAPI及びFITC蛍光の併合画像を示す。オリジナル倍率200倍。

【図36】中皮腫腫瘍中のエフリンB2及びEphB4の発現を示す。悪性中皮腫バイオプシーの免疫組織化学。H&E染色された切片は腫瘍構造を明らかに示した；左下パネルは一次抗体の無いバックグラウンドコントロールである。EphB4及びエフリンB2特異的染色は茶色である。オリジナル倍率200倍。

【図37A】H28細胞の増殖に対するEphB4アンチセンスプローブの効果。

【図37B】H28細胞の増殖に対するEphB4 siRNAの効果を示す。

【図38A】細胞移動に対するEphB4アンチセンスプローブの効果。

【図38B】EphB4 siRNAの効果を示す。

【図39】EphB4はHN SCCの一次組織及び転移で発現したことを示す。図39Aは、上段が本方法に記載のEphB4モノクローナル抗体で染色し、腫瘍細胞に局在化するDAB(茶色)で画像化した代表的保存用切片の免疫組織化学を示す。下段は、隣接する切片のヘマトキシリン及びエオシン(H&E)染色を示す。濃紫染色は腫瘍細胞の存在を表す。右手カラムは、EphB4ポリクローナル抗体で染色し(右上)、DABで画像化したリンパ節転移の凍結切片である。コントロール(中央)はヤギ血清でのインキュベーションであり、H&E(底部)は染色されないストロマで囲まれた転移性病巣の位置を明らかにする。図39Bは、ランオフ転写により生成した、DIG標識化EphB4(左カラム)及びエフリンB2(右カラム)のアンチセンス又はセンスプローブでプローブしたHN SCCケースの連続凍結切片のin situハイブリダイゼーションを示す。ハイブリダイゼーションシグナル(暗青)はアルカリ-ホスファターゼ-複合抗DIG抗体を使用して検出し、切片をNuclear F

10

20

30

40

50

ast Red(商標)で対比染色した。H & Eで染色された連続切片を、腫瘍構造の例示のために示す(左下)。図39Cは腫瘍(T)、無関係な正常組織(N)及びリンパ節バイオプシー(LN)から構成される患者サンプルの蛋白質抽出物のウェスタンプロットを示す。サンプルは、4~20%トリス-グリシングル中でポリアクリルアミドゲル電気泳動により分別され、次にナイロン膜上で電気プロッティングされた。膜は、EphB4モノクローナル抗体及び-アクチンM o A bで順にプロープした。化学発光シグナルをオートラジオグラフィルム上で検出した。120kD位に移動したEphB4特異バンド及び40kD位に移動した-アクチンを示す。-アクチンシグナルをそれぞれのサンプルのローディング及び転移のためのコントロールとして使用した。

【図40】EphB4はHN SCC細胞系中で発現し、EGFによりレギュレートされることを示す。図40AはSCC細胞系中のEphB4発現の試験結果を示す。図39Cに記載のように、順にEphB4モノクローナル抗体でプロープし、ストリップし、-アクチンモノクローナル抗体で再プロープされた全細胞溶解産物のウェスタンプロットを示す。図40BはEphB4発現に対する特異的EGFR阻害剤AG1478の効果を示す。10%FCSを補充された培地内で0~1000nM AG1478で24時間処理(左)、又は1mM AG1478で4、8、12又は24時間処理(右)したSCC15の粗細胞溶解産物に対してウェスタンプロット法を適用した。EphB4及びアクチンの有無を順にプロープした膜を示す。図40Cは、SCC細胞系中のEphB4発現に対するEGFRシグナルの阻害効果を示す。10%FCSを含有する増殖培地(growth media)中に保持された細胞を、1μMのAG1478で24時間処理し、その後、粗細胞溶解産物についてウェスタンプロット法により分析し、EGFR、EphB4、エフリンB2及び-アクチン抗体の有無を順にプロープした。EGFRの特異的シグナルが170kD位に検出され、エフリンB2が37kD位に、更にEphB4及び-アクチンが図40C中に示されるように検出された。-アクチンはローディング及び移動のコントロールとして働く。

【図41】EGFによるEphB4のレギュレーション機構を示す。図41AはEGFRシグナル経路の概略図であり、作用部位及び使用された具体的なキナーゼ抑制剤の名前を赤で示す。図41BではSCC15細胞を24時間血清飢餓状態とした後に、EGF(10ng/ml)、3μM U73122、又は5μM SH-5、5μM SP600125、25nM LY294002、-μM PD098095又は5μM SB203580の存在又は非存在下で24時間のインキュベーションを更に行つた。N/Aは、同体積の希釈剤(DMSO)のみを加えた培養物を表す。細胞溶解産物をEphB4モノクローナル抗体を使用したウェスタンプロット法で分析した。-アクチンシグナルは、蛋白質のローディング及び移動のコントロールとして働く。

【図42A】特異的EphB4 siRNAは、EphB4発現及び細胞生存能力を抑制し、細胞周期停止を引き起こすことを示す。安定して完全長EphB4を発現する293細胞を、リポフェクタミン2000(商標)を使用して50nMのRNAiでトランスフェクトした。トランスフェクション40時間後、細胞を採取、溶解及び加工してウェスタンプロット法を行つた。膜をEphB4モノクローナル抗体でプロープし、ストリップし、蛋白質のローディング及び移動のコントロールとして-アクチンモノクローナル抗体で再プロープした。スクランブルされた緑蛍光蛋白質(GFP)配列に対する陰性試薬コントロールはRNAiであり、コントロールはリポフェクタミン2000(商標)のみでトランスフェクションされる。

【図42B】方法セクションに記載のようにsiRNAで48時間処理したSCC細胞系のMTT細胞生存率アッセイを示す。三個のサンプルの平均±s.e.m.を示す。

【図42C】siRNAで上記のようにトランスフェクトされたSCC15細胞を、トランスフェクション24時間後、方法セクションに記載のようにフローサイトメトリーにより細胞周期段階を分析した。プロピジウムアイオダイド蛍光強度に対する細胞数のプロットを示す。上列及び中央列は、siRNAトランスフェクションから16時間後の細胞のプロットを示し、最下列はトランスフェクションから36時間後の細胞のプロットを示す。具体的なsiRNA及び濃度は、それぞれのプロットで示される。Lipo=リポフェクタミン(商

10

20

30

40

50

標) 200 mock トランスフェクション。

【図43A】SCC細胞に対する特定EphB4 AS-ODNのin vitro効果を示す。EphB4完全長発現プラスミドで一時的にトランスフェクトした293細胞を、トランスフェクションから6時間後に上記アンチセンスODNで処理した。細胞溶解産物をAS-ODN処理から24時間後に採取してウェスタンプロット法を適用した。

【図43B】SCC25細胞を48ウェルプレートへ均一密度で接種し、1、5、及び10μMのEphB4 AS-ODNで2及び4日目に処理した。細胞生存率を第5日にMTTアッセイで測定した。三個のサンプルの平均値±s.e.m.を示す。EphB4蛋白質レベル阻害活性を示したAS-ODNも又、SCC15細胞生存能力の効果的抑制剤であった。

【図43C】未処理細胞(上部)と比較した36時間AS-10で処理したSCC15細胞(底部)の細胞周期分析を示す。

【図43D】プラスチックパストールピペットでスクレープして単層中に3mm幅裂け目を作成したSCC15細胞の融合培養物を示す。阻害性EphB4 AS-ODN(AS-10)及び非阻害性AS-ODN(AS-1)の存在下で細胞の移動能力及び傷を閉じる能力を48時間後に評価した。スクランブルされたODNは陰性コントロールODNとして含まれた。未処理の培養物はODNへ曝されなかった。試験開始時点で、全培養物は同一幅のスクレープ(裂け目)を示し、1μMのEphB4 AS-10中で48時間後に観察されるものと類似であった。赤い括弧は当初のスクレープ幅を表す。

【図43E】方法セクションに記載の2室アッセイにおいて、20mg/mlのEGFに応答したSCC15細胞の移動を示す。未処理(NT)、AS-6及びAS-10で処理した細胞並びに、移動阻害の陽性コントロールとしての10ng/mlタキソールの代表的顕微鏡写真を示す。

【図43F】細胞数を5個の高倍率視野中で計測し、平均±s.e.m.をグラフ中に示す。

【図44】EphB4 AS-ODNは生体内で腫瘍増殖を抑制することを示す。5×10⁶個の細胞を移植した次の日から20mg/kg/日でEphB4 AS-10又はスクランブルODN処理したBalb/Cヌードマウス中のSCC15皮下腫瘍異種移植の増殖曲線である。コントロールマウスは同体積の希釈剤(PBS)を投与された。6匹マウス/群の平均±s.e.m.を示す。*P=0.0001(スクランブルODN処理群と比較したスチューデントt-testによる。)

【図45】EphB4ではなくエフリンB2がKSバイオプシー組織中で発現したことを示す。
 図45Aは、エフリンB2及びEphB4についてのアンチセンスプローブによるin situハイブリダイゼーションと、腫瘍構造を示すためにH&E染色された対応する切片を示す。ISH中の暗青色は、エフリンB2の陽性反応を表す。EphB4に対するシグナルは、カポジ肉腫バイオプシーでは検出されなかった。反対に、EphB4に対するISHシグナルは、扁平上皮細胞癌腫瘍細胞中で強い。エフリンB2はEphB4-AP融合蛋白質を使用したKS中にも検出された(左下)。図45Bは、EphB4/Fc融合蛋白質を用いたエフリンB2の検出を示す。隣接する断片は腫瘍構造を示すためにH&Eで染色され(左)、黒い長方形は、方法セクションに記載のFITC標識化抗ヒトFc抗体で検出されたEphB4/Fc処理した断片(中央)中に示される領域を表す。コントロールとして、隣接する断片をヒトFcフラグメントで処理した(右)。その断片へ結合するEphB4/Fcから生じる特別なシグナルは、腫瘍細胞の範囲のみに観察される。図45Cは、エフリンB2及びHHV8潜伏蛋白質LANA(潜伏感染関連核抗原)1の共発現を示す。冷凍KSバイオプシー材料のエフリンB2(赤)、LANA1(緑)又はEphB4(赤)に対する抗体を用いた二重標識法-共焦点免疫蛍光学顕微鏡分析は、KSバイオプシー中のLANA1及びエフリンB2の共発現を直接的に示す。共発現は黄色で示される。プロピジウムアイオダイド染色(赤)された核を有する細胞中のPECAM-1(緑)に対する抗体を用いたバイオプシーの二重標識法-共焦点画像は、腫瘍の血管特性を示す。

【図46】HHV-8は静脈性内皮細胞中での動脈性マーカー発現を誘起することを示す。図46Aは動脈/静脈マーカー及びウィルス性蛋白質用のHUVEC及びHUVEC/Bc-1の培養物の免疫蛍光を示す。材料及び方法のセクション中に記載のように、培養

10

20

30

40

50

物をチャンバースライド中で成長させ、エフリンB2(a、e、i)、EphB4(m、q、u)、CD148(j、v)、及びHHV-8蛋白質LANA1(b、f、m)又はORF59(r)の免疫蛍光検出用に処理した。同一視野の併合画像中の黄色は、エフリンB2及びLANA又はエフリンB2及びCD148の共発現を示す。生存細胞の位置は、第三カラム(c、g、k、o、s、w)中のDAPI(青)での核染色法により明らかになった。顕微鏡写真は、代表的視野のものである。図46Bは、HUVVEC及び2種のHHV-8に感染させた培養物(HUVVEC/BC-1及びHUVVEC/BC-3)の、エフリンB2及びEphB4に対するRT-PCRを示す。エフリンB2生成物(200bp)はHUVVEC/BC-1中で観察され、HUVVEC/BC-3及びEphB4生成物(400bp)はHUVVEC中で観察される。また、インプットRNAの量及び完全性のコントロールとして-アクチンRT-PCRを示す。

【図47】HHV-8はカポジ肉腫細胞中の動脈性マーカー発現を誘起することを示す。図47Aは種々の細胞溶解産物に対するエフリンB2のウェスタンプロットを示す。SLK-vGPCRはHHV-8vGPCRを発現するSLKの安定なクローニングであり、SLK-pCEF1はエンブティ発現ベクターでトランスフェクトされたコントロール用の安定なクローニングである。LANA又はLANA-440でトランスフェクトされたSLK細胞は、それぞれSLK-LANA及びSLK-440である。蛋白質ローディング及び移動量を-アクチンモノクローナル抗体を用いて膜を再プロープすることにより決定した。図47Bでは、発現ベクター-pvGPCR-CEF1によるKS-SLK細胞の一時的トランスフェクションは、FITC(緑)を用いた免疫蛍光染色法によって示されるように、エフリンB2の発現を生じた。一方、コントロールベクター-pCEF1は効果を示さなかった。KS-SLK細胞(0.8×10^5 /ウェル)を $0.8 \mu\text{g}$ のDNAでリポフェクタミン2000(商標)を使用してトランスフェクトした。24時間後、方法セクションに記載のように細胞を固定化し、エフリンB2ポリクローナル抗体及びFITC複合二次抗体で染色した。図47CではHUVVECのvGPCRによる一時的トランスフェクションは、エフリンB2ルシフェラーゼコンストラクトからの転写を誘導した。24ウェルプレート中の 8×10^3 HUVVECを、Superfect(商標)を使用して、翻訳開始部位に関する-2941~-11、又は示されている2個の5'-欠失の配列を含有する $0.8 \mu\text{g}$ /ウェルのエフリンB2プロモーターコンストラクトで、 80ng /ウェルのpCEF1又はpvGPCR-CEF1と共にトランスフェクションした。ルシフェラーゼはトランスフェクションから48時間後に測定され、誘導割合はグラフの右側に示される。pGL3Basicはプロモーターの無いルシフェラーゼコントロールベクターである。ルシフェラーゼは、GPCRが共トランスフェクトされた-ガラクトシダーゼの発現を誘起したために、蛋白質へ規準化した。グラフは、複製物6個の平均値±SEMである。3個の複製物の同様な試験の1例を示す。

【図48】VEGF及びVEGF-CがエフリンB2発現をレギュレートすることを示す。図48Aでは、抗体中和によるエフリンB2の阻害を示す。細胞は完全増殖培地(full growth medium)中で培養され、抗体($100\text{ng}/\text{ml}$)へ36時間曝されてから採取及びウェスタンプロット法用の溶解が行われた。図48Bでは、エフリンB2の発現の誘導のために細胞を、5%血清を含有し増殖因子を欠くEBM増殖培地中で培養した。個々の増殖因子を示されたように添加し、細胞を36時間後に採取した。蛋白質ローディング及び移動量は膜を-アクチンモノクローナル抗体を用いて再プロープすることで測定した。

【図49】特異的siRNAでのエフリンB2ノックダウンは、VEGFの存在下であるが、IGF、EGF又はbFGFの非存在下でのKS細胞中の生存能力及びHUVVEC増殖を抑制することを示す。図49Aでは、KS-SLK細胞を種々のsiRNA、エフリンB2及びコントロールでトランスフェクトした。48時間後、細胞を採取し、粗細胞溶解産物を4~20%SDS-PAGEで分別した。ウェスタンプロット法を、インハウスで生成されたエフリンB2に対するモノクローナル抗体を用いて行った。膜をストリップし、-アクチンモノクローナル抗体(シグマ社製)で再プロープすると等価なローディング及び移動が示された。図49BはエフリンB2及びEphB4 siRNAの存在下でのKS-SLK培養物の3日

細胞生存率アッセイを示す。24-ウェルプレート中の 1×10^5 細胞/ウェルを0、10及び100ng/mlのsiRNAでグラフに示すように処理した。方法セクションに記載のように、培養物の生存能力をMTTアッセイで測定した。2個のサンプルの平均±標準偏差を示す。図49Cでは、HUV-E細胞をフィブロネクチンで被覆された8ウェルチャンバー-スライド上に接種した。HUV-E細胞を、全成長サプリメントを含むEGM-2培地中で一晩増殖した。翌日、培地をVEGF(10ng/ml)、又はEGF、FGF及びIGFを含有する培地に交換した。37で2時間インキュベーションした後、細胞をリポフェクタミン2000(商標、インビトロジエン社製)を使用して10nMのsiRNA含有OPTi-MEM培地(商標)中でエフリンB2、EphB4又はコントロールとしての緑蛍光蛋白質(GFP)に対しトランスフェクトした。細胞を2時間インキュベートし、次に複数の増殖因子を含有する新しい培地又はVEGF単独をそれぞれウェルへ添加した。48時間後、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、直ちにデジタルカメラにより倍率10倍で写真を撮った。

【図50】可溶性EphB4は、KS及びECコード形成及び生体内血管形成を抑制することを示す。マトリゲル(商標)(上列)中のHUV-Eのコード形成アッセイを示す。指數関数的成長期の細胞を、マトリゲル(商標)上にプレートする前に表示濃度のEphB4細胞外領域(ECD)で一晩処理した。細胞をトリプシン処理し、0.5mlマトリゲル(商標)を含有する24-ウェルプレート中で培養した(1×10^5 細胞/ウェル)。試験化合物の連続的存在下でマトリゲル(商標)上で培養した8時間後のコード形成の代表的な20倍の位相コントラスト視野を示す。オリジナル倍率200。マトリゲル(商標)上のコード形成アッセイで同様の方法で処理したKS-SLK細胞を示す(中央列)。最下列は生体内マトリゲル(商標)アッセイを示す。即ち、増殖因子及びEphB4 ECD又はPBSを含有するマトリゲル(商標)プラグを、マウスの中央腹部内に皮下移植した。7日後、プラグを除去し、断片化し、H&Eで染色してマトリックス内への細胞移動を可視化した。大型管腔を有する無損傷の脈管がコントロール中に観察される一方、EphB4 ECDはほとんど完全にマトリゲル(商標)中への細胞の移動を阻害した。

【図51】膀胱癌細胞系でのEphB4の発現(A)及びEGFRシグナル経路によるEphB4発現のレギュレーション(B)を示す。

【図52】p53のトランスフェクションは5637細胞中のEphB4の発現を阻害することを示す。

【図53】EphB4 siRNA472での処理による膀胱癌細胞系(5637)の増殖阻害を示す。

【図54】EphB4 siRNA472でトランスフェクトされた5637細胞のアポトーシスについての研究結果を示す。

【図55】EphB4アンチセンスプローブの細胞移動に対する効果を示す。5637細胞をEphB4 AS-10(10μM)で処理した(下図)。上図はコントロール細胞を示す。

【図56】EphB4 siRNAの細胞侵潤に対する効果を示す。5637細胞をsiRNA472又はコントロールsiRNAでトランスフェクトした。

【0244】

【図57】G250及びブルダウンアッセイによるEphB4モノクローナル抗体の比較結果を示す。

【図58】EphB4抗体はSCC15異種移植腫瘍の増殖を阻害することを示す。

【図59】EphB4抗体はSCC15、頭部癌及び頸部癌腫瘍種のアポトーシス、壊死及び血管形成減少を引き起こすことを示す。

【図60】EphB4抗体の全身的投与は腫瘍退縮を導くことを示す。

【図61】ヒトEphB4のゲノムスクレオチド配列を示す(SEQ ID NO:6)。

【図62】ヒトEphB4のcDNAスクレオチド配列を示す(SEQ ID NO:7)。

【図63】ヒトエフリンB2のゲノムスクレオチド配列を示す(SEQ ID NO:8)。

【図64】ヒトエフリンB2のcDNAスクレオチド配列を示す(SEQ ID NO:9)。

【図65】ヒトEphB4のアミノ酸配列を示す(SEQ ID NO:10)。

10

20

30

40

50

【図66】ヒトエフリンB2のアミノ酸配列を示す(SEQ ID NO:11)。

【図67】HSA-EphB4融合蛋白質とその他のEphB4ポリペプチドのエフリンB2に対する結合性の比較を示す。

【図68】マウス内におけるEphB4-HSA融合蛋白質とEphB4ポリペプチドの生体内安定性の比較を示す。

【図69】特定のpH条件下でPEG化した可溶性EphB4ポリペプチドのエフリンB2結合活性を示す。

【図70】SP-セファロンカラム上でのEphB4蛋白質のPEG誘導体のクロマトグラフィによる分離を示す。PEG修飾EphB4蛋白質の純度をPAGEにより分析した。PEG化反応産物のエフリンB2結合性についても示す。

【図71】クロマトグラフィによって分離した未PEG化、モノPEG化及びポリPEG化EphB4画分のSDS-PAGEにより測定した純度を示す。

【図72】EphB4のPEG化反応後のクロマトグラフィ画分のエフリンB2への結合活性を示す。

【図73】EphB4のPEG化反応後のクロマトグラフィ画分を、37℃で三日間マウス血清中にてインキュベートした後のエフリンB2への結合活性の保持状態を示す。

【図74】マウス内における未PEG化、モノPEG化及びポリPEG化EphB4画分の生体内安定性を示す。

10

【図1】

B4Ec v3蛋白質のアミノ酸配列

```
MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWKVTFPQVDGQWEELSG  
DDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVYATLRFTM  
LECLSLPRAGRSCKETFTVFFYESDADTATALTTPAWMENPYIKVDTV  
AAEHHLTRKRPGAEATGKVNVKTLRLGPLSKAGFYLAQFDQGACMALL  
SLHLFVKKCAQLTVNLTRPETYVPRELVVVPVAGSCVVDAVPAAGPSP  
SLYCREDGQWAEPQPTGCSCAPGFEAAEGNTKCRACAGTFKPLSGE  
GSCQCPANSHNTIGSAVCQCRCVGYFRARTDPRGAPCTTPSAPRPS  
VVSRLNGSSLHLEWSAPLESGGREDLTYALRCRECRGGSCAPCGGD  
LTDFGPRDLVFPWVVRGLRPDFTYTFEVTLNGVSSLATGPVGPVFE  
PVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSSLAWAVPRAFGAWLDYEVK  
YHEKGAEGPSVRFKTSSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGP  
FGQEHHHSQTQLDESEGWRREQGSKRAILQIEGKPIPNPLLGLDSTRG  
HHHHHHH
```

【図2】

B4Ec v3 NT蛋白質のアミノ酸配列

```
MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWKVTFPQVDGQWEELSGL  
DDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVYATLRFTMLE  
CLSLPRAGRSCKETFTVFFYESDADTATALTTPAWMENPYIKVDTVAEE  
HLTRKRPGAEATGKVNVKTLRLGPLSKAGFYLAQFDQGACMALLSLHL  
FYKKCAQLTVNLTRPETYVPRELVVVPVAGSCVVDAVPAAGPSPSLYCR  
EDGQWAEPQPTGCSCAPGFEAAEGNTKCRACAGTFKPLSGEQGSQPC  
PANSHSNTIGSAVCQCRCVGYFRARTDPRGAPCTTPSAPRVSRLNG  
SSLHLEWSAPLESGGREDLTYALRCRECRGGSCAPCGGDLTFDPGPR  
DLVEFWVVRGLRPDFTYTFEVTLNGVSSLATGPVVFEPVNVTDR  
VPPAVSDIRVTRSSPSSLSSLAWAVPRAFGAWLDYEVKYHEKGAEGPS  
SVRFLKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEEHHHSQTQL  
DESEGWRREQGSKRAILQISSTVAAARV
```

【図3】

B2Ec蛋白質のアミノ酸配列

```
MAVRRDHSVWKYCWGVLMVLCRTAISK SIVLEPIYWNSNSKFLPGQGL  
VLYPQIGDKLDIICPKVDSKTVGQVEYYKVMVMDKDQADRCTIKKENT  
PLLNCAKPQDQDIKFTIKQEFSPNLWNGLEFQKNKDYYIISTSNGLLEG  
LDNQEGGVQCQTRAMKILMKVGQDASSAGSTRNKDPTRRPELEAGTNGR  
SSTTSPPVFKPNPGSSTDGNSAGHSGNNILGSEVGSHHHHHH
```

【図4】

B4Ec v3 - FC蛋白質のアミノ酸配列

```
MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWKVTFPQVDGQWEEL  
SGLDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVYATL  
RFTMELCSSLPRAGRSCKETFTVFFYESDADTATALTTPAWMENPY  
IKVDTVAEEHLTRKRPGAEATGKVNVKTLRLGPLSKAGFYLAQFD  
QGAGTFLSLSLHLYKKAQQLTVNLTRPETYVPRELVVVPVAGSCVV  
DAVPAAGPSPSPLYCREDGQWAEPQPTGCSCAPGFEAAEGNTKCR  
CAQGTFKPLSGEQGSQPCPANSHNTIGSAVCQCRCVGYFRARTDP  
RGAPCTTPSAPRVSVSRLLNGSSLHLEWSAPLESGGREDLTYALR  
CRECRPGGSCAPCGGDLTFDPGPRDLVFPWVVRGLRPDFTYTFE  
VTLNGVSSLATGPVVFEPVNVTDRREVPPAVSDIRVTRSSPSSL  
SSLAWAVPRAFGAWLDYEVKYHEKGAEGPSVRFKTSSENRAELR  
GLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEEHHHSQTQLDESEGWRREQDPE  
PKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTC  
VVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVVRVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREFQVYTL  
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTPPP  
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL  
SLSPGK
```

【図5】

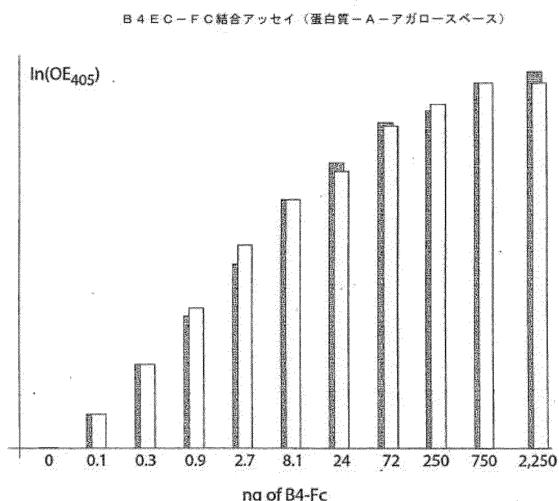
B2 E C - F C 蛋白質のアミノ酸配列

```

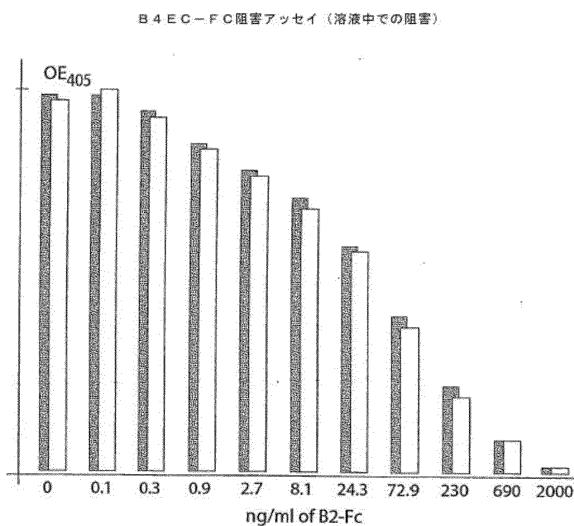
MAVRRDSVWVKYCWGVLMLCRLTAISKSIVLEPIYWNSNSNKFLPGQ
GLVLYPQIGDKLDIICPKVDSKTVGQYEEYKVYMDVKDQADRCTIK
KENTPLLNCAKPDQIKFTIKFQEFSPNLWLEFQKNKDYYIISTS
NGSLEGLDNQEGGVQCQTRAMKILMKVQDASAGSTRNKPDRPE
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPVVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

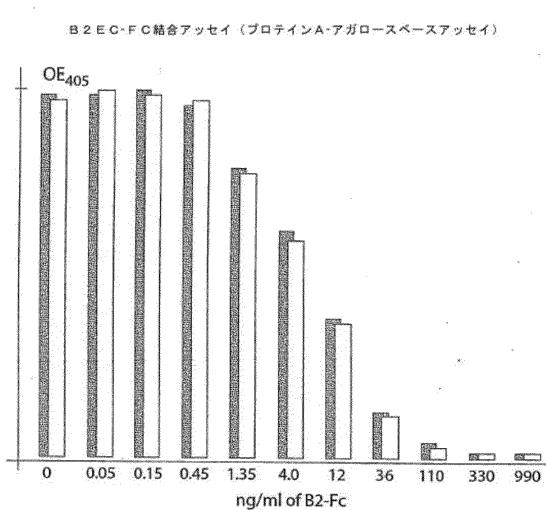
【図6】



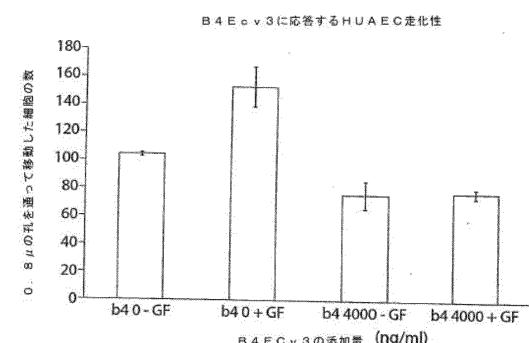
【図7】



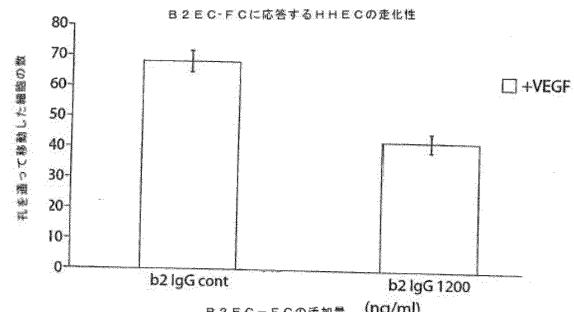
【図8】



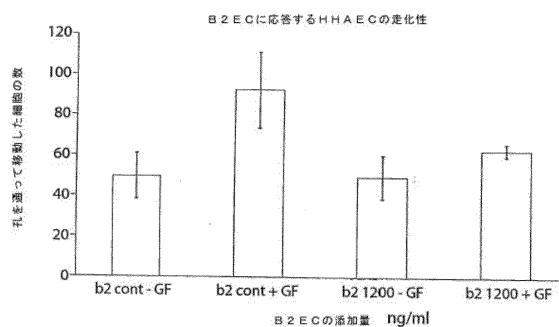
【図9】



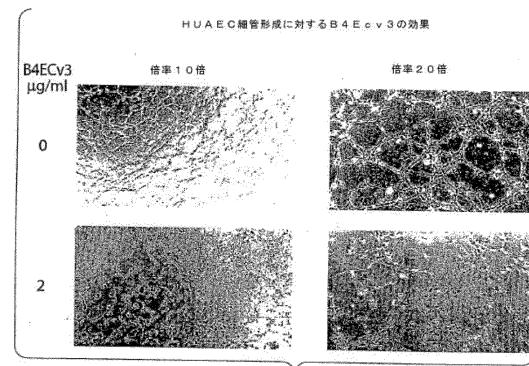
【図10】



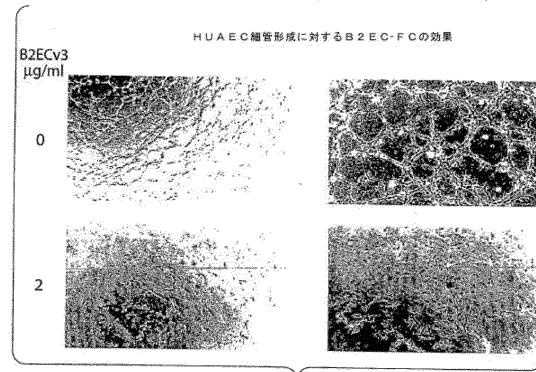
【図11】



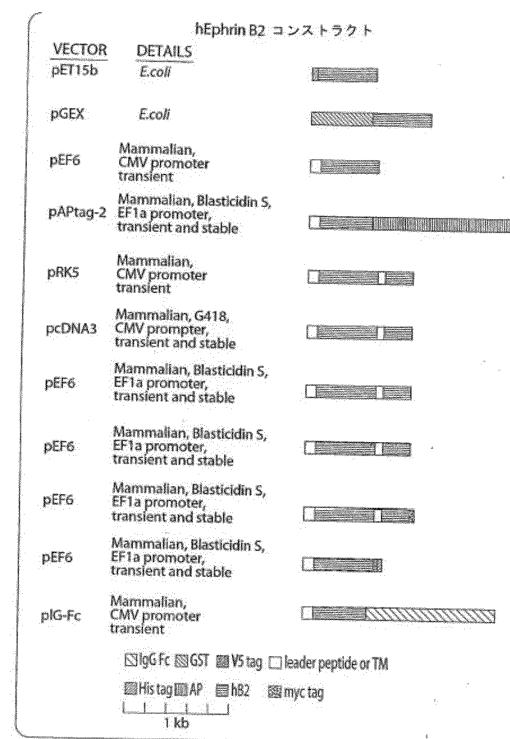
【図12】



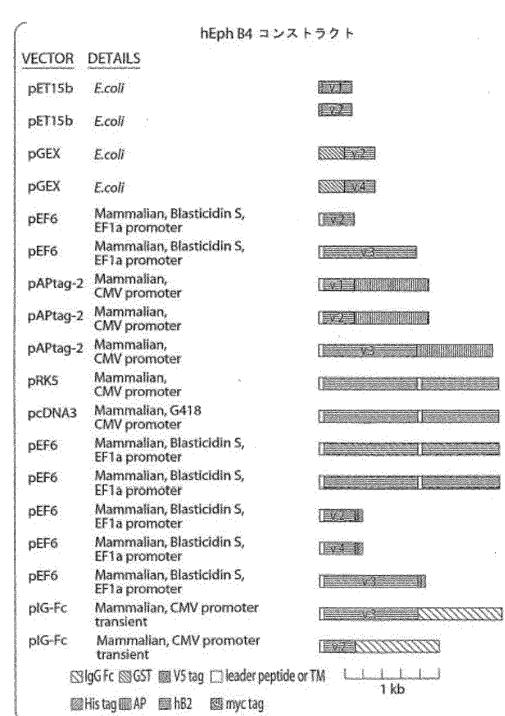
【図13】



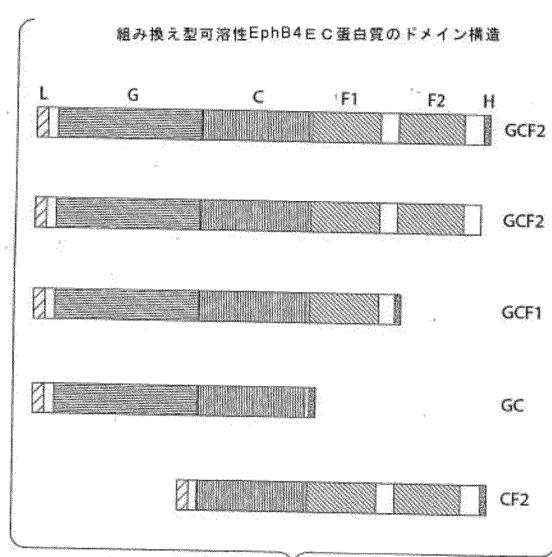
【図14】



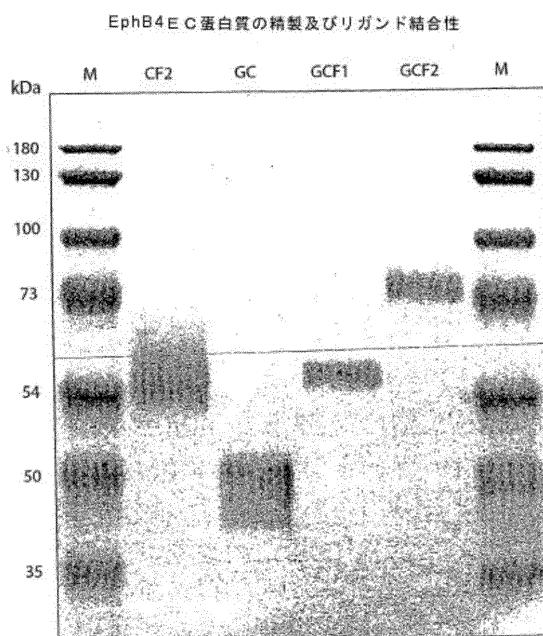
【図15】



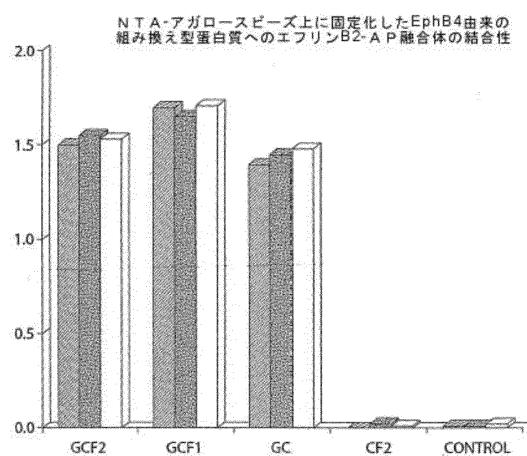
【図16】



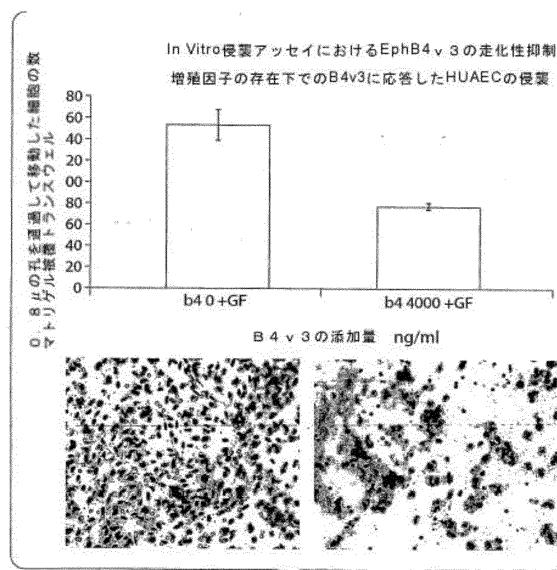
【図17A】



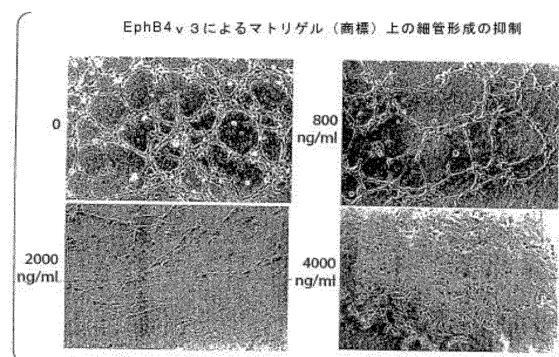
【図17B】



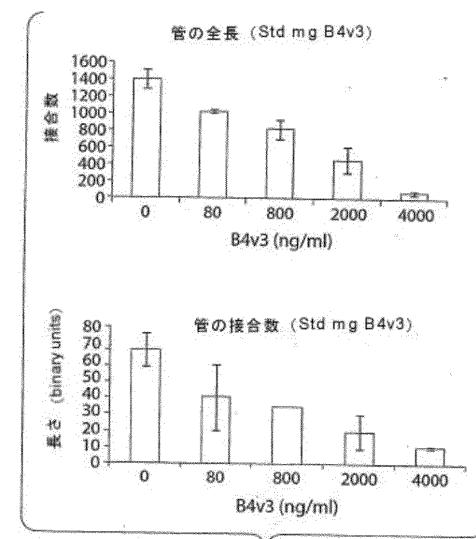
【図18】



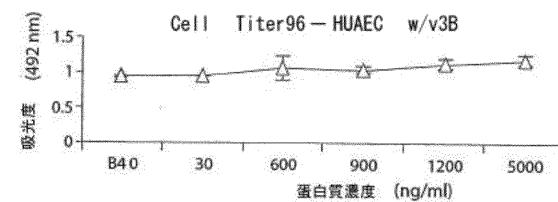
【図 19 A】



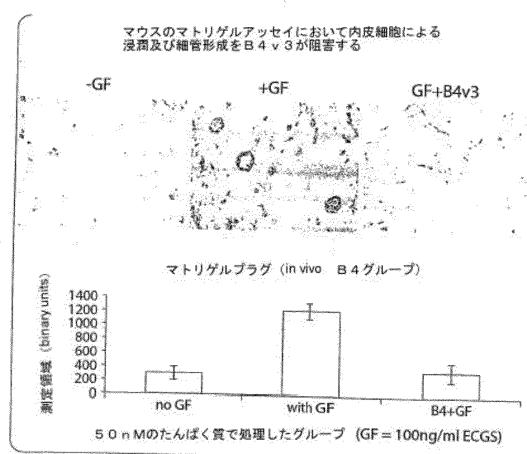
【図 19 B】



【図 20】



【図 21】



【図 22】

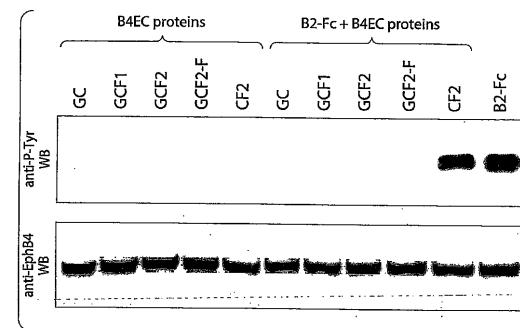
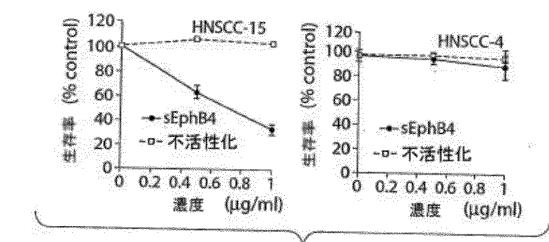
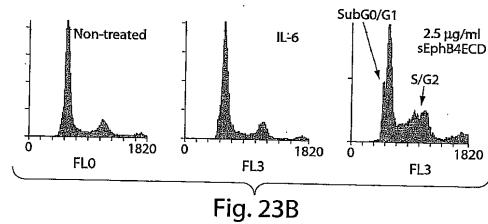


Fig. 22

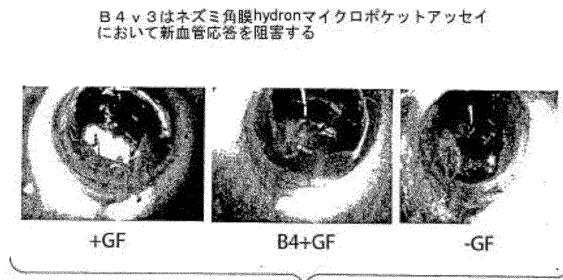
【図 23 A】



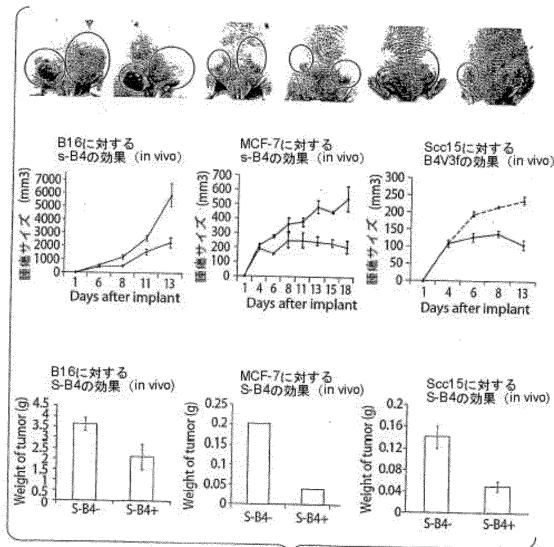
【図 23B】



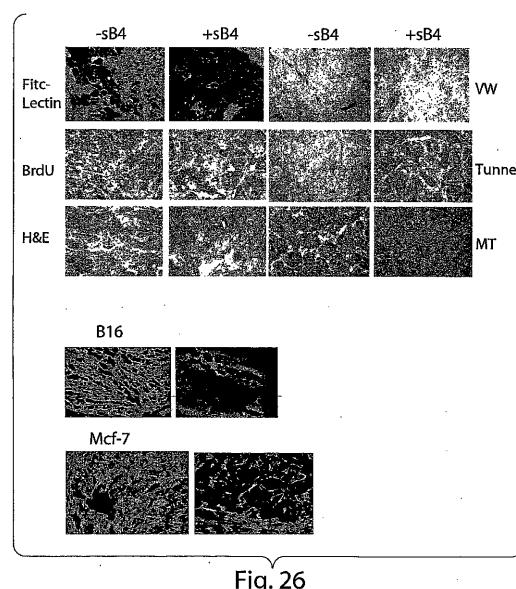
【図 24】



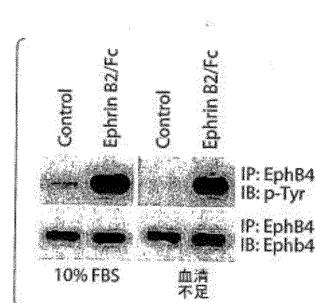
【図 25】



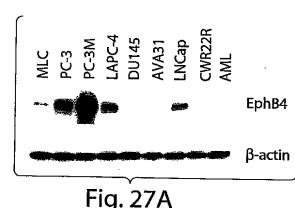
【図 26】



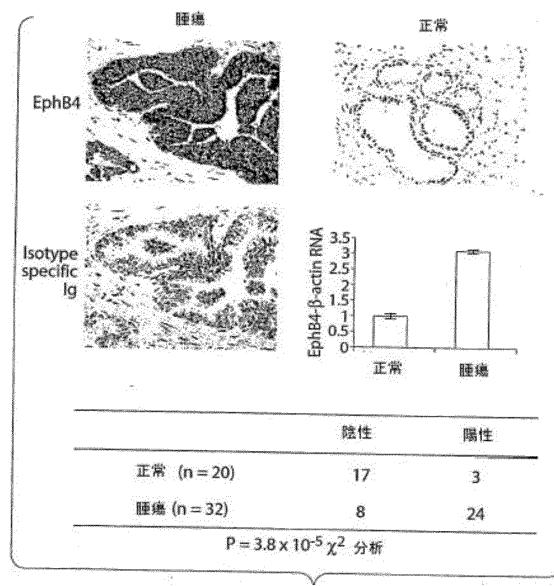
【図 27B】



【図 27A】



【図 28】



【図 29 B】

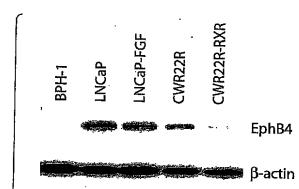


Fig. 29B

【図 30 A】

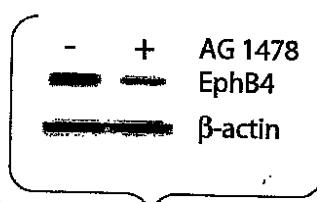


Fig. 30A

【図 29 A】

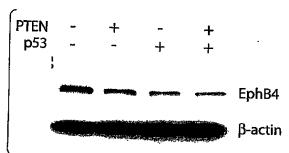


Fig. 29A

【図 30 B】

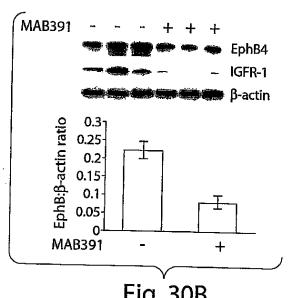


Fig. 30B

【図 31 A】

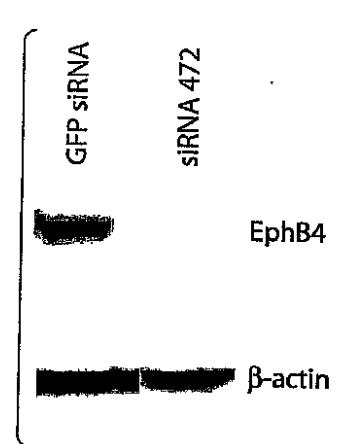


Fig. 31A

【図 3 1 B】

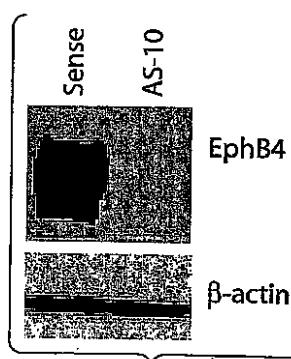
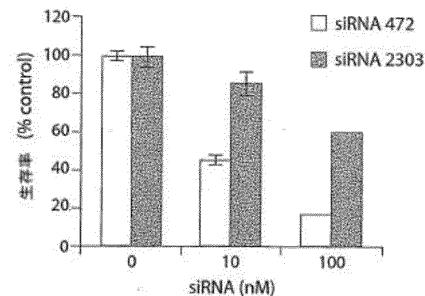
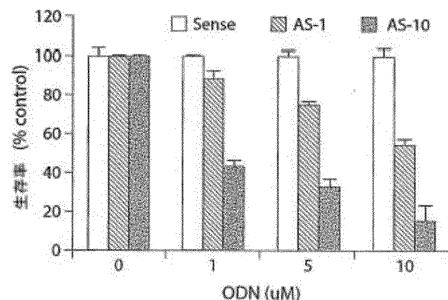


Fig. 31B

【図 3 1 C】



【図 3 1 D】



【図 3 1 E】

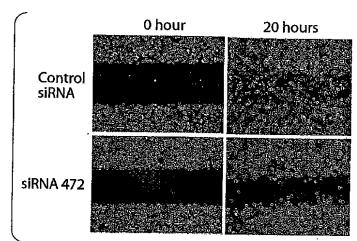


Fig. 31E

【図 3 1 F】

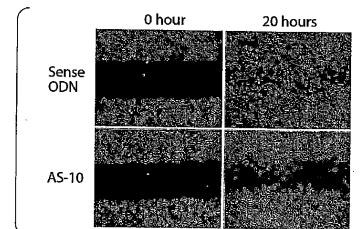
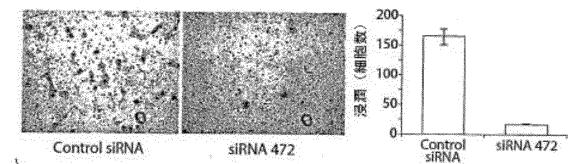
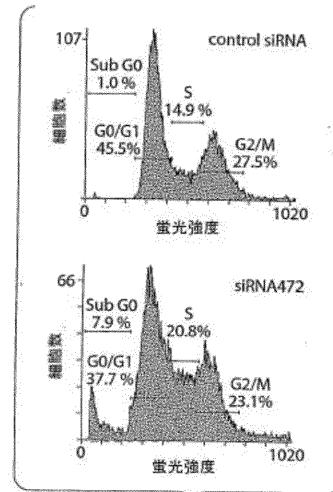


Fig. 31F

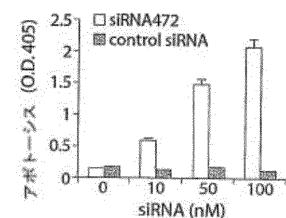
【図 3 1 G】



【図 3 2 A】



【図 3 2 B】



【図 3 3 A】

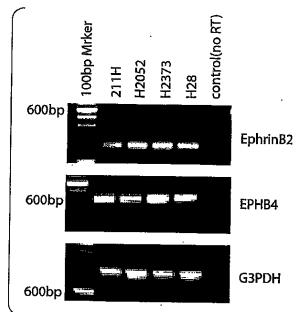


Fig.33A

【図 3 3 B】

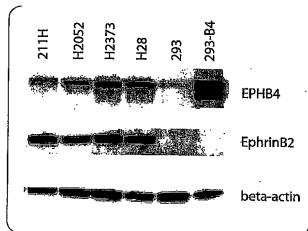


Fig.33B

【図 3 4】

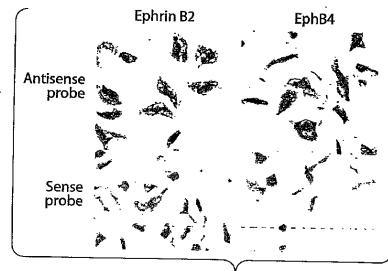


Fig.34

【図 3 5】

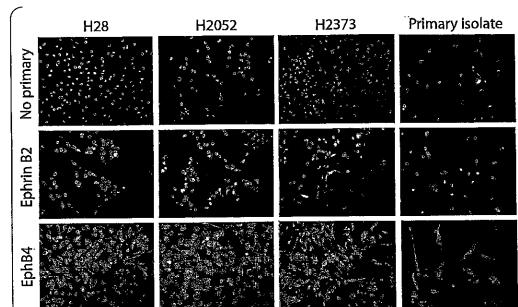


Fig.35

【図 3 6】

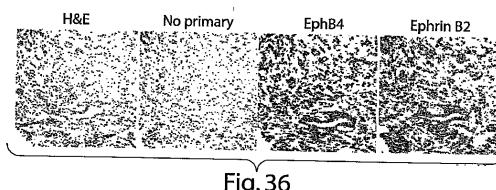
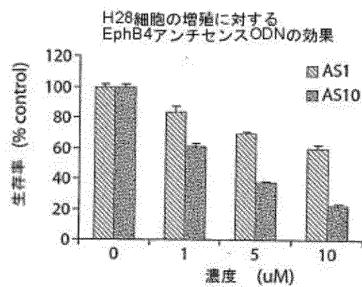
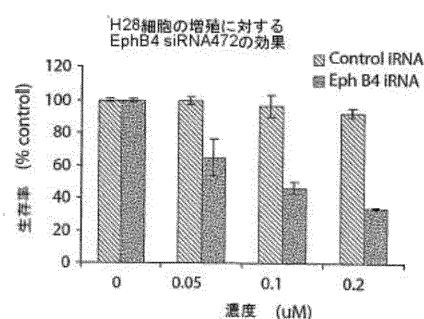


Fig.36

【図 3 7 A】



【図 3 7 B】



【図 3 8 A】

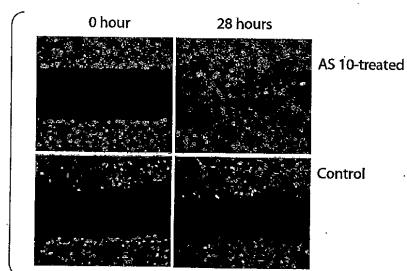
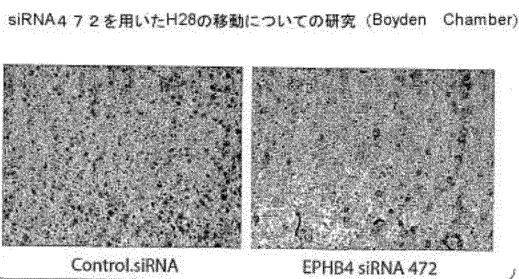


Fig.38A

【図 38B】



【図 39A】

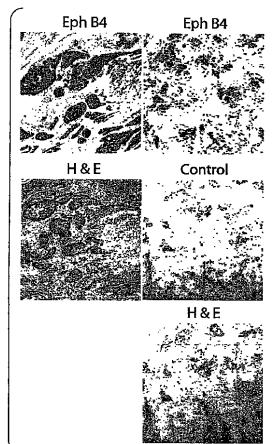


Fig. 39A

【図 40A】

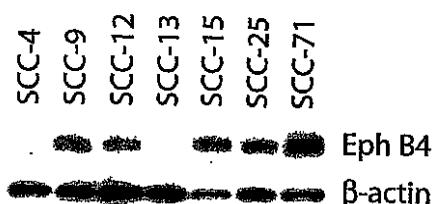


Fig. 40A

【図 40B】

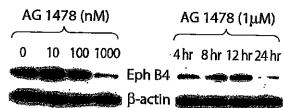


Fig. 40B

【図 40C】

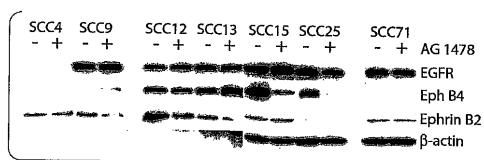


Fig. 40C

【図 39B】

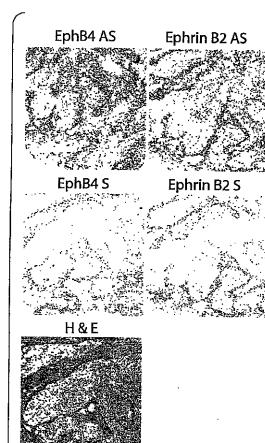


Fig. 39B

【図 39C】

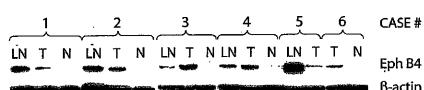


Fig. 39C

【図 41A】

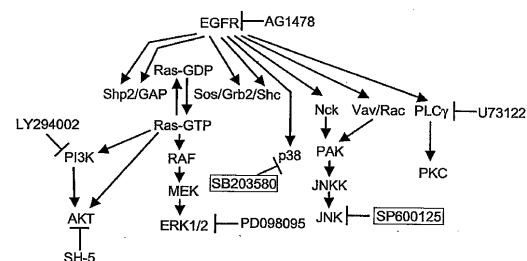


Fig. 41A

【図 41B】

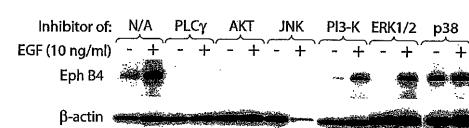


Fig. 41B

【図 42A】

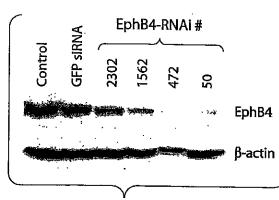
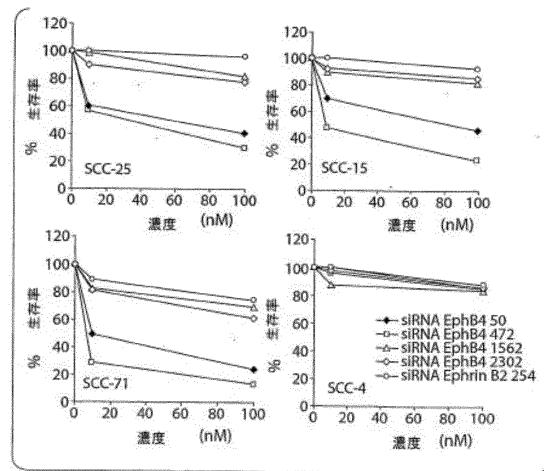


Fig. 42A

【図 4 2 B】



【図 4 2 C】

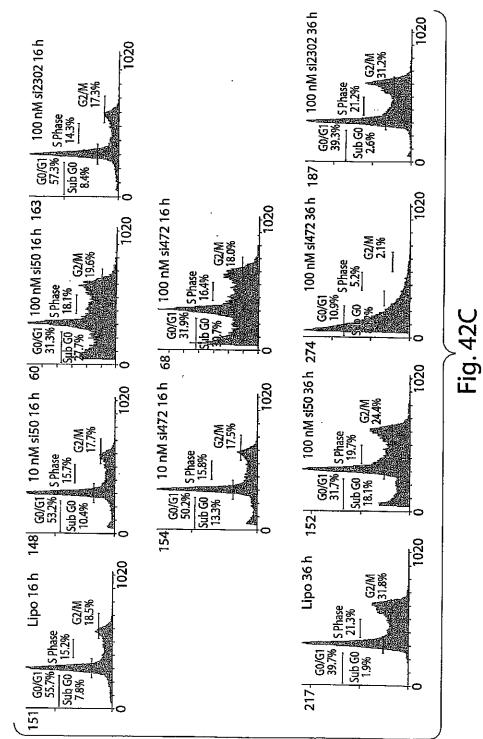


Fig.42C

【図 4 3 A】

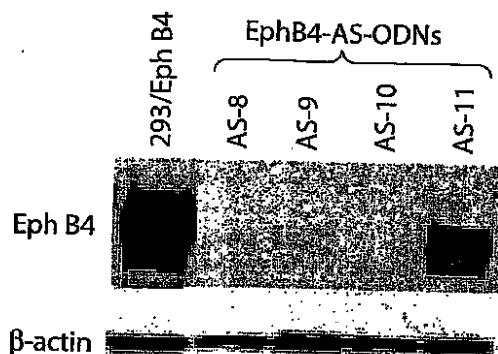


Fig. 43A

【図 4 3 C】

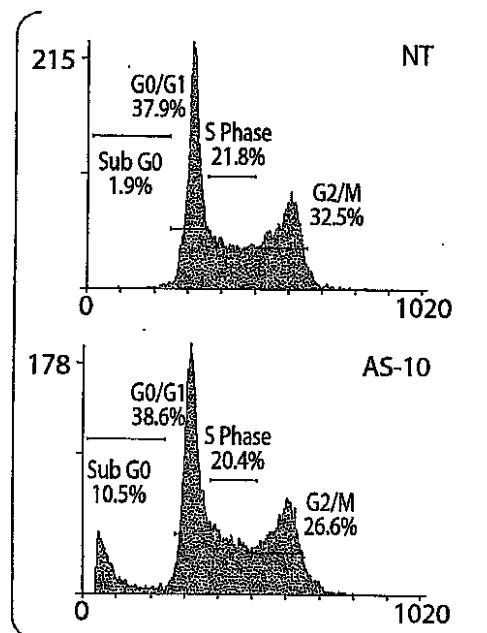
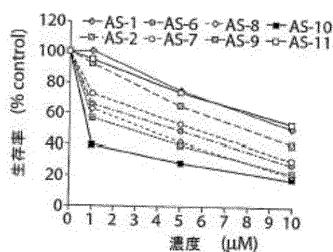


Fig. 43C

【図 4 3 B】



【図 4 3 D】

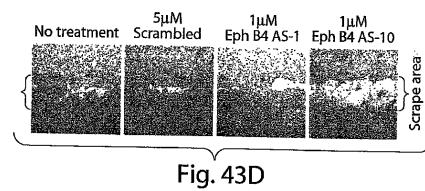


Fig. 43D

【図 4 3 E】

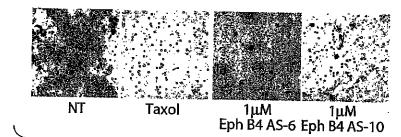
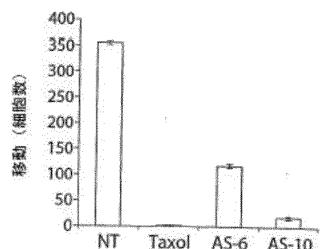
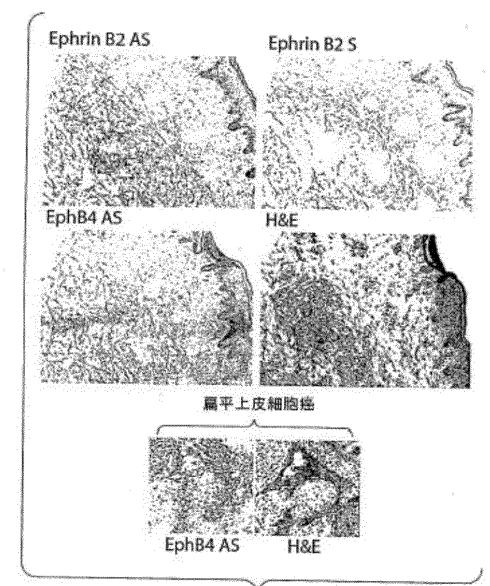


Fig. 43E

【図 4 3 F】



【図 4 5 A】



【図 4 5 B】

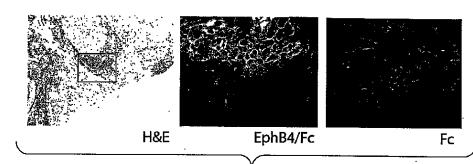
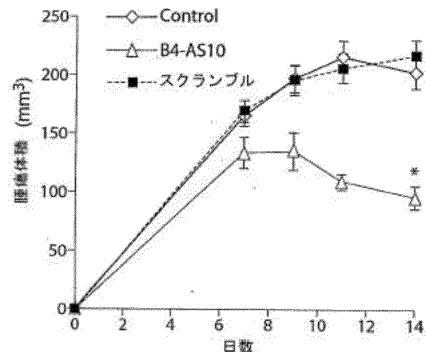


Fig. 45B

【図 4 4】



* indicates significant difference

【図 4 5 C】

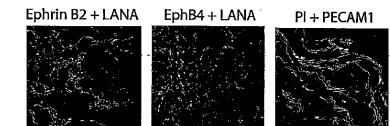


Fig. 45C

【図46A】

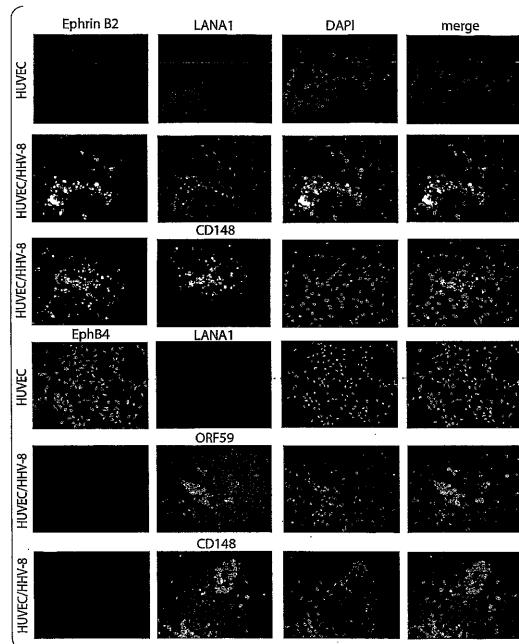


Fig.46A

【図46B】

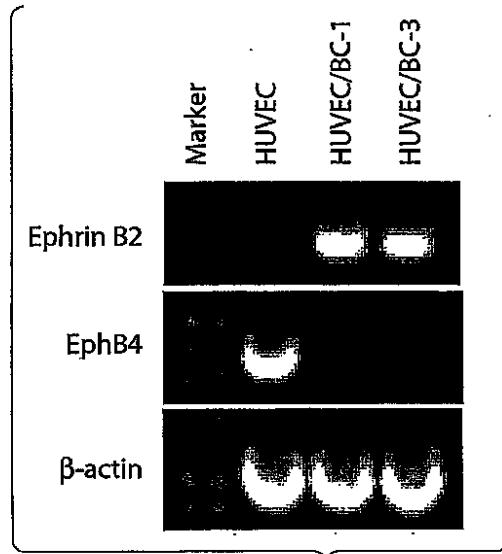


Fig.46B

【図47A】

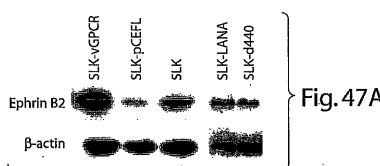


Fig.47A

【図47B】

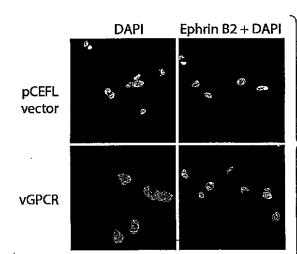


Fig.47B

【図47C】

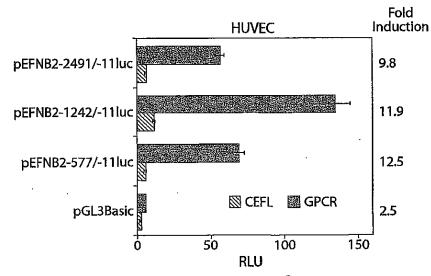


Fig.47C

【図48A】

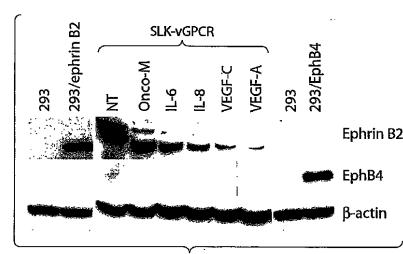


Fig.48A

【図 4 8 B】

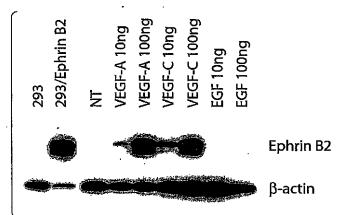


Fig. 48B

【図 4 9 A】

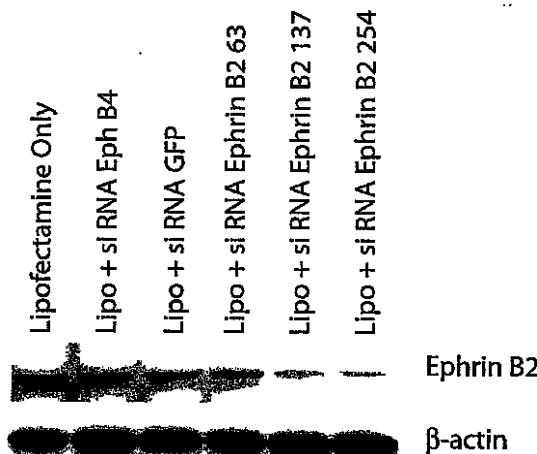


Fig. 49A

【図 4 9 B】

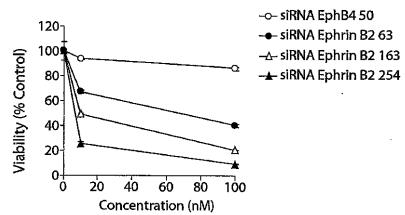


Fig. 49B

【図 4 9 C】

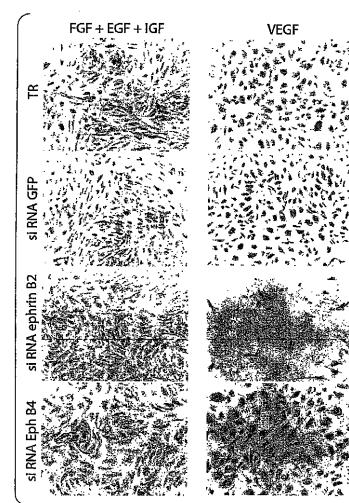


Fig. 49C

【図 5 0】

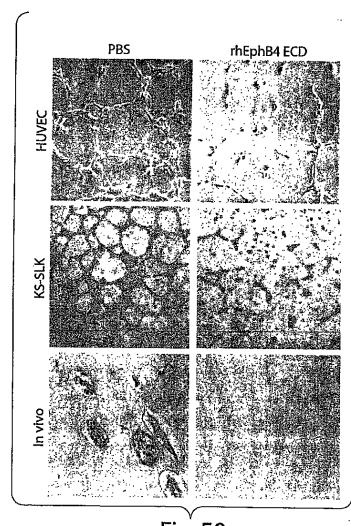
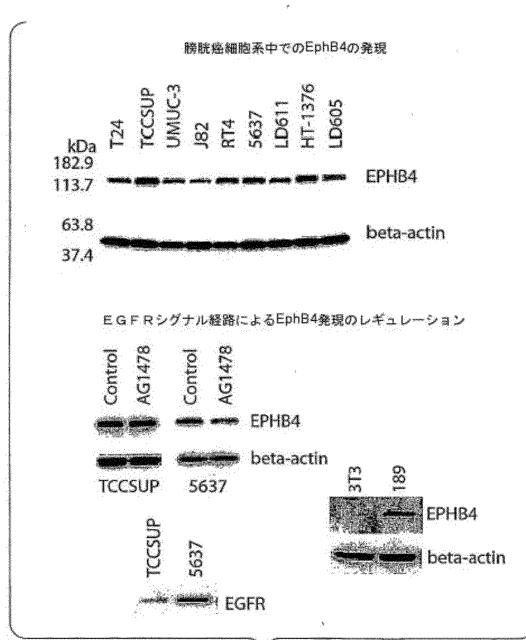


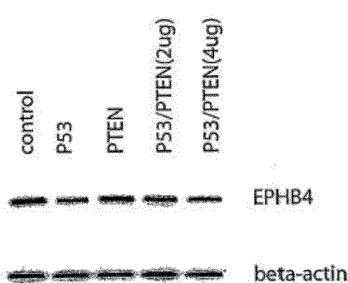
Fig. 50

【図 5 1】



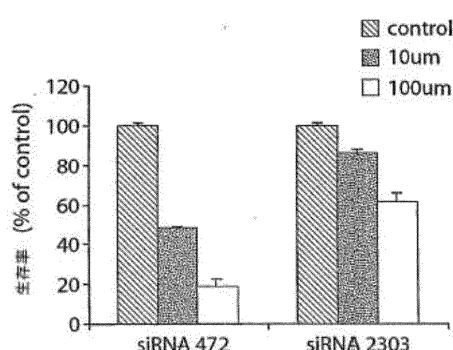
【図52】

p53のトランスフェクションは5637細胞中のEphB4の発現を阻害する



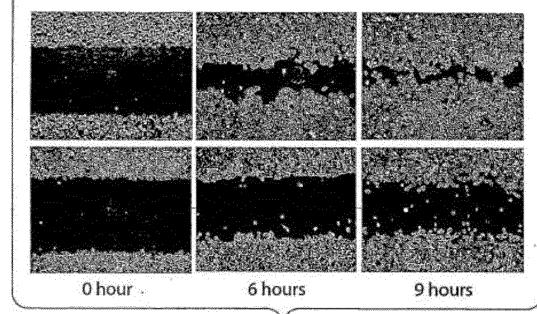
【図53】

EphB4 siRNA472での処理による膀胱癌細胞系（5637）の増殖阻害



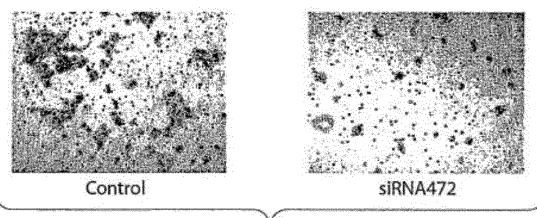
【図55】

AS10 (1.0 μ M) で処理したときの5637細胞の細胞移動に関する研究



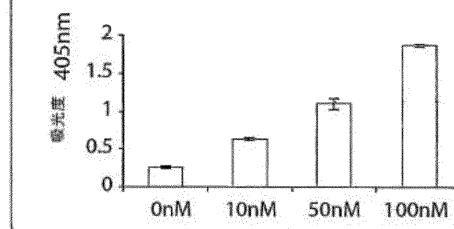
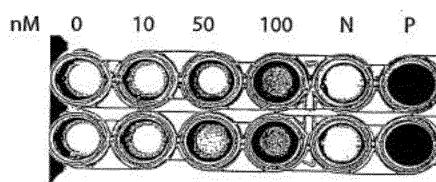
【図56】

siRNA472又はコントロールsiRNAをトランスフェクトした5637細胞の浸潤についての研究



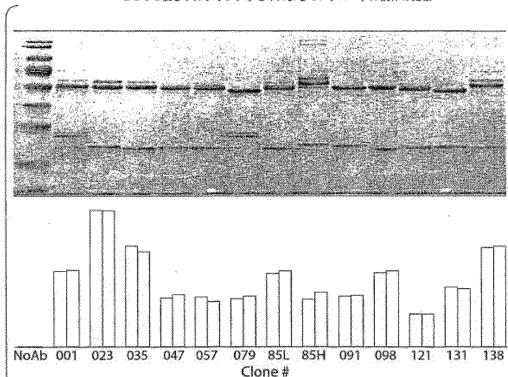
【図54】

EphB4 siRNA472でトランスフェクトされた5637細胞のアポトーシスについての研究



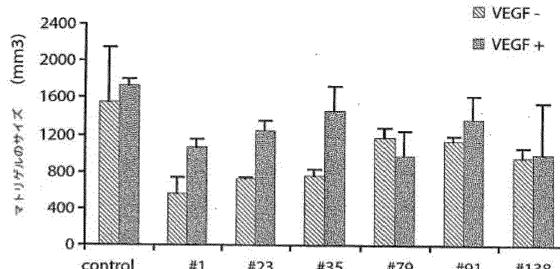
【図57】

G250及びブルダウンアッセイによるモノクローナル抗体の比較

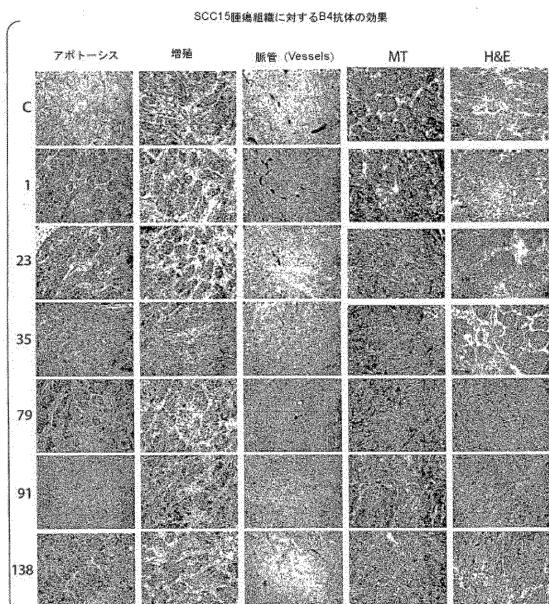


【図58】

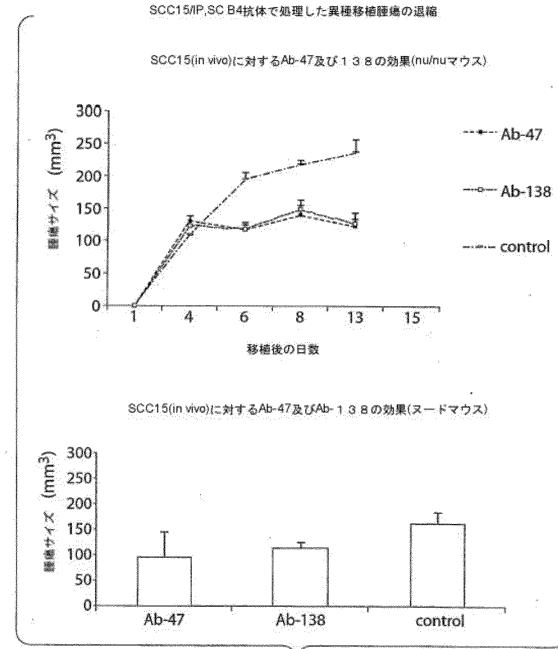
SCC15/MG異種移植腫瘍の退化(nu/nuマウス内のScc15上の2T4げん)に対するB4抗体とVEGF-/-+



【 5 9 】



〔四六〇〕



【 6 1 A 】

EphB4 gene

Fig. 61A

(义 6 1 B)

Fig. 61B

【図61C】

5281 ctcttaactcc tgggtcaag agatgttctcc acactcgccg tccttaamtg ctggatttat
 5341 aggcatgagg caactacggc ggcctcaagg tacattatac ctcccccagg attccatcat
 5401 cgcgtctcc ttgtacttgc gptcaaggc tggcatggg tcaatgttgc taaaatgttgc
 5461 taagaacgtt gaataaaaaag ggggagaggc gcaggccaga ggcggggat atccgggg
 5521 ttggaaaggc ctgaatgtggc agttgtgggg ctggagaaaa ggttgtccctt gggaaatgtgg
 5581 agggaaaggatt ctggaaaggc aaccaaggag gtccggggag gtgactgtgg aagcacacaa
 5641 cagtccgtg ggttcccaag ggtggggagc agacggcgtg tgcctcccccc cccgggg
 5701 ttggacacgg tggccggggg gaatcttccce cggaaaggcc ctggggggca gycacccgg
 5761 aaggtaatggc tcaaaaggc ggttctggg cccgtccagg aggttgggtt ctaccatggcc
 5821 ttccaggacc aggttggctg catggccgtt etatccctt aacaaatgtgg
 5881 gcccaggctg ctgtggaaatc gactcgatc cccggggatc tgccctgggg gtcgtktgg
 5941 ccctgtggcc ctgtgtgtgt gttgtggatc gtcccccggc ctggcccccggc cccaggcc
 6001 taactcggtc aggttggccca ggccggggcc cgggggttgc ctgtgttcgg
 6061 ggttgg
 6121 taactgtgtc catccgggggg agatgttgc atccactaa gggaaatccat tttttttt
 6181 cattttttgtt agttgtatgtt tgaaatgggg gttttttttt tttttttttt tttttttttt
 6241 ttggacaaatc ttgttgcata tggcaacttcc gttttttttt tttttttttt tttttttttt
 6301 ctggccatggc ctggggatggat gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 6361 ttgtttttttt ttggaaatggc gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 6421 ctggatgtat ttggccggcc ctggggcccaaaatgggggggggggggggggggggggggggg
 6481 caccaggatgg
 6541 aatcccaatccatggatgg
 6601 gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 6661 cacttgccggc cgg
 6721 aaaaaaaaaaaaaaaaatgg
 6781 ggttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 6841 gcttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 6901 tttagatggatc ttgtttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 6961 ttgtccggcc ttggccctcccaaaatgggggggggggggggggggggggggggggggggggg
 7021 taatccaaatccatggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 7081 ttcttactaaatccatggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 7141 ttgg
 7201 gatccatccca ctggatccctccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 7261 ttggccatgg
 7321 ccatggggat tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 7381 cacacccgg
 7441 gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 7501 aggttccatccatggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 7561 taatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 7621 ccacaaatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 7681 ttatggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 7741 taatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 7801 cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 7861 taatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt

Fig.61C

【図61D】

7921 ttgttggccatgg qctttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 7981 aaatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 8041 atgtttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 8101 ttggatggatc gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 8161 ggcgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 8221 ttggccatggatc gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 8281 aatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 8341 ttgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 8401 gtgttgg
 8461 ttccctttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 8521 gtctttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 8581 ctatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 8641 acatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 8701 taatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 8761 ccacgg
 8821 ggg
 8881 ggg
 8941 aggccgg
 9001 ggg
 9061 gaatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 9121 coacttacttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 9181 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 9241 ttgg
 9301 agtccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 9361 agccgg
 9421 ctatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 9481 ccatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 9541 ttgg
 9601 ctggccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 9661 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 9721 cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 9781 ttggccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 9841 atggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 9901 gggttgg
 9961 ttccctttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 10021 aaaaatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 10081 gtccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 10141 gggttgg
 10201 ggccgg
 10261 atccaaatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 10321 aaaaatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 10381 gggttgg
 10441 gocacttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 10501 aaaaatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt

Fig.61D

【図61E】

10561 ctgttaatccca ggcacttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 10621 gaccatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 10681 gtgttggccatggggccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 10741 taatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 10801 atccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 10861 taatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 10921 atggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 10981 gacccggccatggggccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11041 ctatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11101 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11161 taatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11221 taatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11281 ttgtttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 11341 taatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11401 ggtttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 11461 getttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11521 ctccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11581 atgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11641 aaaaaatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11701 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11761 aaaaaatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11821 atgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11881 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 11941 ttgg
 12001 agccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 12061 gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 12121 ggtttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 12181 ttttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 12241 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 12301 atccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 12361 ctatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 12421 gggccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 12481 gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 12541 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 12601 taatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 12661 gatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 12721 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 12781 taatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 12841 gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 12901 taatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 12961 taatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13021 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13081 gggccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13141 ctatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt

Fig.61E

【図61F】

13201 ttgttattttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 13261 agtccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13321 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13381 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13441 ttgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13501 ttatttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 13561 ctatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13621 atgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13681 aaaaatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13741 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13801 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13861 aggttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13921 atgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 13981 gggccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14041 cggccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14101 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14161 cccttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14221 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14281 aacccgg
 14341 ccggccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14401 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14461 gacccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14521 aggttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14581 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14641 atccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14701 ttatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14761 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14821 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14881 atgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 14941 aaaaatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 15001 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 15061 accccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 15121 ttatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 15181 ctatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 15241 ctatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 15301 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 15361 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 15421 aaaaatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 15481 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 15541 ttggatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 15601 gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 15661 coacttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 15721 acatccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 15781 agacccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt

Fig.61F

【図 6-1 G】

Fig. 61G

【図 6-1-H】

Fig. 61H

【 义 6 1 I 】

Fig. 61

(図 61)

Fig. 61J

【図 6-2-A】

Fig. 62A

【図62B】

2641 tggttgcact ttggcccttc cccatgttcg gaggagaact cttecgatcc cactcacg
2701 agctccctgg gaggaaatcc tccatccca tggttgcggcc cggagttttc tggttcggc
1879 atggtaacctt ccccccgttg tgcctgtt gatggatgg tgatggggg ggtatgttc
2821 ttttggggaa ggccgtatcc gaatccatgg aattccggatc tgatcatgg ccatacgac
2881 gactacccgg tcccccggcc cccacatgt cccacccatcc tccacccatgt catgttcac
2941 tggtggaca aagacggaa tgccggccgg cgatccccc aggttgttgcg cccggctgg
3001 aasgtatgtcc gaaaccggcc cccatccaaa atggccggcc gggagatggg cggggatgg
3061 cacttcctcc tggccatggcc gggactccaa tactccatgt ttggctgtt gggggatgtt
3121 etttccggcc tccaaaaatggg agatccatgg gaaatgggtt cggccgttgg ttgttgcgg
3171 ttccatgtttt ccggatccatgg tggccatgg tggatgtcc gatccatgg cttttccgg
3241 ggacacccaa aaaaatggcc gggccatgtt cccacatgtt agtccccggg acccgggg
3301 accccgggtt ggacacggg accggccgg cccatccatgtt ccggaaaggcc tccccccccc
3361 agggacacccg cttccccccat ttccggggca gatgtggggaa tcacagggcc cccaggccat
3421 ggcccccgtt gatgtttttt ccgggggggg ggggggggg gtgttgcggaaat ttggagggaa
3481 ggatttttttt gttttttttt aatggggggg gaaaatccaa ccccccaccc ctggggggac
3541 tccggccaccaaa gggtgggggtt ccgttccccc cccatgggggggggggggggggggg
3601 tgcccaaaaa tttccatggcc tcccccgggg ccccccaccc ttgtatgggtt gggtttccgg
3661 accggccaaa aaggtgttgcact cccttgcacg cccatgggggggggggggggggggg
3721 aagaagggtt gtcaggggcc agtggaaaaaa ttatgggggtt ttgtatggcc aactttgtcc
3781 tgcccaaaaa aaactccatcc ttatttttcc ttgttgcggaaat ccctccccc accgtgtcc
3841 ttccatgtttt aggtttttttt tggtttttt tggttggat ttttttttttt tggttgcgg
3901 tggtttttcc ttgtttttttt ctacccgtt tgatccatgtt ttgttgcgg gggggatgtt
3961 ttccatgtttt ctccctttttt ccggatggaa acccggggggg atccatgtt ccgttccgg
4021 aaccatgtcc tggccatcc acatccccc accggccgtt gggcccccacccatgggggg
4081 atguagggtt gtgggggttgc agtggaaaaaa gggccgggtatg tggttgcgg accccggaaa
4141 ggccggccgtt gttttggggg ttatttttat ttatttttttt aaaaatgttcc ttgttgcgg
4201 taaaagaaaaaa tggccatgtt cccatggcc ggggt

Fig. 62B

【 义 6 3 A 】

Fig. 63A

(义 6 3 B)

Fig. 63B

【図 6-3c】

5281 ttaaaaaggg atagaaaaat tagggcagat aatcttgcgt tgatccaaata accaaaaacc
5341 tttttcgtttt ctgtataaaa atatgtgt aaatcatcg agtttcaatg atgtttaaagg
5401 agataaaaggg tgaagccatg gcaacatata gatttaggtt atgttggaaa tgccacgtt
5461 ctggaaaggc cggggccgg acggcccttg ctccgggtt tgccgttta tgggaaacc
5521 acacacactt gggaaactttt attagggatg atgttggaaatc tttttttttt ctggggatgg
5581 tgggcagttt aaaaaaaagggtt gotttttttt tgccatgtt tggtttttttt tggttttttt
5641 gtatggatcc ttgtatccc ttttttttttt tggtttttttt tggtttttttt aacttttttt
5701 cactcgatgg ttggggccgtt gggtttttttt ctttttttttt ttccgttccca accaaaggcc
5761 cgtttttttttt ggtttttttt ctgtttttttt aatcttggttt tggtttttttt ccgttttttt
5821 agggacatgtt tggggaggaa caagagccaa agggggatgg taggtttttttt tggttttttt
5881 aaaaaaaaggc agacccatttt ttccatggcc ttttttttttt ccacgttcccc ttttttttt
5941 catggggaaa gggaaatggtta accaggccaa ttgtttttttt ccacgttcccc caagggatcc
6001 ctgtttttttt tttttttttt ttgg
6061 gg
6121 ctatccatgtt gaaatttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
6181 ctgtttttttt tggtttttttt ttccatggat tttttttttt tttttttttt tttttttttt
6241 gtccaaaaaaa gaaaaaaatctc ttgtttttttt ttccatggat tttttttttt tttttttttt
6301 ttgtttttttt ttccatggat tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
6361 aataaaggccat tttttttttt ttccatggat tttttttttt tttttttttt tttttttttt
6421 coogaaggccat atacttgtcc ttgtttttttt ttccatggat tttttttttt tttttttttt
6481 ttgg
6541 ttttttttttt tggtttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
6601 ttgtttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
6661 ctgtttttttt caaaaaaaatgtt ctgtttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
6721 atttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
6781 ttgtttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
6841 taatccatggaa atatctttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
6901 ttatccatggaa atatctttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
6961 agttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7021 atttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7081 gggggacatgtt ctgtatggaa ctggccaaatgg atttttttttt tttttttttt tttttttttt
7141 gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7201 cagttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7261 ttgtttttttt taatccatggaa accacatata gttttttttt tttttttttt tttttttttt
7321 cagggatgtt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7381 ttttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7441 agacatcaatc cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7501 atttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7561 agaaacatata gggaaaggaaat gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7621 aaaaacatata gggaaaggaaaat gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7681 ctttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7741 ctgtttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7801 ttgtttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7861 ttatccatggaa atatctttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
7921 ttatccatggaa atatctttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt

Fig. 63C

【図 6 3 D】

7921 taccatccc cccatgttgc tggtggcctt atccatcgat ttgttgtata caacttcgtgt
7921 atccccccg aataattatgg atgtgtttcc agacttttg aaccactaga ccatacatgt
8041 ttgtttttgg ggaaggccaa tgatgttta gcattttttgg caggggttga tgbtgtttta
8101 atgggggttg gtgtccggcc ttatgttgcg ctatccatgt tgbtgtttcc accatccat
8161 cccgtggggg cacaatccct gtgtccatag caaaaatgttcc gacccatcca gaccagag
8221 ttgtttccatc ttgtatccctt ccaggtttgg ttgtatccatgt atgtatccat atccatgttgc
8221 ttcccaacatc ttatgttggg cttatccatgg cttaaaaacat ttgtccatgaa catgtatgg
8341 ttatgtatgg gatggggggc agggaaatcc tttgttccatgg cagctgtggaa tggtttactgg
8041 tggaaaggat gttagaaatgt ttgttttttttcc acttatatac gacactataa ttggaggtac
8451 attttatggat taaaaaaaaaa gcaatgttcc gttaggtttcc aatccccccccc ttgttgtatgg
8521 aaaatggatcc attttatataa ttggatgtttcc agttatgtttcc atgtttttcc tcacatgt
8581 ttcttttttttcc ttatgtatgg atccatccatgt ttgtttttcc ttatccatgttcc
8641 ccggatcttcc ttatgtatggat tttttttttttcc gacccatgttcc cccggatgttcc
8641 atgcacggcc ttccatccatgt acgttgcata gaaatgttcc cccggatgttcc
8671 atgcacggcc ttccatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
8761 ccgtccccc ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc gagacacac
8221 ccggatcttcc ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
8881 ttgtatggac ctggatggatcc gttttttttcc ttatccatgttcc cttatccatgt
9001 ccggatccccc ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
9001 ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
9061 ctggccggcc ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
9121 ggaaacacaa cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
9181 ttgtttttgggg agccatccagg atttatccatgt ttgtatggat ttgtttttgggg
9241 aacgaacatctt ataaatgttgc ttgtttttgggg
9301 gtatccatgttcc gatttatccatgt ttgtatggat ttgtttttgggg
9361 ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
9421 ttggagggttcc cggasacccggc ttatgtatggat ttgtttttgggg
9481 ctccatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
9541 cttatccatgttcc cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
9601 ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
9661 ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
9721 ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
9781 agttaagggg atccatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
9841 ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
9901 tggacccatccatgttcc ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
9961 ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
10021 ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
10081 tggatccatgttcc ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
10141 ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
10201 gaaccttccgtt cttatccatgttcc acgttgcata gaaatgttcc
10261 ttatgtatggat cttatccatgttcc acgttgcata gaaatgttcc
10321 ttatgtatggat cttatccatgttcc acgttgcata gaaatgttcc
10381 agggatgttcc ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
10441 ggatgttcc ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc
10501 sagatgttcc ttatgtatggat cttatccatgt acgttgcata gaaatgttcc

Fig. 63D

【図 6.3 E】

Fig. 63E

【図 6.3 F】

Fig. 63E

【図 63G】

15841 gatcgaatcat gatgtttttt aaataagaago ttcccacaa catttccaa cactgtcata
 15901 gtgtatgtat cgttggggg tttaaccttgc ctatgttatot tgcgtgggtg agaaatgtt
 15951 agttccgtt tgatctttt ttgttgcgt ctctttttc tgcgttgatc aaatatttt
 16021 goagtcgtt actaacatata taactatcc ttgtttggaa acctttggatc atctttccat
 16081 ggtttccctt cgtggccctt cgtgttccat caggagacg acccggtata ttgttacaca
 16141 ttgttcgtt attttccatc actacagaa catcaagtg cccccccagctt atttgggtt
 16201 ttgttcgtt taatccatc ttgttgcata accgttgcgaa acctttgttgc aaggcatc
 16261 atgtttgtgc taaaggcgctt gtatgttgc caggagaa aaaaaggaa gaaaatgg
 16321 tggccgttgg tggagggggaa aaggaggatc gcaatttccg gtcaactaca cagcttcc
 16381 taaaatccctt cafcgttgc ttccacccgaa tocttccattt aacttggccaa aagtggaa
 16441 atatgcagg cggaccactt ctcgttgc ttccacccgaa ccttgttgcgaa coogataat
 16501 caatacaggat cggacggat gacatgttgc gacatgttgc cttgttgc
 16561 gaatggaaat cacaatgggtt gacccgttgc ttgttgcgtt gtttttttt
 16621 atttggccctt tggtttttt aatggatgtt cttgttgcgtt gttttttt
 16681 tccatattttt atttttttt atttttttt atttttttt
 16741 ctatgtttttt atttttttt atttttttt atttttttt
 16801 gtgtatgtatc gatgtttttt ttgttgcgtt cttgttgcgtt
 16861 ttccggatgtt cttagtgcactt cggccgttgc caccatccgcg aactgttgc
 16921 attagacggc ggttttttccat ttgttgcgtt accttgcgttgc ttgttgc
 16981 accccgcctt gcttcccaa cttgttgcgtt gttttttt
 17041 taatggatcc ttgttgcgtt atttttttt atttttttt
 17101 tagatgttgc ttgttgcgtt atttttttt atttttttt
 17161 aatgttgcata gatgttgcgtt atttttttt aatggatggaa aacttgggg
 17221 aatgttgcata gatgttgcgtt atttttttt atttttttt
 17281 tcgttgcgtt ttgttgcgtt atttttttt atttttttt
 17341 atatgttgc ttcaacggaa gggccatgttgc ttgttgcgtt
 17401 agccatgttgc ttgttgcgtt atttttttt atttttttt
 17461 ttccacggaa gggcccttgc ttgttgcgtt ccacccacaa cccatgttgc
 17521 ttgttgcgtt gggatgttgc ttgttgcgtt gggatgttgc
 17581 tagttagagat cttgttgcgtt cttgttgcgtt gttttttt
 17641 octgttgcgtt acatgttgc ttgttgcgtt
 17701 cagatgttgc ttgttgcgtt cttgttgcgtt
 17761 macagccctt cccatgttgc ttgttgcgtt
 17821 ttgttgcgtt gggatgttgc ttgttgcgtt
 17881 gaatggatgttgc ttgttgcgtt
 17941 ttcaacggaa agatgttgc ttgttgcgtt
 18001 tagatgttgc ttgttgcgtt
 18061 aatataaaaccc cttatccatc
 18121 gggatgttgc ttgttgcgtt
 18181 ttgttgcgtt gttttttt
 18241 acacatgttgc ttgttgcgtt
 18301 gaagggttgc acatgttgc ttgttgcgtt
 18361 tsoggaoacca ctgttgcgtt
 18421 getcaatgttgc ttgttgcgtt
 18421 getcaatgttgc ttgttgcgtt
 18421 getcaatgttgc ttgttgcgtt

Fig. 63G

【図 63H】

18481 ttggggaaaaaaa aatgttgcgtt tccaaatgttgc gtgggttataa ttgttgcgtt tgcaatgttgc
 18541 actgttgcgtt gtttttttccat gggggccctt tccatgttgc ctatgttgc
 18601 ttccatgttgc ttgttgcgtt gtttttttccat gtttttttccat
 18661 tggggccctt gacatgttgc
 18721 ttgttgcgtt ttgttgcgtt gtttttttccat gtttttttccat
 18781 ctgttgcgtt ttgttgcgtt gtttttttccat gtttttttccat
 1884 ctgttgcgtt gggatgttgc ttgttgcgtt gggatgttgc
 18901 ctgttgcgtt ttgttgcgtt gtttttttccat gtttttttccat
 18961 atgttgcgtt atgttgcgtt
 19021 atatgttgc ttgttgcgtt
 19081 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 19141 atatgttgc ttgttgcgtt
 19201 atatgttgc ttgttgcgtt
 19261 gaatggatgttgc ttgttgcgtt
 19321 ggccggatgttgc ttgttgcgtt
 19381 taatgttgc ttgttgcgtt
 19441 aatgttgc ttgttgcgtt
 19501 ctgttgcgtt gtttttttccat gtttttttccat
 19561 ttccatgttgc ttgttgcgtt
 19621 tagttagatgttgc ttgttgcgtt
 19681 agccatgttgc ttgttgcgtt
 19741 atatgttgc ttgttgcgtt
 19801 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 19861 ctgttgcgtt gtttttttccat gtttttttccat
 19921 ttccatgttgc ttgttgcgtt
 19981 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 20041 ggaaatgttgc ttgttgcgtt
 20101 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 20161 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 20221 ggaaatgttgc ttgttgcgtt
 20281 gggttgcgtt ttgttgcgtt
 20341 tgccatgttgc ttgttgcgtt
 20401 aggttgcgtt ttgttgcgtt
 20461 taatgttgc ttgttgcgtt
 20521 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 20581 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 20641 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 20701 totacagacca acatgttgc
 20761 tggtttgttgc ttgttgcgtt
 20821 aatataatccat ttgttgcgtt
 20881 tggatgttgc ttgttgcgtt
 20941 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 21001 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 21061 ttgttgcgtt ttgttgcgtt

Fig. 63H

【図 63I】

21121 aatataatccat ttgttgcgtt
 21181 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 21241 aaaaagggttgc ttgttgcgtt
 21301 taatgttgc ttgttgcgtt
 21361 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 21421 ttccatgttgc ttgttgcgtt
 21481 aggttgcgtt ttgttgcgtt
 21541 gtttttttccat gtttttttccat
 21601 ggccggatgttgc ttgttgcgtt
 21661 caccatgttgc ttgttgcgtt
 21721 taatgttgc ttgttgcgtt
 21781 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 21841 aatgttgc ttgttgcgtt
 21901 aacatgttgc ttgttgcgtt
 21961 aacatgttgc ttgttgcgtt
 22021 taatgttgc ttgttgcgtt
 22081 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 22141 aatgttgc ttgttgcgtt
 22201 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 22261 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 22321 taggttgcgtt ttgttgcgtt
 22381 aatataatccat ttgttgcgtt
 22441 aacatgttgc ttgttgcgtt
 22501 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 22561 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 22621 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 22681 tggcccccctt ttgttgcgtt
 22741 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 22801 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 22861 cttatccatc ttgttgcgtt
 22921 caccatgttgc ttgttgcgtt
 22981 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 23041 taatgttgc ttgttgcgtt
 23101 aacatgttgc ttgttgcgtt
 23161 atatgttgc ttgttgcgtt
 23221 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 23281 ctactatgttgc ttgttgcgtt
 23341 aatgttgc ttgttgcgtt
 23401 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 23461 gactgttgc ttgttgcgtt
 23521 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 23581 atgttgcgtt ttgttgcgtt
 23641 ggccggatgttgc ttgttgcgtt
 23701 atccatgttgc ttgttgcgtt
 23761 ctgttgcgtt ttgttgcgtt

Fig. 63I

【図 63J】

23821 gtttttttccat gtttttttccat
 23881 agtataatccat ttgttgcgtt
 23941 agatgttgc ttgttgcgtt
 24001 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 24061 aatgttgc ttgttgcgtt
 24121 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 24181 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 24241 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 24301 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 24361 gtttttttccat gtttttttccat
 24421 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 24481 gtttttttccat gtttttttccat
 24541 gggatgttgc ttgttgcgtt
 24601 aacatgttgc ttgttgcgtt
 24661 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 24721 aatataatccat ttgttgcgtt
 24781 gtttttttccat gtttttttccat
 24841 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 24901 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 24961 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 25021 aatataatccat ttgttgcgtt
 25081 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 25141 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 25201 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 25261 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 25321 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 25381 aatataatccat ttgttgcgtt
 25441 aacatgttgc ttgttgcgtt
 25501 agttgttgc ttgttgcgtt
 25561 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 25621 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 25681 aatataatccat ttgttgcgtt
 25741 ttgttgcgtt ttgttgcgtt
 25801 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 25861 acatgttgc ttgttgcgtt
 25921 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 25981 aatataatccat ttgttgcgtt
 26041 aacatgttgc ttgttgcgtt
 26101 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 26161 aatataatccat ttgttgcgtt
 26221 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 26281 ctgttgcgtt ttgttgcgtt
 26341 ttgttgcgtt ttgttgcgtt

Fig. 63J

【図63K】

26401 gtttatttgg gatattaaatg tattttcaat ttaatgtatg tttcgactt ctttgtgttt
 26461 atcaagatc agacatagc cccaccaatg ttatggaga ttctgtatg gtttttttt
 26521 ttgtttaga attcactttt tcaatgtacc tatttcgtatg attagccctg ggccatgtt
 26581 gcataatgt attcctcaat ctcaatgtaa tgcaatgtg gatgttattt ggccatgtgg
 26641 ttctggagaga cttttttttt attatgttca gatctttatg tcgtttaaaa atagatgtc
 26701 taatttacat aacatctatg tattttttt tttgtttttt atgtttttt atgttcatg
 26761 aaataactgt ttgttttttgc ctatitcca agggaaatgt ttgttttttgc ttatcaatg
 26821 ctccatgtga taatggaaa gctttttttt gtgtttagtca ttatcgta gatgtttttt
 26881 tgcaatgtt ttgtgttgc ttgttttttgc ttatggagg cgacaccacg agctgtatg
 26941 gtcaatgtt ttgtgttgc gaccccttgc aacatgttgc ttatggagg ttctgtggc
 27001 ttgttattat accttgcat aaaaatccg aaaaatccc acaaaggatg ttctgttca
 27061 ctaccaatgc ctatgtgtc agatgtgtt gaaaaatgt tgccatgttgc ttatcaatc
 27121 tcaccaatgc agatgtatc ctatgtgtc tagacaaga aacatctatg ataaagggc
 27181 ctccatgtat gtttttttttgc ttatgttgc gatctttatg gatataatgt agatgtatc
 27241 ctatgttgc ctatgtgtc agatgtatc ttcaatgttca agggaaatgt ttatggatgc
 27301 ttgttgcattt accctgtttt gtcaatgttca ttcttttttgc ttatggatgc
 27361 ctccatgttca ttgttgcattt agggatcttca aacatgttca gatgttgc ttatggatc
 27421 ggccttgcattt ttgttgcattt ttatttttttt ttatggatgc
 27481 ttatggatcaat cttatgttca ttgttgcattt ttatggatgc ttatggatc
 27541 otaatggatcaat cttatgttca ttgttgcattt ttatggatgc ttatggatc
 27601 aaagaaatca agcagaaatgc ttatgttca ttgttgcattt ttatggatgc
 27661 ttcttttttttgc ttatgttgc ttgttgcattt ttatggatgc ttatggatc
 27721 taatgtatc ttgttgcattt ttatggatgc ttatggatgc ttatggatc
 27781 taatgtatc ttgttgcattt ttatggatgc ttatggatgc ttatggatc
 27841 taatgtatc ttatggatgc ttatggatgc ttatggatgc ttatggatc
 27901 taatgtatc ttgttgcattt ttatggatgc ttatggatgc ttatggatc
 27961 gggatgtttt ttgttgcattt ttatggatgc ttatggatgc ttatggatc
 28021 taatgtatc ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28081 ttgttgcattt gggatgtttt gggatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28141 aacatgtatc ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28201 ctgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28261 tgacagatcc ttgttgcattt ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28321 ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatgc ttatggatc
 28381 aggttgcattt ttgttgcattt ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28441 gggatgtttt ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28501 taatgtatc ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28561 ttgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28621 ttgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28681 agacagggg gggatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28741 ctgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28801 aatgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28861 ttgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28921 ggttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 28981 ttccatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc
 29041 tacatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatggatgc ttatggatc

Fig. 63K

【図63L】

29101 ggctctcggy tatatggatgc ttacatgttgc gggatgttgc ttccatgttgc ctctgtgtt
 29161 aaaaatggatgc agtctgttgc gacccatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 29221 atcatgtatc caaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 29281 aaaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 29341 tataatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 29401 cttaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 29461 aaaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 29521 cttaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 29581 gggatgtttt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 29641 tagatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 29701 cagtgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 29761 ggttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 29821 agtaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 29881 cacatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 29941 ggttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30001 ttgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30061 gggatgtttt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30121 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30181 ttgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30241 aaaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30301 ctatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30361 ctatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30421 ttgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30481 gggatgtttt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30541 attagatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30601 ctatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30661 ttgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30721 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30781 agatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30841 ctatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30901 atgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 30961 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31021 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31081 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31141 tacatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31201 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31261 aaaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31321 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31381 agtggatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31441 atgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31501 agtggatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31561 gtatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31621 gactgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31681 aggttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31741 tataatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc

Fig. 63L

【図63M】

31801 agaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31861 actgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31921 aaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 31981 aatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32041 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32101 gtatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32161 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32221 aacatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32281 gggatgtttt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32341 atgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32401 tagatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32461 tagatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32521 atgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32581 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32641 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32701 gaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32761 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32821 aatgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32881 atgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 32941 ctgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33001 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33061 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33121 gaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33181 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33241 ctgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33301 ctgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33361 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33421 ctgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33481 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33541 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33601 gatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33661 gaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33721 gaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33781 gaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33841 aacatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33901 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 33961 atgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34021 aatgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34081 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34141 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34201 gtaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34261 gaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34321 gaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34381 gaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34441 ctgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc

Fig. 63M

【図63N】

34501 ctctgtgtt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34561 agtggatgttca aatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34621 acaatgttca aatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34681 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34741 ctatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34801 tgatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34861 agtggatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34921 gatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 34981 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35041 aactatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35101 sagatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35161 gaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35221 gactgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35281 acatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35341 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35401 atgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35461 tgatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35521 agatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35581 aatgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35641 tgatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35701 ctatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35761 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35821 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35881 tgatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 35941 atcaatgttca aatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36001 ctatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36061 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36121 ccattatgttca aatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36181 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36241 gatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36301 gaaatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36361 catgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36421 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36481 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36541 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36601 gttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36661 aatgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36721 aatgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36781 ctatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36841 aatgttgcattt ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36901 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 36961 ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 37021 agtttgatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 37081 gatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc
 37141 ctatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc ttatgttgc

Fig. 63N

【図630】

Fig. 630

【図63P】

Fig. 63P

【図 630】

Fig. 630

【図 6.4.A】

Fig. 64A

【図 64B】

2641 tggcaattaa gtggcccaa tgctcagcgc ttaaaaaac aaatggada gotacttctg
 2701 gggaaaaaac catcattcca aaaagacaa taatgagac aaatgcaaa ataaaaaagt
 2761 cctccyaaag catctcaggg aaccgtacg taggaatgac gagccccccc gagaggaaag
 2821 cogatgtac tgcatatat atttaacaaat gacaaggatgt tcggcggtt attttctgg
 2881 tgggttttcc otgccttaa gggtcgaaat gtttcttaga atccagggg tcacactgg
 2941 ggcttcagggt gaegetttag ctgttggtcc ctccctctgg ccocccccc accccctccc
 3001 ttctggggaa caagaaatgtt aaacggaaa ctactctttt atgtgtatg caaaaatagac
 3061 atctttaaata tagtcttgtt actatgtttt cactttgtt tttttttttt aaaaaaaaa
 3121 aaatgttagc acgacattt aaggbcgtt gacccgttggt gttttttttt aaaaaaaaa
 3181 tggcacagaa atatgtatcc ttatattttttt gaaacctggaa atttatgttgc tccaaatgtc
 3241 ttgttgtgtatgttggatgttggatgttggatgttggatgttggatgttggatgttggatgtt
 3301 ctacaatata tattttatata atctatata tatttttttttggatgttggatgttggatgttgg
 3361 gccccccatc atatgtatcc tt
 3421 aagatgtttt ttt
 3481 gaaaaatggg aataatgttgc atttttatgttgc atttttatgttgc atttttatgttgc
 3541 gtt
 3601 ccaatgttt
 3661 aactgttt
 3721 tatgtatgttgc ctctgttt
 3781 ttt
 3841 ttt
 3901 taatgtatcc aatgttt
 3961 attt
 4021 aatgttt
 4081 ttt
 4141 ttt
 4201 attt
 4261 cacatctgtt ttt
 4321 aaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaa

Fig.64B

【図 65】

EphB4 Precursor Protein

1 melrvllcwa slaaaleestl lntkletadl kwvtfpqvdg qweelsglde eqhsvrtyev
 61 cdvgrapqga hwrtwgwpv rgravhyatl rftmleclsl prgrscket ftvfyeesda
 121 dtataltpaw mnpypikvdw vktirliplis kafylafqld
 181 ggacmali1 blylkkaql vsltrfrpet vpxelvvpva gscvvvavpva ppapaplycr
 241 edgqwaegpv tgcsapfie aaeenmkora caagcifkpls gegscpcpc nshantigss
 301 vcgcrvgyfr artdpqrspc ttipspapsrv vsrlngsslh lewasaples gradlyalr
 361 crecrpgss apggdltfd pppcdlvepe vvvrlrpdf tytfewtalaq vqsslatgpy
 421 pfepvnvttd revppasdi rvtrspsl slawavprap sgavlydevk ybkgaaeps
 481 svrlfiktsen raelrlgkrg asylvlyqvar seaygypfgg ehhsqtqlde segwreqal
 541 lagtvavgvv lvivvivvav lclrkqmgns eaeysdkhgg yliiaghqkv yidpftyedpn
 601 eavrefakel dvyvylkeev iigagegfgevc sgrlkapkk escvalikit ggyterqre
 661 flesasimqq fhpnuiirle gvtvttmvpva ilsfleenes dptyttsig
 721 lxglasgnry laempsyhrl laarnilnva nlvcvksdfy luxfleenes dptyttsig
 781 kiprlvtape aiafkrttsa sdawsyivina wevmfgerp ywdmangdvi naieddylp
 841 ppdcptalh qlmldcwqkd nrarprfpv vsaldkmirn paalkivare nggashpld
 901 qrpqphssfg svgewlraik mgryeefaa agfgsfelvs qisaedllri gvtlaghqkk
 961 ilasvqhmkas qakpgtpggt

Fig.65

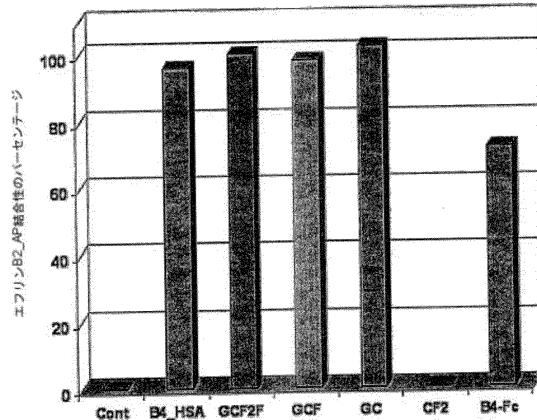
【図 66】

EphrinB2

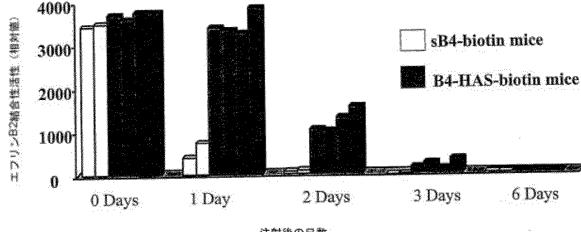
1 mavrrdsavwk ycgvlmlvc rtaisksivl epiywnssns kflpgggivl ypqigdkldi
 61 icpkvdkskv yqeyvkywm vdkiqadret ikkantpln cakpdqdkif tikfgekspn
 121 lwglefqkak dyiyisteng slegldnqeg gvcvtramki lmkygdass agsttrnkdpt
 181 rrpeleaqtn grsatspsfv kpmgsatdg nsagbagnmi lgsevalfag iaegciifiv
 241 iiitivvilll kyrrzhrkhs pqhettls1 tlatpkrsgn nngsepsdii iplrtadsvf
 301 cphyekvsgd yghpyiyvgw mppqspaniy ykv

Fig.66

【図 67】



【図 68】



【図 69】

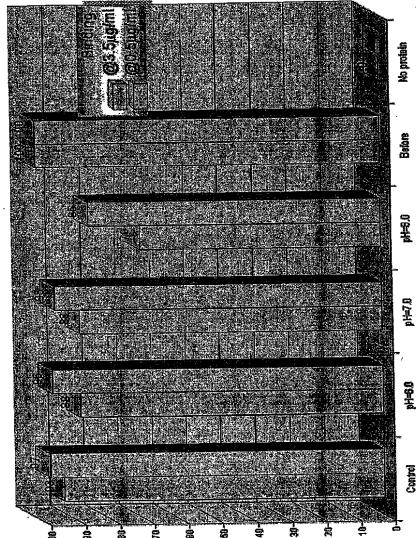
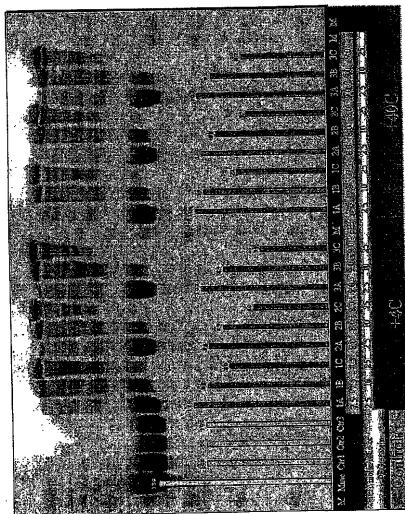
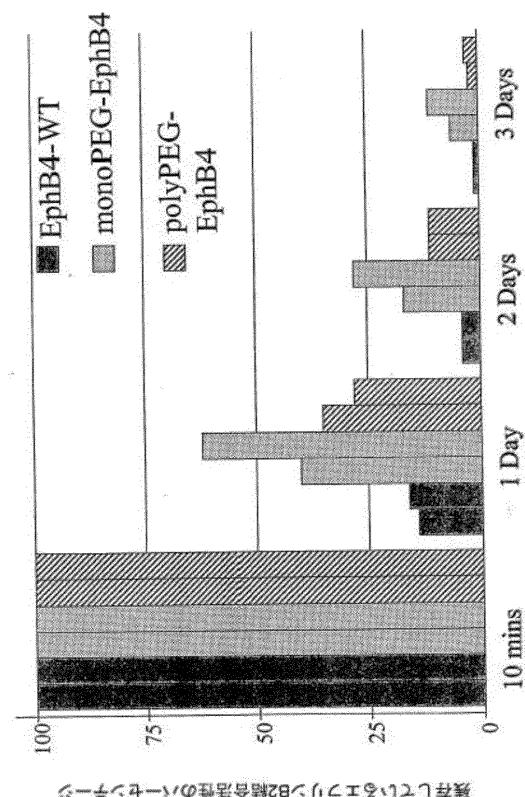


Fig.69

【図 7 0】



【図74】



【配列表】

0005219513000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
- | | | |
|---------------|-----------|---------------|
| A 6 1 P 35/00 | (2006.01) | A 6 1 P 35/00 |
| A 6 1 P 35/02 | (2006.01) | A 6 1 P 35/02 |
| A 6 1 P 35/04 | (2006.01) | A 6 1 P 35/04 |
| A 6 1 P 9/00 | (2006.01) | A 6 1 P 9/00 |
- (72)発明者 バレリー クラスノペロフ
アメリカ合衆国 91030 カリフォルニア、サウス パサディナ、アンバーウッド ドライブ
1699、ナンバー-112
- (72)発明者 セルゲイ ゾズリア
アメリカ合衆国 92129 カリフォルニア、サン デイエゴ、ヤズー ストリート 1448
1
- (72)発明者 ナタリー ケルテズ
アメリカ合衆国 91301 カリフォルニア、カラバサス、ロスト ヒルズ ロード 4240
、アパートメント1603
- (72)発明者 ラマチャンドラ レディ
アメリカ合衆国 77584 テキサス、ピアーランド、タイデンハーフェン コート 1140
8
- (72)発明者 パルカシュ ギル
アメリカ合衆国 91301 カリフォルニア、アグーラヒルズ、クレストハーフェン セントラ
ル 29420

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 特開2003-530871(JP, A)
米国特許第05635177(US, A)
国際公開第99/052541(WO, A1)
国際公開第02/026827(WO, A1)
国際公開第04/020468(WO, A1)
特表2002-505338(JP, A)
特開平04-218000(JP, A)
HE S, IOVS, 2004年 4月, V45 N.SUPPL 1, P.U804
PNAS, 2004年 4月13日, Vol.101, p.5583-5588
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004年 9月 6日, Vol.14, p.4395-4398

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 07 K 19 / 00
C 07 K 14 / 47
C 07 K 14 / 765
CA / BIOSIS / MEDLINE / WPIDS (STN)
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamII)