

(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 I

C O 7 K 19/00 (2006. 01)

C O 7 K 19/00

C O 7 K 14/47 (2006. 01)

C O 7 K 14/47 Z N A

C O 7 K 14/765 (2006. 01)

C O 7 K 14/765

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 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) 国際出願番号 PCT/US2005/034176
 (87) 国際公開番号 W02006/034455
 (87) 国際公開日 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ペンシルベニア
 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、カポジ肉腫、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蛋白質のフィブロネクチンタイプ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。

【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】

【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GRESSION、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】

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。

【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

10

20

30

40

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。

【0006】

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十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)、第一のフィブロネクチンタイプ3領域(図65のアミノ酸324-429, SEQ ID NO:10)及び第二のフィブロネクチンタイプ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ドとしては図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ッ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ッ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变化又は欠失であり、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。

10

【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 - 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 - 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。

20

【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】

30

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】

40

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

50

。好ましい実施形態においては、EphB4 - H S A 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。

【 0 0 1 3 】

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十分な膜貫通領域の部分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效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 6 6 (SEQ ID NO:11) により特定されるアミノ酸配列の残基 1 ~ 2 2 5 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、H E K 2 9 3 T 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、単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 6 6 (SEQ ID NO:11) に示す配列の最初の 2 6 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 6 6 (SEQ ID NO:11) のアミノ酸 1 - 2 2 5 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 6 6 のSEQ ID NO:11に対応) : 2 6 - 2 2 5 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。

【 0 0 1 4 】

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。

【 0 0 1 5 】

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。

【 0 0 1 6 】

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十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 P E G 化、血清アル

10

20

30

40

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。

随意的に、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。

【 0 0 1 7 】

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 :

(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。

随意的に、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。随意的に、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投与してもよい。

【 0 0 1 8 】

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十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。

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。

【 0 0 1 9 】

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。

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、慢性関節リウマチ及び乾癬、眼性血管形成病、オスラーウェバー症候群、心筋性血管形成、ブランク新生血管形成、毛細血管拡張症、

10

20

30

40

50

血友病性関節、繊維血管腫、毛細血管拡張乾癬強皮症、化膿性肉芽腫、ルペオース、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。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。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ことを見出した。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蛋白質のフィブロネクチンタイプ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

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に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】

【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ブ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。

【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ブサイト<http://www.eph-nomenclature.com>でアクセスできる。

【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）リンケ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EphA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EphB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。

【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。それらはそ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、EphA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EphB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、その次に一對のフィブロネクチンタイプIII

10

20

30

40

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 -モチーフ（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。

【 0 0 2 9 】

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、Binns KS、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 B s 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; Berciaz G、1996）。

【 0 0 3 0 】

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。

【 0 0 3 1 】

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。

【 0 0 3 2 】

40

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。

【 0 0 3 3 】

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（組み換え的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ッ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。

【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ッシングを受けた形態である。

【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パリンと、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。

【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もある。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。

【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ヘライゲートされる。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回クリーブ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) Science198: 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 USA89:2429-2433; Devlinら、(1990) Science、249:404-406; Cwirlaら、(1990) PNAS USA87:6378-6382; 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) Biochemistry33: 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) Biochemistry30:10832-10838; 及びCunninghamら、(1989) Science244:1081-1085); リンカースキャニング突然変異誘発 (Gustinら、(1993) Virology193:653-660; Brownら、(1992) Mol. Cell Biol.12:2644-2652; McKnightら、(1982) Science232:316); 飽和突然変異誘発 (Meyersら、(1986) Science232:613); 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10000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、多糖若しくは単糖、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ズ的性質、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、ポリエチレングリコール (“PEG”)、ポリプロピレングリコール、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) によってエチレングリコール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グリコール分子を包含するように広く使用され、次式:

$$X-O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH \quad (1)$$
 (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。

【 0 0 4 6 】

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。

10

【 0 0 4 7 】

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(エチレングリコール)基に共有結合し、ポリ(エチレングリコール)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-アミノ基が利用可能な(遊離)アミノ基である。

20

【 0 0 4 8 】

上記共役体はより具体的には次式(II)： $P-NHCO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$ (II)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(II)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”の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、免疫原性及びその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。

30

【 0 0 4 9 】

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))。

40

【 0 0 5 0 】

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)。

【 0 0 5 1 】

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。別の一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役させ、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と共役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ネート又は分枝状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】

別の一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、又はループ領域中で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】

別の一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WO94/01451に開示されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

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。

【 0 0 5 8 】

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単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単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。

【 0 0 5 9 】

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とすることができる。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）。

【 0 0 6 0 】

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。

【 0 0 6 1 】

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。

【 0 0 6 2 】

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：ゲル濾過）及びイオン交換クロマトグラフィーを使用することで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。

【 0 0 6 3 】

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、

随意的に約 10,000 Da ~ 36,000 Da 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、450 mM 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含む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。斯界で周知のそ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 F L A G、インフルエンザウイルスヘマグルチニン（H A）、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 やトロンピ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。

【 0 0 7 0 】

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。

【 0 0 7 1 】

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変領域は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変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変領域、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。

【 0 0 7 2 】

一実施形態においては、重鎖不変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変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変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。

【 0 0 7 3 】

更に、免疫グロブリン重鎖不変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。

【 0 0 7 4 】

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

、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（1-387）、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： R_1-L-R_2 ; R_2-L-R_1 ; $R_1-L-R_2-L-R_1$; 又は $R_2-L-R_1-L-R_2$; R_1-R_2 ; R_2-R_1 ; $R_1-R_2-R_1$; 又は $R_2-R_1-R_2$ の何れを有することもできる。ここで、 R_1 は可溶性ポリペプチドの配列であり、 R_2 はHSAであり、Lはペプチドリナーの配列である。

【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十分な距離だけ、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HAS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 HAS のリンカーとして有用なアミノ酸配列には、限定的ではないが、 $(Ser Gly)_y$ (式中、 y は 8 以上) 又は $Gly_4 Ser Gly_5 Ser$ が挙げられる。好ましいリンカー配列は $(Ser Gly)_4$ の式を有する。別の好ましいリンカーは $((Ser - Ser - Ser - Ser - Gly)_3 - Ser - Pro)$ 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 蛋白質はリンカー配列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。

【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、HAS 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的に生産してもよい(同様に下記参照)。

【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。

【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することが容易に理解できる。例えば、 $6.0 \times$ 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC) 約 45 でハイブリダイゼーションを行い、次に $2.0 \times$ SSC で 50 で洗浄してもよい。例えば、洗浄ステップ中の塩濃度は約 $2.0 \times$ SSC で 50 の低い緊縮から約 $0.2 \times$ SSC の 50 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 $6 \times$ SSC 室温での低い緊縮条件下

10

20

30

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が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、発現に使用される宿主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、種々の宿主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。

【 0 0 8 9 】

20

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宿主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む。選択可能なマーカー遺伝子は当分野で公知であり、使用される宿主細胞に応じて変化できる。

【 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む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む。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、アデノウイルス又はサイトメガロウイルス直前プロモーター、l 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、形質変換される宿主細胞、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。

30

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宿主細胞に関する。宿主細胞は、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。他の適切な宿主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宿主細胞は、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。細胞培養物は宿主細胞、培地及び他の副成分を含む。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、蛋白質精製の公知技術を使用して、細胞培養培地、宿主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、pBR322由来プラスミド、pEMBL由来プラスミド、pEX由来プラスミド、pBTac由来プラスミド及びpUC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。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo及びpHyg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pBR322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、ウシバピローマウィルス（BPV-1）、又はエプスタイン-バーウィルス（pHEBo、pREP由来及びp205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宿主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SLC5A8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、pVL由来ベクター（pVL1392、pVL1393及びpVL941等）、pAcUW由来ベクター（pAcUW1等）、並びにpBlueBacIII含有（-gal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ブラントエンド末端又は相補末端（stagger-ended）の採用、適切な

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、ペプチド、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、例えばライブ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。これらのライブラリーとして、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。

【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。

【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。

【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できる。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以上のリンカー分子を介してでもよい。

【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

10

20

30

40

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に作成できる。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、適切な発現用宿主細胞中へ導入できる。宿主細胞は破壊され、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、又は後に随時行っても良い。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

40

【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

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、トラコーマ、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；慢性間接リウマチ及び乾癬；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、新血管の緑内障、後水晶体繊維増殖症、ルベオシス；オスラーウェバー症候群；心筋性血管形成；プラーク新生血管形成；毛細血管拡張症；血友病性関節；繊維血管腫；毛細血管拡張乾癬強皮症、化膿性肉芽腫、ルベオシス、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、又は白血病又は骨髓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せられた場合に、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、ピカルタミド、プレオマイシン、ブセレリン、ブスルファン、カンプトセシン (camptothecin)、カペシタビン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、クロドロネート、コルヒチン、シクロホスファミド、シプロテロン、シタラビン、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、ゲムシタビン、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、メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート、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、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、ボルフィマー、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、トラスツツマブ、トレチノイン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン及びビノレルビン。

【 0 1 1 0 】

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、カペシタビン、ゲムシタビン及びシタラビン) 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 (メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン及び 2 -クロロデオキシシアデノシン (クラドリピン)) 等の代謝拮抗物質 / 抗癌試薬；ピンカアルカロイド (ビンブラスチン、ピ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)、ピンクリスチン、ビンブラスチン、ノコダゾール、エポチロン及びナベルピ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、プレオマイシン、ブスルファン、カンプトセシン、カルボプラチン、クロラムブシル、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、イフォスファミド、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 (V P 1 6)) 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、プレオマイシン、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；窒素マスタード (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、クロラムブシル)、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)、アルキルスルホネート-ブスルファン、ニトロソウレア類 (カルムスチン (B C N U) 及びアナログ、ストレプトゾシン)、トラゼン-ダカルバジニン (D T I C) 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、ピカルタミド、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

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(シクロスポリン、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、繊維芽細胞増殖因子(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(トラスツズマブ);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)、エピルビシン、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ゼ活性化剤;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(基本的繊維芽細胞増殖因子)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、 γ -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(tropoin)サブユニット、ピトロネクチン_{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naaladase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/又はその後が続けられてもよい。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

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分量は、一般的に治療的効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増量剤；（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レート等の湿潤剤；（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、固形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、テトラヒドロフリルアルコール、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

【 0 1 1 9 】

懸濁液は活性化合物に加え、エトキシ化イソステアリルアルコール、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、アルミニウムメタヒドロオキシド、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。

【 0 1 2 0 】

特に、本発明の方法は、局所的に、（子宮）頸部及び膈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、安定剤及び表面活発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

【 0 1 2 1 】

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、及び必要ないずれかの保存薬、パuffa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

【 0 1 2 2 】

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

【 0 1 2 3 】

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、パuffa、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す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

【 0 1 2 4 】

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。

【 0 1 2 5 】

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、リボ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った。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

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 ~ 1 1)。B 4 E C v 3 及び B 2 E 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 1 2 ~ 1 3)。

【 0 1 3 2 】

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。

【 0 1 3 3 】

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) :

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDE EQHSVRTYEVCEVQRAPGQ AHWLRTG
WVPRRGAVHVYATLRFMTLECLSLPRAG RSKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGEA
TGKV NVKTLRLGPLSKAGFYLAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRE LVVPVAGSCVVDVAPAPGP
SPSLYCREDGQWAEQPVGTGCSCAPGFEAAEGNTKCR ACAQGTFFKPLSGEGSCQPCPANSNTIGSAVCQCRVGYFRAR
TDPGAPCTTPPS AHHHHHH

10

である。

【 0 1 3 4 】

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 1 5 アミノ酸、プロセッ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。

【 0 1 3 5 】

20

GCF 前駆蛋白質の配列 (SEQ ID NO:13) :

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDE EQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGW
VPRRGAVHVYATLRFMTLECLSLPRAG RSKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGEAT
GKV NVKTLRLGPLSKAGFYLAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRE LVVPVAGSCVVDVAPAPGPS
PSLYCREDGQWAEQPVGTGCSCAPGFAEGNTKCRAC AQGTFFKPLSGEGSCQPCPANSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDP
RGAPCTTPPSAPR SVVSRLNGSSLHLEWSAPLESGGREDLTALRCRECRPGGSCAPCGDLTFDPGPR DLVEPWVVV
RGLRPDFTYTFEVTALNGVSSLATGPVPFEPVNVHHHHHH

【 0 1 3 6 】

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 1 5 アミノ酸、プロセッ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。

30

【 0 1 3 7 】

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) :

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDE EQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGW
VPRRGAVHVYATLRFMTLECLSLPRAG RSKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGEAT
GKV NVKTLRLGPLSKAGFYLAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRE LVVPVAGSCVVDVAPAPGPS
PSLYCREDGQWAEQPVGTGCSCAPGFEAAEGNTKCR ACAQGTFFKPLSGEGSCQPCPANSNTIGSAVCQCRVGYFRART
DPRGAPCTTPPS APRSVVSRLNGSSLHLEWSAPLESGGREDLTALRCRECRPGGSCAPCGDLTFDP GPRDLVEPWV
VVRGLRPDFTYTFEVTALNGVSSLATGPVPFEPVNVTTDREVPPAV SDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAPSGAWLDYEVK
YHEKGAEGPSSVRFLKTSENRAE LRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHHSQTQLDESEGWREQGSKRAILQIEG
KPIPNPLLGLDSTRTGHHHHHH

40

【 0 1 3 8 】

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 1 5 アミノ酸、プロセッ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。

【 0 1 3 9 】

EphB4 CF2 蛋白質、先駆体 (SEQ ID NO:15) :

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETQLTVNLTRFPETVPRELVVPVAGS CVVDVAPAPGPSPSLYCREDGQWAEQ
PVTGCSCAPGFEAAEGNTKCRACAQGTFFK PLSGEGSCQPCPANSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAP
RSVVSRL NGSSLHLEWSAPLESGGREDLTALRCRECRPGGSCAPCGDLTFDPGPRDLVEPW VVVRGLRPDFTYTFE

50

VTALNGVSSLATGPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSP SSSLAWAVPRAPSGAWLDYEVKYHEKGAEGPSSVRF
LKTSENRAELRGLKRGAS YLVQVRARSEAGYGPFGQEHSQTQLDESEGWREQGGRSSLEGPRFEGKPIPNPLL GLDS
TRTGHHHHHH

【 0 1 4 0 】

好ましいGCF2蛋白質（GCF2Fともいう）の前駆配列は（SEQ ID NO:16）：

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDEEQHS VRTYEVEVQVRAPGQAHWLRTGW
VPRRGAVHVYATLRFMTLECLSLPRAGRSCK ETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGAEAT
GKVNVT LRLGPLSKAGFYLAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVVPV AGSCVDAVPAPGPS
PSLYCREDGQWAEQVPTGCSCAPGFEAAEGNTKCRACAQG TFKPLSGEGSCQPCPANSNTIGSAVCQCRVGYFRART
DPRGAPCTTPPSAPRSV SRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTALRCRECRPGGSCAPCGDLTFDPGPRDLV EPWV
VVRGLRPDFTYTFEVTALNGVSSLATGPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVT RSSPSSSLAWAVPRAPSGAWLDYEVK
YHEKGAEGPSSVRF LKTSENRAELRGLKR GAS YLVQVRARSEAGYGPFGQEHSQTQLDESEGWREQ

10

【 0 1 4 1 】

プロセッシングを受けた配列は（SEQ ID NO:17）：

LEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDEEQHSVRTYEVEVQVR APGQAHWLRTGWVPRRGAVHVYATLRF
TMLECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESD ADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGAEATGKVNVT LRLGPLSK
AGF YLAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVVPVAGSCVDAVP APGPSPLYCREDGQWAEQP
VTGCSCAPGFEAAEGNTKCRACAQGTFKPLSGEGS CQPCPANSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPR
SWSRLNGSSLHL EWSAPLES GGREDLTALRCRECRPGGSCAPCGDLTFDPGPRDLVEPWVVVRGL RPDFTYTFEVT
ALNGVSSLATGPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSSLA WAVPRAPSGAWLDYEVKYHEKGAEGPSSVRF LK
TSENRAELRGLKRGAS YLVQV RARSEAGYGPFGQEHSQTQLDESEGWREQ

20

【 0 1 4 2 】

生物化学的アッセイ；

A．結合アッセイ：

10 μ l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BB
（20mM Tris-HCl、0.15M NaCl、0.1%ウシ血清アルブミンpH8）中
で希釈した50 μ l表示量のB4ECv3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1.4mlのBBで2回洗浄し、次
に50 μ lのB2-APを使用して最終濃度50nM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量をP
NPP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 μ lのBB中に希釈された異なる量のB4ECv3を、50 μ lの5nM B2E
C-AP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B2EC-
APを膜結合した完全長EphB4を発現するHEK293細胞5000と共に20分間沈降
させた。結合反応を1.2mlのBB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（PNPP）基質を添加して測定した。

40

【 0 1 4 4 】

（細胞ベースの阻害）

B4ECv3を20mM Tris-HCl、0.15M NaCl、0.1%BSA、pH8
中で順に希釈し、膜結合した完全長エフリンB2を発現するHEK293細胞5000と混
合した。インキュベーション1時間後、50 μ lの5nM B4EC-AP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3
0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1.2mlのBBでの
希釈により停止し、遠心分離した。細胞-沈降したAPの比色分析的反応をPNPP基質
で展開した。

50

【 0 1 4 5 】

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) 1 0 μ l のプロテイン A - アガロースをエッペンドルフ型試験管中で、結合バッファ B B (2 0 m M Tris-HCl、0 . 1 5 M NaCl、0 . 1 % B S A、p H 8) 中に希釈した 5 0 μ l の表示量の B 4 E C - F C 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 3 0 分間後、プロテイン A アガロースビーズを 1 . 4 m l の B B で 2 回洗浄し、次に 5 0 μ l の B 2 E C A P 試薬を適用して最終濃度 5 0 n M とした。結合を 3 0 分間振とう台上で行い、次に試験管を遠心分離し、1 . 4 m l の B B で 1 回洗浄した。沈降した A P の比色分析的反応を P N P P の適用後に測定した (図 6) 。

10

【 0 1 4 6 】

(ニトロセルロースベースのアッセイ) B 4 E C - F C を順に 2 0 m M Tris-HCl、0 . 1 5 M NaCl、5 0 μ g / m l B S A、p H 8 中に希釈した。2 μ l 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 3 0 分間ブロックし、次に 5 n M B 2 E C - A 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 4 5 分後、ニトロセルロースを 2 0 m M Tris-HCl、0 . 1 5 M NaCl、5 0 μ g / m l B S A、p H 8 で 2 回洗浄し、アルカリホスファターゼ基質シグマ F a s t (シグマ社製) を適用して色を展開した。

20

【 0 1 4 7 】

D . B 4 E C - F C 阻害アッセイ ;

(溶液中阻害) B 4 E C v 3 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) B 4 E C v 3 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) B 4 E C - F C 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) B 4 E C - F C について記載した上記参照。

【 0 1 4 8 】

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 (H U V E C) ($1 . 5 \times 10^3$) を 1 0 0 μ l の E B M - 2 (Clonetic 社製、番号 C C 3 1 6 2) を含む 9 6 - ウェルプレート中にプレートする。2 4 時間後 (第 0 日)、試験用組み換え型蛋白質 (1 0 0 μ 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) で添加する。第 0 日に、1 のプレートを 2 0 % メタノール中 0 . 5 % クリスタルバイオレットで 1 0 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 7 2 時間 3 7 $^{\circ}$ でインキュベートする。7 2 時間後、プレートを 2 0 % 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 5 4 0 n m で E L I S A リーダー (Dynatech ラボラトリーズ社製) を使用して測定する。第 0 日吸光度を 7 2 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。I C ₅₀ (5 0 % 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

【 0 1 4 9 】

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) (6 0 μ l の 1 0 m g / m l ; Collaborative Lab 社製、番号 3 5 4 2 3) を氷冷 9 6 - 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 1 5 分間放置し、次に 3 7 $^{\circ}$ 3 0 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、H U V E C を E G M - 2 (Clonetic 社製、番号 C C 3 1 6 2) 中に濃度 2×10^5 細胞 / m l で調製する。試験化合物を 2 \times 目的濃度 (5 濃度レベル) で同一の培地中に調製する。細胞 (5 0 0 μ l) 及び 2 \times ドラッグ (5 0 0 μ l) を混合し、2 0 0 μ l 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 (IC_{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-ウェルポイデンチャンバー (商標) 及び 8 μ m 孔径のコラーゲン被覆された (10 μ 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 μ l の DMEM 培地のみ (ベースライン) 又は化学走性誘因物質含有培地 (bFGF、VEGF 又はスィス 3T3 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 DMEM + 1% BSA 中で調製される 45 μ l の HUVEC 細胞懸濁液 (1×10^6 細胞/ml) を配する。37 °C で 5 時間インキュベーション後、膜を PBS 中で洗浄し、Diff-Quick 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 Kimwipe (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 \pm S.D. としてプロットする。 IC_{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な EphB4 の異所性部位のサブドメインを特定するために、EphB4 EC 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 (FNIII) を含有する。EphB4 の完全異所性部位を含有する組み換え型 B4-GCF2 蛋白質に加え、球状領域及び Cys-リッチ領域 (B4-GC) を含有する EphB4 EC の 3 個の欠失変異体を構築した; 即ち、球状、Cys-リッチ及び第一の FNIII 領域 (GCF1) 並びに削除された球状領域 (CF2) を有する ECD 変異体。球状領域のみを含有する短縮された EphB4 EC 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りガンドの不存在であった。更に、B4-GCF2 の非標識化体 (GCF2-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 x His 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乳類細胞中で予備的に発現し、条件付けした増殖培地から Ni^{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)。明らかにそれらのグリコシル化を原因として、この蛋白質は 34.7 kDa (GC)、41.5 (CF2)、45.6 kDa (GCF1) 及び 57.8 kDa (GCF2) 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 SDS-PAGE 上を移動する。ヒト EphB4 の細胞外領域の配列は、Cys-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 (NXS/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

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1 7）。

【0 1 5 4】

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EphB4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蛋白質とのブレインキューベーションは、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ブレインキュー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。

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。

【0 1 5 5】

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、投薬量依存性挙動でのボイデンチャンパー（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1 8）。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挙動で非常に阻害された（図1 9）。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。

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2 0）。

【0 1 5 6】

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；

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った（図2 1）。反対に、b F G F及びV E G Fを補充されたプラグは、プラグ全体に十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2 1）。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2 1）。

【0 1 5 7】

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2 1）。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ブ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2 2）。

【0 1 5 8】

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

10

20

30

40

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、b F G F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投与の阻害的効果を試験した。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、b F G F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。S C C 1 5 腫瘍をマトリゲルと共に増殖因子有り又は無しでブレインキューベートして皮下移植し、又s c単独で移植し、マウスを一日1～5 u gの可溶性EphB4でs c又はi p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 mm^3 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 mm^3 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明らかになった（昏睡、断続的な背中への曲げ、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 μm 幅で囲まれている、全S C C 1 5 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（P E C A M - 1；C D 3 1）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、繊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、繊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P C 3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R P M I培地中で維持した

10

20

30

40

50

。細胞を5% CO₂ / 95% 空気湿生雰囲気下37℃で保持した。通常、細胞を接触するまで60mmディッシュ中で増殖し、10分間1μg/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EphB4ECD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; GC、GCF1、GCF2、GCF2-F、CF2)で5μg/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5μg/mlで処理し、培地を1μg/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分間インキュベートした。

10

【0164】

刺激後、細胞を直ちに、20mM Tris-HCl、pH7.4、150mM NaCl、1%(v/v) Triton X100(商標)、1mMのEDTA、1mMのPMSE、1mM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、14000rpm、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、電気ブ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。

20

【0165】

内皮細胞管形成アッセイ;

マトリゲル(商標)(60μlの10mg/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(500μl)及び2×蛋白質(500μl)を混合し、200μl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。

30

【0166】

細胞移動アッセイ;

HUVECのVEGF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、6.5mm直径、8μm孔径、10μm厚ポリカーボネート膜(BD Biosciences社製))を使用して評価した。200μlのEBM中のHUVEC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、100nM~1μM試験化合物の存在又は非存在下で10~20ng/mlのVEGFに应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。

40

50

【0167】

増殖阻害アッセイ；

HUVEC (1.5×10^3 細胞)を100 μ lのEBM-2 (Clonetic社製、カタログ番号CC3162)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 μ l)をそれぞれのウェルへEBM-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℃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:0.1M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540nmでELISAリーダー(Dynatechラボトリーズ社製)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(ビヒクル処理した細胞)割合としてプロットした。IC₅₀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℃で液状のマトリゲル(商標)(8.13mg/ml、0.5ml)を内皮細胞成長補充物(ECGS)、試験蛋白質プラスECGS又はマトリゲル(商標)プラスビヒクル単独(PBS含有0.25%BSA)と混合した。マトリゲル(商標)(0.5ml)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NIH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PBS溶液中で固定化してパラフィン中に包埋した。3 μ m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Kenyonら、1996の詳細に従って行った。簡潔には、90ngのbFGF(R&D)又は180ngのVEGF(R&Dシステムズ社製、ミネアポリス、MN、米国)のいずれか及び40 μ g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ペレット(ポリヒドロキシエチルメタクリレート[ポリHEMA]、Interferon Sciences社製、ニューブランズウィック、NJ、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、Bard-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(2'30mm)を使用して切開した。1個のペレットを移植し、一時的(temporal)角膜輪部(bFGFペレット用に0 \pm 7 \pm 1 \pm 0mm及びVEGFペレット用に0 \pm 5mm内)に対して進め、それぞれの増殖因子用のペレット位置内での相違は、このモデル内でVEGF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ペ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ペレット移植後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。

30

40

【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 μ m; ベクトンディッキンソン社製、フランクリンレイクス、NJ)を24-ウェルプレ

50

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を同じ培地中にEphB4無しに培養した。次に0.5 ml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 $8 \mu\text{m}$ 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、ピ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、0.1 mlマトリゲルと混合した0.1 ml P 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 $50 \mu\text{l}$ を毎日投与された。

【0173】

30

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】

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、 $5 \mu\text{m}$ に断片化し、ヘマトキシリン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)。

40

【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；

最初にウェスタンブ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120 k D 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の転移性クローン) 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が臨床性前立腺癌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。前立腺癌標本中の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）。前立腺癌組織アレイ中、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）。

【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）。

【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（Zhong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CWR22R及びCWR22R-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）。

【0179】

E．EGFR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pro-生存増殖因子と相関関係を有することが予測された。独立してEGFR及びIGF-1Rシグナルをブロック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シグナルのブロック後（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。

【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ロチオアート-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

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、投薬量依存性挙動で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でトランスフェクトされ、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10 μ M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トランスフェクト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でトランスフェクトされた場合に確認された(図32B)。100nMで、siRNA 472トランスフェクトされた細胞中ではコントロールsiRNAトランスフェクトされた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)。これはアスベ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ベ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

、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十分な頻度で発生し、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。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。

10

【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)及びウェスタンブ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腫瘍構造で明かなように、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ブ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が最小で観察された。

【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ブ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いことを示された(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 E p h B 4 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 E p h B 4 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 E p h B 4 のリガンド、即ちエフリン B 2 の発現を表した。いくつかの系で E p h B 4 と共に、エフリン B 2 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 シグナルの障害は S C C 1 5 細胞中の E p h B 4 レベルを抑制した。次に E G F は E p h B 4 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 E p h B 4 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 E p h B 4 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 γ 、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 E p h B 4 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 での障害及び P 1 3 - K の L Y 2 9 4 0 0 2 又はウォルトマニンでの障害は、E p h B 4 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 リン酸化が障害された時に、E p h B 4 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 活性の障害は基底を増加したが、E G F は E p h B 4 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 E p h B 4 の障害は生存能力を減少させ細胞周期停止を生じる；

次に、siRNA 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 E p h B 4 発現作用を研究した。E p h B 4 配列への数個の siRNA 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 E p h B 4 発現をノックダウンした。siRNA 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 E p h B 4 発現のブロッキングに最も効果的であった（図 4 2 B）。E p h B 4 siRNA 1 5 6 2 及び 2 3 0 2 又はエフリン B 2 siRNA 2 5 4 では生存能力への影響はほとんど観察されなかった。E p h B 4 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った。siRNA 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、E p h B 4 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った siRNA 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った。

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 E p h B 4 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	
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	10
100 nM 472	80.2	10.9	5.2	2.1	
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	20
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	

【 0 1 9 9 】

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-ODN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)。

【 0 2 0 0 】

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ツ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への移動を、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発現をブロックする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グダブルチャンバー(商標)アッセイを使用して示された(図43E)。

【 0 2 0 1 】

F . EphB4 AS- 1 0 のin vivo抗腫瘍活性 ;

細胞生存能力及運動性を減少するEphB4 AS- 1 0 の効果を、Balb/Cヌードマウス中のS C C 1 5 腫瘍異種移植で決定した。マウスへ毎日2 0 m g / k g A S - 1 0 、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。A S - 1 0 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希釈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4 4)。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。

【 0 2 0 2 】

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。

【 0 2 0 3 】

実施例6 (カボ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)

カボジ肉腫(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 europeus」凝集素- 1 (U E A - 1) 用レクチン結合部位、C D 3 4、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レセプター、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発現する(4)。

【 0 2 0 4 】

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1 9 9 4 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 感染後の骨髓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 プロテイン結合レセプター(v G P C R) について蓄積された(9)。

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障害は、K S 細胞の生存能力及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。

【 0 2 0 5 】

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

10

20

30

40

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、F I T C 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H H V - 8 潜伏蛋白質L A N A 1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P E C A M - 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R T - P C R 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H H V - 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H H V - 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H H V - 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)。十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R T - P C R 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R N A 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、H H V - 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 / H H V - 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、R N A 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った。更に、蛋白質の細胞性局在化も決定できた。R T - P C R 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(L A N A 1) と関連するH H V - 8 潜伏を全く発現しなかった(図46A (b , n)) 。H H V - 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L A N A 1 及びO R F 5 9 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)) 。H H V - 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L A N A 1 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H H V - 8 感染させたH U V E C は、同様に動脈性マーカーC D 1 4 8 を発現する(19)(図46A (j , v)) 。エフリンB2及びC D 1 4 8 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C D 1 4 8 に陰性であった(記載せず)。

【0208】

C . H H V - 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H H V - 8 L A N A 、又はL A N A 4 4 0 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ブロット法で、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 -

LANA 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(pCEFL)でトランスフェクトされたSLKを、コントロールとして使用した。SLK-vGPCR及びSLK-pCEFL細胞も又、一時的にトランスフェクトされた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-pCEFL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-pCEFL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-pCEFL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示唆する。HHV-8はHUVEC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B2 5'-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、HUVEC中に一時的にトランスフェクトされた。エフリンB2 5'-フランキングDNA配列-2491/-11は、HUVEC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HUVEC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の共トランスフェクションは、コントロール発現ベクターpCEFL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。

【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、HUVECをVEGF、VEGF-C又はEGFで処理した。HUVEC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挙動でエフリン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。

【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でトランスフェクトして48時間後、エフリンB2発現をウェスタンブ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siRNA GFP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 63 siRNAは、上記2種のsiRNAエフリンB2よりも効果が低かった(図49A)。

【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HUVEC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

、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)。

【0 2 1 2】

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。

【0 2 1 3】

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 μ M)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。

【0 2 1 4】

実施例8 (EphB4アンチセンスプローブ及びR N A 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ロ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、ウェスタンブ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処理され、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 R N A i プローブに対する結果を下記表7にまとめた。

【0 2 1 5】

本実施例のアンチセンス及び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。

【0 2 1 6】

実施例9 (エフリンB2アンチセンスプローブ及びR N A 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 μ M)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R N A 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R N A 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。

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B2 RNA i プローブについての結果は、下記表 9 にまとめた。

【 0 2 1 7 】

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。

【 0 2 1 8 】

実施例 1 0 (EphB4 抗体は腫瘍増殖を阻害する。)

図 5 7 は、G 2 5 0 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 5 8 は、EphB4 抗体はマトリゲル及び増殖因子の存在下で SCC 1 5 細胞の in vivo 腫瘍増殖を阻害することを示す。

B a I b C ヌードマウスへ 2.5×10^6 の生存腫瘍細胞 SCC 1 5 を皮下注射した。SCC 1 5 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 ' と予備混合した $2.5 \sim 5 \times 10^6$ 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 1 4 日後に解剖した。SCC 1 5 は頭部及び頸部扁平上皮細胞癌系であり、B 1 6 は黒色腫細胞系であり、M C F - 7 は乳癌系である。これらの処理に対する腫瘍の応答を、P B S 注射を受けたコントロール処理マウスと比較した。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 2 3 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 SCC 1 5 腫瘍サイズの顕著な退縮を示した。

図 5 9 は、EphB4 抗体は、SCC 1 5 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。

【 0 2 1 9 】

血管形成を C D - 3 1 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 C D 3 1 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 2 m m 連続断片ヘスライスし、パラフィン中に包埋した。パラフィン包埋した組織を 5 μ m 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 P B S 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フェラーゼ及びフルオレセイン標識化ヌクレオチド溶液) 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) 及びヘマトキシリン及びエオ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、繊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 2 0 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 2 3 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 3 5 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 7 9 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 9 1 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 1 3 8 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 P B S 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。

【 0 2 2 0 】

CENQDSISSKLKECKEPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLA ADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
VLLLLRLAKTYETTLEKCC AAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQLGEYKFQNALLVRYTKKVP QVSTP
TLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSWLNQLCVLHEKTPVSD RVTCKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKE
FNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA LEVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLV AASQ
AALGL

である。

【 0 2 2 4 】

pEF6-GCF2プラスミドの核酸配列は (SEQ ID NO:20) :

aatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaata
gggggttccgcg cacatttccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatcgggagatctccgateccctatggtcgac 10
tctcagtacaatctgtctctg atgcccatagtttaagccagtatctgtctccctgcttgtgtgttggaggctcgctgagtag
tgcgcgagcaaaatttaagctacaacaag gcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggtaggcgtt
ttgcgctgcttcgcgatgtacgggccagatatacgctg tgacattgattattgactaggcttttgcaaaaagctttgca
aagatggataaagttttaacagagaggaatctttgcagctaattggacct tctagggtcttgaaaggagtgcctcgtag
gctccggtgccgctcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagtgg gggggaggggtcggaattgaac
cgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcggtactggctccgc ctttttcccgaggggtggg
ggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttgcgaacgggtttgccgccagaacac aggtaagt
ccgtgtgtgggttcccgcgggctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcag
tacgtgattcttgatcccagcttcgggttgggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccctcg
ctcggtgctt gagttgaggcctggcctgggcgctggggccgcccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgccgtgtctgcg 20
tgctttcgataagtctc tagccatttaaaattttgatgacctgctgcgacgcttttttctggcaagatagcttctgta
aatgcgggccaagatctgcacactggattt tcggttttggggccgcccggcgacggggcccgtgcgtcccagcgca
catgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggc caccgagaatcggacggggtagtctcaagctggccggcctgctct
gggtgcctggcctcgcgccgcccgtgtatcgccccgcccgt ggccgcaaggctggcccgttcggcaccagttgcgtgagcg
gaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaat ggaggacgcgcgctcgggagagcgggagggtgagt
caccacacaaaaggaaaaggcccttccgctcctcagccgtcgcttca tgtgactccacggagtaccgggcccgtccag
gcacctcgatttagttctcgagcttttgagtagctgtcttttaggttggggggag gggttttatgcgatggagtttccc
cacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaaattt gccctttttagt
ttggatcttgggtcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttcttccatttcagggtgtcgtaggaattagc 30
tt ggfactaatacgaactactatagggagaccaagctggctaggtaagcttggtagcgagctcggtaccactagtcca
gtgtgtgtg aattgcccttCAAGCTTGCCGCCACCATGGAGCTCCGGGTGCTGCTCTGCTGGGCTTC GTTGGCCGAG
CTTTGGAAGAGACCCTGCTGAACACAAAATTGGAACTGCTG ATCTGAAGTGGGTGACATTCCCTCAGGTGGACGGGCA
GTGGGAGGAACTGAGC GGCCTGGATGAGGAACAGCACAGCGTGCGCACCTACGAAGTGTGTGACGTGCA GCGTGCCCC
GGGCCAGGCCACTGGCTTCGCACAGGTTGGGTCCCACGGCGGG GCGCCGTCCACGTGTACGCCACGCTGCGCTTCACC
ATGCTCGAGTGCCCTGTCCC TGCCTCGGGCTGGGCGCTCCTGCAAGGAGACCTTACCGTCTTCTACTATGAGA GCGAT
GCGGACACGGCCACGGCCCTCACGCCAGCCTGGATGGAGAACCCCTAC ATCAAGGTGGACACGGTGGCCGCGGAGCATC
TCACCCGGAAGCGCCCTGGGGC CGAGGCCACCGGGAAGGTGAATGTCAAGACGCTGCGCCTGGGACCGCTCAGCA AGG
CTGGCTTCTACCTGGCCTTCCAGGACCAGGGTGCCTGCATGGCCCTGCTAT CCCTGCACCTCTTCTACAAAAAGTGCGC
CCAGCTGACTGTGAACCTGACTCGAT TCCCGGAGACTGTGCCTCGGGAGCTGGTTGTGCCCGTGGCCGGTAGCTGCGTG 40
G TGGATGCCGTCCCCGCCCCCTGGCCCCAGCCCCAGCCTCTACTGCCGTGAGGATG GCCAGTGGGCCGAACAGCCGGTC
ACGGGCTGCAGCTGTGCTCCGGGGTTCGAG GCAGCTGAGGGGAACACCAAGTGCCGAGCCTGTGCCAGGGCACCTTCA
AGCC CCTGTGACAGGAGAAGGTCTGCCAGCCATGCCAGCCAATAGCCACTCTAACA CCATTGGATCAGCCGTCTGCC
AGTGCCGCGTGGGTACTTCCGGGCACGCACAG ACCCCGGGGTGCACCCTGCACCACCCCTCCTTCGGCTCCGCGGAG
CGTGGTTT CCCGCTGAACGGCTCCTCCCTGCACCTGGAATGGAGTGCCCCCTGGAGTCTG GTGGCCGAGAGGACCT
CACCTACGCCCTCCGCTGCCGGGAGTGTGACCCGGA GGCTCCTGTGCGCCCTGCGGGGAGACCTGACTTTTGACCCC
GGCCCCGGGAC CTGGTGGAGCCCTGGGTGGTGGTTTCGAGGGCTACGTCTGACTTCACCTATAACC TTTGAGGTCACT
GCATTGAACGGGGTATCCTCCTTAGCCACGGGGCCCCGTCCCA TTTGAGCCTGTCAATGTCAACCACTGACCGAGAGGTAC
CTCCTGCAGTGTCTGAC ATCCGGGTGACGCGGTCTCACCAGCAGCTTGAGCCTGGCCTGGGCTGTTCCC CGGGCAC
CCAGTGGGGCTGTGCTGGACTACGAGGTCAAATACCATGAGAAGGG CGCCGAGGGTCCCAGCAGCGTGCGGTTCTGAA
GACGTCAGAAAACCGGGCAG AGCTGCGGGGGCTGAAGCGGGGAGCCAGCTACCTGGTGCAGGTACGGGCGCGC TCTGA 50

GGCCGGCTACGGGCCCTTCGGCCAGGAACATCACAGCCAGACCCAACT GGATGAGAGCGAGGGCTGGCGGGAGCAGtct
agaGATGCACACAAGAGTGAGGTT GCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTGATT
GCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTG AATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAA
CATGTGTAGCTGATGAGTCAGCTGAAAA TTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGC
AAC TCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTG AGAGAAATGAATGCTTCTTGCA
ACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCGA TTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAAT
GAAGAG ACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTAT GCCCGGAACCTCTTTTC
TTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGT TGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCG
ATGAACTTCGG GATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAATGTGCCAGTCTCCA AAAATTTGGAGAAA
GAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTGGCTCGCCTGAGCCAGA GATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAAGATTTCCAAGTTAGT 10
GACAGATCTTACCA AAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGG GCGGACCTTGC
CAAGTATATCTGTGAAAATCAGGATTCGATCTCCAGTAACTG AAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGAAAAATCC
CACTGCATTGCCGAAGT GGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGA AAGTAAG
GATGTTTGCAAAAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCA TGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTG
ATTACTCTGTGCTGCTGCTGCT GAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAG ATC
CTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTTGGAAG AGCCTCAGAATTTAATCAAACAAAACCTG
TGAGCTTTTTAAGCAGCTTGGAGAGT ACAAATTCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTG
T CAACTCCAACCTCTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAA TGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAA
AGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCC GTGGTCCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTG
ACAG AGTCACAAAATGCTGCACAGAGTCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGC TCTGGAAGTCGATGAAACAT 20
ACGTTCCCAAAGAGTTTAAATGCTGAAACATTCAC CTTCCATGCAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAAT
CAAGAAAC AACTGCACTTGTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAA CTGAAAGCTGTTATGGA
TGATTTGCGAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCT GACGATAAGGAGACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTT
GTTGCTGCAAG TCAAGCTGCCTTAGGCTTATAAtagcgccgcttaagggcaattctgcagatatccagcacagtggcg
gccgc tcgagtttagagggcccgcggttcgaaggaagcctatccctaaccctctcctcggtctcgattctacgcgtac
cggtcatcatcacc atcaccattgagtttaaacccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgtt
gtttgccctccccgctgccttctt gaccctggaagtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaattg
catcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctggg ggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaaga
caatagcaggcatgctggggatgagggtgggctctatggcct ctgaggcggaagaaccagctggggctctagggggtat
ccccacgcgcccgttagcgggcgcattaagcgcgggcggtgtggtg gttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcg 30
ccctagcgcccgtctcttctgctttcttcccttcttctcgccacgttcgcccg ctttccccgtcaagctctaaatcg
gggcatccctttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgacccccaaaaacttgattaggg tgatggttcacgt
agtgggcatcgccctgatagacggtttttcgccctttgacgttggagtccagttctttaatagtgagctcttgttcc
aaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattcttttgattataagggattttggggatttcggcctatttggtta
aaaaatgagctg atttaacaaaaatttaacgcgaattaatctgtggaatgtgtgtcagttagggtgtggaaagtcccc
aggctccccaggcaggcagaa gtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccaggtgtggaaagtccccaggctc
cccagcaggcagaagtatgcaaagcat gcatctcaattagtcagcaaccatagtcggccccctaaactccgccccatcccg
cccctaactccgcccagttccgcccattctccgccc catggctgactaatttttttatttatgcaaggccgaggccg
cctctgcctctgagctattccagaagtagtgaggaggcttttttgag gcctaggcttttgcaaaaagctcccgggagc
ttgtatatccattttcggtatctgatcagcacgtgttgacaattaatcatcggcatagtat atcggcatagtataatagc 40
acaaggtgaggaactaaaccttgccaagcctttgtctcaagaagaatccaccctcattgaaagagca acggctacaat
caacagcatccccatctctgaagactacagcgtcgccagcgcagctctctctagcgacggccgcatcttactggt gtc
aatgtatatcattttactgggggacctgtgtcagaactcgtggtgctgggcactgtgtgtgtcgggcagctggcaacct
gactt gtatcgtcgcatcggaatgagaacaggggcatcttgagccccctcgggacggtgtcgacaggtgcttctcgat
ctgcatcctggg atcaaagcgatagtgaggacagtgatggacagccgacggcagttgggattcgtgaattgctgccc
ctggttatgtgtgggagg ctaagcacttcgtggccgaggagcaggactgacacgtgctacgagatttcgattccaccg
ccgcttctatgaaaggttgggcttcg gaatcgtttccgggacgcccggctggatgatcctccagcgcggggattctcat
gctggagttcttcgcccacccaacttgtttattgca gcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaatttc
acaaataaagcatttttttactgcatctctagttgtggtttgtccaaactc atcaatgtatcttatcatgtctgtatagc
cgctgacctctagctagagcttggcgtaatcatgggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttat ccgctcacaattcc 50

acacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatagtagtgagctaactcacattaatt gcgttg
cgctcactgcccgcctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaaacgcgcggggagaggcg
gtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggctcgttcggctgcggcgagcggatca
gctcactca aaggcggtaatacgggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagc
aaaaggccaggaa ccgtaaaaaggccgctgtgtggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaa
tcgacgctcaagtcagagggt ggcaaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccGcctggaagctccctcg
cgctctcctgttccgacctgccgctta ccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcaat
gctcacgctgtagggtatctcagttcggtgtaggctgttc gctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccggttcagcc
cgaccgctgcgccttatccggttaactatcgctcttgagtccaacccgg taagacacgacttatcgccactggcagcagcc
actggtaacaggatttagcagagcgaggatgttaggcggtgtacagagttcttg aagtgggtggcctaactacggctaca
ctagaaggacagtatgttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttg gtagctcttgatccgg
caaacaacaccgcgtggtagcgggtgggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatc tcaagaa
gatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaaactcacgttaagggattttgggtcatgagattatc
aaa aaggatcttcacctagatccttttaaatataaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttg
tctgacagttaccaatg cttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatcttcgttcatccatagttgcctgac
tccccgtcgtgtagataactacgatacgg gagggcttacatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacg
ctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagcc agccggaagggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatcc
gcctccatccagctctattaatgtttgccgggaagctagagtaag tagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttg
ccattgtctacagggcatcgtgggtgtcacgctcgtcgtttgggtatggcttcatcagct ccggttcccaacgatcaaggcg
agttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcgggttagctccttcggctcctccgatcgttgtcag aagtaagttggcc
gcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtga
ctgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttgccggcgctcaatacgggat
aataccg cgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcatctggaaaacgttcttcggggcgaaaaactctcaaggatct
taccgctgttgagatc cagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgt
ttctgggtgagcaaaaacaggaaggc aaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcata
ctcttcctttttc

である。

【 0 2 2 5 】

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 (2 9 3 T 細胞) を 1 0 % 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 % C O₂ / 9 5 % 空気の加湿した大気中にて 3 7 °C で保持した。

【 0 2 2 6 】

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 2 0 0 0 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 8 0 % のコンフルエンスに達するように 2 9 3 T 細胞を高密度で接種した。プラスミド D N A 及びリポフェクタミン試薬を 1 : 3 の比率として Opti-MEM 1 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 1 0 c m 培養皿に対して、1 0 μ g のプラスミド D N A を使用した。2 0 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 1 6 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 4 8 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 1 0 , 0 0 0 g で 2 0 分間遠心分離することにより浄化し、0 . 2 μ m のフィルターで濾過し、精製に使用した。

【 0 2 2 7 】

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 2 9 3 細胞から 7 0 0 m L の培地を採取し、最終的な体積である 1 2 0 m L に濃縮した [膜 : (オメガ、7 6 m m) 、5 0 k D a C / O] 。濃

10

20

30

40

50

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の増加。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で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 nモル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

10

20

30

40

50

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ジ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StBでO/N透析した。3mLのSP - セファロースをStB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ー分離を示す。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 7 1 に示すように、得られた画分を P A G E 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 s B 4 に対応することが分かった。

【 0 2 3 9 】

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 P E G 化した s B 4 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 s B 4 に対応) のエフリン B 2 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 7 2 に示す。結合活性の順は未 P E G > モノ P E G > ポリ P E G であることが分かった。

【 0 2 4 0 】

画分の in vitro での安定性も試験した。マウス血清中にて 3 7 °C で 3 日間インキュベートした後のエフリン B 2 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 7 3 に示す。In vitro 安定性の順はモノ P E G > 未 P E G > ポリ P E G であることが分かった。

【 0 2 4 1 】

K . マウス中における EphB4 細胞外領域の P E G 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 P E G 化した s B 4 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 s B 4 に対応) を静脈内注射によってマウス内に 0 . 5 n モル / マウスの量で導入した。1 0 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 1 0 m L を使用して、エフリン B 2 - 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ジン被覆磁性ビーズを用いた結合アッセイを行った。1 0 分のときに得られたシグナルを 1 0 0 % 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 7 4 に示す。P E G 化は未 P E G 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分かった。

【 0 2 4 2 】

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 】

【 0 2 4 3 】

【 図 1 】 B 4 E C v 3 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 】 B 4 E C v 3 N T 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 】 B 2 E C 蛋白質のアミノ酸配列を示す (非開裂エフリン B 2 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 】 B 4 E C v 3 - F C 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 】 B 2 E C - F C 蛋白質のアミノ酸配列を示す (非開裂エフリン B 2 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 】 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) を示す。

【 図 7 】 B 4 E C - F C 阻害アッセイ (溶液中阻害) を示す。

【 図 8 】 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) を示す。

【 図 9 】 B 4 E c v 3 に応答する H U A E C 走化性を示す。

【 図 1 0 】 B 2 E C - F C に応答する H H E C の走化性を示す。

【図 1 1】B 2 E C に応答する H H A E C の走化性を示す。

【図 1 2】H U A E C 細管形成に対する B 4 E c v 3 の効果を示す。

【図 1 3】H U A E C 細管形成に対する B 2 E C - F C の効果を示す。

【図 1 4】ヒトエフリンB2コンストラクトの概略図である。

【図 1 5】ヒトEphB4コンストラクトの概略図である。

【図 1 6】組み換え型可溶性EphB4 E C 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 = C y s リッチ領域、F 1、F 2 = フィブロネクチン型IIIリピート、H = 6 x H i s タグ。

【図 1 7 A】EphB4 E C 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 S D S - P A A G ゲル電気泳動を示す（クマシー染色）。 10

【図 1 7 B】N i - N T A - 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- A P 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 4 2 0 n m の光学密度。

【図 1 8】EphB4 v 3 が走化性を抑制することを示す。

【図 1 9 A】EphB4 v 3 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 B 4 v 3 による細管形成の強い阻害を示す。

【図 1 9 B】蛋白質なしの細胞と比較において、B 4 v 3 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 2 0】可溶性EphB4は、M T S 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 2 1】マトリゲル（商標）アッセイにおいて、B 4 v 3 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 2 0 倍で画像をとった。A B 左上は G F なしのマトリゲルプラグの切片を示し、A の右上は G F を含む B 4 I g G を有する切片を示し、左下の区域は G F を含有し、右下は B 4 v 3 の存在下での G F を示す。内皮細胞の顕著な侵潤は G F 含有マトリゲルのみで観察された。右上は B 4 I g G 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、B 4 v 3 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 2 2】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、P C 3 細胞中のEphB4レセプターのチロシンリン酸化を示す。

【図 2 3 A】生存率及び細胞周期に対する可溶性EphB4 E C D の効果を示す。2 種類の H N S C C 細胞系に対する 3 日間の細胞生存率アッセイを示す。

【図 2 3 B】A と同様に処理された H N S C C - 1 5 細胞中の細胞周期の F A C S 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 G 0 / G 1 及び S / G 2 期の蓄積を生じた。 40

【図 2 4】B 4 v 3 はネズミ角膜hydran（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 2 5】マトリゲル及び増殖因子の存在下で S C C 1 5、B 1 6 及び M C F - 7 を s B 4 v 3 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 2 6】可溶性EphB4は、三種の腫瘍種：B 1 6（黒色腫）、S C C 1 5（頭部癌及び頭部癌）及び M C F - 7（乳癌）において、アポトーシス及び壊死を引き起こし、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。1 0 ~ 1 4 日後、マウスに F I T C - 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 P B S 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。s EphB4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（MLC）及びEphB4モノクローナル抗体でプローブした急性骨髄芽球性リンパ腫細胞（AML）の全細胞溶解産物のウェスタンブロットを示す。

【図27B】ウェスタンブロット法により決定されるPC3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。代表的な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BPH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BPH組織から抽出されたRNAの代表的QRT-PCRを示す。

【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RXR発現を示す。PC3細胞は短縮（truncated）されたCD4及びp53若しくはPTEN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、CD4-分類された細胞を採取し、溶解し、ウェスタンブロット法で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）のウェスタンブロットを示す。LNCaP-FGFはFGF-8の安定なトランスフェクションクローンであり、一方CWR22R-RXRはRXRレセプターを安定して発現する。BPH-1は、良性肥大性前立腺上皮から確立した。

【図30】EGFR及びIGFR-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EGFRの特異的阻害剤であるAG1478（1nM）で36時間処理したとき又は処理しなかったときのPC3細胞のウェスタンブロットを示す。EphB4シグナルの減少がAG1478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ブした。図30BはIGFR-1を特異的に中和する抗体MAB391で（2µg/ml；一晚）処理したとき又は処理しなかったときのPC3細胞の3個の複製サンプルに対するウェスタンブロットを示す。膜をEphB4、IGFR-1及び -アクチン抗体で順にプローブした。IGFR-1シグナルは、MAB391処理によって予測されるシグナルの抑制を示す。

【図31A】発現及び前立腺細胞機能に対する特異的EphB4 AS-ODN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 472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50nMのRNAi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； GFP siRNA）又はEphB4 siRNA 472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ブし、ストリップし、 -アクチンモノクローナル抗体で再プローブした細胞溶解産物のウェスタンブロットを示す。

【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-10の効果を示す。細胞をAS-10又はセンスODNへ6時間曝露し、（A）と同様にウェスタンブロット法により分析した。

【図31C】方法セクションに記載のようにsiRNAで処理されたPC3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ODNで処理したPC3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50nMのsiRNAの存在下でトランスフェクトされたPC3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（0h）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 472では充填されなかった。

【図31F】AS-10又はセンスODN（両方とも10µM）で処理した細胞に対する

同様のアッセイを示す。

【図3 1 G】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5 mg/mlフィブロネクチンに反応するマトリゲル(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siRNA 472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 \pm s.e.m.をグラフに示した(右下)。

【図3 2 A】細胞周期及びアポトーシスに関するEphB4 siRNA 472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。ヨウ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。siRNA 472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3 2 B】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。405 nm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。siRNA 472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 \pm s.e.m.を示す。

【図3 3】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3 3 A)及びウェスタンブロット法(図3 3 B)によって示す。

【図3 4】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3 5】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3 6】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3 7 A】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3 7 B】H28細胞の増殖に対するEphB4 siRNAの効果を示す。

【図3 8 A】細胞移動に対するEphB4アンチセンスプローブの効果。

【図3 8 B】EphB4 siRNAの効果を示す。

【図3 9】EphB4はHNSCCの一次組織及び転移で発現したことを示す。図3 9 A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3 9 B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HNSCC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 3 9 C は腫瘍 (T)、無関係な正常組織 (N) 及びリンパ節パイオプシー (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ブロットを示す。サンプルは、4 ~ 20 % トリス-グリシゲ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ブロッティングされた。膜は、EphB4 モノクローナル抗体及び α -アクチンモノクローナル抗体で順にプローブした。化学発光シグナルをオートラジオグラフィフィルム上で検出した。120 kD 位に移動したEphB4特異バンド及び40 kD 位に移動した α -アクチンを示す。 α -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 4 0】EphB4 は HNSCC 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 4 0 A は SCC 細胞系中のEphB4発現の試験結果を示す。図 3 9 C に記載のように、順にEphB4モノクローナル抗体でプローブし、ストリップし、 α -アクチンモノクローナル抗体で再プローブされた全細胞溶解産物のウェスタンブロットを示す。図 4 0 B はEphB4発現に対する特異的EGFR阻害剤AG1478の効果を示す。10 % FCS を補充された培地中で0 ~ 1000 nM AG1478 で24時間処理 (左)、又は1 mM 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ブ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ブした膜を示す。図 4 0 C 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、1 μ M 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ブロット法により分析し、EGFR、EphB4、エフリンB2及び α -アクチン抗体の有無を順にプローブした。EGFRの特異的シグナルが170 kD 位に検出され、エフリンB2が37 kD 位に、更にEphB4及び α -アクチンが図 4 0 C 中に示されるように検出された。 α -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 4 1】EGF によるEphB4のレギュレーション機構を示す。図 4 1 A 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 4 1 B ではSCC15細胞を24時間血清飢餓状態とした後に、EGF (10 ng/ml)、3 μ M U73122、又は5 μ M SH-5、5 μ M SP600125、25 nM LY294002、 α - μ M PD098095又は5 μ M 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った。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ブロット法で分析した。 α -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 4 2 A】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50 nM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ブロット法を行った。膜をEphB4モノクローナル抗体でプローブし、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 α -アクチンモノクローナル抗体で再プローブした。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 4 2 B】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 \pm s.e.m. を示す。

【図 4 2 C】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يد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ブ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10 μ M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 \pm 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】プラスチックパスツ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、1 μ M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、20 mg/mlのEGFに回答した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10 ng/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 \pm 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 \times 10⁶個の細胞を移植した次の日から20 mg/kg/日でEphB4 AS-10又はスクランブルODN処理したBalb/Cヌードマウス中での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 \pm 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、カボ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バイオプシー中での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。プロビ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、HUVEC及び2種のHHV-8に感染させた培養物 (HUVEC / BC-1 及び HUVEC / 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HUVEC / BC-1 中で観察され、HUVEC / BC-3 及びEphB4生成物 (400bp) はHUVEC 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 β -アクチンRT-PCRを示す。

10

【図47】HHV-8はカボ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のウェスタンブロットを示す。SLK-vGPCRはHHV-8 vGPCRを発現するSLKの安定なクローンであり、SLK-pCEFL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ンである。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 β -アクチンモノクローナル抗体を用いて膜を再プローブすることにより決定した。図47Bでは、発現ベクターp vGPCR-CEFL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pCEFL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HUVEC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 HUVEC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、 80 ng / ウェルのpCEFL又はp vGPCR-CEFL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 β -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 \pm SEMである。3個の複製物の同様な試験の1例を示す。

20

30

【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 ng/ml) へ36時間曝されてから採取及びウェスタンブ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 β -アクチンモノクローナル抗体を用いて再プローブすることで測定した。

40

【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HUVEC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。ウェスタンブロット法を、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、 β -アクチンモノクローナル抗体 (シグマ社製) で再プローブ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

50

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100 ng/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培地中で一晚増殖した。翌日、培地をVEGF (10 ng/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、インビトロジェン社製) を使用して10 nM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 Cのコード形成アッセイを示す。指数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) で一晚処理した。細胞をトリプシン処理し、0.5 ml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】膀胱癌細胞系中での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 siRNA 472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 siRNA 472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 (10 μ M) 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siRNA 472又はコントロールsiRNAでトランスフェクトした。

【0244】

【図57】G250及びプ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のゲノムヌクレオチド配列を示す (SEQ ID NO:6)。

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

【図63】ヒトエフリンB2のゲノムヌ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ヌ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)。

【図 6 6】ヒトエフリンB2のアミノ酸配列を示す (SEQ ID NO:11)。

【図 6 7】H S A - EphB4融合蛋白質とその他のEphB4ポリペプチドのエフリン B 2 に対する結合性の比較を示す。

【図 6 8】マウス内におけるEphB4 - H S A 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 6 9】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 7 0】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 7 1】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S D S - P A G Eにより測定した純度を示す。

【図 7 2】EphB4の P E G 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 7 3】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 7 4】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】

B4ECv3蛋白質のアミノ酸配列

```
MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWHEELSG
LDEEQHSVRTYEVCEVQAPGQAHWLRGTGWVPRRGAVHVVYATLRFMTM
LECLSLPRAGRSCKETFTVFYIESDADTATALTPAWMENPYIKVDTV
AAEHLTRKRPGAEATGKVNVTLRGLPLSKAGFYLAQDQGACMALL
SLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVPVAVAGSCVVDVAVPAGPSP
SLYCREDDGQWAEQPVGTGSCAPGFEEAEGNTKCRACAQGTFFKPLSGE
GSCQPCPANSHTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPRS
VVSRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTALRCRECRPGGSCAPCGGD
LTFDPGPRDLVEFPWVVVRGLRDPFTYTFEVTALNGVSSLATGPVPFE
PVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLAWAVPRAPSGAWLDYEVK
YHEKGAEGPSVRFKLTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGF
FGQEHHSQTQLDESEGWREQGSKRAILQIEGKPIPNPLGLDSTRTG
HHHHHH
```

【図 2】

B4ECv3NT蛋白質のアミノ酸配列

```
MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWHEELSG
LDEEQHSVRTYEVCEVQAPGQAHWLRGTGWVPRRGAVHVVYATLRFMTM
LECLSLPRAGRSCKETFTVFYIESDADTATALTPAWMENPYIKVDTV
AAEHLTRKRPGAEATGKVNVTLRGLPLSKAGFYLAQDQGACMALLSLHL
FYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVPVAVAGSCVVDVAVPAGPSPSLYCR
EDGQWAEQPVGTGSCAPGFEEAEGNTKCRACAQGTFFKPLSGEGSCQPC
PANSHTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPRSVVSRLNG
SSLHLEWSAPLES GGREDLTALRCRECRPGGSCAPCGGDLTDFDPGR
DLVEFPWVVVRGLRDPFTYTFEVTALNGVSSLATGPVPFEFVNVTDR
EVPVAVSDIRVTRSSPSSLAWAVPRAPSGAWLDYEVKYEKGAEGPS
SVRFKLTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGFPGQEHHSQTQL
DESEGWREQGSKRAILQISSTVAAARV
```

【図 3】

B2EC蛋白質のアミノ酸配列

```
MAVRRDSVWKYCWGVLMLVLCRTAISKISIVLEPIYWNSSNSKFLPGQGL
VLYPQIGDKLDIICPKVDSKTVGQYEEYKVMVDKQDQADRCTIKKENT
PLLNCAKPDQDIKFTIKFQEFSPNLWGLEFQKNKDYIISTSNGLSLEG
LDNQEGGVCCQTRAMKILMKVGGDASSAGSTRNKDPTRRPELEAGTNGR
SSTTSFVFKPNPGSSSTDGNSAGHSNNILGSEVSGSHHHHHH
```

【図 4】

B4ECv3-FC蛋白質のアミノ酸配列

```
MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWHEEL
SGLDDEEQHSVRTYEVCEVQAPGQAHWLRGTGWVPRRGAVHVVYATL
RFTMLECLSLPRAGRSCKETFTVFYIESDADTATALTPAWMENPY
IKVDTVAEHLTRKRPGAEATGKVNVTLRGLPLSKAGFYLAQD
QGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVPVAVAGSCV
DAVPAPGPSPLYCREDDGQWAEQPVGTGSCAPGFEEAEGNTKCR
ACAQGTFFKPLSGEGSCQPCPANSHTIGSAVCQCRVGYFRARTDP
RGAPCTTPPSAPRSVVSRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTALR
CRECRPGGSCAPCGDLTDFDPGPRDLVEFPWVVVRGLRDPFTYTFE
VTALNGVSSLATGPVPFEFVNVTDRVPPAVSDIRVTRSSPSSL
SLAWAVPRAPSGAWLDYEVKYEKGAEGPSVRFKLTSENRAELR
GLKRGASYLVQVRARSEAGYGFPGQEHHSQTQLDESEGWREQDPE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKQSL
SLSPGK
```

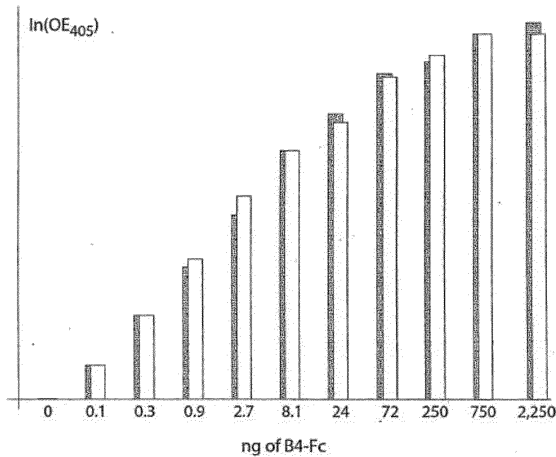
【図5】

B2EC-Fc蛋白質のアミノ酸配列

MAVRDRSVWKYCWGLMVLCRTAISKIVLEPIYWNSSNSKFLPGQ
GLVLYPQIGDKLDIICPKVDSKTVGQYBYKVMVDKDQADRCTIK
KENTPLLNCAPDQDIKFTIKFQEFSPNLWGLEFQKNKDYYIIST
NGSLEGLDNQEGGVCQTRAMKILMKVGQDASAGSTRNKDPTRRPE
LEAGTNGRSSSTSPFVKPNPGSSDTGNSAGHSGNNILGSEVDPEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHL
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

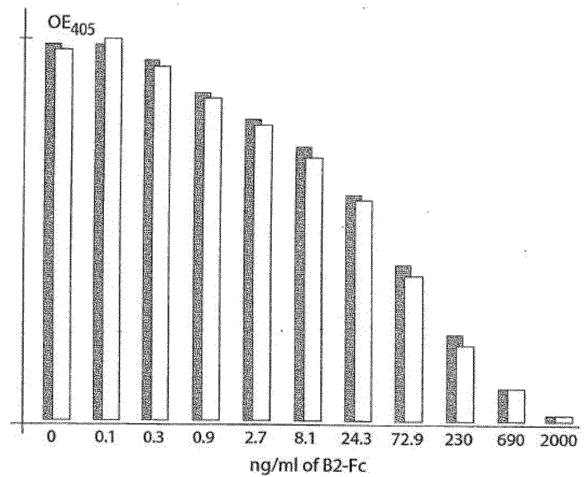
【図6】

B4EC-Fc結合アッセイ（蛋白質A-アガロースベース）



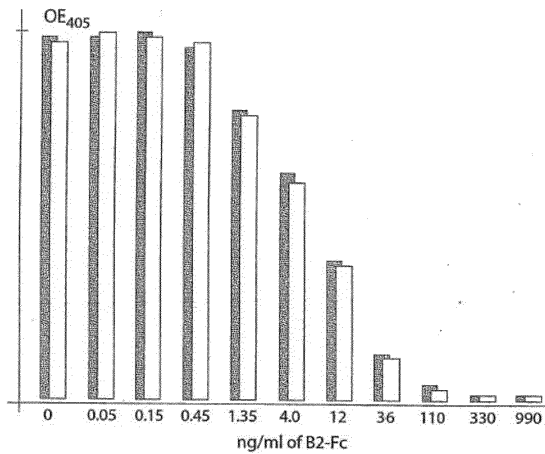
【図7】

B4EC-Fc阻害アッセイ（溶液中での阻害）



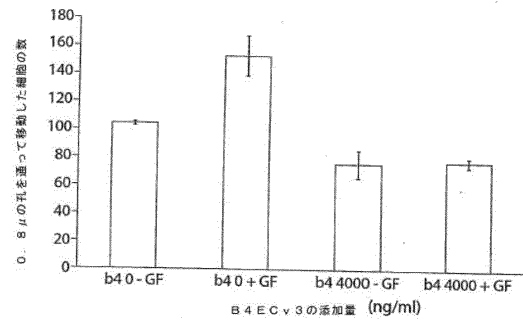
【図8】

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）



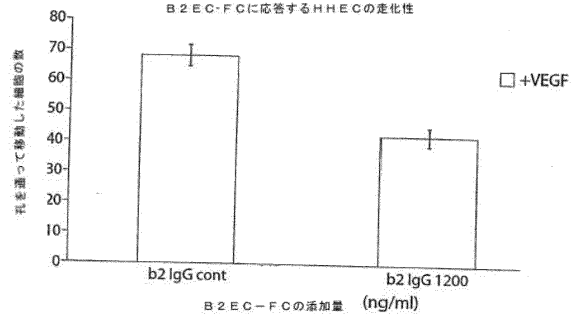
【図9】

B4ECv3に反応するHUAEC定化性

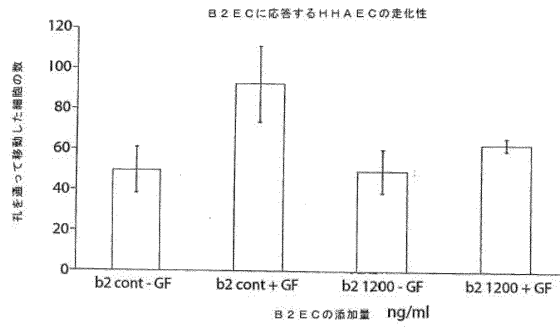


【図10】

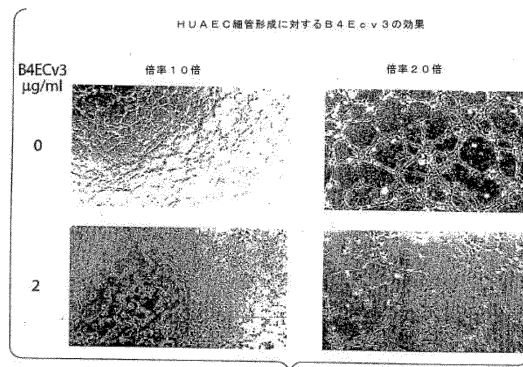
B2EC-Fcに反応するHHECの定化性



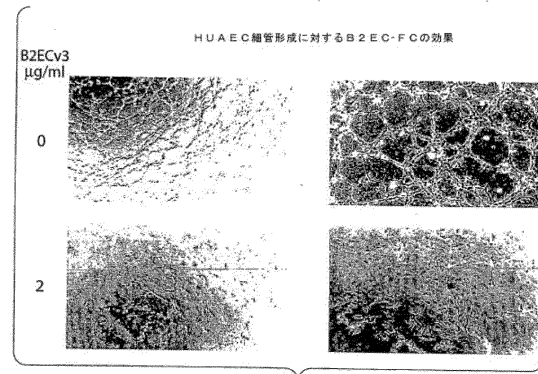
【図 1 1】



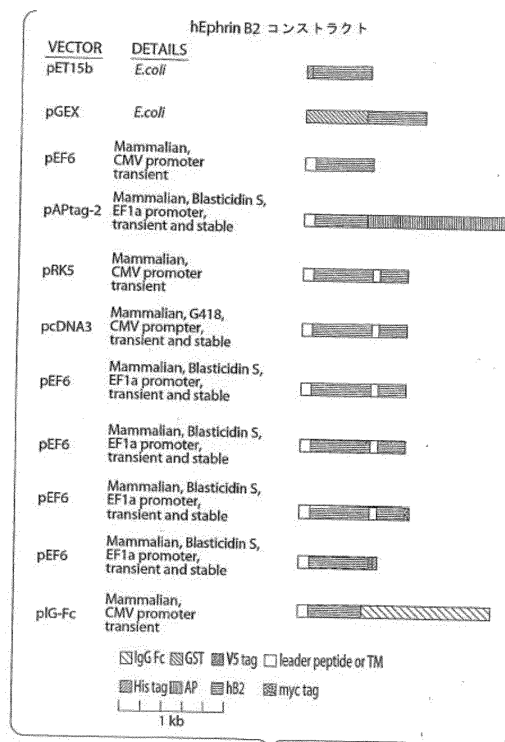
【図 1 2】



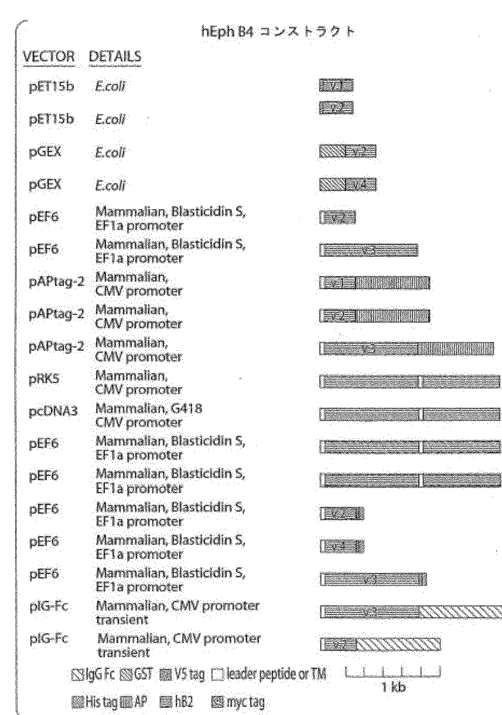
【図 1 3】



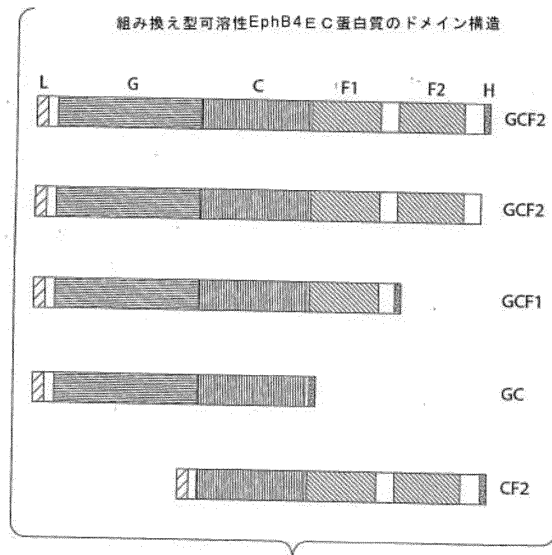
【図 1 4】



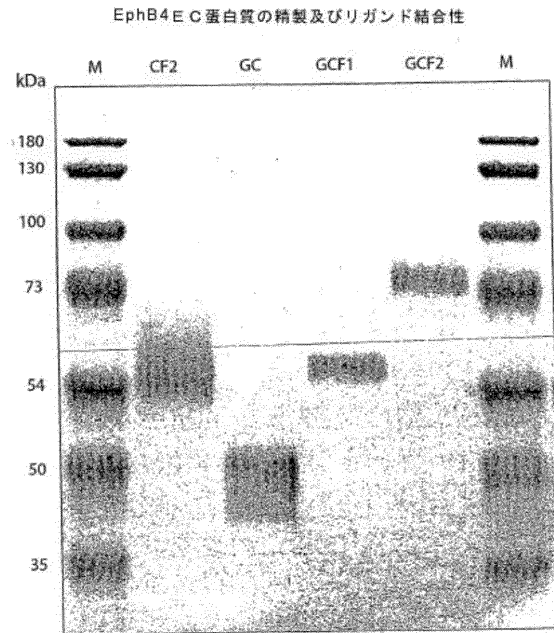
【図 1 5】



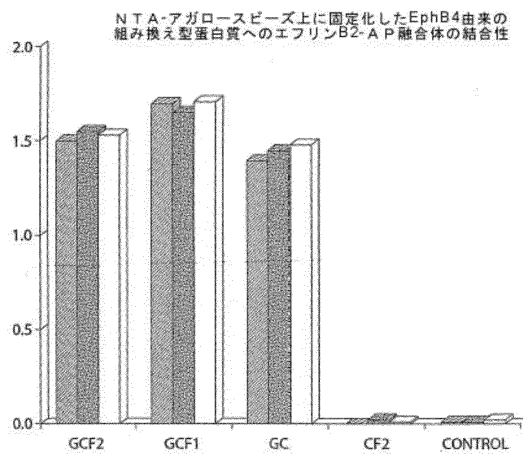
【図 16】



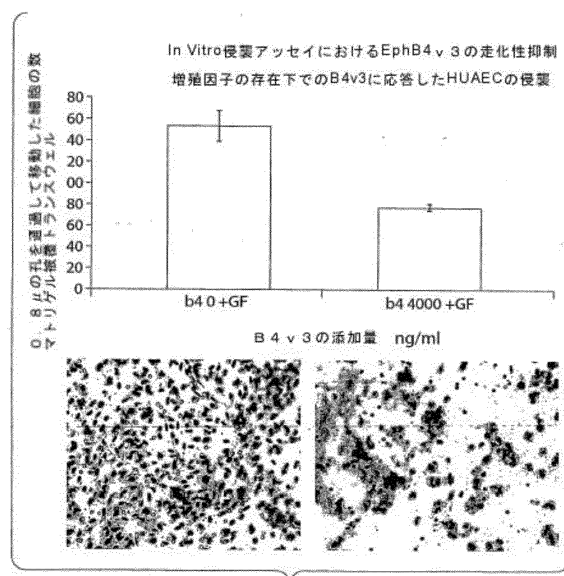
【図 17 A】



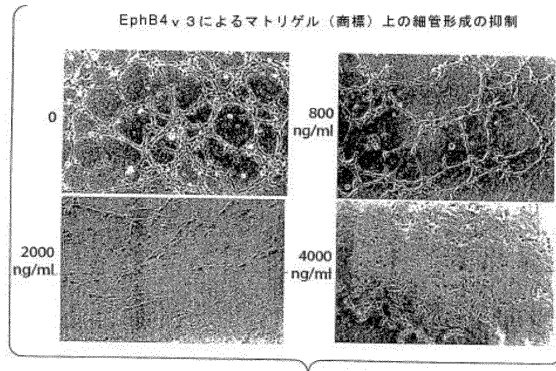
【図 17 B】



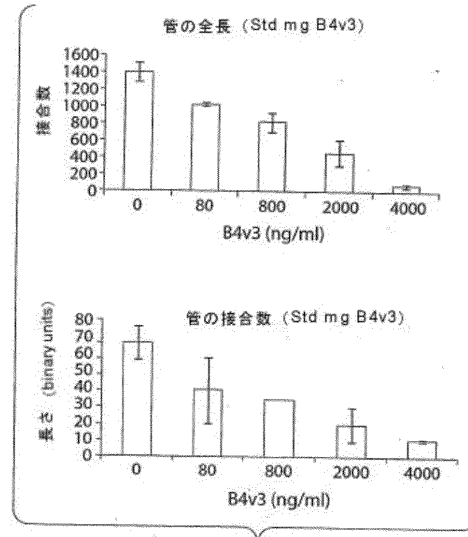
【図 18】



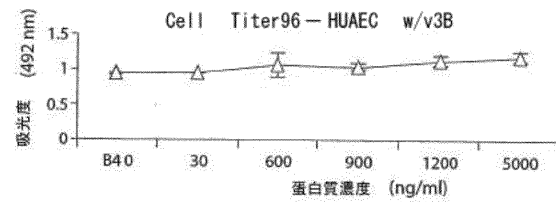
【図 19 A】



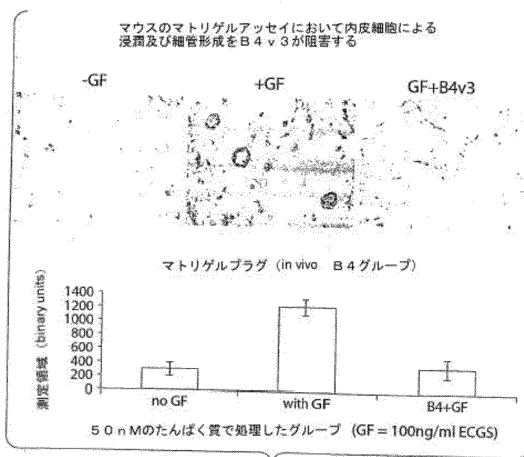
【図 19 B】



【図 20】



【図 21】



【図 22】

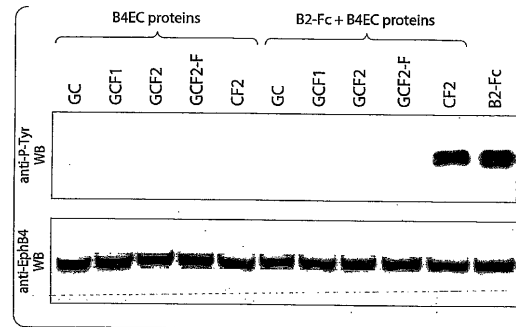
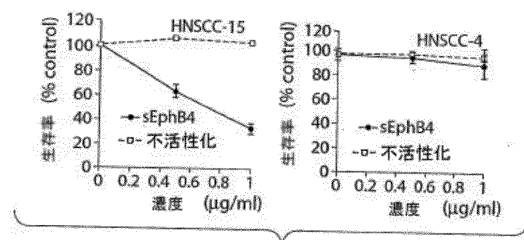
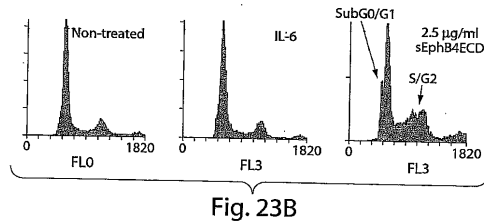


Fig. 22

【図 23 A】

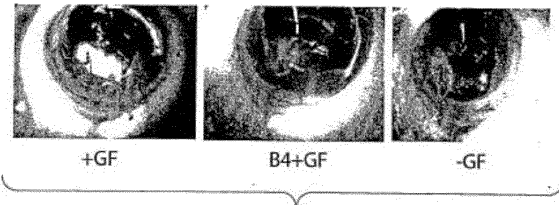


【図 23 B】

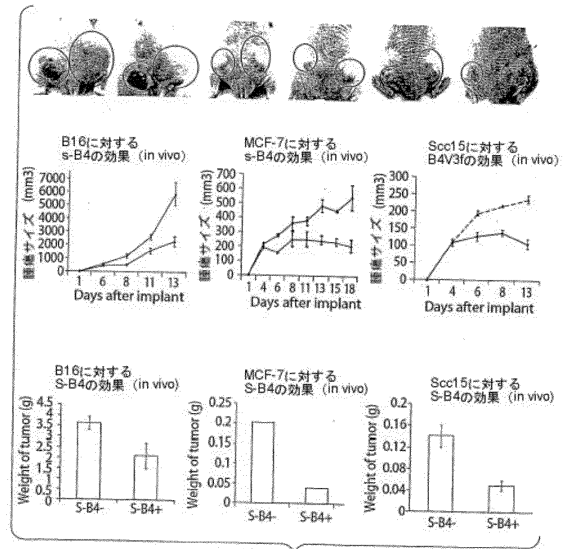


【図 24】

B4 v 3 はネズミ角膜hydranマイクロポケットアッセイにおいて新血管応答を阻害する



【図 25】



【図 26】

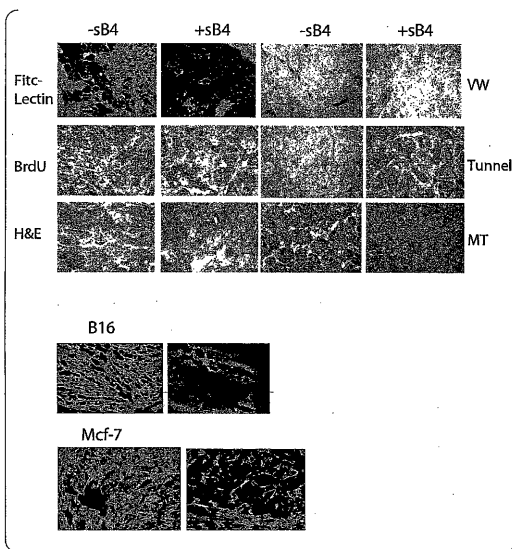
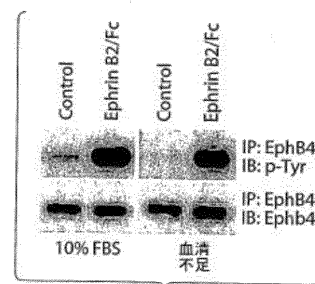


Fig. 26

【図 27 B】



【図 27 A】

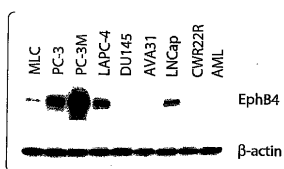
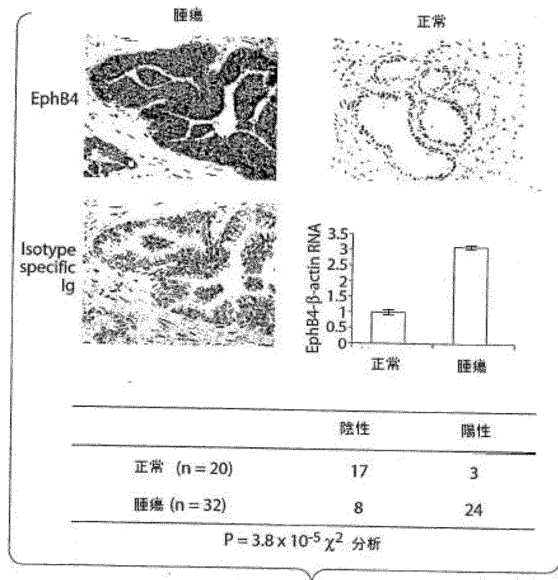
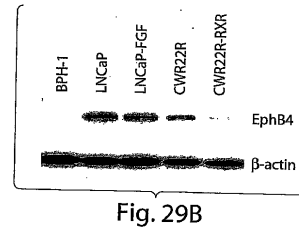


Fig. 27A

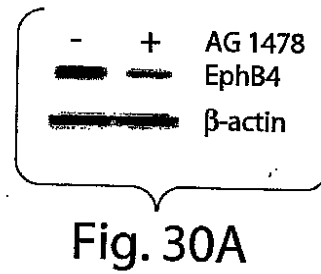
【図 28】



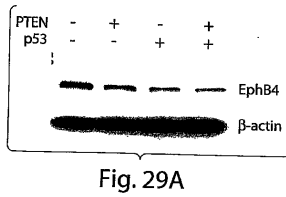
【図 29 B】



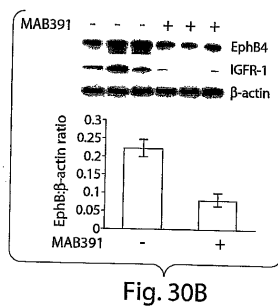
【図 30 A】



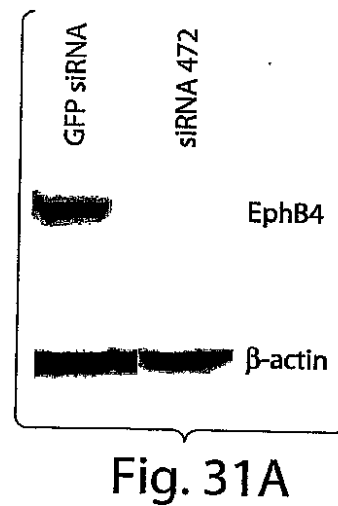
【図 29 A】



【図 30 B】



【図 31 A】



【図 3 1 B】

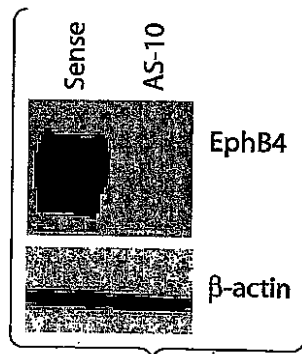
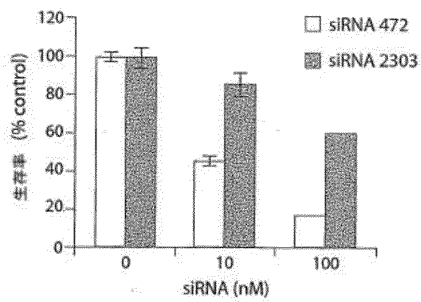


Fig. 31B

【図 3 1 C】



【図 3 1 F】

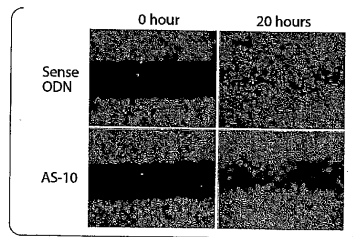
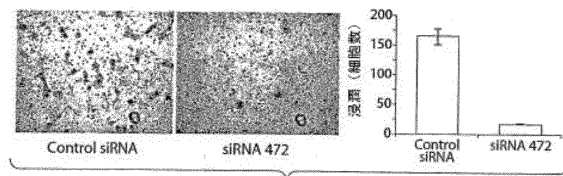
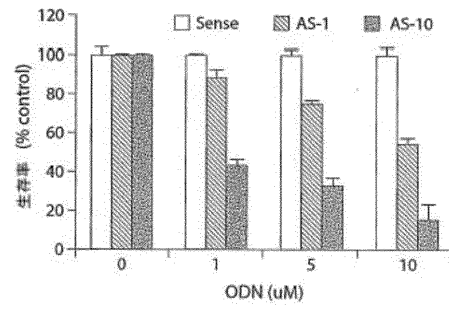


Fig. 31F

【図 3 1 G】



【図 3 1 D】



【図 3 1 E】

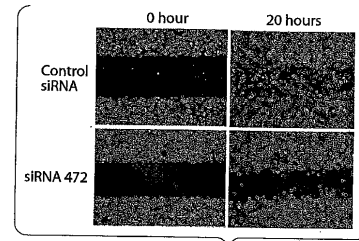
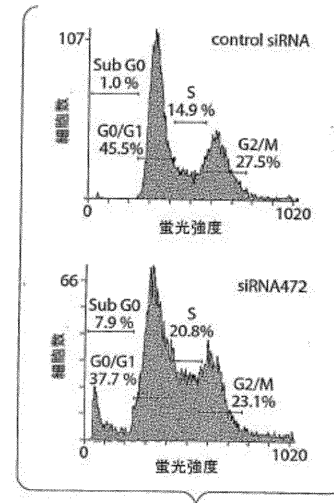
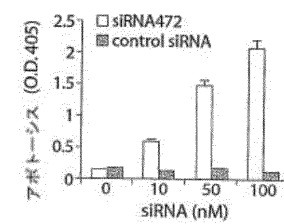


Fig. 31E

【図 3 2 A】



【図 3 2 B】



【図 3 3 A】

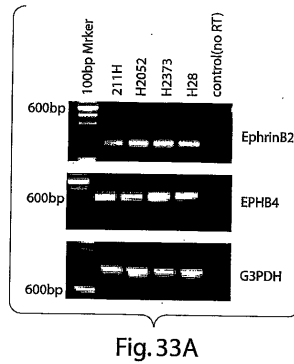


Fig.33A

【図 3 3 B】

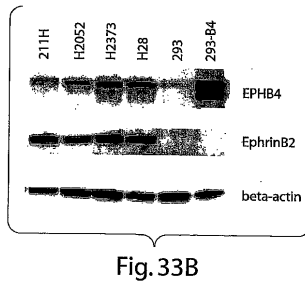


Fig.33B

【図 3 4】

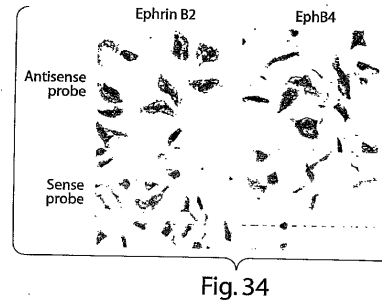


Fig.34

【図 3 5】

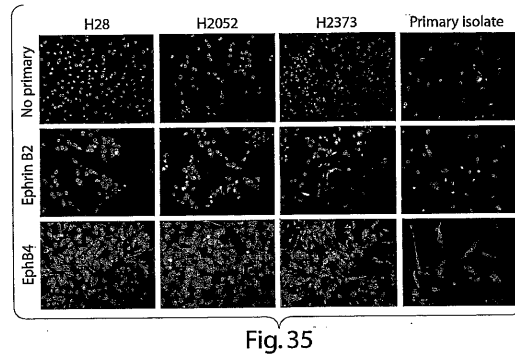


Fig.35

【図 3 6】

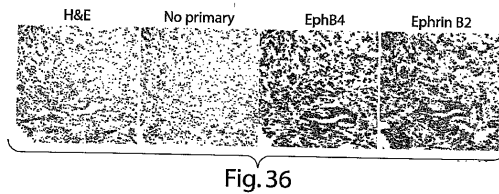
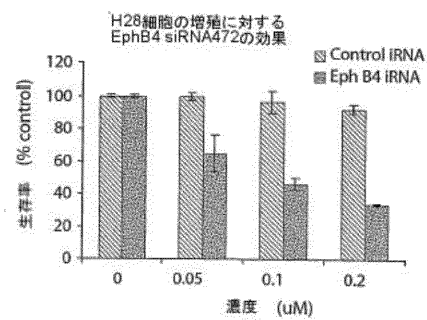
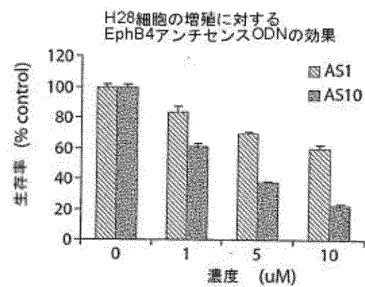


Fig.36

【図 3 7 B】



【図 3 7 A】



【図 3 8 A】

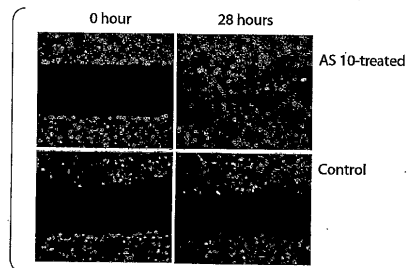
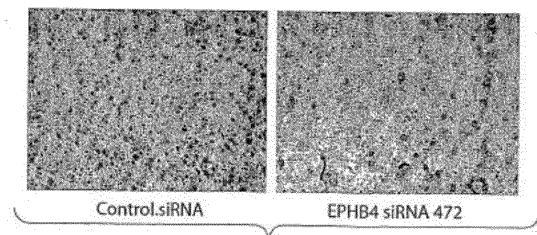


Fig.38A

【図 38 B】

siRNA472を用いたH28の移動についての研究 (Boyden Chamber)



【図 39 A】

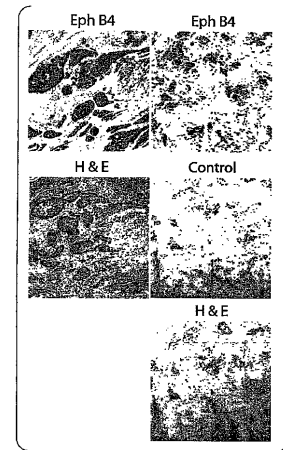


Fig. 39A

【図 40 A】

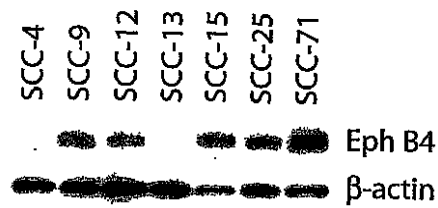


Fig. 40A

【図 40 B】

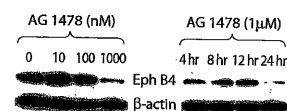


Fig. 40B

【図 40 C】

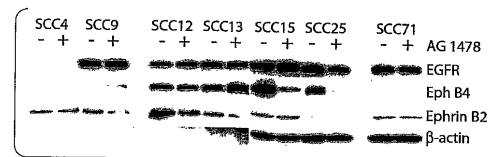


Fig. 40C

【図 39 B】

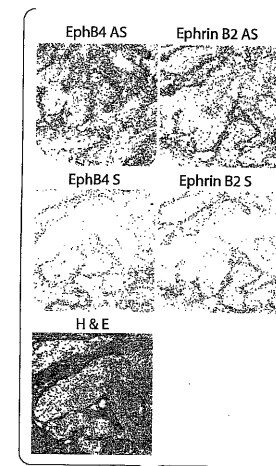


Fig. 39B

【図 39 C】

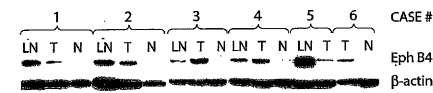


Fig. 39C

【図 41 A】

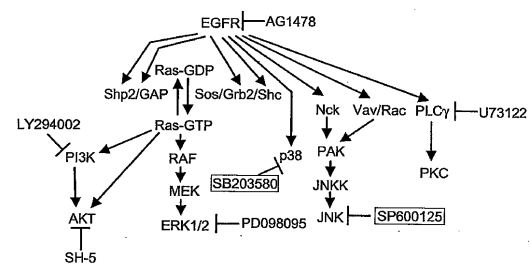


Fig. 41A

【図 41 B】

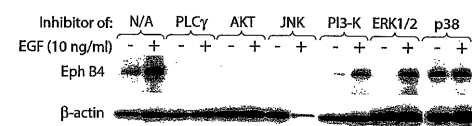


Fig. 41B

【図 42 A】

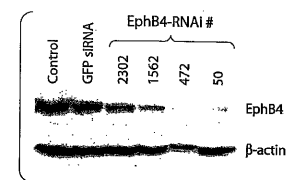
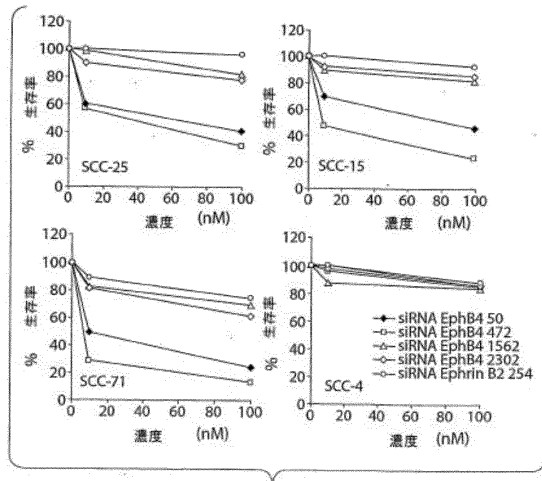


Fig. 42A

【図 4 2 B】



【図 4 2 C】

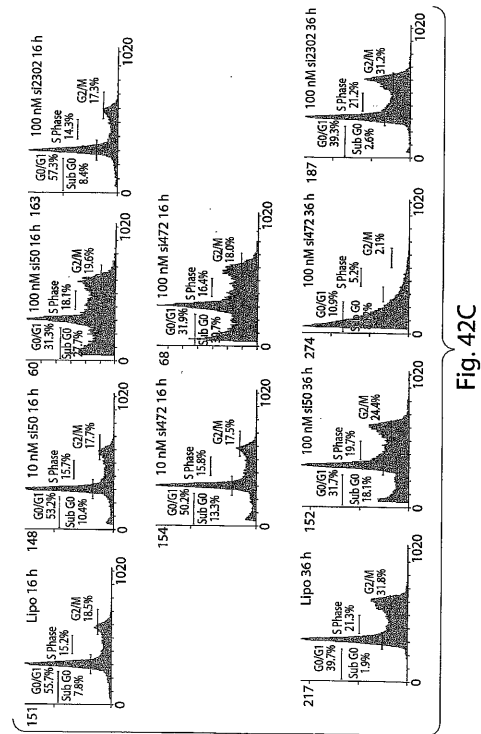


Fig. 42C

【図 4 3 A】

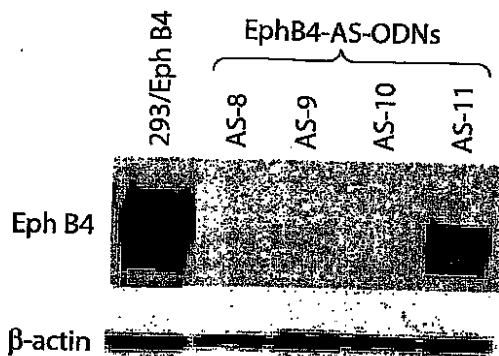
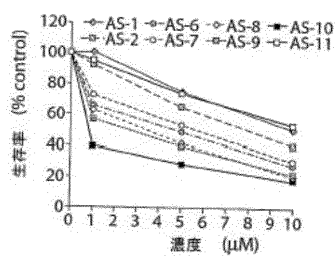


Fig. 43A

【図 4 3 B】



【図 4 3 C】

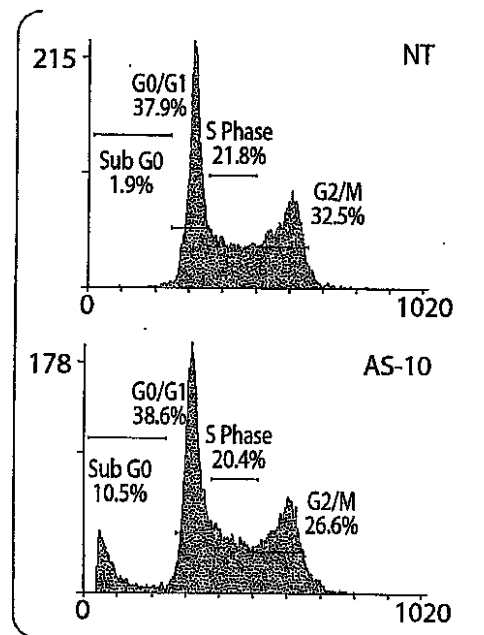


Fig. 43C

【図 4 3 D】

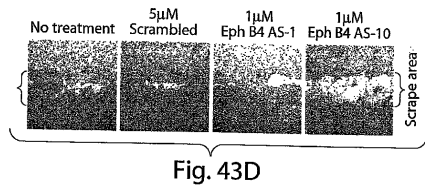


Fig. 43D

【図 4 3 E】

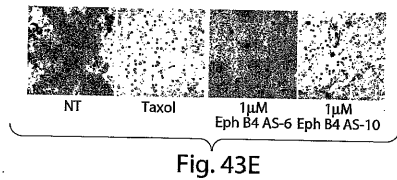
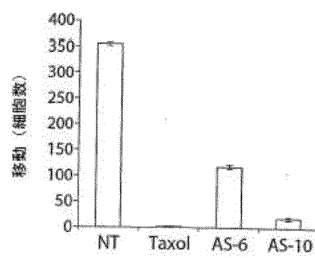
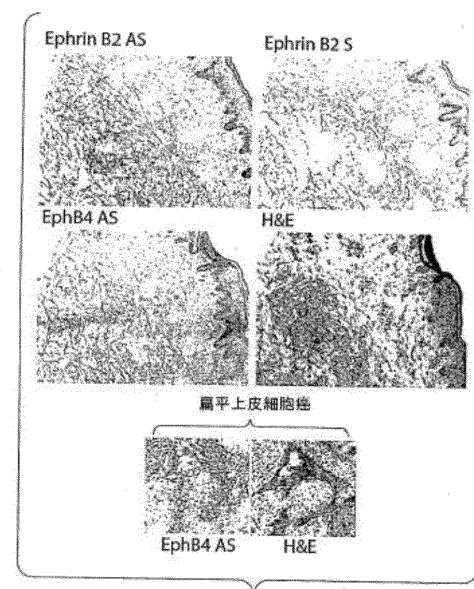


Fig. 43E

【図 4 3 F】



【図 4 5 A】



【図 4 5 B】

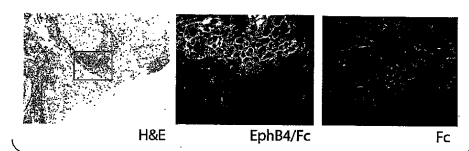
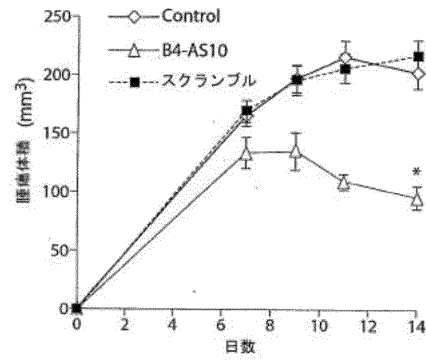


Fig. 45B

【図 4 4】



【図 4 5 C】

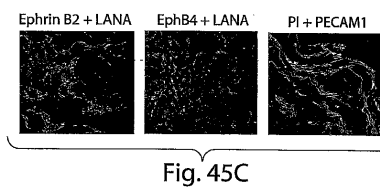


Fig. 45C

【 4 6 A 】

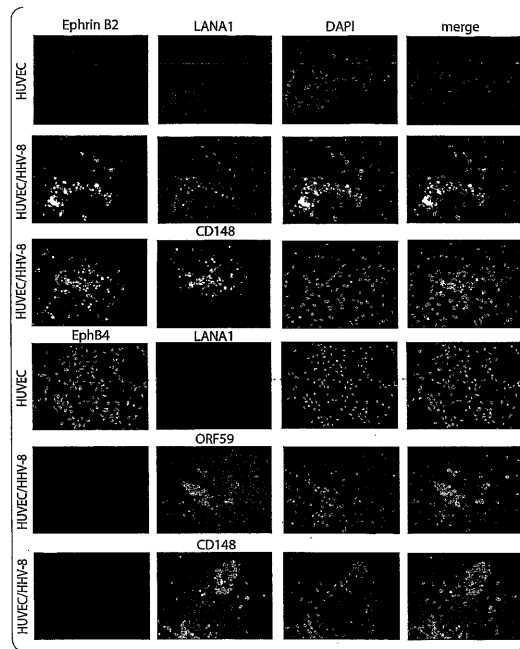


Fig. 46A

【 4 6 B 】

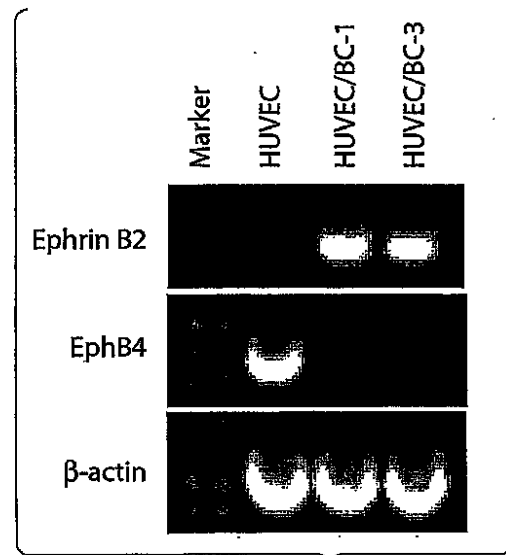


Fig. 46B

【 4 7 A 】

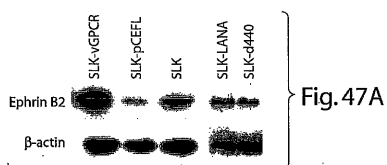


Fig. 47A

【 4 7 B 】

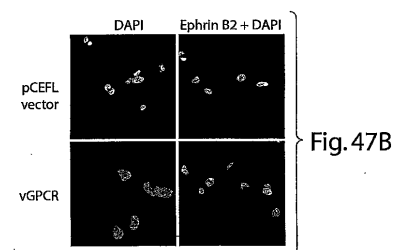


Fig. 47B

【 4 7 C 】

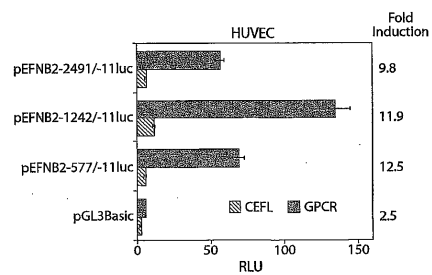


Fig. 47C

【 4 8 A 】

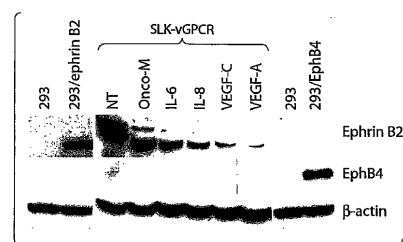


Fig. 48A

【 図 4 8 B 】

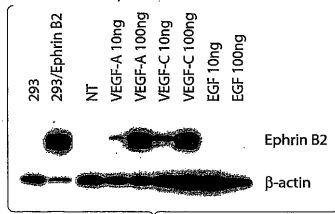


Fig.48B

【 図 4 9 A 】

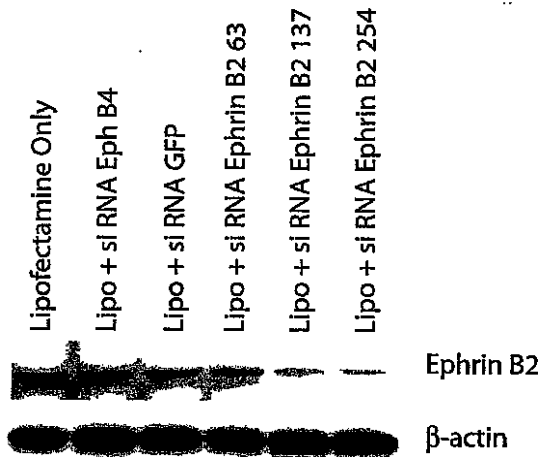


Fig.49A

【 図 4 9 B 】

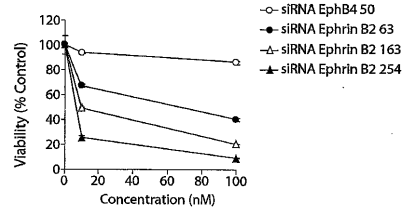


Fig.49B

【 図 4 9 C 】

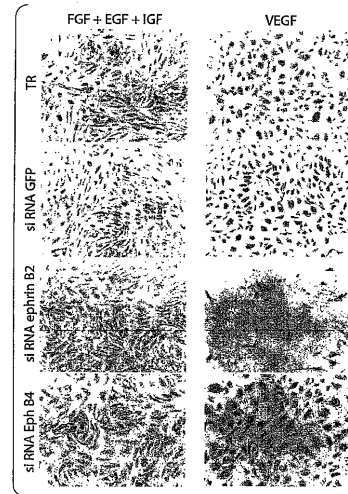


Fig.49C

【 図 5 0 】

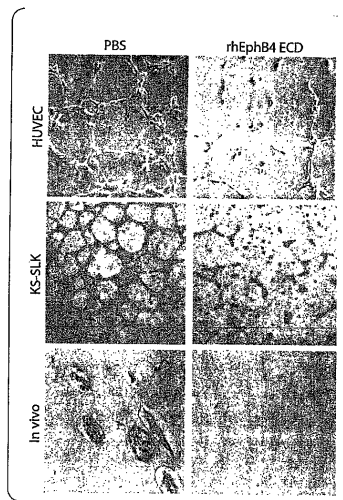
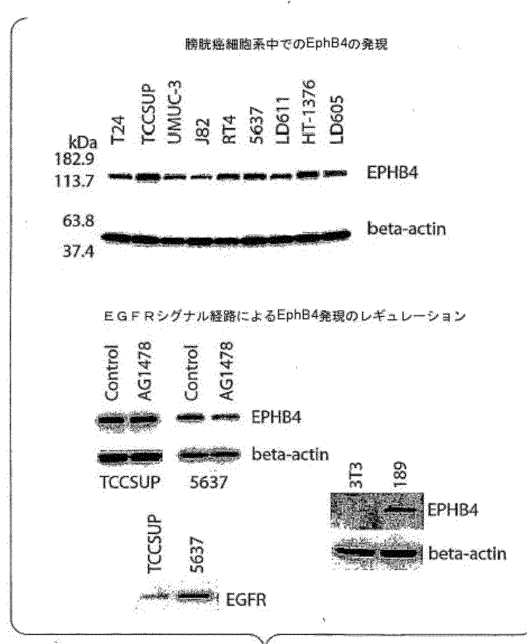


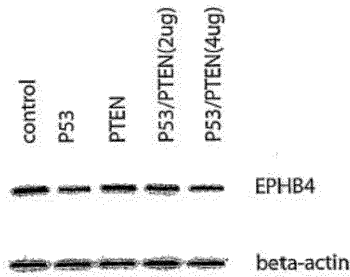
Fig.50

【 図 5 1 】



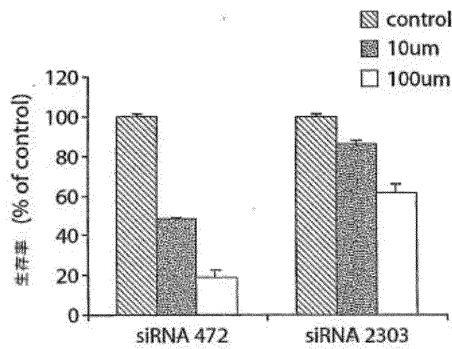
【図 5 2】

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



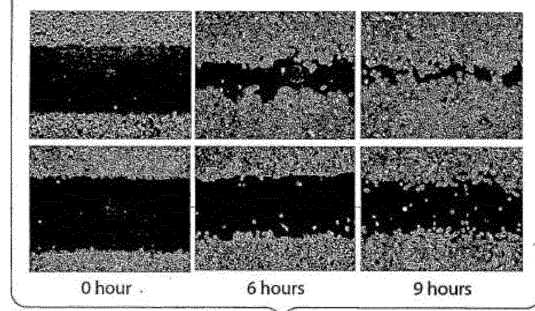
【図 5 3】

EphB4 siRNA 472 での処理による
膀胱癌細胞系 (5637) の増殖阻害



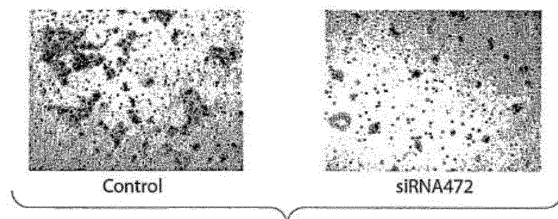
【図 5 5】

AS10 (10 μM) で処理したときの
5637細胞の細胞移動に関する研究



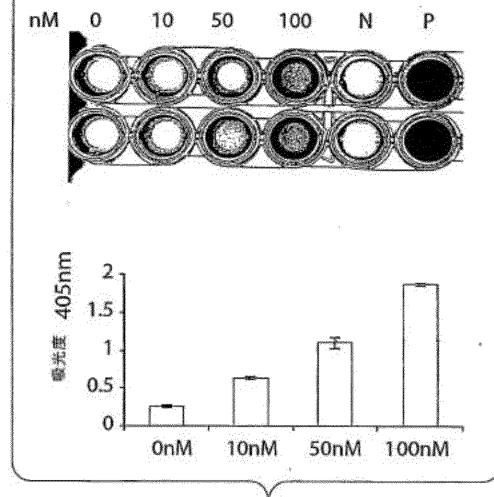
【図 5 6】

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



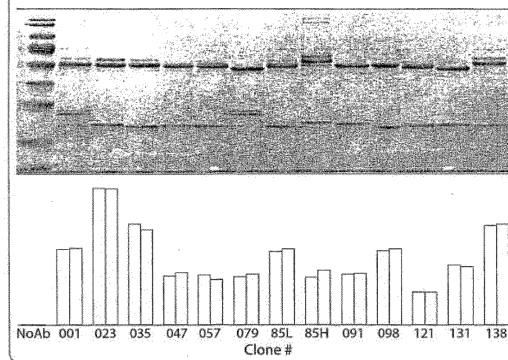
【図 5 4】

EphB4 siRNA 472 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



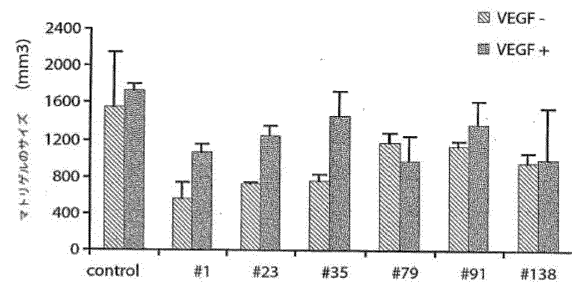
【図 5 7】

G250及びプルダウンアッセイによるモノクローナル抗体の比較

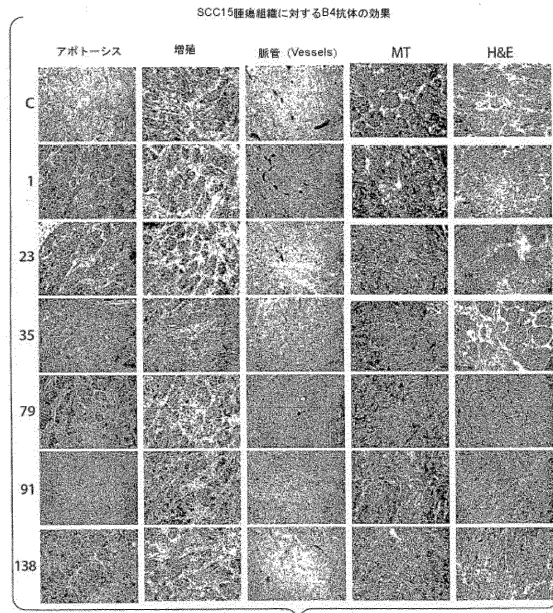


【図 5 8】

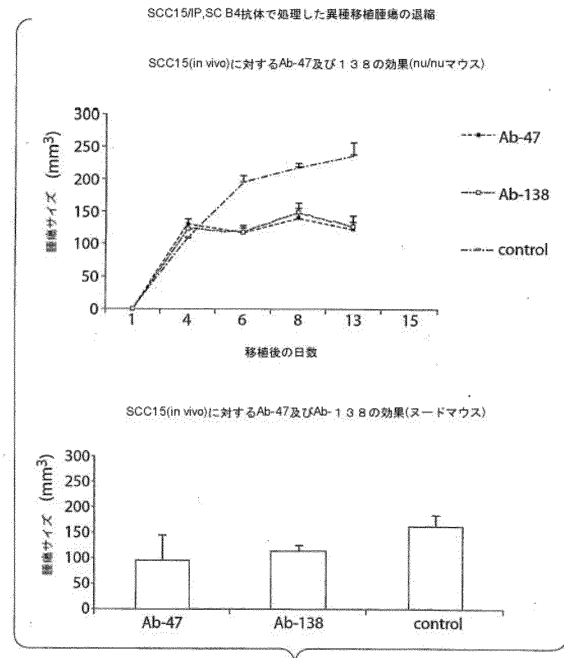
SCC15/MG異種移植腫瘍の退化
(nu/nuマウス内のScc15上の149g 株に対するB4抗体とVEGF+/+)



【図 59】



【図 60】



【図 61A】

EphB4 gene

```

1  ggggttttoat catgtttggcc aggtctgggt tgaactctg acctcaaat atccgctgc
61  ctctgctccc caaaatgctg ggaactacag cgtgagccac cgcgcgcgc acaacacac
121  ttctttttac ttgttttctt gattttttt ctactcccta gcgcagctta gtgcgcgct
181  cctctggaca ttgtttcagg cttgtttggc cgcacagtag gtccccaaca ctgaattgtt
241  atgggtggac ttgttgaaag ttctgttcaa cgttatocaa actgggattg ctctctggag
301  ccctctgggc ggcgtgaaat ttctccaaag cttctacccc ttctctctcc ttctctccca
361  aaacgcagtc cctgcagcca ctgagggggt gttggggcat caatagaggt catctagagt
421  ccgcagagag ctcagagagg cttttgtgtg cgtgttgtaa atttagtgc acgtctgggc
481  ggcctctcgt ttgtgtgtgt ggtgtgtgtg ttctgtgtgt cgtgtgtgtg cgtgtgtgtg
541  ggcctgtccc ggcgtgtcct ggcgtgtcct ggtctgtcct cgtctgtcct cgtctgtcct
601  ccgcagagag ggcagatctg ggcagatctg ggtctgtcct cgtctgtcct cgtctgtcct
661  ccaaatcttc ttctaatctc cgaactctgt cgaactctgt cgaactctgt cgaactctgt
721  gaattattca gtatgtgtgt ctcacatcag cgcgcgcgcg gctacatcgc ggcgcgcgcg
781  cgttggtgga cgtgcgcgcg cgcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
841  ggcagatctc agcgcgcgcg agcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
901  ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc
961  cactctctcc ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc
1021  ggcgcgcgcg cgcgcgcgcg ggcgcgcgcg cgcgcgcgcg cgcgcgcgcg cgcgcgcgcg
1081  cactctctcc ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc
1141  cgcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
1201  cgcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
1261  cgcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
1321  cgcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
1381  cgttggtgga ttgttttctt cgtgtgtgtg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
1441  ccaacacatc ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
1501  cagtcgcgcg cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc
1561  cgcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
1621  cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc
1681  ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc
1741  cgcgcgcgcg cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc
1801  cgtgtgtgag cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc
1861  ccagtcgcgc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc
1921  ccgtctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc
1981  tgcaccccat cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc
2041  ttgagacata ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
2101  acagccacca cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc
2161  attctctctg cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc
2221  agaaactctc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc
2281  cctgtgtatg aagtggttat ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
2341  agcgcgcgta gaaacacatc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc
2401  aagcgcgcgt ttgtgtgtgt ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
2461  ggcgcgcgta cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc cactctctcc
2521  acgaggtgtg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
2581  tgagtggttc caagcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg

```

Fig. 61A

【図 61B】

```

2641  cagcaacgct aagggtgtgt ctattattgc cccatttttt cagatgagga ggcgtggggt
2701  tagttaaggt taagtatttt atccaaagcc cgtgtgcgcg aggaacagcg aggaatggag
2761  gcgaaagcgc aaggagagat agtgactgtc agaaagagga acggaggtgg acagagagtg
2821  gaggagagat agtgagaga catggaactc gacagatcaa agcgtggctg cagatgagtg
2881  gggagcgcga aaggagcgtc ggcgtgtgtc tgggtgtggt acagagcgcg gcagagagag
2941  ttgttaaatg ggaagacgga aaactatctc cgcgtgtgaa caatggggg ttgagagagc
3001  agccttatct cccccccttc ccagaccccg ggcacactgt cccagtgagc caggtgtgtc
3061  ttgtgtccac catgtggacc ttgcgcctct caactcaggg ttggtgtgtt ccaatctgac
3121  ccttagctgg aggcacatct ttgtgtccca ggaagagcgt ggcacaccca cccattttct
3181  cttctctctc gacagtcaca tgggtgtgga gccaggttgt cgtgtgtgtc ttctcaactc
3241  ttccagcgcg caatgtcccc cactatgccc gcccgcaggg ggcattctgt accctctctc
3301  ctccactctc cactgtccag ggcgtgtgaa ttctttctaa ttcccccctc ttctcagtg
3361  cctgtctctc ccccccagta ttgcagccaa gccaggttgt ttcccccctc ccaattctac
3421  cgcgcgcgcg aatctctctc cctgtgtgtt cccataacca aatccagatg ttgaggtgtg
3481  ggcgcgcgcg ggaacaccca gcatcgcgac ctcagtgct ttctgtatga ggcagctgtg
3541  ggcgcgcgcg tactgtgagt ggcgcgcgcg ctatgtccca ggcagcagga ggcctctctc
3601  aggaaggaag ggcgcgcgcg ttgtgtgaa agcagagagg ggtctgtgac aggaatgaa
3661  attgtgtgtg agagagcgtc attctgtgaa ttgagcaggg aaactgtgag cgtgagcaa
3721  gagggtctcc ttccacacca gcagcctctg cctgtgtgtg ttgagcaggg cgcgcgcgcg
3781  taatttttcc cctttctgtg cgtgcgcgcg ttctctctcc caatctgtat cctctctctc
3841  cctccagcga ggcctagatc ttggtgtatcc caagggagcc cactgtctac cagatgtgtg
3901  ggcgtgtgtt ggcacttagc agaaagagcc agaaatcagg cgcgtgtgaa ggcgcgcgcg
3961  ttgtctctcc ttgcccctcc aactctctc gctcagatgt aagagatccc accgtctctg
4021  gttccacagg atctgtgtct cgtgactctc cctcccccac cagagcagtg actgtgtctc
4081  ttgtgtgtct ttgcagaccc ttgtgaaacc aaactgtgaa actgtgtatc tgaatgtgtg
4141  gacattctcc caggtgtgag ggcaggtgtg agcgtgaccc aggaagctga cgtctgtgtc
4201  gaaactgagg gaggagaggg ggcgtgtgac ggcgtgtctc ttgtgtgacac ttctctctcc
4261  ttgtctctcc gatgagagga ggcgcgcgcg ttgtgtgtga ggcctctctc ttctctctcc
4321  cctgcagcga cagcagcgcg cctctctcga ttctctctcc ttctctctcc ttctctctcc
4381  ggcgcgcgcg cctgtgtgag ttccacaccc cctgtgtgac cctctctctc ggcagtgagg
4441  aggaactgag cgcgtgtgag ggcgcgcgcg acagcgtgag caactacgaa ggtgtgtgag
4501  ttgcagcgtg cgcgcgcgcg ggcgcgcgcg ttgcgcgcg ttgcgcgcg ttgcgcgcg
4561  cgtctcaggt gtagcgcgcg cgtgcgcgcg cactgtctga cgtgcgcgcg ggcgcgcgcg
4621  cgtgcgcgcg cgtgcgcgcg acctcagcgc ttctctctca ttgagagcat ggcgcgcgcg
4681  cgcgcgcgcg cgcgcgcgcg ttgagtgaga accctctact caagtgactc ggcgcgcgcg
4741  aggcgtcagc cagcgcgcgc ggcgcgcgcg agcgcgcgcg cgcgcgcgcg ggcgcgcgcg
4801  cagtgtagtg ggcgcgcgcg ttgcgcgcgc ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
4861  ttgagagagga aggcgcgcgc cctctgtgag ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
4921  cgcgcgcgcg ggcgcgcgcg aggcgcgcgc ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg ggcgcgcgcg
4981  cactgtgtgt cgcgcgcgcg ttgagtgaga ttgagtgaga cactgtgtgt cgcgcgcgcg
5041  agcgcgcgcg ttgagtgaga ttgagtgaga ttgagtgaga ttgagtgaga ttgagtgaga
5101  taactgtgtt cgcgcgcgcg ggcgcgcgcg ttgagtgaga ttgagtgaga ttgagtgaga
5161  cctctctctc atctctctca cctctctctc cctctctctc cctctctctc cctctctctc
5221  ttattttttt ttattttttt atatttttaa aggcgcgcgc ttctcagttac cagaggtgtg

```

Fig. 61B

【図 61C】

5281 ctctaactcc tgggoccaag agattctctc acdctcggcc tcttaaatgt ctgggattat
 5341 aggcactgag cactacagcc ggocctaatg taactttataa ctctccagag atcactatcc
 5401 cgcctgtctc ttgactctga ggtcaaggcc tggcactggg tcaagtgtac taaatgtttg
 5461 tagaagaagt gaataaaag ggggagaggt cagagccaga ggcccggaat atcgagaggat
 5521 otttgcaagg ctgaatggac agtctggggg ccctcagaaa gtgtgcctcg gggaaagtgg
 5581 agggaaagatt ctgaaacagg aacaaaggag tcccgaggag gtgagctggg aagaacacaa
 5641 cagctgcctg ggtctccagg gactggggag agcagcgggt tgcctccccc ccgccggcag
 5701 gtggacacag tggccggcga gactctcaac cggagacgac aggtctggtt ctactctggc
 5761 aagggtgaat tcaagacgct ggcctcggga ccctcagaca aggtctggtt ctactctggc
 5821 ttccaggacc aggtgtgctc catggccctg ctatccctgc acctctctta caaaaagtgc
 5881 gccacagctga ctgtgaacct gactcgatct ccggagacgt tgcctcggga gtgtgtttgt
 5941 ccgctggcgg gtacgtgcgt ggtggatgct gctcccccgc ctggccacag cccagccttc
 6001 tactgctgct aggatggcca gtgggcccga cagccggctc cgggtgcgac ctctgtctcg
 6061 ggggttcagg cagctgaggg gaacacaaag tggcagagtg agagctggag ctctccctgc
 6121 gactgtgct catccggggg agagtctga actccactca ggacccaatt cttaagtctc
 6181 cattttgtat agttagatgt tgaattggag gctgtctctg tcccccagc tggagtgcag
 6241 tggcacaaat tctgtcaact tgcacacctt gctcccgagg tccctgttca agcagtcttc
 6301 ctgcctcagc ctctgagta gtctggacta caggcaacag ccacacacgc cgcctaattt
 6361 ttgtatttta cttagagagc ggtcttgcga actccactca ggacccaatt cttaagtctc
 6421 ctgaagtgtat ttgcgcgctc cggctcccca aagtctctgg attacaggcg tgcctaccca
 6481 caccacagct gaaaaaaaaa agactttatt tccactgaaa attcattaat ttaacttga
 6541 aattccacct gcaagtgtag caggacactga cactctgggc ccattggaaat caaggttatt
 6601 gcttgacaca tgggtctaat cccatagctc cagcactttg agatgcacag gtgggaggat
 6661 caacttgacc caggagttcg agatcagctc ggggtgacga gaaagacccc gctctcaaaa
 6721 aaaaattttt tttttttttt aagacagagt ctgtctctgt cgcocaggct ggggtgcagt
 6781 ggtgcagctc cggctgcctc caagctccgc ctcccaagtt aacacacatc tctgtcctc
 6841 gctcccgagc tggagtgagc taacaggccc gacacacgct ccggttaatt tctgtattt
 6901 ttatgtaga tggagtttba cugtggttag caggagtggt gctgactgct gaactatga
 6961 tctgcccgcg tgggctccc aaagtctggy gattacaggt gtgagccacg aacacccggt
 7021 taacaaaact ttgtgagta ctctgggg gactctgctt acacaatggy agaaacccgt
 7081 tctctactaa taataaaaaa ttagcgagc atgtgggggc atgtctgtaa tccagactga
 7141 tggaggcgtt gggcgagctc aatctttga acacaggagc cagaggttgcg ggtgaacgca
 7201 gcttagtcca cgtctccctg tctgtggagt gaactccaaa aagaagaggtt tctgctctt
 7261 tggccacgca tggagtgagc tgggtggatg taactccaaa gcaactccca cctcccggtt
 7321 ttagcgagct ctccctgcct agotcccca ggaatagctg gattatagat tatgcatagt
 7381 caacacaggc ttttttttta ttttttagt aggcaggttt caacatgtt ggcacagctg
 7441 gtottgaact caagtgtatc gctctctctt gctctctctt caggaaaaaa aaaaaatcac
 7501 aggtattacc aggtcacttc aggtgccaaa agattgtttt ctctctctct cactctgaat
 7561 tcaacagatt tagagagatt gctgtctatc gtaagaagag aagacacaaat gttgtgttag
 7621 cccaaacttt ttctctcatt ttctaatga ttactgttca attggttttc ctgtgttagc
 7681 tatgtatttt gtggagtgct tttaaaacta taagtgtgag tagaggtctt tctgtgggtg
 7741 tcaacagact ccgagatgca aggtgtgag atctttttgc cattttccca ccttagcact
 7801 cttttctctc ctgaagagaa aggtttttg atctttttgc cattttccca ccttagcact
 7861 tcatcagctc taaaagaagc tggattttt tttttttttt ttggagatgy gactctgata

Fig.61C

【図 61D】

7921 tgggtgcagc gctgtgtttg aaacccctgg ctcaagagat cctccagcct cagcctccca
 7981 aagtgtctgg attcgagcca tgaagacagc agccacagct gaaagtgtat gttttgtgtc
 8041 atgtgtttga tgaatgtctt ctctctctca gctgtgtccc aggtgacact caagccctgc
 8101 ctaggagagc ggtctgtcca gcaatgccca gccatagcgc actctaaaca catgtgtcca
 8161 gctgtgtccc agtgcgcgt cgggtacttc cgggcacaga cagacccccc ggttggaaca
 8221 tgaacagta agtgcacagc acccaggtgc agtctcaatg gggaggggtc cagactctgc
 8281 aggttggaac tcaatggccc ccaatctccc ctgggtctct cctgtgtgtc ctgtgtgtc
 8341 ttgtctcctg cccggaggaa natgtggagc ccaatctctc caagggaaga gctgcagctg
 8401 gctgtgtgtg cctcaatgct cctctcccca ccaacccaga caggtgtggc ctgtctgtg
 8461 ctccctgtgc tctgcagccc cctccctggc cctccggagc cgtgtgttcc cgcctgaagc
 8521 gctctctccc gcaactggaa tggagtgcgc cctgtgagtc tgggtgcgca gaggacacca
 8581 cctacgctc cctgtgcggg gagtgcagac cccggagctc ctgtgtgccc tgggggggag
 8641 acctgacttt tgaacccggc ccccgaggac tgggtgagcc ctgggtgtgt gttcgaggc
 8701 tactctctga ctcaacatct acccttgagg tcaactgact gaacgggga tctctcttag
 8761 ccaaggggcc cgtccacttt gactgtgca atgtcacac tgaactgagc ggttgagact
 8821 gggggctggg cgggtgtgtg gctgtggcgg agagatgtca ctgagggct gaaggaggga
 8881 ggcaggggct gtaagtgtg gtaacccgga agtgtgaggg cctaaaggct tggggccaag
 8941 aggcagaaag agggcaatgg ctggggcagc tggctcagcc ctgtaaccc agcaattcca
 9001 gagggtgaga caggcgatcc acttgagccc tggagtctca gacacgctg gyttaacatg
 9061 gaagtctctc ctacaaaaaa taaaatatt atgcagagca ggtgtgcat gctgtgtgtc
 9121 ccagtaactc aagaagctga ggcaggagga tctgttgaac ccaaggtgtg gtagctgcag
 9181 tagactatga tgcacagctc gactgcagc ctgggtgaca gacagctgtg agatctctc
 9241 tcaaaaaaaa tgaataagaa agagaggggt agagagctgt aaagctggcc tgggaggtta
 9301 agtcaaggaa ggcocccagt gggactgggg ccagagagga tcaagagaaa tctctgaaac
 9361 agccaggggc aaattgagac aagtgtagcc agacagagaa ggttgagaa agataaggga
 9421 catgcccagg ctgatacaca ggtcaggagt caggacatag cctggccaac gttgtgagc
 9481 ccaatgtcta ctaaaaataa aaaaattagc caggcatggc ggttgagact gttactccac
 9541 tgggaagca accagaaaga tggcttgaac agcagagcgt ggggtgtgac taagtgtaga
 9601 ctggccactc gcaactcagc ctgggtgata gaggacagc gctactgtca aaaaaaatt
 9661 ttttttaagt taagggaagc agtaccagc caaacaggct cctgtgtctc ctgctctcca
 9721 cagtactccc tgaagtgtct gacatccgag tgaacggggt ctaacccagc agcttagacc
 9781 tggcctgggc tgttcccggt gcaacccagt gggctgtgtc ggaactagag gtaataaac
 9841 atgagaaggt aaggccatcc agcagccctg ggttgggtg cctggaggtt gttgtctctc
 9901 ggttgaggca cctgggtgtg aggcacctg caggctgttt aatccagct ctgcatgtga
 9961 tctccctagg agctctgggt aagccctggt gctgtgtgta gctgagact ctctctctc
 10021 aaaaagtta ctgtatagat taacagcagc tggacacagt ggttgaggtt ggtgtgtgtg
 10081 gctccagctc gtaatacaca gcaacttggg agcctgaggg gggcgagagt ctgtgacctc
 10141 ggggttttag accagctggy gcaacttggg gcaacttggg gaaactgact ctctataaaa
 10201 gggccggggc cgtgagttca gacacttggg ccaagcagct tggggagctg agtggggcgg
 10261 atccaaaggt caggagttac gacacatccc tgggttaaac ggttgagccc catctctc
 10321 aaaaatacaa aaaaatagcc agcggcggtg gcaaggcgtc tgggtccagc ctactgggga
 10381 ggtgtgagga ggaagatgg tgaacccag cggcgagcgt tggagtgagc cagagtagc
 10441 gcaactgagc tccgctgctg gcaagaagac aagactctgt ctccaaaaa aaaaaaaa
 10501 aaaaaaagc caaaaatac taaaatgaa aaaaataga ctgggacag tggctatgc

Fig.61D

【図 61E】

10561 ctgtataccc ggcactttgg gaggccagag ttggtagAAC acctgggggt aagagttoga
 10621 gaccagctgc gcaacaagag tgaatcccc tctctacta caaatgcaa aatcagctga
 10681 gctgtgttgg gggccctgct aatccagctc actccagag ctgagacagc agaatcaactg
 10741 gaacacagct gactctcagc tggagtgtga ggtgcaggtg agtctgtttt gcaactctgc
 10801 attccagctc gagaagatga accgtgtgct taaaaaaaag gaatgatatt atgaatacag
 10861 caactagctt cagctgtgaa gttctccaaa agaacctccc agtgcagagc caggctagctg
 10921 tgggtgttgg agggcgaggt aaggagcag gaaagacaaa aggaacttgg gttcccggtg
 10981 gaccgcccac caactacttc cggcgagctg tggggcggta gttcccggtg cgtgcgggtg
 11041 ctgaagcagt cgaacaagcc ggcagcagc tggggcggta agcggggagc cagctcaactg
 11101 gctcaggtac gggccgcttc tgaagcggc tggggcggta agcggggagc cagctcaactg
 11161 cagacacacac tgaatgtga cctgtgggga ggggtgagc gtgggggtg gaaagacccc
 11221 caaagtcttc agtgcagccc caggtgttcca agtccacata actttttttt tttttttt
 11281 ttttttgagt ggaagtctgc tctgtctccc agcctggagt ccaatgggac catctccgt
 11341 cactgcaacc tgcctccccc ggtatcaagc caatctctgc cctcagcttc ccagtagct
 11401 gggattacag ccgcctgcca ccccgctgca cgaatttttt gttattttag tagagacggg
 11461 gcttccagcc gtgcccagc actgcttga actccagc tgtgtgctgc ccgcctcgg
 11521 cctccagagc tttgggagt acaggtatga gttgtgctc cttaacttgc taaccccagc
 11581 atgtctcttc tctgtggtt cactgtgcat gctctagaga ggaagagac taagattagt
 11641 aaaaacaaac caacagctga gttttgtgaa gttgtgctc cttaacttgc taaccccagc
 11701 ctggagagca gttgtgtgat caaagctcac tgaacaccca ggcacagtg ctaacccctg
 11761 aaccccagca ctttggtgaa ctgaagcagg agtatcact gaggtaacga gttcgagacc
 11821 agtctgacaa gactgtgaaa accggtcttc taactaaaa atagaagta gttcgagctg
 11881 gttgtgcaac cctgtatccc cagctactgc ggaagctgag caggagaaat cgttgacac
 11941 tgggaggttg aggtgtgagt gactgtgagt tgtgcagct cactccagcc tgggcaaac
 12001 agcaagactc tttgtcaaaa aaaaaaagc taacccagc cttgactttt agcaacacac
 12061 tgaacccctga gttccacttt cccactccca caaatggga ataatatga gttcttgcga
 12121 ggggtttgag gattggaggt aacaggttat ttttaatat gtaggcagc ggtttctttt
 12181 ttttttttca atttttttt ttgagagga gttcactct gttgcccagc ctggagtgctg
 12241 gttggcagat ctccagctac cgcagctccc acctccgtg ctgatctgc tgaactctgc
 12301 atccacccgc cctggctccc cgaatgctg ggaactgctg cgtgagccc cagcccccgc
 12361 ctactttttt ctttttttt agagacagc tttttttt caacccagct ggaagtgcgtg
 12421 ggaacaccca tagctattg cagctacaaa ctcccgagct caacacatc ttccacttga
 12481 gctccacaaa gttgtgggc tatgtgctg tgcacagct ctcaactaaa tttttttt
 12541 gtttttttgg agaacgttc ctatgttgc ccaagctgtg ctcaacttc tgaactctga
 12601 caatccccc gactccgct cccaaagctt ggtgattaca ggcagtagcc gcaacaccca
 12661 gcaatgggac agtgccttcc taaactgtg aattttctg aatgacttta ctgaaataca
 12721 gttccctgct gttactaaa gctgttcaa agtttcaa ctgatctt tgatactga
 12781 acaagattgt cagtagacca ccaacagtaa ttttgagca ttttcagc cctcaaaaag
 12841 gacactatgt gactgacca tcccccacca cccagact tctgttgcct tagctccag
 12901 caagcaotaa cccactttct gtttgaat ctccagat gttctttgt gactgttcc
 12961 cagcagaat ttttttgaag ttlatgtatg tttgtatga tctccgtggg tttttttt
 13021 tgtgtttgtg tttttttt ttttttgaag aggttctgc tctgtcacc aggtggagt
 13081 gcaagtgttc aattacag cactgcagc taaacccc aggtccagt gactccagc
 13141 cctcagcttc ccaagcagc ggaactgtg gactgacca cactgcccac ctaattttt

Fig.61E

【図 61F】

13201 tttgtttttt ttgtaaaag aggttttcc catgtttccc aggtgtgtct cgaactctgc
 13261 agctcaagga atccacacac ctacgctcc caaagtgtg tgaattacag catgcccac
 13321 tggacctggt cgtgtttttg tttttgtttt gaacacaga tttgttttgc caccagcgc
 13381 tggaaagtga tgggtgtgac atagtgtcat gctgttca acctctggc ccagctgct
 13441 ctctacatc agctcctga gttactggga ccaacagctg taacacacat gttgtctca
 13501 tttatttat tttttgatg agacggggct tgtctatgt tcccggtgct gcttgaca
 13561 cctgtctcca ccaactctcc caactcag atctacaggt gttgtgata cagcatagc
 13621 ccaactgtcc tggcaaat ttoatttct tttatgaga gtttaaatc agttgtatg
 13681 aatagtga tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt
 13741 ttgtaaaaa actgaataat gtttccact tagaacctt cactgaaagt agatttttt
 13801 gttgagctg ctattttac tgaacacaaa ttaaaacac ccaactgact tttttttt
 13861 aggtgtgtt gactgtgac tgcacacac gttgaaac cactctact aaaaatagc
 13921 aaattagc agactgtg taaacacac taatccccc taactagag ctaactgac
 13981 gagaatgca gaacccggga ggcggagatt gcaatgact gactgtgac cactgactc
 14041 cagctgtggc gaaagagta gactgtgtc caaaaaaaa caactgact tactgtgca
 14101 gtaagaaaa atttcgaac tttctctct gctgtgagt acttagagc agctgtgtg
 14161 cccctggggg agattttgaa accactgtt ttttccctga cctgtgctc tttgtctc
 14221 tctctccac tgtctctct actgtggac tgttctctg agatcagc taattgtca
 14281 aagccggggc tggggctccc taacagacca tgaatttct cgtatcaga cacttctct
 14341 ccagagagc cggagggctg cgggagcagc tggccctg ctggcgccag cgaatgtgtg
 14401 gttgtgtct gttctgtgt gttctgtgt tgaactgtg tgcactgt ctgctgactc
 14461 gacacccaga ggcocctgga agcctcagc tgaatgccc cctgctgggt gttcagagc
 14521 aagcctttct ggtgtccccc agcctcttt tacttgaat ctctccact cctgtctct
 14581 tctttgtgt tgtgtgctc ataaagatg gttcagact ttaactttg tttcttccc
 14641 atggctgca ggaagacag caatgggaga gaagcagaat atcgagaca acagagagc
 14701 tatctcagc gactgtgtg gttgcccac tttgagga agtgggctt gggcgaggc
 14761 gttgtgtgct ctactataa tccagcact tggggagca gagggtggca gatcactga
 14821 gttgagagc cagagagc cttggccccc atgttgaac tcaactctca taaaataac
 14881 atcagtagc caggatgtt ggtgggacac tgaataacca gactcactga cactcactga
 14941 gaagaatca ttttaaccc ggaaggggag atgtcagta gcaagagat cgcactgagc
 15001 ctccagcct ggttgacaga gacagactc atctcagga aaaaaaaa aaaaaaaa
 15061 accacggaga cagggtttg ggtctaaa atgtgagcc agcctccagc tccagtgga
 15121 gtttaaccc agtgcaggg cccctgctc atttctgag tactaagtc tactagacc
 15181 cttacttca tgaagacct aatgagctg tgaaggaat tgaagagag atcatgtct
 15241 cttacttca gattgaagc gttgtgtgt aggtgagag ccgaagctg cccgggccc
 15301 tgggaagca ggggggtgt ggggggccc actgagagc gaggagctg gactctgag
 15361 tctgtttgt aggtgtagt tggcaggtg tggcggggc ggtccagag ccagctgagc
 15421 aagagagct gttgtgcaat caagacccc aaggtgtgt cccagagc gcaagcggc
 15481 gatttttga ggaagctcc catatggg cacttgagc accccaat cagactgagc
 15541 gaggcgtgt tcaacacag catgcccct atgatctca cagagtctc gggagacgc
 15601 gctctgact cctctgagc cttgtgagc cttctgagc cttctgagc cttctgagc
 15661 caacttacc cagagagcca ctgtgttaa gaagacaga cagagagct gttccctga
 15721 actcccca gcttttctc cttgggtgaa cctgtgttc tctgtctt ctcttttga
 15781 aagagagcc tctgtgtgt gcccagctg gactgagct ggcgactcc ggtcactgc

Fig.61F

【図 61 G】

15841. tgtetocacg toacaggttc aagocattct cctgcctcag tctocacagt agctgttact
 15901. atagagcatgc accacacatg tgactaattt ttgtattttt agtagacaca ggggtttoac
 15961. atgtagagaca ggtctgtatc aaactctctga cctcaagtga tctocococa toagctococ
 16021. aaagtctgtg tattacaggt gtgagagcac agcctctggcc agcctctctg cttattattt
 16081. cctctctgga aagctgtggt cctctgtgga cctctctctg actcctccat acagctgaag
 16141. gtgtctatct cttctttttt tttttattt ttgttttaatt gaattttttt ttttttgagt
 16201. ggagttttaa ctttctgtgc agggcgggg tgcaatggca agatotttggc tcaocogaa
 16261. ctocgctocg caggtttoaag cgtattctct gctctagcct cccacagtag tgggattata
 16321. ggcattgtgc accacgcttg actaattttt tatttttagt agagagcggg gctctctgt
 16381. gtgtctgagc cgtgtctctga actcctgacg toaggtgctc cgtctctctc ggcctcccaa
 16441. agtctgtgga ttacagaggt gagcacaocg gcccgcccaa tttttttttt ttttttttaa
 16501. gacagagctc cactctgtcc tctagctgtg agtgcagttg tgcattcata gctcactgta
 16561. gcttctgact cctgtgtctc agtgcattct cgcctcagc cctctagta gctggaaota
 16621. cactcactga ccaacatgct cagcaattt ttaaaattt ttgtagagac aggtactoga
 16681. taggttgcac aggtctgtct gaactctggt cctcaagcga gctcctctc tcaogctccc
 16741. acagcactgg gattgcagcg atbgacact gtgcctggcc tgcattctct tcttttgaca
 16801. aatatttact gctcatttca atgtttgcca ggtctgttct agtccccagc aataaagota
 16861. tacacacgag aaactggatt tctcctctgt gggagcagag ggtctaatgg ggcaggggga
 16921. ctgaaaaata goaagttaat agacagctgt ttaaaaaag taacaacatc atttcaaatg
 16981. tgaaaaaaag caaacgggtt cctctatgca gatgtggcta gagaggaagc agaatctggt
 17041. aattttattg tgcactttac cagattttac tgaacttttt ttttttttta actttattaa
 17101. cgtttttctt tttcttgaga tggagtcttc actctgcacc caggctggag tgcactgtgt
 17161. cgttctgtgc tcaacgcaac gtccacctcc tgggttcaag tgaactctct cctcagctc
 17221. cctgagtgcg tgggaatgc atggcatgca ccaacatacc cagctgatgt ttgtattttt
 17281. agtagagaca ggggttctac atgtttgcca ggtctgttct gaactctgtg gctcaagbta
 17341. tcaacacatc tgggctctcc aaagtgtggt gattacagcg atbgacacac atgctgtgoc
 17401. taggcatctt tttaaaaaaa tcaaaactt ttctatgta gcaaaataac attgcatbta
 17461. acagagttat agcgattccc tagctctatt gaataccacg ttgattttta cgtttctota
 17521. gttgtttota agagtctctt cactctgtct ttatctaac caggatcagc tcaacagcga
 17581. ggtttgttgc cgtgttatta tataattttt attattattt tttagaaaaa aggtctgtgc
 17641. cctctgcaca gtttagagc aggtgtgtga atcatagctc cctcagcctc ccaaatctct
 17701. tggctcaggt gatctctctg cctcagctgc cgtgtgtggt ggaatacagc gtgcacacaa
 17761. ccaacacggg ctcaattttta aattttttac ggaattgggg ctctcgtatc gtgtccagc
 17821. ctgtctcaca actcctggagc taacagctgc ctctcctctt aaactctcaa agtctgtgga
 17881. tcaacgggct gatgcacacg gctcgtctat tatttattt tggagctctc ctcaactttg
 17941. agcagctctc cagctcagcga gctcagcagc agaggtgttg cctcctgtat cctcagctat
 18001. tcttgaatgc tggatttagt aaattctctt tctggatcga tttagctgtt cctctgtat
 18061. tctctgaaga agagctcota cctgtgtgtg ggtttttttt gttttttttt tttttttttt
 18121. gagatggagt cctgtctgtg cccagctgtg atgctagtg ccaactctgc gctcactgca
 18181. actcctgcg cgtctgtctga agagattctt cctcctcagc cctctagta gctgggaata
 18241. cagcgaggtg cagactgcgc cagctaat tttgtatttt agtagagaca ggggtttaac
 18301. atattgtgca ggcagctgca gaactctgca cctctgtatc tgcocacac cctcagctctc
 18361. cagactgtct ggtatcacag catgagcacc tatgcocggc taatttttgtt atttttagta

Fig.61G

【図 61 H】

18421. gagacagggc ttgcctcagt ttgcacaggt gatctgaac cctcggctcc aagcactoca
 18481. cctcctctgt cctcccaagc ttgcctcagt aaacagctga gcaacgtgc cttgtctgaag
 18541. agacagaaag ggttttaagc gttcagtgac acacacatct aatccagc ctttgggaag
 18601. ctgagctgtg ttgatacact gaggcacaga gtttagatgc accctgggca acatgtgaa
 18661. acccgtctc tacacaaaat acaaaatgg cagagacatg attgtgata tctgtctaac
 18721. cagctactgc gggagctgag cggggagagt cacttaagcc tgggagatag aggtctagt
 18781. gagcactatc tgcactactg cactcagcc tggggagatc catctcttaa aagagagag
 18841. agatgggaag accagcacag gtgaactgtg tgaacagagg agagatgta gatgtgcat
 18901. tgggagctgt gacgggaacc cgtgtgagg ctttggcagg agagatggtt aagagatc
 18961. cagctgggca cagtgctcga cactgtgat cccagcactt ggggagcgc gggcaggtg
 19021. atcacttgag gtcagagatt cgagacacgc cttggcaca tggtagaacc ctgtctgtac
 19081. taaaaataca aaaaacagcc aggtatggtg gtcgacccct gtaactccag ctactctgac
 19141. gactaagaca ggaagatgc ttgaactcag gggcagagg agagatcctc ctcaaaaaa taataataa
 19201. gcaactttac tcaagcctgc gcagtagagc gagactcctc ctcaaaaaa taataataa
 19261. aaagacactc ttgtctgggt gctaggagc aagagcagga gctggagagc cctcagaca
 19321. gaagctgtgt gcaagcctcc aggcctgtg gttgaatgga agtgcctgtt gaggagagaa
 19381. tcttgggaag atcaacagca gaactgtgt atggatgga agtgcctgtt gaggagagaa
 19441. aggggttcaa aggaactctc gaggctata cctgaccat cttggcaagt gttgtgtgc
 19501. caaaaactga gggggagta gggcaggtg aggtctggag ttgtctgga aaatctaggt
 19561. ttgtgagctc atgtcctgtg ttctgtagg cctcagatgt ttgtccaat cttagcgaa
 19621. cccagataac gggatttgtt tactgtctgt gaactgtgtt gactctgtt cactcagat
 19681. tctttaaagc tcaagttgtg gcttcagac ttgtgttttt caccagatc ttgtctact
 19741. gcaatctcct actctctctc tgcacacaa cactgtgta gctcagagat agtgcagc
 19801. ttgtgtgtg gatcagcacc aatgtatct cactgtgta cgggtgtct agtgaacta
 19861. tgcctgtat cccagacact tgggagcga aggtgggaag attgtgtgag gcaagaggtt
 19921. ggaagcagc cttgggaaca cagtgagac ccatctacac caaaaaaac cttgtgttt
 19981. aatgacagc ttgcagtggt gtcacactat agtccagct actagaggc ctgaggcaga
 20041. aggtactttt gacgcacaga gtttaaggt cgggtgaacc atgataagc cactgcactc
 20101. caactctggg gaaagaaga gactgtgtc ctaaaaaac taataaacg aaagacttt
 20161. gttgagttt tctcgggtat aaagcaggtt accaggttaa atggaagaa aagtgtaat
 20221. aatttttcaa ctcaaatctc gatgtggga gactgagtc ttacattga agcggaac
 20281. atgtgtctgt tactgtgagc aagagctgag aaactctgg aaaaagaaa
 20341. gttgaagca tcaactgagc gatgtggggc gctgcacca caggtgagtt gtaggtggg
 20401. actggaagca acagatgcag tttaggaagc gggcagagag cttgtctagc gactcaac
 20461. ctgttaacc cagtgctgtt gggagacacg cgggaagat cgtctgaagc caggagbta
 20521. agacacgct ggggaacata gttgggaact atctcacta actataaaa aattatcga
 20581. gcaatagtc aatgctatc ttgtcagct actcagagg cttcgtcag cccagaggt
 20641. tgaagctga gtagcatat atggcaccac tgcactcag cctgggcagc aacacagac
 20701. cgtgtctcga aaaaaaaag atgtggagc gagggggac ggtgtgtgg cgtctctac
 20761. aaagcccca cctatctgc tctcagata aacagcagc agttccact cctcagctc
 20821. gttggcatgc ttgggggcat cgcctcggc atgctgtaac ttgcagagat gactcagtc
 20881. cccagacac ttgtctctg caacatcta gctcaacaga accctctctc caactgtct
 20941. gaacttgcc ttctccgatt cttggagagc aactctcag atcccaact cagcagctcc
 21001. ctgttaagc ttgggggtaac actgggtgt agctcttagc ggcaggtgg gaaaggcag

Fig.61H

【図 61 I】

21061. ttggaagggt gggagctga ggttttggca gctcctgc agggagagga tacagagaga
 21121. ggtctgtggt ggggggacag tcaagctcagc gaagcagact tcaagatgc taggaanaaa
 21181. acagttggat accctgggca acatgacagc acccactctc tcaaaaaa taaagatt
 21241. agcagagcgc agtgcctgc accctgtatc cagctactt gggaggttga ggcagagga
 21301. ttgtttaagc accctgagtt gaggtctgag tagctatga atgtgccact gtaactgca
 21361. ctggggcaga gagcagacg cgtctctcaa agaacagtg caggtgtgtg tggctcagc
 21421. ctgttaactc agacttttg gagctgagg cagagagatc gctctgaggt agagtttga
 21481. gacacagctg gccacatgta gaaaacactg tgcatactaa aatacaaaa ttactgtgag
 21541. gttgtgttga agcctgttaa tccagagatc tccagagagc gaggtaggag aacacgttga
 21601. acccgggagc cggagtttca gtcagacagc atgcacacac tgcactccaa cctgggcaca
 21661. cagagttgga gagttagag cttgggctgt gactgtgagc gaaaaagc aggcaggtg
 21721. gggagctggg ggcagctgtc tgggtgtgtt gctcctcga gtagctccc cagctcactc
 21781. tttctctttt ttctgctggc aggaagactt cccatccgat ggaactgccc gggagcactt
 21841. gctctcaga agtctactc cgcagtgat agctggagtt accagagctt gatgtgggag
 21901. gtagtgcac ttgggggagc gctgtatggt gacatgagca atcagagctt aagtgtccc
 21961. tggctctaac aggtttctt caggtgtctt cctcactggg atttgggggt aaggttgggt
 22021. tccagagagc tcaactcgc tgggtctgt agacacaga gctgacaaa agagagatg
 22081. atctttgtat caagaggtgt agatcacagg cagcgcctag ttgctcaca ctgtaatcc
 22141. agcacttggc gagcagagc tgggagacat acctaagttt aggtgtcaa gacacagctg
 22201. gccacacagc tgaacccgct tctctaaaa aatacaaaa atagcagc catgatgggc
 22261. ggtgtcgtc atccagcct actcagagag ctagacagc ataatgctt gaacacagga
 22321. acagaggtt cagtgagctg agatcagc atgtcttcc agcctgggca actgagcag
 22381. actctgtctt aataaaaaa taaagaggtt ggttcagca ttttgggtc gcagagagat
 22441. gcagagagtg agggcaggtt tgaaggttaa catgtctgta tcaagacca agagctgctg
 22501. gggcctcag cccagagagc cctcaactcc ggttagagag attcctggt ctgttattt
 22561. ttggggggtg gttgctcta tctcaactc tccaaagta ccatctcttc gggctgttag
 22621. catcttgtt ttctctggc agcctcactc agagctctt cctctcttcc caggtgatac
 22681. atgcatgga acagagactac cggctgccc cgcococaga cgttccacac tccctccac
 22741. agctcattgt ggaactgtgt cagaagaacc ggaatgccc gccocgttc cccaggtg
 22801. ctacagcctt ggaacagat acccggaacc cgcocagctt caaatctgt gcccgggaga
 22861. atgctgggtt aggaactgag gaagtggcc cctctccgc ctctctgccc cactctctg
 22921. cccagagtg tctgttaatt ggtgttgggt ggggggct cgttccgct cgcacaggt
 22981. ggttccac tctctccgc gaactgggct tggtaactgc catctctcc catcttgc
 23041. cccaggggc tcaactcctc tccgggctg gggggcct cactcactag ctttctgtc
 23101. tggggggg tggctcggc ccaataaaa ggaagagatc gaagaagtt tgcagcgc
 23161. tgggttggc tctctcagc tggctcagca gatctctgt gactgaagc tggcagagc
 23221. tgaagtggt cctcagagc gggcagctg gactgaagc cagcgggtat ccaagggct
 23281. tgggtggtg cttgggtgc caatgtctc tcttgcact ggcctatgc cctgcctaga
 23341. agggccagc agagagactc aagcctcact ggaagtagg acccaagc actttgggc
 23401. cagctcgc gctcactc cctctgcat cagacccgt ggcacccgc cctcgcctc
 23461. tcaactctg ctactctgt gactctat gacttccag cccgctctc acggttaaca
 23521. tgtgttaact cgggtctctt ttttccac aataaagag aagattggc taggtttgt
 23581. agatctctt cagctttat gttgaattgt tttatgatc cttgctccc aaagcctgc
 23641. tatcccaact tggccttgt ctgatactc cctctctgc cttccgctc cctccacag
 23701. atctctctc acccaggtt gaatacaga aataaagga atagaactc gaagcggg
 23761. catggtggt catgctgt atgcacac tttgggagc caggttggc agatcactt

Fig.61I

【図 61 J】

23821. aggttaggag ttgcagacca ttgtggaca cttgtgaaa ccttatgtc actaaaaa
 23881. caaaaatag cttggcatg tttgtctgt cttgaacc agctcagc gagctgag
 23941. cagagagatc gttgaacc gggaggttga gtttgcagc agcagatgc gccacactc
 24001. actcagact gtagacaga gtagaactc atctcaaaaa aaaaaaaa
 24061. aaatgtgac gtagagagc gtagctgagc gtagctgagc gtagctgagc gtagctgagc
 24121. gtagagagc cttgagaca aaatgtgagc gtagctgagc gtagctgagc gtagctgagc
 24181. cttcaaaaa ctaaaatgagc gtagctgagc gtagctgagc gtagctgagc gtagctgagc
 24241. ctaacagga gtagagagc agaggttctc agcagactc agcagactc agcagactc
 24301. gtagagact ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc
 24361. ttttctctc tctctcagc tcaagcactc agcagactc agcagactc agcagactc
 24421. tctctctc ctaactatc ttttctctc ctaactatc tctctctc ctaactatc
 24481. cagactcctc ctaactatc attttggg ctttctctc ttttctctc ttttctctc
 24541. ccaagcaca agcctgctc tctctctc ctaactatc ctaactatc ctaactatc
 24601. gtagctgagc ctaactatc aaaaactc ctaactatc ctaactatc ctaactatc
 24661. ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc
 24721. gtagagagc gtagagagc ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc
 24781. ctaactatc atcagagc ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc
 24841. ctaactatc ctaactatc agcagactc ctaactatc ctaactatc ctaactatc
 24901. gtagagact gtagagact ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc
 24961. gtagagact ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc
 25021. gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact
 25081. aaaaactc ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc
 25141. gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact
 25201. ctaactatc gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact
 25261. ctaactatc gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact
 25321. attttgggtt gtagagact ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc
 25381. gtagagact ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc
 25441. gtagagact ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc ctaactatc
 25501. ctaactatc gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact
 25561. gtagagact ctaactatc gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact
 25621. ctaactatc ctaactatc gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact
 25681. gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact
 25741. tttttaaagc gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact
 25801. gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact
 25861. gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact
 25921. tttttaaagc ctagagact gtagagact gtagagact gtagagact gtagagact
 25981. ctagagact ctagagact ctagagact ctagagact ctagagact ctagagact

Fig.61J

【図 6 2 A】

EphB4, mRNA

```

1 ctgggcccggc gggcgcgagc agagccactc caggagaggg gggagacccc gagcgccggc
61 ctoagccccc gcaacccccc gcccggacccc gagggcccgc agggacccca actccagccca
121 cgtcttctgt cggcgcgcgc cggcgcgcgc actgcacaga cgtctcgggc ccgcgcgcgc
181 cggcgcgcgc acagacgcgc ggcacacactt gggcgcgcgc ccggctgcgc ccgcgcgcgc
241 catggggccc cgtgcagggc ccgcagcagg agtcgcgcgc ggaatctcgc cgtccacccc
301 cccagggaga cctgcagactt gggggggcag ggcccacaa actcagctgc gatccacccc
361 gagtgagggc ggcgcagcca gctccgggtg ctgctctctt gggctctctt ggcgcagctc
421 ttgggaagaga cctgctgcaa cacaacaaat gaaactctgt atctgaagtg ggtgacatcc
481 cctcaggttg accggcagtg ggaagaaact agcgcgcgtg atgaggaaca gacacagctg
541 cgcacactag aagtgtgtga cgtgcagctg gcccggggcc agcccccact gcttcgacaa
601 ggttggtctc cagcgcgggc cgcgcgtccc gtgtgaccca cgtctcgtct caccatctgc
661 gagtgctctg cctgcctcgc gctggggcgc tctctcaagg agacactcgc cgtctctctc
721 tatgagagag atgcgcagac ggcacagccc ctcacgcgag cctggatgga gaacccatcc
781 atcaaggttg acacgggtgc cggcggagcat ctcacccgga agcgcctctg ggcgcagggc
841 accgggaagg tgaatgtcaa gaocgtcgtt ctggcagccc tcagcaagggc tggctctctc
901 cttggccttc agaacacagg tgcctgcatc gcccctgcat cctgcacact cctctacaaa
961 aagtgccccc agctgactct gaacctgact cgtatccccc agactgtgac cggggagctg
1021 gttgtgctcc tggcgcgtag cgtcgtgtgt gatgcgctcc cgcgcctctg ccccagcccc
1081 agcctctact gctcgtaggc tggcagcttg gccgaacagg cgttcacggg ctgcagctgt
1141 gctccggggg tcgagggcag tgagggggaac accaagtgcc gagcctgtgc ccagggcacc
1201 ttcaagcccc tgcagaggga agggctcctgc cagccatcgc cagccatagc cactctaaac
1261 accaattgat cagcgcctgc cagctgcgcg ctggggtact tccgggcaag cacagacccc
1321 cggggtgcat cctgcacccc cctcctctgc gctccgcgga gctgtgttcc cgcgcgtaac
1381 ggcctctccc tgcacactga atggagtgcc cccctggagt ctgtgtgccc agaggacctc
1441 acctacgccc tccgtcgcgc ggaagtcgga cccggggagc cctgtgctcc ctcgggggga
1501 gaactgaact ttgacccccc ccccggggac ctgggtgagc cctgggtggt ggttcagagg
1561 ctacgtctct actcactcca tacccttgag gtaactgcat tgaacgggtt atctccttta
1621 gcaacggggc cgtccactt aatgtcaca ctaacgcaga ggtacactct
1681 gcaagtctct acactcgggt gaacgggtcc tcaacacaga gcttgagctt ggcctgggct
1741 gttcccccgc caccacgttg ggtctgtgtg gactacagag tcaaatacca tgagagggc
1801 gccagaggtc ccacgagctt ggggttctgt aagacgtcag aaaaacgggc agagctcggc
1861 ggcctgaagg gggggccacg ctactctgtg caggtacggg cgcgcctgta ggcgcgtac
1921 gggcctctgc gccaggaaca tcacagccag acccaacttg atgagagcga gggcgtcggc
1981 gagcagcttg cctcgtatgc gggcagcggc ctgctgggtg tggctcgtt cctgggtggt
2041 atgtgtgtc cagttctctc cctcaggaag cagagcaatg ggaagagagg agaatctct
2101 gaacaaacag gacagtatct cctcggacat ggtactaagg tctactatga cctctcact
2161 tatgaagacc ctaactgaggc tctgagggaa ttgcaaaaa agatcgatgt cctcctacgt
2221 aagattgaag aggtgatttg tgcaggtgag ttggcgagag tctgcggggc ggcgtcaagg
2281 gccccaggga agagagagag ctgtgtggca atcaagacc tgaaggtgag ctacacggag
2341 cggcaggggc gtgagttctt gagcagggcc tccatcatgt gccagtctga gcaacccaat
2401 atcctcgcgc tggaggggct ggtcaccacg agnactgcgc tcatgattct cacagagttc
2461 atggagagag ggcgcctcga cctcctctgc ggtgtaaac agggacagtt cacagtcatc
2521 cagctcgttg gcatgtcggc gggcagtcgc tccggcatgc ggtacactgc ctagatgagc
2581 taagtccacc gagaactgac tgcgtgcacc atctagtcca acagacactc cgttgcaaaa

```

Fig. 62A

【図 6 2 B】

```

2641 gtgtctgact ttggccttcc cagattctct gagaggaact ctcccgatcc cactacacag
2701 agctcctctg gaggaagatg tccatccaga tggactgccc cggagccact tgccttcggc
2761 aagttcactt ccgcacagta tgcctggagt taocgggagt tgcgtgggga ggtgatgca
2821 ttgggggaga ggcgcactgt ggcactagac aatcagagag tgatccaatg catgtaacag
2881 gactaccggc tgcccgcgcc ccacagactg cccactcccc ccccacagct catctgggac
2941 tgttggcaga aagacggcaa tgcocggccc cgtctccccc aggttggtag cgcctcggac
3001 aagatgactc ggaacccccc cagctccaaa atcgtgtaac gggagatggc cgttcggctg
3061 caccctctcc tggcagacgc gcaactccac tactcagctt ttggtctctg ggcgcagctg
3121 cttcggggca tcaaaatggg aagatagcaa gaaagtcttg cagcgcgtgg ctttggctcc
3181 ttgcagcttg tcagcagcat cctctgtgag gactctctcc gaatcgaggt cactctgggc
3241 ggaacaccga agaaaacttt ggcagctgtc cagcacatga agtcccagc ccagccggga
3301 acccgggttg ggaacaggag acccggcccg cagtaactga ctccaggaac tcccacccc
3361 agggacaccc cctcccccatt ttcocgggca gactggggag ctagcagggc cccacgccc
3421 gtcocccgct ggaatgcaat ttagacccgt ggggtgagga gttgcaatt tggagagaca
3481 ggatttgggg gttctgcat aatagaggag gaaaataccc ccccagccc cctgggggac
3541 tccagaccaa gggtaggggc gctctccct caggacgtgg tbtgacaga ggaagagaa
3601 gttgcccaca tctcccagcc tcccagggt ccccactcac cttgtagggt gcttcccgc
3661 agacacaa gaagtgtact cctctgccc cctcagagtg ggggggctgt cccagggggc
3721 aagaagggtt gtcagggccc agtgacaaa tcatgtgggt ttgtactccc aactgtctg
3781 tgcacacccc aaactcaatc attttttccc cttgtaagt cccctcccc agctcgtccc
3841 tctaatatga aggtttttga gttttgttt ttgtcttaat tttctctccc gttcctccc
3901 tgtttcttgc tttgttttt ctacgctct tctataaact ttgtgttga ggaacactt
3961 ttcaactatg cctcctttgc ccaagtga acagggtgac atcactaac tttgtctcag
4021 aacagtctct tggctctccc acatcccgc acccggctgt ggaaccccaa cgtgtctct
4081 atgaagggtt gttgggtgag gtatgaaa gggcgtagt tgggtgtga accagaaa
4141 ggaagcgggt gcttgtaggt gttttaaact tatattaaa aagtaactt ttgtataaa
4201 taaaagaaa tgggaagctt cccagctcca ggggt

```

Fig. 62B

【図 6 3 A】

EphrinB2 Gene

```

1 ggcgcctcga gctgctgctg ggcgcagccc gttctccccc ccagctctgc ccggagagatt
61 ggggggtccc gctcgtgctc cgtcagctcc tttctggccc ggaagtgcgc gagctgggag
121 ttgcttctgc atgctgttga gaaggagctc cgtgtggaag tactgctggg ggttttgat
181 gtttttatgc agaatcgga ttcccaaatc gatgatttta gacgtatctt attggaattc
241 ctgcgaactc aagtaagtg gctcccgcat cccctatgtt cccgcgcgcg ggttcocgoc
301 cgcgcctcgc tcccgcagga gggctagctc cgggggcctc ggaagctggt ttgtgaaact
361 cgttctccgc gcccacaccc ccaacccccc ccccaattta ctaggtggag aactcctgct
421 cggctttcca acccgagccc cgtcgaagc gacggtctct cgcgccttcc tcccocaaac
481 gctccacagg cttcaaaagt actatcgtt cgggtgtcaa gtcocgggaag gttctgaagt
541 gcatcactgt accctctctt gttttcgagg acgaagagca tggccacaaat ctaggctgac
601 cggcagcggc cgtcgggaga gctcgggaga gctcgcacac tgcggggagc gggggagagc
661 cgggggggct gctcgggggc cgcgcggggg ggcagcgggg tggcagagag cttgcagcga
721 agcgcgtctt gggaggggga gctcggagtc cgcgcagcgc cttggagcgc cttggagcgc
781 ggcgccttgg cagcgcgcgc cagcgcgcgc ggtgcgcgc gagctcgcgt gcttcgcagc
841 agaatccggc cgtcgcgcgc ttccctcgcg gccggggaga cgggccttag gctctcctc
901 aggggcgcgc cgcacccgct cctccgcctt cgttataag cgtgtagccc cggagtatgc
961 gctctgatg gcgcagctga ttgataagca ctctcctaaa aagcttaggg cctgcgcagc
1021 tgcgaactgc tctgaagccc tctcctctgc ggaacctggt aggaatggga tctctagagt
1081 cagatttgtt ctacccagac tctacgcgag ggaagcagag aggcctgtgt gagagttaat
1141 ttcagtttgt gcccacagag tgcattcaga attagaaaa tccatccact ccttaaatct
1201 gttgtggtcc acactagatt cactcgtgta tgaatgactg tttatccctt tacttgtaat
1261 cagacgcaaa acatatttta agaatctgtt caattgtagt ctgggaaac ttggagaaga
1321 agtatgaga catctagtg tttctggaga aaagtcttga gatccagagc aaatccatgt
1381 gctcaattga agttgagcaa gttggggcgt gtttttagag aaagaatgt ggggattgat
1441 ttagaataca cgtcttaaa ggtgtgtctt attctcttaa aagttcnaac ttcaaatc
1501 actaactagt taaccaagaa tccctctatg aaaggggaga aaagctggtt tacaatccg
1561 tttaacaaaa tttgttgtat atgctagaag gcaacttcaa cagcgcctat agggagaagt
1621 tacttagctc tgctcctctc catgtagtct gcttttgat ggttatatt tttaagttaa
1681 atgttgttat ttgctgatg agtaactgag cgcgcctatt tgcataatg ccgctcggg
1741 agcgcgcagg tggctgcgga agggcgcggg ctaggacctc ggcgcagcgc ggttcocgga
1801 gtcocgggga ggcgcgcggg cgggcgcagg ggtcgcgggg agcgcgcggc ggcgcgcgc
1861 gcccggtgcc tccagaggtc actctctcat cgggaatcgc ggaagcagag gctcgcgcgc
1921 tcccacaggc cgcctcctcc agccactctg caatttcaat gacgggttct ctttgaggct
1981 gttttttttt ttcttatgag gatttaatat ttctgtttaa acttagtga aagcaatcc
2041 gttagctctt toaggtttta gttctgtgtg tttcttctta totttgctgt atattaact
2101 ttagttttgt ttcttatgag gatttaatat ttctgtttaa acttagtga aagcaatcc
2161 agaaacatag ttatttcaac ctaaggttta gacttaata acttcttttt gtaattgttc
2221 gagatggggg gctcgggggg gaggtagaac gttactcaaa ctcocccccc cactctgtat
2281 gatgaagatg agtctgctct tccagctatg gtaacacctg cggagggcct ggtttctgtg
2341 aagcctgcgc ttgctgcgct cgtctgtctt gctgctgtct tgtctccaaa agcagactt
2401 ctttttaaat tctcctgata acgctcgcct cggagtactg gataatgtgt gctcggaaaa
2461 ggtctccctt gctcgcgact gctgactcca gagataagaa agattcttc ctttaggaga
2521 cataggaaag agtctctctt aagtttttga gaatgctaac aaccccttga tgcaggggg
2581 togcttctct tgggggaagt ttatatttat tccagagga aagtttgat cgttaaatat

```

Fig. 63A

【図 6 3 B】

```

2641 gatgtggcag gaagtgatc aaatgcattg aagtttccaa toagttctca tgaactgttg
2701 acaattctat ttgtaatga gccgcacata gtaattagat ttgtttatc cagagctcag
2761 ctttttttag aggtgttga cacaaggagc atgcagagc ttgttggata caggtctcag
2821 aaaaacccctt gtaattcag cgtctcctga actactttaa tccactgttc caggtctcag
2881 cctcgtactg tatgtaataa ttgaagagtg tctcgtgtgc tgaacacgta gctcgtcgt
2941 taggttatcc acattgcttt gatacgtctt ggtagagttt ggtcgtgtgt agccttttg
3001 gttgttttaa gttttgttt tttttttttt ttttttttaa ttcagcagag aacagtaag
3061 cctagctctc gtttttaact taacacttca gtgaacaaat tttttccag agggagatt
3121 tggcctaaat aagtagtgg gctctttttt aaaaaaaat taatttact ttaagtgtg
3181 caaatctgta ttgttatgt gttctgaaat gtaactaac cactttgaa attctgctg
3241 ctaatgctct atgtctggt ttacactcc cgtctgcaaa ctaactgctt gtttaacata
3301 gcaatttgtt ttccactagt aattttttcc ctataataa ctgactctct gatactatc
3361 gacttgatac aaacagatg ctgagatgta tccagacata gtataataa cgtgctcacc
3421 ccaatcagg ctctgaataa atcacacct gtcagagat gatataataa actcaatgg
3481 atagtctgt taaacagtc cactcaata ctataataa cagactgccc tccactgtg
3541 tctgaatct atttttttg aggttaacaa atgcacatc agcactgatt gaatagcccc
3601 ttgaactatg ctccacagtt tgcgtttggg ttaattgtt cgttttaat atagagaaa
3661 aaaagctcaa agccacggg gttggaattg tagtgtttc acatccaat tccctatctt
3721 ttgtcaggat gataaactg aggtaatgga ctgtctgtgt tctgcagagc aactgagaa
3781 ggcagagcac aaagactaag ctaaacgcat accctcaaac atgtctgta cctctctttt
3841 cagatgagaa ttatttttag atcactgtgt ctagggactg caactcttaa cctcaacagt
3901 taacagctta agcccacaga acaggagctg gaggtaaga ttgatttga agcactggt
3961 tctaaatott ttaacaagca taagctgttg acgtcggttc tgcgcagcca aagcactgca
4021 gatgactcca acatttccag aggtctctga attaagctaa agtgtgtgga caggtgaatt
4081 cgcactgggc ctggagacca gctgtgtaaa aactatgtgt ttgaaatggt cctccagaca
4141 ggtctagctc aagaacaatt ggttgattta tattaatacc tctgtctgt aaactctgt
4201 aggtgcaatc tctggttgtt ggtacagtg gataatggt tctcagtgga cactgcaact
4261 ggaacactaa aactctgtct gtttttctt cctctgaat attccagga gctcccgaga
4321 gctcagatg gaacacaaac ttcggggcac gtttttaggt gogttacact aatgggaaac
4381 tattcgagat cccagcgtga ctgcagtaat gogtcatagc aatggagagt gaaagggaaa
4441 agaaataaca gattgtagc ctaataaaaa aaatttttag gaagatatt tcttttaagt
4501 ttatgagaa ctactctct aaaaacttta atgcaaat agacaatag aagtgctctt
4561 ctaagggaag tgattaaact ggtctcctca tcaagctaat cctcgtcgc cttgtctgct
4621 gacataaga acgtgttttt caggtcaact aataacatc tactagatt ttgattgag
4681 ctaccccttt gttgagcga gttagacct aagagagagt gctcaactg ttaaatatt
4741 ttgattaaaa tatgagaac ctaatagaat ataagctct agtccagat tagctcttct
4801 agggaaacag tcccoccttc tttttaagg ggggaattga agagagctg gggagagaaa
4861 taagaacagc aaagaagaaa ggaatagcaa tgggaactgt tccgaacag cttgaaaaaa
4921 tctgtgtgct tcaattgct tataaagca aagaatacaa agcataagc cttgtaaccc
4981 tctccctatg atggagagt taaacggtg acatgcctcc cgtgttaac tttgttaatt
5041 ctcaatttaa atgacagc atactagcc tgtgaactga gaagattct taagttaatt
5101 atttgtagt tccagtaaa aaacaaagt aaggggtctc acacattgt cttttttttt
5161 taggcaaat acccctgct atagttaa agggagatc accacagat aggtcttatt
5221 agatgtgat taaactaag gcagagtata aagaactga tcccttttga ttgaagtata

```

Fig. 63B

【図 63C】

5281 gtaaaaggc atagagaac tagcagcagt aatctgattg tatggcaata aaacccacat
 5341 tttctgtctt toagataaaa ataattgtgt aaatccatgc agttoaag atgtaaaggc
 5401 agataaaggg tgaagcctgc gaaacacata gactagcttg atgttagaaa tgacagctct
 5461 ctgaaaaggg cggggacgca aggcctctgc ctccagctgc ttgggcatba tgtgaagcgc
 5521 acacagactt ggaacctggg gaaactctgc atgttagaag atgaaagctc ctgggagtagg
 5581 tgaggcagta aagaanaagc gtccagctctt tgcctatctg ttgggtgataa tatggnaaag
 5641 gtgattttca tgaactgcct tttttataga ttgagatttg ggcctgataa aaactcagat
 5701 cactgcagtt gttagggcct gggagatttt cctttttaac tcoctggcta acagcagcag
 5761 cctgtctgta gatttaactg ctcttcggcg ttgttgcttt aatctatttg ggcctcaggg
 5821 agggacatgc tgggaaggaa cagagaccag aggggcatag tagggctggg gttatctgaa
 5881 aagaacacag agaccttttg atttcagcca tcttttcaag ccacgctccc tctccgctg
 5941 catgggagaa gcaaaagtaa acagagacca tbtccctctc cctccagcca cagagctctt
 6001 ctgtgagttt tgtcttccc acccttgaaa aaagataaaa atacaatttt taaaagggga
 6061 gggaggaatt tagtttaact tcaaatgagt agtaatacca tatgcaaaa gcaatgggct
 6121 ctactagat gtaattttac tctgaatgt gactgtttaa cttgagttg aatggggcag
 6181 gctgttagag gtgggtgaaa ttcacagatt ataaaatgt tagtctgccc cagctttaa
 6241 gtcaaaaagc gaataatctc tbtgtgttg agtcttccc cctctctccc tgaacaacct
 6301 tgtaatgaag ctgagacttt gttttgctc tccatcactt ccaattcagc catatacaaa
 6361 aataagccat tgaacaacag atttggtctc taatcaggtg acatccgcga tcgggtcaag
 6421 ccagaaggaa atactgtctc gattgctccc taattgcat tacaggaag tctccacact
 6481 ttggaagagt tgaactctg aaatgcocaa aaatgcocaa gctgcacaa acactgtgtc
 6541 ttctgtgatg gactgcatct ttgtgtgttt taacaaaggg aatcagtgcc tgttttttg
 6601 ttgtgtgttg tgttttttt ttttaagag cagcaatagg cctcttga cctgttgatt
 6661 ctgtgtctga caaaaaggt catataatga gcaatattat aatttagacc catctoaagt
 6721 attttgtccc aaattctcaa ctgacttgag catctgttg gggctgtaga tcaatggccc
 6781 ttgttgactt tttttctgt tctatggga attacktgag ccaattactat gtactttcaa
 6841 tagactcaaa aatittttta agtattgcat ataggctggc catatccagt ccoctgttact
 6901 ttaactcttt ttcttaactt aatgcagcat tctgatataa cagatccactt aaactgttgc
 6961 agctctatca gagagaggtt acccctgcag ttacaggctg tccatcccca gcaactctgc
 7021 atctcaactt tgaagctgat tgcataaggc ccaatccact aaagctattg ctgtgttaaa
 7081 gggaaagaaa catgataaat gtccagagaa ctgtgtgctc ccttagctt tcaaaagca
 7141 caactgtgca tatttatggc aggcataatg caaaagaaa agctgaattg cctcggctcc
 7201 gactgttcta taactctcat ggttaaaagt gctgttgatg ataaagaaa agcctggctcc
 7261 gttgttttca taactctcat ggttaaaagt gctgttgatg ataaagaaa agcctggctcc
 7321 cagagattat taactctcat ggttaaaagt gctgttgatg ataaagaaa agcctggctcc
 7381 gttataaagt gctgtctcat cacttgatg gcaagggaaa cctattctgt tcttcaagc
 7441 agcaactagc cagtgagctt agattattaa catatttccc tctatgtat aaattcaaa
 7501 atgttaattct agtccaggtt ctgtgtgggc tgtaagcaac atactgtgt atcttaata
 7561 agaaaacata agcaagaaa gctccatcta acagattgtt tctgccttta gtaattctct
 7621 aaacaagata ggaagaaaa gtggacgta gtggagattt aatagtgtgc ttttaacttc
 7681 cctcaaaaga ccagtagata agcttctaaa ctactctgtg gtggcgaac atttagagcg
 7741 ctgtgaaaga ccagtagata tctgcctcta ctactttat ttatattatt atttcttca
 7801 tattgtgttt ttattgtatt attataatta ttattttata ttactaattt atttcttca
 7861 ttttaactct gctgcatcaa attttaatta gacttttgt atctgcttcc ccaactgtgc

Fig. 63C

【図 63D】

7921 tacccacgtc ccaattgcca ctggggcctt atccatgttt tctgtgtaca ccaactctgt
 7981 atcccccagc aataattatg agtgcacccc agacttttga aacccataga gtaacacagt
 8041 ttgtctttga ggaagaccaa tbtgtcttta gcaatttttg cagggttgga tgtgtgttta
 8101 agtggggctg gtgcagctcc ttattgtctg cctattctac tgttgttccc atccacatt
 8161 cctctggggg caactaacct gtgtgcatag caagaatttt cgcacttcca agcaggaag
 8221 tttttctcca ttgatctctt ccaagctagg gtattatgtg atgaattata atcctgtctc
 8281 ttccacaccc ttactctggg ctacacatgg ccaataaaca ttgtccaga atcagaattg
 8341 tctctagagt gactggggga agcacaatcc tgttccagac cagctgagaa tgcacttag
 8401 tgcagaagaa gttagaaggt gctatctttt acttatctac cagaactata ttgaggttag
 8461 attttagatt taaaaaaaaa ccaagttctc gttagccttg aatccccccc ttgtatggg
 8521 aaaaaggatc attattataa tggactgtcc atctaagttc atgattttcc ctgacatgt
 8581 tctctctctt tatgacatg atcaagagtg atctctttaa gtctttttct cataatccca
 8641 cagcactttg taacttagat taactagaaa gaacacatca caggttagct catgattgat
 8701 atgcaagcct tccacactct acctgtctca aaagttaggg acacaccttc tctattctat
 8761 cagtcctctc tctctacag catggcctc cagtaagtat tagtgaatg gacagacac
 8821 ccgaatttgt gctgatggca gtttaacctg ttttaactgt cactctctgt ctactagaca
 8881 tggatgagac ctgagacgat ggaactgtc agaggtctct ggcctgtgaa ctttagggca
 8941 ccagaatccc ctgcagggct tgaagaaa cgggtttctg ggcctacccc ccaagattct
 9001 tgactctgta ggtctgggtt ggggttgaaa gatggacatg tttacaagc tccaggttga
 9061 cgtctggcaac tctgtctcca ggcctatgtc gagaacacct gcoctcaaca accctttctg
 9121 ggaacacac tcaacattaa agctgttttg agatctctga agaatctgt agctctgtcc
 9181 ttgtttgggg agcatcagg atctaacat tgaattgtga gtattgttg ttaattgao
 9241 aagcaactat taagtgttag cctgttact cgtctctaac aatacaaggg agagtgaact
 9301 gtaacctoga gatttaagt ctaagtctg tagagagaa cccaggttgg agcagacaa
 9361 tttagagtta ggtgttgtt gcaaggttgg gacacagaag aagggaatg cactgtctc
 9421 tggaggggtc cggaaacagc ctaggggaga ggaacttgag tcttgaata ctgtgggact
 9481 cctcaagca agtccagta gacagtgaa ataaagaaa tagtgaaca gcaagagaaa
 9541 cagttattca gcaagggga cgtgtgtct atccagcca cctgtgaca agctccagga
 9601 tctctgcat cgtccatgt ctaagagag atccctcaaa ggaacagta agcactgat
 9661 ttagagtaac tgtccaggt agaatatca tgaactgat ctttcaaaa tgaattatg
 9721 catgatagg tgaaggaatt cagtttoga gagaactgag ggaagtgccc actgtagtt
 9781 agttaaggg caatgtgata gattgttgtt tagtgtgtcc aaatttgttc tagcattta
 9841 ttactgggt agctttaga cagtagact tagtgtctct cagttgtccc atctotata
 9901 ttagggcaat acataatag tctgaataa aagatgaaca aaatttgttc taactattaa
 9961 tttatttaa gactgaact cgtgtattgg acactgaac caatcaacca aacacactgt
 10021 gttatttaaa aagtagtg taattatgac ttgtgtgtcc gcoctgtcca accctttact
 10081 tgaataaag gaaataata aatattctg ttaataaga ctatagata atactttcac
 10141 cttaaaotc ttgatgttaa tttatttgt tctgtctgtc agctgtgtcc ccttacttat
 10201 gactttctg tcaatgaac accctttgt atcttttgt cctatttaaa taagtctctc
 10261 ctactctgt tctctgttt ttgtgtctt taataaactt agttgtctt ctttacttat
 10321 ttaactgtg caactgtgga ctgagaggc gctatttga ttaatttgt atattctagt
 10381 agagagtag ctgagcaggt ggtgtgttga atgatacat taattcaacc ttgagggatg
 10441 ggaactatg cactttttac attgatata atgattatt agaaaactg ttaactgtg
 10501 caggttgttt tattaacaga atttttgtta tagaactcac tatgtgcag ctgtctctt

Fig. 63D

【図 63E】

10561 aactgctgca caaatactcc tgaaaccttc atggtaacca tatagggaa gcaactttta
 10621 tatatccata ataccaggg ggaagctggt gcccaatttg ttaattact tagcaaaagt
 10681 catattgac taataagttg atttaaaccc aggtagctgt gggcaggggt ccccttttta
 10741 atctctctgc tctgtctgtt gctgtgagt aggtagctgt ttaatactta actaaattaa
 10801 gactgacttt gctgtgagt gctgtgagt aggttagctt taatactta actaaattaa
 10861 ttaattctgt tcaattctca ttttgattta taactgctgt tctgtgagt tctgtgagt
 10921 ttaaatggaa cttgtgcttc ttgatataa taactgctgt tctgtgagt tctgtgagt
 10981 gttatactcc aatgaacaa gaataatgat cagccacttt aaagtagac ttgagagtt
 11041 ttcaataaaa taatagctgc ctgataatgt agctgatttc taactgctgt tctgtgagt
 11101 taaaaattgt aaatttgat ttttctgtg ttgggaaaa gggctgaga ttttgaggg
 11161 gagatccat tgaattgagt ctgattgtgt gtaagatga ttgagatga tgaactcttt
 11221 tttagagctt agtcaactat aaatgcaatt ttatttggg ttgtgggac cgtgcagct
 11281 tccagctgtt agcagctgtg aagactcaaa ccaagcgtgt aatattgtg tctctgggt
 11341 gggattctgt cttctgtggt gtgattatcc tcaatgacg ccaatgtgtt ttgtgtgt
 11401 tgaagtttg gagcatttg gttagggag ccaagcgtgt aatattgtg tctctgggt
 11461 tctctgact ccaagtggtt ccccttggtt tgaatttca ccaatgttag catctgttta
 11521 cctggagacc atgcaagcgt cggcagaggt tctcaacaaa ccaatcttct atgcttttta
 11581 gaactcagc tcccaagcgc atctctcttc cctctctgt tcaatattat tcaatgtgct
 11641 tctcagtag tctgtgtgtt aatcaactat agtatttca tctaggtgt tttttgggtt
 11701 ttgtctcagg taattcagg ctgaattgtg tgaataagca ggaataaat ggtgtgct
 11761 caaagttaac ttgttgactt gttctatct tctaaagta ccaagtttg gggcgatcc
 11821 gtatggaggt caggaaacca gtctgatttt gctctcttt gatgttaga ctacagacat
 11881 ggtgtgttt tagctgtctt gttttttct ccttctctc cctcaactca cggctgtgtg
 11941 caaagcctgt agactgtgcg gaaattgtct atgtgtgaa gcccacaga gacactgccc
 12001 tgaacccctc ctgaaacttg ggaagagagt atgtgtgaa gcccacaga gacactgccc
 12061 tgaacacagc ctgttaactt gtttactgt gtgattata ctgtattg gaagtgaat
 12121 tcttataga aanaagacat ttgagattt tctatcat tctgttat taatttgtt
 12181 atcttttaac tacaacgcca cctattgag ccaactatta tgaaggtac ctgtgtggg
 12241 gtaagaggga ggttccatgt tgaacagga cagactcaat cttgtagttt aagaatggc
 12301 agccctctgc tgggtgtgtt gcccaacaaa aagggaaggt tttcatttta ataactatg
 12361 ggtgaatcat ttgttccat aggcnaaatt cttgtagttt aaaaaaatt atgattgtg
 12421 gaaggaaggt gattggcaga ggtttaaact aaatgatgt cctctcttaa ccttagatt
 12481 tagtattgtt atgtctgta ctgtagctga atctcatct tttgagttt ttaagtgtc
 12541 agcatctccc tgtatgact acgtgagct tbaactccg cgaattttcc catcaggtga
 12601 aatgagcaaa tggatttga cactcatat cttgtgaggt atgtgaatgt tgaagtgtc
 12661 ctttgaattt ccttctctta tgaacacttt cttgttctgt cttgtgaggt atgtgaatgt
 12721 agagttbcca octtctctta tagactctgt atgtgaatgt gtttggaggt cttgtgaggt
 12781 aggtgcaaac aaattacagt ttgggaagaa gctgtgaggt gctgtgaggt cttgtgaggt
 12841 tgaatctccc ctttttgata ctttttgata ctttttgata ctttttgata ctttttgata
 12901 ttgttgaggt ccccccctt tctctgata caaattatc atgtgattt ctttttgata
 12961 caactctcca cttttttct tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt
 13021 cgtgtgtgtt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt
 13081 aggtgtgtgt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt
 13141 aagacacaaa tgaattttt ggaatcaca cttaaagttt gatttttga tgaattttt

Fig. 63E

【図 63F】

13201 caaagtagat gatttttttg cctcagcact ttataggtat gcoctctgtt gaatttttta
 13261 tgaagctgaa atactgcca cagataaaaa taataaattt actctgttta tttctgtgaa
 13321 gaaaaaaaaa aaagctttaa actatgaaa tcaatgtctt ggcoccttta aataaattt
 13381 gactcagcc agcagatttt tgagactaac atccacaaa aaaaacaga ttaactbcaa
 13441 aaggagtgac ttctctttaa atgttgagc actgtgggtt aggttttga atattattt
 13501 gactcagct ctaatttgat actcagagc gaaatttgat ttgtttttaa taaaaggtt
 13561 caagatgca cagcagctgt tacaataac aggtttgggt actgtgggtt ggaactggg
 13621 gcoctctgag tctgttatg cagattcagc ttgacaaat aaaaacttcc tttagactt
 13681 agtttaata tcttttttca aggtatgag tgaagaagc gcaacaaat ccttactct
 13741 gaagagtggt taaactgttt ttgtgtgca tcaatbcaa gttgtttga attttgtg
 13801 tttctacttt tcttttttca atgagattt ttgtgtgcat ttgtgtgcat ttgtgtgcat
 13861 acccccaccc atctagtctt tgcctcaga ttataaacc ttaattgtt ccaattgtg
 13921 tagctctgtc ttgacccctt tttttttt tgaataaact caggtttgtt ttgagagta
 13981 tattgtttt aggaaggtt gaaagaggt gcaactgtga aacacgcaa ttgttcaac
 14041 acacataaac atccaaatta aagcagaaa tctcaagcc tccaactat ccttatttc
 14101 ttggaggttt aaagcgtgt agagtagt ggtgcoctgt cgtgaagtt taaggtatt
 14161 actttttact ctaagcagta gctatctgta actcaattcc gtataaactt gacacccat
 14221 cgtcacaacc cagttatttt ctgattttag aataagctgt cgtgaagact tttctgtg
 14281 ttaagtgca aaagggggga gtaaggtgt atccacaaa aggaataaact ttattttag
 14341 tatttttact tactcctgtt gtttttga ggcocctgtt tttatttat attttaac
 14401 aaaaacttta tttttgggtt atcagagaa taacttata agctgttga gcaatctg
 14461 ataaatgga agactcagaa gactgaagat cctgcoctgt tatgaggtt gcaactaat
 14521 tcaatctgt atgatgaga gttctttt gtttttga gtttttga ttttttga ttttttga
 14581 cacttgagaa aggagcctgt gtttttgggt ttaattgtct ctagctctg ctatagatt
 14641 gaggcccaaa agtcaatgtt ggggtgaag gtaaggttt ttggcttct ctagagagc
 14701 tgaactttt gtaagaggt gactggaac accagcgaat tcaagcaga ctgagagc
 14761 ctaatgtga ttgggaatt cagtagaac agtttgtact gaacttctt cttactagt
 14821 aggttttga atttaataa aattaaagc ctttttga aagaataat gttttttaa
 14881 atggggtaaa ttogaagat aattgataa gaacactggt ttgggataa accctgtga
 14941 ttactgact ttgtgttg aactgtag ctgagcctt ttgtaagct gggatttga
 15001 atctttgaaa ttgtgtgca gttcaatga taagcataa ttgtatata tcocttttt
 15061 tcaattattt gatttaacaa gttgttact acagctctg ttgactoga gattattga
 15121 ttaaatgga cacaactca actagagata tttatttct cttctgttga gggaaatga
 15181 caaaagttt aagctgtgac gatttaata ttttaaggt tttttttta agtcaatgat
 15241 gaagataga acaagtttt ttgaaacta ctttaaaaaa ataatgtttt aacttatca
 15301 caaagcatt gactattat tgaagaaa acacagagc ctaaaaaat ttttattct
 15361 accattagt agcccaagt gttctaggt agtaggggt ttgtgaca tttttttt
 15421 ttgtctctg tgaactcag aaaaataaa gaacacact ccaataata ttgttttga
 15481 ttttttcaa tgaatttag cactgtctg caatgcat caactaat ggtataatt
 15541 tgaattgaaa agaaaataa aatattttt ttgtggagt aatggaaat gactattga
 15601 tctcgtctgt tctcgtagt ttgtctag ttgagaggt ttatctgtt gctcgtct
 15661 ccccccacac attttattg ctaacattg caccagccc cagtctgga ctacactgt
 15721 cttgttaact gatttaact gcoctgato tcaagtcat gtaactgca ataatcaac
 15781 ataatatta aattattaaa tagacttta cgtgtgta attaggtga agtgcctgt

Fig. 63F

【 図 6 3 G 】

15841 gatogaatct gatgtctttt aaatagaagc ttctccacaa catttccaaq cactgtctac
 15901 gtgtctgtctt cgttttgggg tttaactcgc ctatgttatct gtctgtgtgtt agaaactcgtt
 15961 agttctgtctt tgtatctctt ttgtctctgt ctcttttctt ttgtctctgtt aaatattctct
 16021 cagtgatctct ctaaacatcat taactatctac ttgttttgaaa acttttggaat atctctctcat
 16081 gggttctctt cgtggacgtg tcgtctctctt caggagagcc acogagttata ttgtcaacaa
 16141 ttctgtctgtt attttcagag actacagagag catcaagtgct ccccccaggg atttggtgttt
 16201 tctctctctt taactctacac tcttttgcaa acogtggaaa aacttgttaag aggcctctcc
 16261 atgtttgtctg taagggtctgt ctgatctgtt cagaggaaga aagaagcagg gaaataggag
 16321 tggcgtgtgg taaggaggga agcaggaggt cgaatttcgg gtctactaga cagctctcca
 16381 taactctctt cactgtctgc ttcccacgga tctctctatt acactgtggc aagtgcagaa
 16441 atagatcagc cagcaactgc cctcgtctat ttcccagcca cctgttgaga cccgataatg
 16501 caatcagagt cagcagaaaa gtcccagact gacatcccaa cgtgcacatg ttgtgtctgt
 16561 gaatgaaaaa cactcagagt gacotctgaa ccttaagtgg cgtgtttatg ttctcagtgt
 16621 attagggccc tgttttaaac aagcagtgct ctgtatgtga ggttaaaact tctctgtgtc
 16681 tctacttaatt atgtctgttt ctactgtatt aatattaaag aatattgtgt tgcataatga
 16741 ctaattttttt tatttttttg agcaggagtc ttgtctctgc acccaggctg gagtgcaatga
 16801 gtgcagatct ggctcactgc aacotcgcct ttctggatct agcaattctt ctgtctcagc
 16861 cctcagatga ctaggactac aggcgcgcgc caccatgccc agotaaagtgt tgtattttta
 16921 atagagagcg ggtttttacca tcttgccagc gctgtctctg aactcctgac cctgtgatac
 16981 acccgcctca gctcccaaaa gttctgggat tatagggtgt agcacaacag cctggcaaca
 17041 taaggactat ttcttaaggt ttcttaaat attactgtga agttgaaatg tctaaatcat
 17101 tagagatcca gtttagatta ctaaatattt atgtctaat gatgtatga gacttatgca
 17161 aagtatcact gttagaagat tagagctcat atttgtgaaa aacttgaaaa agcttggtgt
 17221 aagtctcaat ggtataccaa gactgaaaaa agatccaact atcagatctt tccacatag
 17281 tcatgttaag ttgtgaagcc ctaactgagt ttctccagtt ttctccacat tatattgtgt
 17341 ctatatttga ttcaaaagga ggcctctat ttgtctgttt agcactgatt cactgtgaaa
 17401 agccactcaa gtgtctctat tccactcagt atgcctcact cttagatag ctctccatgg
 17461 ttcccagcca ggcctctcag tgagatgaac ccaagccaca cgcactggcc tgggaagcga
 17521 tctcagcaat ggcagtggtc ttactgtgaa ggaagagcca gctctccctt cccaggaaag
 17581 tagtagagag cctcgtctga cctcgtcagc ggtgagaaat ggtctgtctc agttctctct
 17641 cctgtgtgtg aactgataca cctcgtctgt ttctgtgttt ttatttgggc ttaaaactag
 17701 cagactttat tttaataaac cctctctcaa cactctctgt ttctggcgaa gtttaaacga
 17761 aacagcctcc cccactgtgt tatgggtgtg aactgtggcg gttccctctg gctgtttgtt
 17821 gttcaaatg tagcatatct tgaacacaca gaagaatct ttgtatttgc atccataatg
 17881 gaagctcagt gactatgctt taactgtgaa gattatcact atccataatc tttttaaac
 17941 ttccaaagct agcagagag aagtgtgata ttgtatatta caaatattct agggcagta
 18001 tagatgtgtg gttgtgtctt atttgttaat ggtcttaagc aatcaagga tttgaactca
 18061 aataataaaa cctctcactc caaaatagga actctgttta taactgtat tataaatat
 18121 ggaactcaat ttctctcaat taataataga taactatgag aactccccc cactttcttt
 18181 tcatatcatc ttgtctattt gcaataatgt ctggagacca tatgtatcat taagttaaaa
 18241 acaaaagc ccttgagtg gctgtttctt tctcaacttt ttgttctgt cctctctggg
 18301 gaaggtgtgc aactctgagc gctgtgtgca gatgactgac tggagagcc cctctctctt
 18361 tccagaccca ctgagtgtgt cttgagtgtg agctagactt tccctgctc tccatgtgac
 18421 gctcaactgt ggtgtctgtt atttcccta actctatgag ttatctatga acagctgtat

Fig. 63G

【 図 6 3 H 】

18481 ttgggggaaa aaaaatgttt tcccaatgtt ggagttataa ttgaatgtgc tgcagcaaaa
 18541 actgaaatgt gtgcagagaa agggggcttt tctgtctatg ctacttgggc accagtggtt
 18601 cttcacctgt ttgtgtgttt aggtccatgc gtctatgtga aactgaagac atgggatga
 18661 tggggctgtg gacagtgtgt agccaaaagc aagtgtcaca aagcagctgt gttgtatta
 18721 tttagtggtt tggaggtggc tgattgtcctt gacttttaag tagagagaga ttgtagaaga
 18781 ctgcacaaac ttagaacttt ttccagagag gaagggtcag aactcagatc tgcagggctc
 18841 ctgtctctcc agaaaagcca gttgtcctgg gaggagactc taagaacttc agtctctct
 18901 cctcagctgt tctgtaccc actcagtggt ttgtctctca gaattctcat cactgtctgt
 18961 atctgcaaat agtgttattt aatttgactt caatttgtat aatgttttag tctctattgt
 19021 tctctctcat tttttgttca attaacatct tatttattga gcactcactc tgtctcagcc
 19081 ccttggtgtt ttaactatga attagtcaca tggggactt cctctcctcc agggagctag
 19141 actataaatt cctaatgato agtggctccc actttctgtt cactcacaat gctcgcaca
 19201 acataggtta cttagtgtt tcaactcaca ctactgtgt ttgtctctgt ggtcgttag
 19261 gaagtgtgag agttccggg aggcagagtc aataatgag actcaacgta gtgaaaaact
 19321 ggccagga ga cgtgtagtc aggtctctag ctcaactgca ctctgtccac tggagaacca
 19381 taattctctc acttaaatgt actgtgctt atgtctgttt atatacagc ttaaaaagta
 19441 aaagtgtgta aacactcaa ggttggggc ctttgttatt gatttaatta aaggaacat
 19501 cactgtttta atgactctca gaacacatta cttttgaaga gccaggagtc aactctctgc
 19561 ctaactgttt gccacagtgt gttctgaag gttacttaat gctgttgaaa tctactctgc
 19621 tagtgacttt tgcacagatt taacttttca agcgtatcat aatgttgata ttgaaatgt
 19681 agctcccca ccaactctc gctttgataa gactccccg gattgtccgc actgaactat
 19741 atagattttt acaaaagtg gacagtacac actgaatgaa aactttacat caaggaggg
 19801 cgtgtgtgtt tgaataatga attaaaaggc taattaaagt atttatga attacgctt
 19861 ctgaaaaat ggcctcaaac acagagatcc caaagccac accgaccctt ggtctcactg
 19921 tctctgact caccgactca gccacagcaa gactgtctgc tggagcgtgt agtgatgaga
 19981 gtaaaaaaaa aactctatg aaggaacag ggaactctgc tggagactct tagttaagaa
 20041 gcttagtgag ccaactctga gactatggg gtaagtgtgg gacttttga tgaagagga
 20101 gatgtcagc tgggagggg gctgtatgca tttcttaaaa agagctgaat gaatgttga
 20161 ggaaatgggt acatctgttt tggtaagga tctcaatga tgaactctgc ggtcgtctga
 20221 gggctgttaa tttagaata cttccctaaa tagtagtaaa cctttatata gttcgtctgt
 20281 gggctgttaa tttagaata cttccctaaa tagtagtaaa cctttatata gttcgtctgt
 20341 tgcaggtctac aaaaagga gaataagat agaaagggtt tggagtgtta ggaagacact
 20401 aggcaggaat tgaactctgt tttttgtaa octtaaatgt gttctaaaaa ggtcagga
 20461 taagacagga gaaaaggaa atgtcagga gatgatcaat tgaatgtta tgaatgttag
 20521 ttgtacttca cttcccgcca tctgtctga gtttttaac ctccagcaga cctcagactt
 20581 actgtgtgtt ttgttgagg gctgggggag ataaagaaat tagctctctc ccaaacat
 20641 tgaactcagt tttacttga gaaactgaat ttgttttgtt ccaataagaa gatgaagaa
 20701 tctacagaga acactatgac attcaagaa tggaggtttt acacagaga ggtctccact
 20761 gtgatttga ttgttcaaaa gttctagaga attcttcaac agtcaacaca tggtttgtta
 20821 aataatata ttgtataaaa aattgtttt gaggttctt tcaagaaatg ttttttgtta
 20881 gaaatgaat tcatatctc ttgtcaag agtctgata aaaaaaag gaaactctt
 20941 ctttttggg gttgtgaaac taacaaact caagaaga gttcaacag ctaactatt
 21001 tcttcccaa taagagtggt ggtttttta tatgaatca tagtatgat ttgtctatg
 21061 ttgtgtgc tctcaacca cactcaagca ctttcaagaa aattaaact attcattag

Fig. 63H

【 図 6 3 I 】

21121 ataaatcata aactattccc ttgtgtatgg ttgaagatg ggggtgcccc atcatctctg
 21181 cttaattctct tagtgaatta tgaactgtga gctctcagc gttctagge tttaattttt
 21241 aagaagaggt tggatggaa ggtactgtctt ggtctcagc agcagtgctg gttgtgtttg
 21301 caatgagctt gagggtgtg cttgtctcagc agcagtgctg gttgtgtttg gttgtgtttg
 21361 gtttagcact ctgtagaaga tgtctctctt gaagtctgt ttctagtttt tccagagaaa
 21421 tcccaatcaa gaagatcatc tcaaggaaat ggtctcagc aaagagaaa ggggagggg
 21481 aggtctctag ctaatagat taaggggata ttgtactgt agtctagt cttaagattt
 21541 gttctgtgaa attaattgga gaaatagat ctcaagggaa gaaaaaaa gattatag
 21601 gcaaggagc gtttttctgt tcaagtaga gaaactctca tttgtcagct gaactcaac
 21661 ccaactaat tatttttgtt tabottttta gaaattttga gaaattgtt ttgtctagtg
 21721 taataaaaaa gaaactgttt gatcagtag tgaactatga ttgataagaa tttaaaact
 21781 tctgtatgaa actgtctgtt taactaaac caacagcaaa gggaaactaa caggcaaaa
 21841 aagattatgt ggaactcagt ttctctcaca ttgacaggt ttctctgtgg catgcccact
 21901 aaactaaag tgcactggt taataataaa caacatgtg ggaagatgta ctcacacagg
 21961 aggaagagt atgtaaggt tacaacaaag agtactgaaa tattacaagc ggggggtgt
 22021 taagaagat tcaagagga cctgctatct acagcttga gtaaggaaag tggttctttt
 22081 ctgtctctct tttttctttt aaagcttaat tcaaaaatc attctccca tattgatctg
 22141 aagtaagaa attttgttaa attaagagt gaactgaaa atgtgtagt ttggattatg
 22201 ggcattgctt ggtatctgt taactgtcat taactgttt aatttttct aactcaatg
 22261 cttttttctt ttatgttttt agttttctac cttggcaagg actgttacta taccacaga
 22321 taggagacaa attggtatt atttgcacca aagtggaact taaaactgtt ggcagtatg
 22381 aattattata agtttatagt gttgataag accagagca cagatgact attagaaggt
 22441 aaaaacccc tctctccac ttgtgcacac cagaccaa ga tacaattc accatgaagt
 22501 tccaagaa cagccctaac ctttgggtg tagaatttca gaagaacaaa gattattaca
 22561 ttatattgaa gtaataattt attcaatttt ttatagaaa ttaagataag ctatattagt
 22621 ttgtatcaat tttttgtttt ctttaaatat ttgtgacaaa taatttgatg aatatctatg
 22681 tggaaaaatt gtcocccccc cttttttttt ttccaagaa aactctatg aattgggac
 22741 cttgtgtcat cagtattcat taagtataca taccaaaaga gaaaaaaa cactagaatt
 22801 cttatagta ttgaataaaa tgtattatat gaatatctc agcatctca ctgcaaaaac
 22861 cttttttag gacactgtgt ggtatttgtt agttaaatct ttgtctatgc cttctctctt
 22921 cccacatcca tccattcaat cactcaatca ttctgtctg agagactgtg
 22981 cttagggtc aggtattcag cagtcaagg ttgttaaat goactgttt ctcagaagt
 23041 taacagtcta gagaagatg agtccataaa ttogaagat ggggagcaaa ggtcaacta
 23101 aaacagatt cagaagaaa agcagaaact aggtttgtct agtactatc tttttttg
 23161 atacatat ataatttgac agctgttaa aagaagagat ggtactatc cttttttg
 23221 tatctgagc tgaactgtga ggtgtgaa toagctgat agcacattg gacccacag
 23281 ctactatgt cagatctctc ttgaagctga tcccaaggc ccaagtggt tttaagtct
 23341 aggtgataca gaagctgtgt cgtgtcatc aagcaatga gttttttt ttaattctt
 23401 tgggttaaaa ttatctcat attaattgt ttgttaatt ccaagtgttt gtttaacta
 23461 gactcacttt tatbagga cctgtatgt ccaactgttt attatttgc accaggtga
 23521 cttataaatt tttagtga cctgtctgt gttcaactg taactctgt ccttaactc
 23581 atgagccga cttatttgtt attttattt tttagagca ggtctatgt ttgtctgca
 23641 ggtgtgtgt cactgactc actgtatgt tgaacacag ggtctatgt
 23701 atctccccc ctagctctc aagtagtgt gactaacgg atgtgcact gccacagct
 23761 caagagctac aactaaag acagaatga aactattt taagacaaa ttgataata

Fig. 63I

【 図 6 3 J 】

23821 gactagetta ccaagaatta gtaacacaa caacaagaa aaaaagag atgtgtgtg
 23881 agtatatct tagtaaggg taattattat aaaaataaag cactctgaaa tgaacaggt
 23941 agatggggt gccaaagt gcactatgt cagcatagta agcaaatct taaatgtta
 24001 caggaataat aaatggaaa tttaagttt ttgaagata acagattat tatatttaga
 24061 aagactttat ttttttatt ttatttatt ttattttat taattttat tctctctgt
 24121 caggtgtgag tgaagtggtg tgaatctggt tcaactcaac ctccactct tgggttcaag
 24181 tgaattctct gctcagact ccaagtagta tggagactga gttgtgtgct aatttttgt
 24241 tttttatga agcaggggtt tcaactgtt ggcagagatc attgtgatct ctgagactg
 24301 tgaactctc cctgtgtgct ccaaaagta tggagactga ggcgtgtgac accgctgtg
 24361 gcttagttaa agacttttaa agtaagact ttctagtgaa agctaactgt aggtatgaa
 24421 tttaacagga actgaagact atcagatgca ttattatga ttgaactgt tgaattgtga
 24481 ggtggagaaa agaatgtgtt ggtacggaaa gaggggacac actagagatg agatgctca
 24541 ggcagtgaa cgaactgctc taatgtctgc atgacagca cgtccacaga taatgcca
 24601 aacccagag tctctctct tactttatg tatgactca cgaagatgc ttgtcaatt
 24661 ctaagtgtgc actgggcca agtgaattt tagtaaacat taagagttta cacttttgt
 24721 tgaataata tgaagata gcaataatt gtttaaac acctctgtt ttaatttgtt
 24781 gactatttaa taattgtctt ttattatcat atgagagatt tgaatttaga agaatttta
 24841 tttaataa taattatcat ctaacataa acgaactca ttatttctt tttttgaaa
 24901 cttctcaac cactcaaca ggtctatgt agttactga ctactctgt cactagactg
 24961 cttctagag ttaactatca cactgcaaaa gcatattgta gctgtggata atgatcat
 25021 ttttaataa gaattgaggt tctcaagttt gaactatga gctgtattt gaatttgtt
 25081 ttgggggact gttcaaggg cttgggtgag gactcagggc taagaattt gccagagat
 25141 caggttga cttccagag agtgagaaa cttccagag ggcgttagca gaggagggc
 25201 tttagatca ttgggaaa atagaagca atctctcacc caccctaac caaagctat
 25261 tgaactcaaa gttctcag aaagaaatg ggaatgag agaacaaatg ttaaatatg
 25321 tttagaatt atattgact ttgtattgt ttgtatag ttccagaca ccaaaaact
 25381 gaattgatt taaaagta ctaactgtg tatcagaca atgcaacac ccaacacac
 25441 acacacac acacacac acacacac agctctgtga cttgtttt tgaagagaa
 25501 agttttgaa gttgtaatt ttatatcat tacattata aatagtgtga ttgactatga
 25561 cggaaagat taaaattac atgtatatt ttaacactc aatagtgtg tttactatga
 25621 gacagttaat aatattaga tttagttca gttttaata attctcaatg gtttaaccc
 25681 caaatctag ttgtatgtg gtaagcctc taagaacag cagtgttata aataatagt
 25741 tatgtgtg ttgtttctt cactggagag gaaaagaga cctgtatgt ttggagagt
 25801 cttgacttt cccactgag gactgataa gaggagctga cttgactgt ggaactcct
 25861 acatgaacag cacttcaaga gaattaaac aggaacatg agtccactt acttctctg
 25921 cttctcaag ttaattgaa agtcaattt atttctgtt actttatgt atttctctg
 25981 aaaaactgt tagtatgtc attgtctgt otaagtgtg aggtctctc cagttctca
 26041 ccaactagg cttgtgcta caaatgaat ataggatc cttgttgtt gttctcaat
 26101 ggaactgact cttgttaat tttttaaat cactttagt ttgttgtgt gttctcaat
 26161 ttaaaataa cttcaacac ttgtgtatt cagagtgaa tatgatttt taatttgaac
 26221 ttatttata acaacataa gttatctca agtccataa gggatagtt ggaacagga
 26281 tatgatct cactcatct tctatagat ttcttaact ttcttaact gttccaaat
 26341 tatattgaa ttgtcaaga ctttaaatg tttacttaa atttttca cttctgtgtg

Fig. 63J

【図 63 K】

26401 gttttatgga gttatataat tatttttcaat ttaattgatat tttoagotta cttgtgtggt
 26461 aatcaagatc aagaataagc cccaaactaa tatgtgagca ttgtgtatat ggtttttatt
 26521 cttgtttaga attgactttt ttttttttca ttatttcaagta ttgtgacctg ggcctgattt
 26581 goataatgag attctcttaa ttcaagtaaa tgaagaagtg gagatattat ggcctatgtg
 26641 totgaagaga cttctttttt attagtctca gttcttttaa ttgcotaaaa atagagttag
 26701 taattttacot aacotttagt tatttttatta ttgtttttaa agtttttttt aatgttcatg
 26761 aaataactgt ttgttaabtg cttatttttca aggaagaotg ttgttttagac ttactaaatg
 26821 cttcaagtga taotgggaaa gcoottttgt ttgtgttagoc ttatatcoyta gaggttttct
 26881 tgcagcattt ttgtgtgctg ttgttagttt ttctcagagtg cgacacocag agctgaatga
 26941 tgcagcagtg ttgtgtgtgc gaccttttgc aacagctgtc ttatcagagg ttctgtgggc
 27001 tggttattct acotttgcot aaaaacttgc aaaaataccc acaaaagggt ttctgtcaaa
 27061 ctaccaaaat catgtgtagc agagatggat gaaaatagaa ttgcatttgt ttctactctt
 27121 tccagtgacg ttgtgtgctg ttgttagttt ttctcagagtg ttctcagagg ttctgtcaaa
 27181 ctcccaattt agotttcaat ggttttttga ttatttttgt goaaatccat agtcaagaga
 27241 catcttgttg catagtccgt aagtcatttt ttcoagaagc ttgtttgata aaggttgttc
 27301 ttgtgagatc acotttgttt gttoatggca ttctcttggg ggccttccct accttccatg
 27361 ctttggcaaa gtcttcttta aggaacactg acaaaagtgt gagaagctgt catttcttag
 27421 ggccttcaat ggttccgttg ttatatgctt ttattttttt attttttttt taataaagag
 27481 tatgtaaaat tggaaagttt cacaacaagc ttgtctattt tttagacatg tactccactt
 27541 ctaagcaaaa tccaaaataa aagtaaatgt cttccocaaa tataatgaaa caatatcttt
 27601 aaagaataca agcagaagaa attcagatgc ttgtgtctat gttaaagata tatttgtttt
 27661 cttctctgtc ttgtatttgc ttattttctg ggtgttagtt ttggaagtag tactgaaagc
 27721 tactgaatgc actgttcttt agcagaatag ttaacaggag ttccaattgt cttcttaaaa
 27781 tatagattct ttttagaata tagataaatg ttgtggctgt ataaagccat tatgtgtctt
 27841 atttgatgaa ttattttatg agcataaatg ttgtcaaaag ccacttttcc taattaaatg
 27901 taatcccaatt ttgtgtatac goaacatcag cctgtcattt ggggtctctg attgagggtt
 27961 gaggatttct gttgtatacc ttgtgtataa ttgtgtgctt caagcattta aacttatttt
 28021 tatttttaac ctaagatgtg cttgttttga ataggatatt catcagatac ttgcagaga
 28081 cttgtgattt gggatctgtg gggataacag cccaaocaaa ccttccctct cttcagaaga
 28141 aacagataca caatttagtg ttgagctgtg ggtgttggaa gacccagatg cttcagaaga
 28201 ctttgaagag taacottaac cctgtgtgoc ttgtctctt cttctgttaa gttgggataa
 28261 tgcagcagc ttgtctcagc ggttggggg aatcagatg ttgtgggata tagaanaagc
 28321 ttatttactc cacttttgcg acaaaataca tataactaag agtttaacttt gggagcgggg
 28381 aggaagtgtg agctcagag ttggagagag actgtgttgc ggtgtgaagc ttgtgagagt
 28441 gggccocaaa agcttggctg atttgaagtc cttccaaaaa atgggaatcc agagagtgt
 28501 caagtttcag taatgtctga taactattca atagacttt cttcttttgt cttcttttag
 28561 ttgtataaaa gcttttttgt cttgttgtgt attcttcaaa gaaacttgca ttattgtatc
 28621 ttgttttga ttgaattgtc caagctgttt agcagctcct ttgtgaagca caaaagagac
 28681 agcagcggga gggatgtctga gatatactta atcatttttc ccaatttcaa ttgttaacgc
 28741 cttgcggaga ctttttttca cttgcctgtt acaactaag tagatocagc cttattgtat
 28801 aatttttaga gocttcaatg ttgtgtataa ttgttttcaa gagaagaaaa ttgttcaagc
 28861 ttgtgttatc attgtgacta gctgtgaag tagatocagc cttattgtgt abatttccaa
 28921 gogtttgttc ttgtattttt gaactatctg tgaactcttt ttctgtgtgt attaagggtt
 28981 ttccagtggt ttgtcagtag gactcctgat tgaattttat atgaataag ataatcttt
 29041 taactttaag gattaaagt ttgagttgtg cttacttga gatgtcactg agaaactcct

Fig. 63K

【図 63 L】

29101 ggtctctggg tatagcggag tcaagacotg gggatgtgtg tccaatatgg cttgtgtgtg
 29161 aagaagaana agctgtgtg gacggagact cttgtacat taagtgaact cacttaagc
 29221 atcatgacag caagaaattt tttagaattg cttagaataa aactgcttcc atatttccat
 29281 aaaaatgac ttgttatctt tagcacotta ttatttgctt ttbaaagttt cactgtgatt
 29341 tataaataat tggacaatg tagagacotta gtacaaagat tttaacttat ttgtatgtt
 29401 cttataaacc tttaaacatt catcaggaag ataaactttt aaagcaaat aaacacatg
 29461 aaaaatagca agtatgcacg accagacaag caataactat tttaacttat ttgtatgtt
 29521 cttaaagctg acattttgtt ctgaagtttc aaaaactcgg gctgagttgt ttgactta
 29581 gggagagttt ttgtgcttca catactttgt ttctacttgg aagtcagaaa acacaggtct
 29641 tagagcaatt ttataactg ttgagaagct gaacttagt gtgagtact tagtaaac
 29701 cagtgtgcca tcaaatgtca gaaacaaaac tcaagtcagg ggcgtggag ctttaggccc
 29761 cgttgttag ttataacag ttgctcctgg gtccaaactat ctgaagtaac atgtagaact
 29821 agtaagata gtatgtatgc atacataca catagttaga gacagcaagc tataogtaca
 29881 cacatgttgc atacatagca acagagaga agctcagaa ctataaagga ttgagctgat
 29941 gttgtatca gacattttgt tactgaogct ttgtcatata ttgtgtaaa tataccagc
 30001 ttgcaatcat ctgcccocaa agtgaacta agaaactcct acaggttact aggaagaaa
 30061 ggcctatggg aaaaagttgt tatagtggca atttgttagc ttctatgat ttctttttt
 30121 tttttagaca taacttaat tccatttttt caataaact atactatttt gtgttttat
 30181 gttagcaagt actttaagcc cctcaataga aagttgtcat atcatatgt tatttattt
 30241 aaaaactct caacataca agtagaggtg gtatgagact tcaaatctcc tttagcaagt
 30301 acaagtgcag cagttttgtt ggtgtgtgtg ctgcatagaa ggaactgatg attgcaagc
 30361 cttcaagctg gagtgttaat gatctaatc acagagagcc aggtctgtgt acagtgtg
 30421 ttgtgaagt ttgttttga ttgtgtgaat agccatttt ttgttctctg ttgttaaaa
 30481 ggggtagaag gtattttttt attgtgcaaa accggggaaa ttgctctgga ctttaggag
 30541 atagaacatg tccctggagc ggaataaggt tcatgttag ggaactatga gatagggga
 30601 cttattgtgg gttactactg gtctotagat ggtcaagca acaactattt ccatataag
 30661 ttgtgtgtcc abtcaagctg ttgtgttcca ttgagtgagc agattttct cttgtgaagt
 30721 ttgttatatt ctaaacgtgt agcagactt aattgtgtg ctgggtgaag cttccagctt
 30781 agagatgaac ttgtgtctcg atggatgttt tccacttca gttgcactgt cttcgaatatt
 30841 cttgtgtcact aatatatgt cttgtgtgtt ttgactgtag aaagctgatg aggtgtgtg
 30901 gttcttctggc aggtatattt tgaacttttt actgtaccc ttcccaagct agactttct
 30961 attagtgtg ggaataatt taagtattga gactgtcga atcttcagc gatagcactg
 31021 ttgttatca tcaactaccc ttccctggga agttatgtt taataaacta atatttttca
 31081 ttgttatca tcaactaccc ttccctggga agttatgtt taataaacta atatttttca
 31141 ttgttatca tcaactaccc ttccctggga agttatgtt taataaacta atatttttca
 31201 ttgttatca tcaactaccc ttccctggga agttatgtt taataaacta atatttttca
 31261 ttgttatca tcaactaccc ttccctggga agttatgtt taataaacta atatttttca
 31321 ttgttatca tcaactaccc ttccctggga agttatgtt taataaacta atatttttca
 31381 ttgttatca tcaactaccc ttccctggga agttatgtt taataaacta atatttttca
 31441 ttgttatca tcaactaccc ttccctggga agttatgtt taataaacta atatttttca
 31501 ttgttatca tcaactaccc ttccctggga agttatgtt taataaacta atatttttca
 31561 ttgttatca tcaactaccc ttccctggga agttatgtt taataaacta atatttttca
 31621 ttgttatca tcaactaccc ttccctggga agttatgtt taataaacta atatttttca
 31681 ttgttatca tcaactaccc ttccctggga agttatgtt taataaacta atatttttca
 31741 ttgttatca tcaactaccc ttccctggga agttatgtt taataaacta atatttttca

Fig. 63L

【図 63 M】

31801 agaaaagett ttttttttgt ttgtttttta tttttgaatt atgttaaat ttttttttta
 31861 actgagagat tccaatatga taactgttca taacttttaa cagtaagatc tttagacttag
 31921 aaagtgtatg ttttttccaa cagaatttat taaaatacaa gscacacagc ttgtccaaat
 31981 aatagtttga ggggaataaa aataaacaac ttccataata attctattgt gttaaacatg
 32041 ttctatgata accaaacaaa aaaaagaagc aggtgttgag ttattgtgac
 32101 gtaactgtct gtcttttcca gaaaagctgc aggtgtacatc gacgtgctgt gaoggtatgt
 32161 ttctttgtat tttatccctc attgtgtacat agtctgtgoc goaacacatc gttagacagc
 32221 acacatgtgc cttcagcttc actttctgtc ttctctgttt ttccatctgt agtgtctgt
 32281 gcaagtagt ttccagctgt gtatagtcga aagatacctat ggcctgttag gtcttcatg
 32341 attgtatttt gacatttcca cgttttttaa ttgttaaaag gctttatgag aaagctgtga
 32401 tagaatttct attgttttca ttgtttttaa ttgtttttaa ttgtttttaa ttgtttttaa
 32461 tagattgac ttcttctcca gtgttccagc cttcctatgc atgtatgagc cttgaatac
 32521 agttgtgtat cttgttctcc ttcttcttcc aacttagaag caatttagta atattgtga
 32581 tcaaaacttt ttaagtgcac atacaacaaa atcaacttca ccaaaactgt ttgttcatct
 32641 tcaactttta acacttctct ttctgagctc ttgggtagaat gtttcatctt
 32701 gaattattga aattaagaaa ataaactgtg accattttct ttaagagcat ccaattgtac
 32761 ttgataacat cttcagctat atttccatgt ttgttcaagc gagggtgagb ttcaactgt
 32821 actcaatttt agaatctact ttttccaaat tatctttttt agtgcagaaa actcaattat
 32881 agtgttgtat agaaaagta ctgagagtg agcagttat actcttctat gnatgatt
 32941 cttgttttaa ttcttaaac acaacatgca accagttgta ttaattcaag ttgatttct
 33001 tatcatattg aacatatttt tcaaggtgtg aaaaactcaca actcattcat cactgatgt
 33061 ttatacagtg ttattagctgt ggtcctgtgc atgcaaaaaa agagttaato aaatgtcag
 33121 gagaacatc ttatccagtg gagggtgtgt ttgtttttaa ttaactttta taagtataa
 33181 ttcttctctg aaaaataatt cttggcgggg cgggtgtggt caagctgtga actcagac
 33241 cttgtggagc cttcagagtg ggggtgtgtg cttggtttaa ttaactttta taagtataa
 33301 cttgtggagc cttcagagtg ggggtgtgtg cttggtttaa ttaactttta taagtataa
 33361 ttgtatgata gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 33421 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 33481 ttcttctctg aaaaataatt cttggcgggg cgggtgtggt caagctgtga actcagac
 33541 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 33601 gttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 33661 gttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 33721 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 33781 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 33841 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 33901 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 33961 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 34021 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 34081 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 34141 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 34201 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 34261 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 34321 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 34381 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta
 34441 cttgtgtgta gttactgtg aggtgtgagc aggaagatg cttggtttaa ttaactttta

Fig. 63M

【図 63 N】

34501 cttgtgtggt ttcatgaacc ttgatgatta ttatgtctct cttgttgact ttctaaagc
 34561 agttgataaa taactattgt tcaagatgto cactgtctcc cttccatcct cttggccact
 34621 acaaatagca taacttttta aataattgta aataacotta atagtattta ttatttctat
 34681 ttgttcaatc ttcttcaag aactgtgata cttattctgt ttgagttatt ttgtgtctc
 34741 cctgttttca actctctgtc cagtgagacg actatctgt ttactatcgg ttactaacta gaagtgtat
 34801 ttgttcaatc attagacac ttgttagaat gttgttgact aaacacagcc aagatgtggt
 34861 gctggagact agctcctgg gacagagcgt gtgacaacta ttgacagaca ttgtaaaagt
 34921 gttactaatc ttcttctct ggggtggggt taaaagaac agcagcaaat attctgtccc
 34981 ttccagctgt ctttcaagtt actcactgt ttcttttttt ttctcactta ctaaacactg
 35041 atactcttcc cagtgaacta gaactgcaga taagtatagg ttgacaatga ttgcaaaccc
 35101 cagatggcag cttgttgtt ttgatgtgc ttgacagact ttgacagact ttgcaaaccc
 35161 gaacttttt ttgtgtcagc aactcttacc cactgttacc ttgacagact ttgcaaaccc
 35221 ttgtgtgact ctactactt actcactgca gttgacccc ttgacagact ttgcaaaccc
 35281 acagctgtga aaactgcact gtactttat ttgactatt ttccactgt ttgcaaaccc
 35341 ttctgtgtaa ttttttaatt ttgaaagtct attttttt ttgacagact ttgcaaaccc
 35401 actcgtggcc taaaagctta gttatacaaa ttgtatttt ttctatctct atgtatgaa
 35461 ttgtatttca ttattgtagc aataactga ttgtgtgtc ttgacagact ttgcaaaccc
 35521 agtatcaaaa aaaaactagc taataagac taacataat ttctcactt ttctctagat
 35581 taaaacttcc cagtacatc aaatgaaca ttgaaataat ttgacagact ttgcaaaccc
 35641 ttgaaataga ttttttttcc cagacttagc caattttgt ttatttttca aaactgtga
 35701 ctaagcttct cagacttct ttgtgactat ttgacagact ttgcaaaccc ttgcaaaccc
 35761 gttttattc aggtgtgct goagagagc aggtataat gggatagagc acttttttt
 35821 tttagctgt ttctgttca agaggggggg ttggaactt cagcagata attacttct
 35881 ttgttaggga ttgtagagc gagaagagc gttgtttta cttgtggagc attacttct
 35941 atcaagata aaatagact aggtatttt ttggaactt cagcagata attacttct
 36001 cttgagtttc agttatgac aggtactaa cttgtttaa cagctgtga gcaacttaga
 36061 ttatttttca cttactgca aaactttcc ttgtgtgagc ttgacttga tttaaatg
 36121 ctttttttca gcaacactg attttggat ttattttgt attagtagt aattttttag
 36181 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 36241 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 36301 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 36361 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 36421 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 36481 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 36541 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 36601 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 36661 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 36721 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 36781 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 36841 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 36901 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 36961 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 37021 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 37081 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag
 37141 ttatttttca ttacttctg aagtcagagc ttgacttga tttaaatg aattttttag

Fig. 63N

【図 63 O】

```

37201 attotacaata attaatgaa gattatagot ctgctotgaa atggctocaga aatagatctot
37261 gctatagaa actaatgatt tgaagctotct gggaggaag gatacttttaa aatttagtca
37321 catatttgga ggagggaaaaa gggaagagc agaatgaaga actgaacacac actacacac
37381 ggggctgtgc gtgaggtggg ggactggggg agggatagca bttagagata taccataagt
37441 aatgaagag ttaacaaag atttttttta gattccacaga cgtatnacata gttaacacaa
37501 ctgcaagttg tgaacatgta ccttagaact taaagtataa taaaaaaata ttttatagct
37561 cccataaat aattaanaag atttttttta gattccacaga agtgtacaaa attttttagt
37621 ttttttttt ttaagctgtc tgcgtgaatg tttctaatg gtotacaatg tttgtatcta
37681 caaacagata ctgtctgtct attactaccc tcccaagaca agtatattta tggcaattat
37741 tggccagttt cccgggaaaaa atttatccac agttacagaa gaatgagatg caattgtgag
37801 actgttaagt ttaagcaagc actcagagaa gacacagtat atgtatgcac agaagaggca
37861 gtctttgttt tgaagaaac agtgaagata aagttaattc aagacacaa agacagtaa
37921 ataatgtctt tattttttgta gttaataata tttcagtgga atgcataatt ctacataaa
37981 tgcataaga actgtttgtg tgaactaact tttggaaaaa aaacataccc attagaagaa
38041 tgtctttggg atttattttt accagaaaat caatcctttt ttcagtcocct tgcaaaagtac
38101 agtgttaca gcaagaaact tgaataoag gtgaaaaagt gatttttaatt gcagaaatgt
38161 atatgaanaa cttttgttcc tggcccttgg aactttaggg gaatgaanaa gtctagcaat
38221 ctccacttcc tttttotctc tggaaactga actgttaattc aaagcctgtt tctcatttaa
38281 gtacactggc gcaatctctc ttaacagttg agttacaaga ctattcagag acctcctgtg
38341 cttaagaga cagaacaagg atgtgtttaa atagacagaa ggcgtgtgaa aaaaaaaat
38401 ctgaanaatg taaaatgatt ctgtctctcc tcccaactcc actgtgag gtggagagg
38461 aatcagttg gtgacacaa gcaagtggtt ggttaaaagt ccaactttct ctccaggtt
38521 gcaacaggac ccaagatgag tgggtggcact gtgtgtgaac tgcactttga cccagagttt
38581 tcccgcaaca ggtagtgtg tgaagaggt tgcactaaagt tgcactttga cccagagttt
38641 cgtatgttct tctgtgttcc aaaaagtggt aggaanaagg gggagtattg aagcactgat
38701 tctgtgtata cttcttaagc atgcataagg gtgaanaagg aagcaaaagg tttgtggagg
38761 cctcgtgtct agtgtttaca gaacttggtt gcttgacaaa cagagcgtca agtcaattgt
38821 tcttgagaa ggaactctgc agtgagga gagggtgtgt ggggatgatt acocactgtt
38881 gaantggct caataactat tttgtctc tgaagtgtgc cccaaaagag tccatagact
38941 ttttgagaa tgcactttat tttatttctc gatttttctc tttcagactt tttgtgaagt
39001 aaggagaag tgcataataa aatttggtgt cagatagcat actgtcggca gtgtttcaga
39061 tatcactcca ctttctattc tttttcttct tttttttt tttcagactt cccactattt
39121 cagaanaact gtgactaaga gtgaattctt atttttccaa tttttttt cactttatgt
39181 tttctgtaa cttgtcttct ttttttctc atttttctc attttttt ttttctatgt
39241 ttttttttca tgcagttact caaatgggtc ttttgagggt cttgataaac agggagggag
39301 ggtgtgcaa cgaagagcca tgaagactct cactgaagt tggacaagta aagacactat
39361 gctgttctat gacgcactgt tgaactgtgt tagcctccac ctagtatgtt gctaatgtgt
39421 cctgtaccca ctttctattc cttcttttct ttttttttca agcaaaactt tctgactttt
39481 gacgcactga cagattctct caagtcaatg tactaatgtt ttttttga tctcaagatt
39541 aagatagaa ggaactctgc tttatttctc tagatagata gatagataga tagataaagt
39601 atagatagat agtatagatg atatttttct ttaaaaagca aaacacttgt gtccaaaact
39661 aaaaactaga gaattgaana taaaagctgt ttttttttca agcaaaactt tctgactttt
39721 acagaagagt tttgttact gtgaactttc caatatagat aactatgtgt gcagaaagaa
39781 ataattatbt ttaactataa aaattgtgt atagtcaat caactgtctc agttaaaagt
39841 aatgtctact tgaactgtt tgcctgcaa atgcaagaat cactatagtt tccacagagt

```

Fig. 63O

【図 63 P】

```

39901 gctcactgt ctaaacctct gaataaacta gtataacact tttgttttaa aagaaaaat
39961 atattcttgt atttcactgt actttgcata aagactotta tttgtatgto tatctatgoc
40021 ttttgaataa tatatgcagc tctaaagct tctaatgct agatgttgtt gctctatgta
40081 atcatttgtt tttctatag atgcagttc tctgtgata accagagata aagatcaaac
40141 aagactgcca gaactgaag ctgttcaaaa tggaaagagt tgcacacaa gtcccttgtt
40201 aaaaacaaat caggtataa cagactgac tttgtgtatg gaggctgtgt ggtcacaact
40261 ttttagtagt atcttaaaag gttagggcaga gtctaaagac tctcaacag atgtatgtag
40321 ctggaagtta cagtagatgc gaacttttgc tgcactgtag tcaattataa ttaacacaa
40381 taagaacaaa ataactcatt ccaatgaag tcaatattc aaagagtag agttcatgt
40441 ctgtaagtg cagttattag aactactctg tccagggcaa ggtttcatgt gctgaacttt
40501 tctcagctgt gtgtcactc cagactaaa cgtgatgtta atgtatatt aatttaatt
40561 ctaactctct atctaattt atctaagca cagaggggtt aattgtactt cttctaatt
40621 ttaaatgtta aacttttaa atattgata atagtattt tttcagtggt tatcgtatt
40681 tttgttcaaa tttctatgt aaaaagaaat attaaacag tccctgacaa aagttagaa
40741 taacagataa aattgtcgt cgtgacact cgttttctta acagtctgg acaaatagt
40801 tctgtattgt ttaactatgt aatgaagtt tttatagata gctgtgtgac agacataagc
40861 agttttgtat taggattgtt gtgtgtgtc tttgtctgtg tgcacaaata tctgtgag
40921 caatattcca tccctttcca agagtcaag agggaggtt tatattttaa cttctaagta
40981 caagatgtgt caaattctgt tgcacaaact ataaatgag aatataatga tgcacagag
41041 ttttttagtg ctaaacattt gggctggcag tctgtctgtg gtgagagttt ctgtcctct
41101 ccaaatatat ttaagtgta aatcaataa tcaagacag tttacagagt acacttttcc
41161 cagggccctt cactcttccc cgttccaga gctgtctgtg tctgacaga ggcagggctc
41221 ttttttagaa ggcagggcct tgaaggttt ccatgaaact cctttctca cctcctgtg
41281 aagagcaata ccaataaac gctcaccgt gaactgtgaa atggcactt cctcctttt
41341 tctcctgctg ctgcctcag ctggtgata cgggtttgaa gatgaagaa gatcagaggt
41401 tggctgtcag cgaactgtg tctctgtcgt ggtatagat acactctatt tctctgtgct
41461 tggaggggta ggaagtcct tctatagat acactctatt tctctgtgct ggtatagat
41521 agaggggta tgggggagc aaagtccagc tctatagatg tttcagttt tttcagttt
41581 tcaactttt aggtgtcata aaagcagtc gbtgtcactg ggaacagat ggaactctct
41641 gacactttt ctctcctgt ctgcagttc tagcagacag tgcacagag cccagacatg
41701 ggggaacaaa atcctcgtgt cgaagtggt cttatttga gggatgtgt cagatagat
41761 catcttcat gctcactata tcaactgtgt ggtctcctgt tgaagactg gggagagaa
41821 caggagaac ctgcctcagc aacagacac cgtgtcctgt agcaactgt ccaacacaa
41881 ggcagcggc acaacacag cgtcagagc cagtagctga acatctccc taaggactgc
41941 ggaacagct tctcctccc actaagaaa ggtcagcggc gactacggg cctcgttgtt
42001 catcgtcag gagatgcct cgcagagccc ggcagaactt tactacagat tctgagagg
42061 accctgtgtg taactgtgt tccacagag accactaat tcccgatgc tcccttgag
42121 gtttgagag cgcctgtgtg gagaattgac tagaagcaga cagcgggga gggagacat
42181 cctcctcga agagccctgc cgcctgtgac gcttactatg tctgtgaga tccgactgt
42241 gtgaacacac actcctcctg gaactgtgaa gactgtgaga gataacgca tccgactgt
42301 tggctcgtgt ccaactctc ctccctgag cactgtgtgt cgtgtacta ggcctgtgca
42361 gaagcagag gaagacagtg gttgtggag gagagagtg gagtagact cagcagtgca
42421 ccagagtgcc actcctgga gggcgggtt ctgcctggg tgaatttccc cgcagtgca
42481 taccgactt gtaacagga cctcgggta ttttaaggtt gcaaaagat ctatagatta
42541 gctcactgt tctactgt tctgttacc agggctgtgc agcaactcac ctagacactc

```

Fig. 63P

【図 63 Q】

```

42601 cactcactat ctgactcact catggaacac taaactgtgt agtccctccc tccagcctgt
42661 ggcacacaa gcttactgtc atgggttaac cgttcaaga aattgtgttt gctaacaaag
42721 tgccttttag ccagatgcta ggtgtgtgtc gaagaaggt aggtttctat agaaggagat
42781 ggggtgtggg aaagggtgtg ctgcaattgt agtcaactgc tctgtcctct gaacacagaa
42841 gttgtgaagg aaaaagaaa aagcaactta cgttagocag cactttgtgt tttcgtgagt
42901 cgaagagggc agtagagagc acgacagcac acacagtga tccagtgca tggggagggc
42961 ctgcctgtha tcaaatagcg atgtgcagga ctcttctatc ctcgggaacaa
43021 agcagggat tttgtgaaa ggaacaggtt tggaggaag ggaagaagta ggcctgtgag
43081 gatatatttg ggaagagctg tttgtgtact gccaataaga tacaacagac cagactgtag
43141 gagactcgt ctgctttgga tgaattttta agcagactca gctgtactac tttactacat
43201 tttataaaca caggggaagc atttaggata tagcagaga gccaaatctg actcaaaagt
43261 tgaanaagca aaggtcaaac aggtcgttaa tccactatca tctgttttat taagaatcc
43321 tttatataaa aaggtagctc agatagctt ccccccaggt tctcctctcc cctccagatt
43381 gacacttaag aactttgtt tttcgggtgt ctgtccgggt gcaagggctg caggtcgtgt
43441 actgtggag gctgaactga cccgtgtgtg gtgtcagggt gaagacata cgcagacact
43501 cttagagctc ttaagagcga agtaaatatt gatgtcagg gggagaagaa agatagagc
43561 tttttatatt aggtatagat aacacaaagg atataaaatg aagattttt actaatatat
43621 atttttaagt tgcacagct acacacagga agatgtgaaa ttaattttgt gcaatttaag
43681 ggtcccaagt ctccagctgt aaaaaaaca attggacagc ttaactgtgg aaaaacacaa
43741 tctattocaa aagaacaata atagagacaa atgcanaaat aacacagtc tccgaagga
43801 tctccagga cgttagacta ggaagtagca gcccccagga caggaagac gatgtgact
43861 catcatatat ttaacatga caagatgttc cggcgtttat tctcgtgtg gtttttccc
43921 tgccttagtg gctgaaggtt tctctaga

```

Fig. 63Q

【図 64 A】

```

1 EphrinB2 mRNA
1 ggcggagct gggagtggt tgcactgga tctgagaag gactcgtgt ggaagtatg
61 ctgggtgtgt tttgagttt tatgagaa tgcagattcc aactcagatg ttttagagcc
121 tctctatttg aattctcga actccaaat tctactcaga caagactggt tactataccc
181 acagataga gacaatttg atattattg ccccaaggtt gactctaaa cctgttgaca
241 gtatgaata tataaagtt atagtgtga taagaccaa cagacagat gactatttaa
301 gaaggaaaat accctctcc tcaactgtg caaacacagc caagatctaa aattcaccat
361 caagtttcaa gaattcagc ctaactctg ggtgtagaa tttcagaaga acaagatta
421 ttacattata tctactcaa atgggttctt ggaagcgtg ggaagcgtg agggaggggt
481 gtgcagaca agacactga agactctat gaaagtga caagatgcaa gttcgtgag
541 atcaaccagc aataaagat caacagagc tccagacta gaactcgtga caatgtgag
601 aagttcagca acaagtctc tttgaaac aaactcaggt tctgacagc agggacaag
661 cgcgggact tgggggaaa acatctcgt ttcagagtg ttcagagtg caggtattgt
721 ttcaggatgc atactctca tctctactc catcagctg ggtgtctct tgcagagta
781 cggagggaga cagaggaagc actcgcgca gcaacagacc agctgtctg tgcagagta
841 gcccacacc aagcagcag gcaacacaa cgtctcagc cccagtgca tttactatcc
901 gctaaggact cggagcagc tctctgccc tcaactcagc aagtgagag cctcagctgt
961 gcccagcgt taccctgtc ggtactgtg ctttccagc ctttccagc cggcgcaaa
1021 ggtctgagag ggaactgtt ggtactgtg ctttccagc ctttccagc cggcgcaaa
1081 cctccttgga ggtttgaga gcccgctgt tggagaattg actgaagac agacacggg
1141 gagagggaca cctcctcgt gaagagccc cgcgtgaga cagactcgtt agactgtg
1201 cactcggct tggtagaac acactcctc tctcactga gactcgtgt ggtgtgct
1261 cactcggact cgtgtgccc gtcccagtc tctcactga agcagaggt ggtgtgct
1321 caggcctctg cagaagcaa gggagaagc tggtttgtg acagagaggt ggtgtgct
1381 ctggcaggtg cccagagtg cccagcgtg aagggcggc tttcgtgtg ggtgtgct
1441 ccccgagtg cactcagac tttcagagc gactcgtgt tagttaagt gttgcaagt
1501 ctctagagtt tagtcttcc tttctcact gttctgttcc cagggctct gacgactc
1561 aactgagac tcaactcac atctgacta cttatgggaa actcagttct ggaactcct
1621 cctcagagcc ctgccaaca cagcttact ccatgggtta cctgttata gaaatttgt
1681 tttgtacaa ggtgccttt agcagatgc taggtgtgtt ggaagaggt cttaggtgt
1741 atagaagga gggggctgt ggaagggtt aaaaagagat taggtagac agacttgtg
1801 ctgaacaga aagttgtgaa ggaagagga acacagagc acacagagc gatctagtg
1861 tttgtgtgag atogaagag ccagtaggag atacaatat gtagtgtgag gaagaagc
1921 cagtgggag cactcgtgt atgttgga aaggaagag cttggagga agggagaag
1981 tccggggaac aagaaggtt cgggagga tttgtgtgta ctggcaata gatacaga
2041 tagggcgtg atgatatct cgtcgtgtg gatgtattt taagagact cagctgtat
2101 ctccagctgt agagagctg gctcgtgtg gatgtattt taagagact cagctgtat
2161 acttatcaa tttatttaa cagagggaa gacttagga gaatagaga gacgaagat
2221 gactcaaaa gttgaaagc caaggtcaa caggctgta atctactat cactgtgtt
2281 ataaagat cttactatc aaaggtag tagactccc ctccccagc gttcctctt
2341 cccctcaga ttagacta cgaactttg gttattgag tttcgtcag gtcagaggt
2401 tgcaggtgtg actgtatg agctcagc ccccgctgt cgtgtcag gtcagaggt
2461 tccggcagc cttctagat ctttagagc gaagttaat atgtgtcca gggggagag
2521 gaagtagga cgtattata ataggtat agaacacag gataataa tgaagattt
2581 ttaactaat atattttaag gttgacaa gtacacaa gaagatgta aactcattt

```

Fig. 64A

【図 6 4 B】

```

2641 tggcaattaa gtggtcccaa tgotagcgc ttaaaaaaac aaattggaca gctactcttg
2701 ggaataacaa catcattoca aaagaacaa taatgagagc aaatgcaaaa ataaccaagt
2761 cctccgaagg catctcaagg aacgtagac taggaagtag gagcccccaca gacaggaag
2821 ccgagtgtac tgcatacatat atttaacaat gacaagatgt tccggcgttt attctgcgt
2881 tgggttttcc cttgcattat ggggtgaagt gttctctaga atccagcagg tcacactggg
2941 ggcttcagggt gaagatttag ctgtgtgtcc cctctctgtt cctcccccgc accccctccc
3001 ttctgggaaa caagaagagt aaacaggaaa cctacttttt atgtgtatgt caaaatagac
3061 atcttttaaca tagtcttgtt actatggttaa cactttgctt ctggaattgg aagggaaaaa
3121 aatgtagcgc acagcatttt aaggtttctca gacctccagt gagtaactgc aaaaatgagt
3181 tgtcacagaa attatgatcc tctatttctt gaacctggaa atgatgttg tccaaatgac
3241 gtgtgtgtat gtgtgagtg gtgtgtgtga tacatgtgta catatatgta taatatatat
3301 ctacaatata tattataat atctatatca tattctgtgt gaggttggt atggttaaca
3361 gacacagtac atatgtaatt ctttccatca ccccaacctc tctttctgtt gacttcattgc
3421 aagagtttct tgaatgcaat cagaagtac ttttaggatg ggggagaggg gggagaggg
3481 gaaaaatggg aaatagctgt attttaatga aatcaaatgt atgtatcact agttggctac
3541 gttttgttcc tatgtcaaac tgtgaaaaat cagatgaatt gataaaagag ttccctgcac
3601 ccaattgaaa agtgtcttgt gctgtctgtt tgtgtctgtt gcaagaatgt acaatctacc
3661 aactgtccct tttgttgaag ttgttttago tttggaagt taacttaaat gcttgcgtt
3721 tatgatgtgc cctgtgtaac gactttgga atttgcacca taatgtttca gtgaagatgc
3781 tgaataatag ttoagatttt aactgttatg gatttgggtt gttcaagtgc ccttatccac
3841 ctttttaata aaataacaca tgaataacag aaagaatagg cttttttac ccaagattgt
3901 tacatagagc aatgttgggt ttttataaag cctaaagcag atgttttgta taaatctga
3961 attttgcaat gtatttagt acagctgtgt taacgcaggt gtaattccct ttgcaactgt
4021 aatgggaaa aatgtgtata aaagttgtgc aaattgtgc atatttgta cgttaattatg
4081 taocatgaat attattttaa aatttctgtg tcoaatttgt aagtaacaca gttatgatgc
4141 tgaattataa atattttttt ctttcttgtt tttattttta tagcctgtca taggttttaa
4201 atctgtttta gtttcaactt gcagttagcc ccaagaatg aaatcgtga agtcacattc
4261 cacatctgtt tcaactgaa tttgttotta aaaaaataa atatttttt cctatggaaa
4321 aaaaaaaaaa aaaaa

```

Fig. 64B

【図 6 5】

EphB4 Precursor Protein

```

1 melrvllcwa slaaaleetl lntkietadl kvrtfpgvdg qweelsglde eghavrttyev
61 cdvqraggga hwlrtgwpvr rgavhyatll rftmleclsl pragrscet ftvfyyseda
121 dtataltapw menpyikvdt vaahltkrk pgaatgkvn vktlrlgpl kagflyafgd
181 qgacmallsi hlffykoasl tvaltrfpt vprelvvpa gcvrdavpa pgspealyer
241 edgwaegpw tgcscapge ttpspaprsv vzrlngsllh lewaaplesg gredltaylr
301 vcqrvgyfr artdpagape pprtdivepv vvvrlrpfdf tytfvotaln qvaslatgpp
361 creorpggse apoggdlfdd pprtdivepv vvvrlrpfdf tytfvotaln qvaslatgpp
421 pfepvavttd revppavddi rvtsspsal slawavprap sgavldyevk yhekgaegps
481 svrflkteem rslrglkrq asylvqvar seagyppfgg ehhsqqlde segwreglal
541 iagrtvrvvv lvlvvrvav lclrkqsvr eaeydkhgg yllghgtkyr idfttyedpm
601 oavrefakei dsvyrkieev igagfsgvvc rgrlkapgk escvaiktik ggyterqre
661 fteasimgq fehpnirle gvttnsmvpm iltefaenga ldsflindg qftviqlvm
721 lrgiasgmry lamsyvhvd laarnilvms nlvokvdsfg lzfleenss dptytsalgg
781 kipirwtape aiafrkftsa sdawsygiva wewmsfgsr ywdmsnqdv naieqdyrlp
841 pppdoptslh qlmldcwkd rmarpfpgv vsaldkmirn pasklivare nggashplld
901 qrpghysafg svqewlraik mgyeasfaa agfsgfelvs qisaedllri gvtlaghqqk
961 ilasvqhmkc qakpgtpggg gspapqv

```

Fig. 65

【図 6 6】

EphrinB2

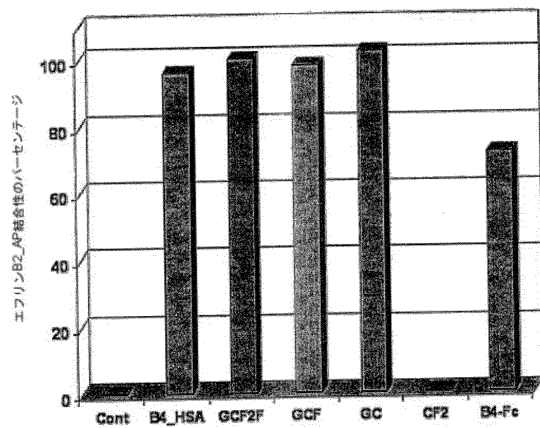
```

1 mavrvdsvvk ycwgvlmvlc rtalsksivl epiywnssns kflpgggglvl ypqgdikldi
61 icpkvdsaktv ggyeykyvm vdkdqdactr ikkentplln cakpdqdklf tikfgefepn
121 lwglefghkn dyriysteng slagldnqeg gvcqtramki lmkvgqdass agstrnkdp
181 xrpelaeagn grssttspfv kmpgsstdg nsaghsnmni lgsevalfag iasgcilfiv
241 iitilvllll kyrrrhkhs pqhtttllsl tlatpkrsn ngsepsadii iprtadefv
301 cphykevsgd yghpvivqe mppgsapani ykv

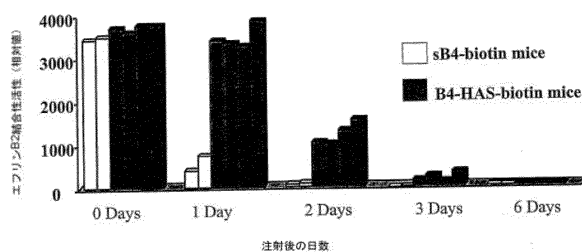
```

Fig. 66

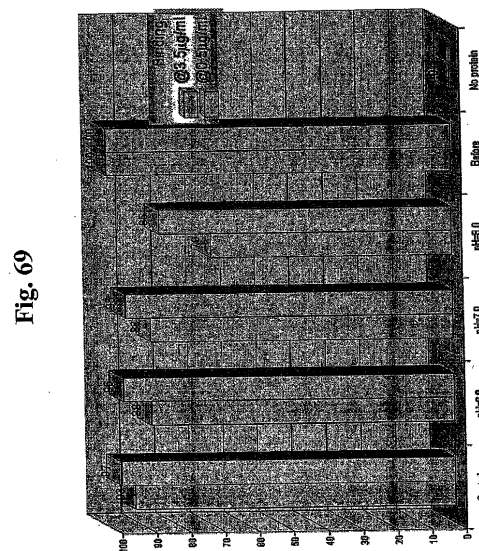
【図 6 7】



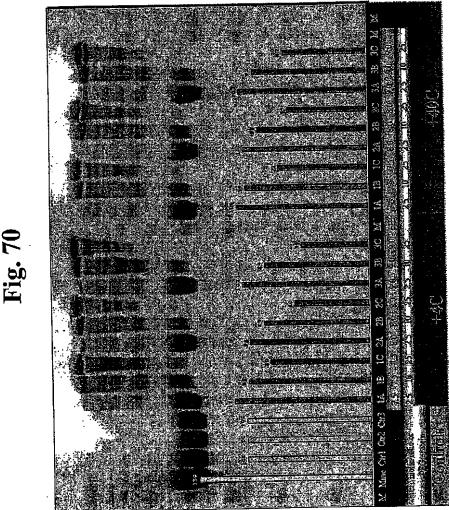
【図 6 8】



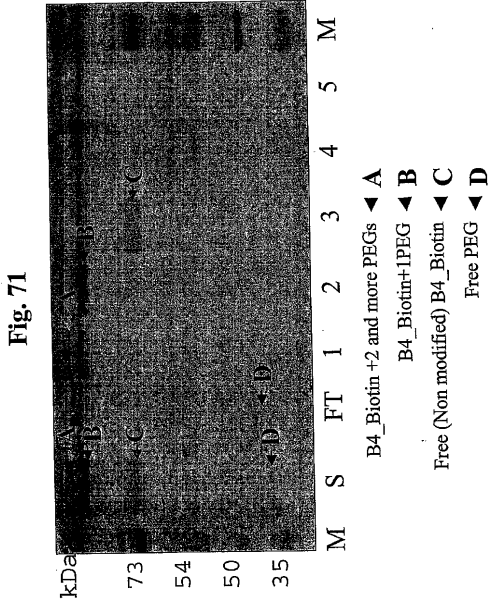
【図 6 9】



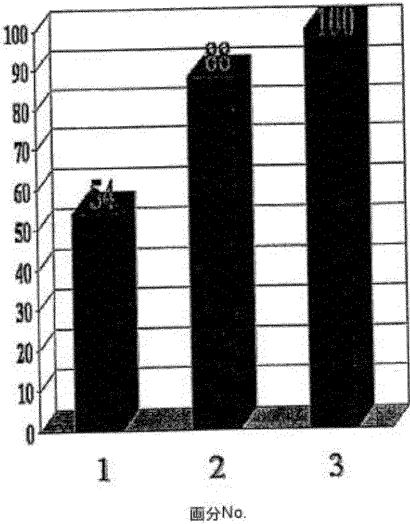
【 図 7 0 】



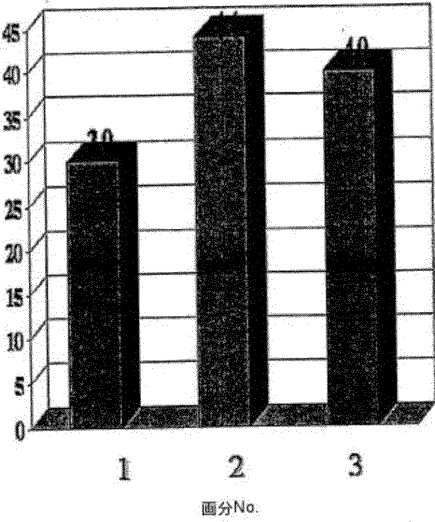
【 図 7 1 】



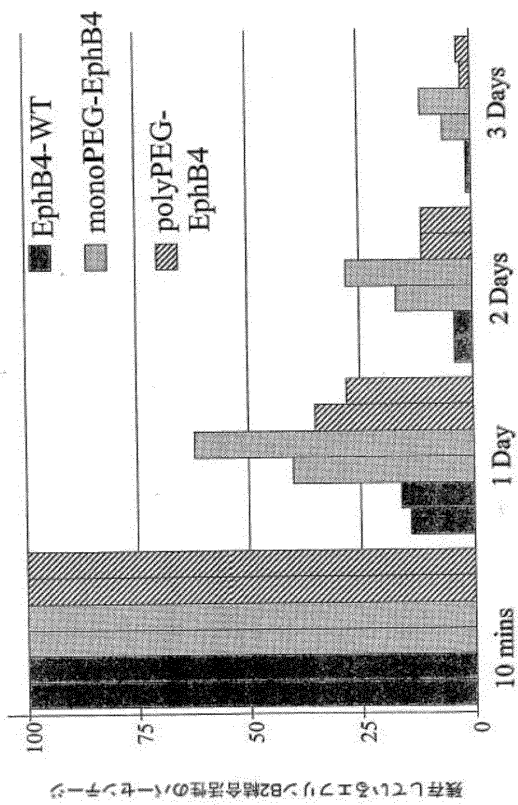
【 図 7 2 】



【 図 7 3 】



【図 7 4】



【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 9 1 0 3 0 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
 1 6 9 9、ナンバー 1 1 2
 (72)発明者 セルゲイ ソズリア
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア、サン ディエゴ、ヤズー ストリート 1 4 4 8
 1
 (72)発明者 ナタリー ケルテズ
 アメリカ合衆国 9 1 3 0 1 カリフォルニア、カラバサス、ロスト ヒルズ ロード 4 2 4 0
 、アパートメント 1 6 0 3
 (72)発明者 ラマチャンドラ レディ
 アメリカ合衆国 7 7 5 8 4 テキサス、ピアランド、タイデンハーフェン コート 1 1 4 0
 8
 (72)発明者 パルカシュ ギル
 アメリカ合衆国 9 1 3 0 1 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 2 9 4 2 0

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 特開 2 0 0 3 - 5 3 0 8 7 1 (J P , A)
 米国特許第 0 5 6 3 5 1 7 7 (U S , A)
 国際公開第 9 9 / 0 5 2 5 4 1 (W O , A 1)
 国際公開第 0 2 / 0 2 6 8 2 7 (W O , A 1)
 国際公開第 0 4 / 0 2 0 4 6 8 (W O , A 1)
 特表 2 0 0 2 - 5 0 5 3 3 8 (J P , A)
 特開平 0 4 - 2 1 8 0 0 0 (J P , A)
 H E S , I O V S , 2 0 0 4 年 4 月 , V 45 N . S U P P L 1 , P . U 804
 P N A S , 2 0 0 4 年 4 月 1 3 日 , V o l . 101 , p . 5583-5588
 B i o o r g a n i c & M e d i c i n a l C h e m i s t r y L e t t e r s , 2 0 0 4 年 9 月 6 日 , V o l . 14 , p . 4395-4398

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C 0 7 K 1 9 / 0 0
 C 0 7 K 1 4 / 4 7
 C 0 7 K 1 4 / 7 6 5
 C A / B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)