

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-521111

(P2006-521111A)

(43) 公表日 平成18年9月21日(2006.9.21)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09</b> (2006.01)	C12N 15/00	A 4B024
<b>C07K 14/705</b> (2006.01)	C07K 14/705 Z N A	4B064
<b>C07K 14/47</b> (2006.01)	C07K 14/47	4C083
<b>C07K 16/18</b> (2006.01)	C07K 16/18	4C084
<b>C07K 16/28</b> (2006.01)	C07K 16/28	4C085
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 109 頁)		最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2006-507160 (P2006-507160)	(71) 出願人 505340951 バスジーン セラピューティクス, イン コーポレイテッド アメリカ合衆国 19079 ペンシルベ ニア、シャロン ヒルズ、フック ロード 4
(86) (22) 出願日	平成16年3月12日 (2004.3.12)	(74) 代理人 100067817 弁理士 倉内 基弘
(85) 翻訳文提出日	平成17年11月9日 (2005.11.9)	(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 國際出願番号	PCT/US2004/007755	(74) 代理人 100062409 弁理士 安村 高明
(87) 國際公開番号	W02004/080425	(74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開日	平成16年9月23日 (2004.9.23)	
(31) 優先権主張番号	60/454,300	
(32) 優先日	平成15年3月12日 (2003.3.12)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	
(31) 優先権主張番号	60/454,432	
(32) 優先日	平成15年3月12日 (2003.3.12)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	

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及びその応用

## (57) 【要約】

癌治療又は血管形成関連障害の治療に有用な、エフリンB2又はEphB4活性を阻害するポリペプチド組成物及び方法。

**【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する単離された可溶性ポリペプチドであり、該EphB4ポリペプチドは単量体であり、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する。

**【請求項 2】**

上記EphB4蛋白質の球状領域を含有する請求項1の可溶性ポリペプチド。

**【請求項 3】**

図65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%同一の配列を含有する請求項1の可溶性ポリペプチド。 10

**【請求項 4】**

図65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%同一の配列を含有する請求項1の可溶性ポリペプチド。

**【請求項 5】**

図65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%同一の配列を含有する請求項1の可溶性ポリペプチド。

**【請求項 6】**

図1又は2により特定される配列を含有する請求項1の可溶性ポリペプチド。

**【請求項 7】**

上記可溶性ポリペプチドはエフリンB2及びEphB4間の相互作用を抑制する請求項1の可溶性ポリペプチド。 20

**【請求項 8】**

上記可溶性ポリペプチドはエフリンB2又はEphB4のクラスター化を抑制する請求項1の可溶性ポリペプチド。

**【請求項 9】**

上記可溶性ポリペプチドは、エフリンB2又はEphB4のリン酸化を抑制する請求項1の可溶性ポリペプチド。

**【請求項 10】**

上記可溶性ポリペプチドは融合蛋白質である請求項1の可溶性ポリペプチド。

**【請求項 11】**

上記可溶性ポリペプチドは1以上の改質したアミノ酸残基を含有する請求項1の可溶性ポリペプチド。 30

**【請求項 12】**

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単離された可溶性ポリペプチドであり、該可溶性エフリンB2ポリペプチドは単量体であり、高親和でEphB4ポリペプチドへ結合するポリペプチド。

**【請求項 13】**

図66により特定されるアミノ酸配列の残基1～225を含有する請求項12の可溶性ポリペプチド。

**【請求項 14】**

図3により特定される配列を含有する請求項12の可溶性ポリペプチド。 40

**【請求項 15】**

上記可溶性ポリペプチドはエフリンB2及びEphB4間の相互作用を抑制する請求項12の可溶性ポリペプチド。

**【請求項 16】**

上記可溶性ポリペプチドは、エフリンB2又はEphB4のクラスター化を抑制する請求項12の可溶性ポリペプチド。

**【請求項 17】**

上記可溶性ポリペプチドは、エフリンB2又はEphB4のリン酸化を抑制する請求項12の可溶性ポリペプチド。 50

**【請求項 18】**

上記可溶性ポリペプチドは融合蛋白質である請求項12の可溶性ポリペプチド。

**【請求項 19】**

上記可溶性ポリペプチドは1以上の改質したアミノ酸残基を含有する請求項12の可溶性ポリペプチド。

**【請求項 20】**

請求項1の可溶性ポリペプチド及び医薬的に適用可能なキャリアを含有する医薬的組成物。

**【請求項 21】**

請求項12の可溶性ポリペプチド及び医薬的に適用可能なキャリアを含有する医薬的組成物。 10

**【請求項 22】**

請求項1の可溶性ポリペプチド及び医薬的に適用可能なキャリアを含有する化粧品組成物。

**【請求項 23】**

請求項12の可溶性ポリペプチド及び医薬的に適用可能なキャリアを含有する化粧品組成物。

**【請求項 24】**

請求項1の可溶性ポリペプチド及び医薬的に適用可能なキャリアを含有する診断用キット。 20

**【請求項 25】**

請求項12の可溶性ポリペプチド及びキャリアを含有する診断用キット。

**【請求項 26】**

(a) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び(b)エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体、の群から選ばれるアンタゴニスト抗体。

**【請求項 27】**

上記アンタゴニスト抗体はエフリンB2及びEphB4間の相互作用を抑制する請求項26のアンタゴニスト抗体。

**【請求項 28】**

上記アンタゴニスト抗体はエフリンB2又はEphB4のクラスター化を抑制する請求項26のアンタゴニスト抗体。 30

**【請求項 29】**

上記アンタゴニスト抗体は、エフリンB2又はEphB4のリン酸化を抑制する請求項26のアンタゴニスト抗体。

**【請求項 30】**

上記アンタゴニスト抗体は、モノクローナル抗体である請求項26のアンタゴニスト抗体。

**【請求項 31】**

上記アンタゴニスト抗体は、ポリクローナル抗体である請求項26のアンタゴニスト抗体。 40

**【請求項 32】**

請求項26のアンタゴニスト抗体及び医薬的に適用可能なキャリアを含有する医薬的組成物。

**【請求項 33】**

請求項26のアンタゴニスト抗体及び医薬的に適用可能なキャリアを含有する化粧品組成物。

**【請求項 34】**

請求項26のアンタゴニスト抗体及びキャリアを含有する診断用キット。

**【請求項 35】**

50

細胞を有効量の請求項 1 の可溶性ポリペプチドと接触させるステップを含む、該細胞中のエフリンB2 / EphB4経路を通るシグナルの抑制方法。

【請求項 3 6】

細胞を有効量の請求項 1 2 の可溶性ポリペプチドと接触させるステップを含む、該細胞中のエフリンB2 / EphB4経路を通るシグナルの抑制方法。

【請求項 3 7】

細胞を有効量の請求項 2 6 の可溶性ポリペプチドと接触させるステップを含む、該細胞中のエフリンB2 / EphB4経路を通るシグナルの抑制方法。

【請求項 3 8】

腫瘍の成長速度を減少させるのに充分な量のポリペプチド薬を投与する腫瘍の成長速度を減少させる方法であり、上記ポリペプチド薬は下記群から選ばれる方法： 10

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

( c ) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び

( d ) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。

【請求項 3 9】

上記腫瘍は比較用組織の非癌細胞よりも高レベルのEphB4及び／又はエフリンB2を発現する細胞を含有する請求項 3 8 の方法。 20

【請求項 4 0】

下記群から選ばれるポリペプチド薬を患者へ投与することを含む癌患者の治療方法：

( 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、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する；  
( 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、高親和でEphB4ポリペプチドへ結合する；

( c ) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び

( d ) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。 30

【請求項 4 1】

上記癌は比較用組織の非癌細胞よりも高レベルのエフリンB2及び／又はEphB4を発現する癌細胞を含有する請求項 4 0 の方法。

【請求項 4 2】

上記癌は転移性癌である請求項 4 0 の方法。

【請求項 4 3】

上記腫瘍は、腸(colon)癌、乳癌、中皮腫、前立腺腫瘍、扁平上皮細胞癌、カポジ肉腫、及び白血病の群から選ばれる請求項 4 0 の方法。

【請求項 4 4】

上記癌は血管形成依存性癌である請求項 4 0 の方法。 40

【請求項 4 5】

上記癌は血管形成独立性癌である請求項 4 0 の方法。

【請求項 4 6】

上記ポリペプチド薬は、エフリンB2及びEphB4間の相互作用を抑制する請求項 4 0 の方法。

【請求項 4 7】

上記ポリペプチド薬は、エフリンB2又はEphB4のクラスター化を抑制する請求項 4 0 の方法。

【請求項 4 8】

上記ポリペプチド薬は、エフリンB2又はEphB4のリン酸化を抑制する請求項 4 0 の方法

50

。

【請求項 4 9】

上記ポリペプチド薬は、医薬的に適用可能なキャリアと配合される請求項 4 0 の方法。

【請求項 5 0】

更に、ポリペプチド薬と添加的又は相乗的に癌細胞を抑制する、少なくとも 1 の追加的抗癌化学療法用試薬の投与ステップを含む、請求項 4 0 の方法。

【請求項 5 1】

細胞を、血管形成の阻害に充分な量のポリペプチド薬と接触させるステップを含む、血管形成抑制方法であり、上記ポリペプチド薬は下記群から選ばれる方法：

( 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、10  
上記EphB4ポリペプチドは単量体であり、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する；

( 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、高親和でEphB4ポリペプチドへ  
結合する；

( c ) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び

( d ) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。

【請求項 5 2】

上記細胞はEphB4又はエフリンB2を発現する請求項 5 1 の方法。

【請求項 5 3】

下記群から選ばれるポリペプチド薬を患者へ投与するステップを含む、血管形成関連障害の患者の治療方法：20

( 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、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する；

( 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、高親和でEphB4ポリペプチド  
へ結合する；

( c ) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び

( d ) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。

【請求項 5 4】

上記可溶性ポリペプチドは、医薬的に適用可能なキャリアと配合される請求項 5 3 の方法。30

【請求項 5 5】

上記血管形成関連障害は、血管形成依存性癌、良性腫瘍、炎症性障害、慢性間接リューマチ及び乾癬、眼性血管形成病、オスラーウェバー症候群、心筋性血管形成、ラーク新生血管形成、毛細血管拡張症、血友病性関節、纖維血管腫、外傷性顆粒化、創傷治癒、毛細血管拡張乾癬強皮症、化膿性肉芽腫、冠状側副(coroanry collaterals)、虚血性血管形成、ルベオーシス、関節炎、糖尿病性新生血管形成、骨折、脈管形成、並びに血液新生の群から選ばれる請求項 5 3 の方法。

【請求項 5 6】

更に、可溶性ポリペプチドと添加的又は相乗的に血管形成を抑制する、少なくとも 1 の追加的抗血管形成試薬の投与ステップを含む、請求項 5 3 の方法。40

【請求項 5 7】

ポリペプチド薬は下記群から選ばれる、癌治療用医薬品の製造におけるポリペプチド薬の使用：

( 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ポリペプチドはエフリンB2ポリペプチドへ特異的に結合する単量体である；

( 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、高親和でEphB4ポリペプチドへ  
結合する；

( c ) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び

50

(d) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。

【請求項 5 8】

ポリペプチド薬は下記群から選ばれる、血管形成関連障害治療用医薬品の製造におけるポリペプチド薬の使用：

- (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、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する；
- (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、高親和でEphB4ポリペプチドへ結合する；

(c) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び 10

(d) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。

【請求項 5 9】

下記ステップを含有する癌患者の治療方法：

(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) 下記群から選ばれるポリペプチド薬を患者へ投与するステップ：

(i) 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、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する；

(ii) 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、高親和でEphB4ポリペプチドへ結合する； 20

(iii) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び

(iv) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。

【請求項 6 0】

下記ステップを含有する癌患者の治療方法：

(a) 患者中の、EphB4及び／又はエフリンB2遺伝子の遺伝子増幅を含む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) 下記群から選ばれるポリペプチド薬を患者へ投与するステップ：

(i) 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、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する； 30

(ii) 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、高親和でEphB4ポリペプチドへ結合する；

(iii) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び

(iv) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。

【請求項 6 1】

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であり、腫瘍細胞中に1以上の下記特徴を検出する方法：

- (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；及び
- (d) エフリンB2遺伝子の遺伝子増幅、

但し、1以上の上記特徴(a)～(d)を有する腫瘍細胞は、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。

【請求項 6 2】

上記エフリンB2又はEphB4アンタゴニストは下記群から選ばれる請求項61の方法：

(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、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する； 50

(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、高親和でEphB4ポリペプチドへ結合する；

(c) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び

(d) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、米国予備出願番号第60/454300号(2003年3月12日出願)及び米国予備出願番号第60/454432号(2003年3月12日出願)の優先権の利益を主張する。関連する予備出願の記載の全てをここで資料として使用する。

10

【背景技術】

【0002】

本発明の背景技術

血管形成、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、成長、プログレッション、及び転移において決定的なプロセスである。生理学的に正常な血管形成中、血管の内皮のその周囲の間質性成分とのオートクリン、パラクリン、及び*amphicrine*相互作用は、空間的に及び時間的に両方で精密(tightly)に調整される。更に、プロ血管新生及び血管新生阻害(angiostatic)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を保つ。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、特に高レベルの異常な血管形成に関係する。

20

【0003】

一般的に腫瘍の発生は、悪性成長力を有する自律性クローンの成長を引き起こす逐次的な関連す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、成長の維持及び制限のない自己再生を含む。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感応性の減少、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。

30

【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試薬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

本発明では例えば、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蛋白質の単一のリガンド結合部及び、特別な方法でEphB4又はエフリンB2に結合し、影響する抗体を含むものを提供する。

40

本発明の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する病気等の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。本発明は更に、しばしば高レベルで種々の腫瘍中で発現されるEphB4及び/又はエフリンB2の発見に基づく。従って、EphB4又はエフリンB2機能をダウント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並びに腫瘍により採用され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。例えば、本発明により、EphB4又はエフリンB2機能をダウントレギュレートする試薬での治療に特に適した腫瘍種の特性が提供される。

【0006】

本発明では例えば、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

50

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、これらのポリペプチドが膜貫通領域を含有しないか、生理食塩水中のポリペプチドの溶解度を保つのに充分な膜貫通領域部分を含有しないことを表すために単に使用される。本発明の可溶性ポリペプチドは、好ましくはエフリンB2等のリガンドへ結合するEphB4と競合し、EphB4活性化で引き起こされるシグナルを阻害する単量体として調製される。任意で、本発明の可溶性ポリペプチドは、例えば、Fc融合蛋白質としての発現又は別の多量体形成領域との融合により、多量体形態として調製できる。これら多量体形態は、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。例えば可溶性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により特定されるアミノ酸配列の残基1～5 10 22と少なくとも90%同一の配列を含有してもよい。好ましくは可溶性EphB4ポリペプチドは、図65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%同一の配列を含有してもよい。更に好ましくは可溶性EphB4ポリペプチドは、図65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%同一の配列を含有してもよい。又、可溶性EphB4ポリペプチドは、図1又は図2に示される配列を含有してもよい。例えば、可溶性EphB4ポリペプチドは、エフリンB2及びEphB4間の相互作用を阻害してもよい。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てもよい。エフリンB2又はEphB4のリン酸化は、一般的に、これらの蛋白質によりレギュレートされる細胞内シグナル経路を活発化する最初の事象の一つであると考えられる。本発明の可溶性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できる。可溶性ポリペプチドは、1以上の改質した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好ましい性質に寄与できる。

#### 【0007】

本発明では例えば、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。この可溶性エフリンB2ポリペプチドは、特異的にEphB4ポリペプチドへ結合する。用語「可溶性」は、これらのポリペプチドが膜貫通領域を含有しないか、生理食塩水中のポリペプチドの溶解度を保つのに充分な膜貫通領域部分を含有しないことを表すために使用される。本発明の可溶性ポリペプチドは、好ましくは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活性化の結果であるシグナルを阻害する単量体として調製される。任意で、可溶性ポリペプチドは、例えば、Fc融合蛋白質としての発現又は別の多量体形成領域との融合により、多量体形態として調製できる。これら多量体形態は、文脈に応じてアゴニスト的又はアンタゴニスト的効果を有する、複合的活性を有する。可溶性エフリンB2ポリペプチドは、図66により特定されるアミノ酸配列の残基1～225を含有してもよい。又、可溶性エフリンB2ポリペプチドは、図3により特定される配列を含有してもよい。例えば、可溶性エフリンB2ポリペプチドは、エフリンB2及びEphB4間の相互作用を阻害してもよい。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てもよい。本発明の可溶性エフリン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できる。可溶性ポリペプチドは、1以上の改質した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好ましい性質に寄与できる。

#### 【0008】

本発明では例えば、EphB4及びエフリンB2に対するアンタゴニスト抗体を提供する。上記抗体は、EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制するように設計できる。上記抗体は、エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制するようにも設計できる。更に上記抗体は、エフリンB2及びEphB4間の相互作用を阻害するようにも設計できる。本発明のアンタゴニスト抗体は、一般的にEph及び/又はエフリンシグナルに作用する。例えば本発明の抗体は、エフリンB2又はEphB4のクラスター化又はリン酸化を阻害できる。アンタゴニスト抗体は本質的に、例えば、モノクローナル及びポリクローナル抗体、单鎖抗体、二重特異性抗体、ミニボディ(minibody)等抗体の可変部を含有するいずれのポリペプチドでもよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 9 】

本発明では又、ポリペプチド試薬及び医薬的に適用可能なキャリアを含有する医薬的配合物を提供する。ポリペプチド試薬は、例えば本発明の可溶性EphB4又はエフリンB2ポリペプチド及びアンタゴニスト抗体を含有してもよい。追加的配合物は、化粧品組成物及び診断用キットを含有してもよい。

## 【 0 0 1 0 】

本発明では例えば、細胞中のエフリン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、細胞を有効量の下記ポリペプチド薬と接触させるステップを含む：(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、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する；(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、高親和でEphB4ポリペプチドへ結合する；(c) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；又は(d) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。

10

## 【 0 0 1 1 】

本発明は、例えば、腫瘍の成長速度を減少させるのに充分な量のポリペプチド薬を投与する腫瘍の成長速度を減少させる方法であり、上記ポリペプチド薬は下記群から選ばれる方法を提供する：(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、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する；(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、高親和でEphB4ポリペプチドへ結合する；(c) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び(d) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。任意で、腫瘍は比較用組織の非癌細胞よりも高レベルのEphB4及び/又はエフリンB2を発現する細胞を含有する。

20

## 【 0 0 1 2 】

本発明では例えば、癌患者の治療方法を提供する。上記方法は、下記群から選ばれるポリペプチド薬を患者へ投与することを含む：(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、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する；(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、高親和でEphB4ポリペプチドへ結合する；(c) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び(d) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。任意で、上記癌は、比較用組織の非癌細胞よりも高レベルのエフリンB2及び/又はEphB4を発現する癌細胞を含有してもよい。上記癌は、転移性癌でもよい。上記癌は、腸(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、及び白血病の群から選ばれてもよい。任意で、上記癌は血管形成依存性癌又は血管形成独立性癌でもよい。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てもよい。上記ポリペプチド薬は、ポリペプチド薬と添加的又は相乗的に癌細胞を抑制する、少なくとも1の追加的抗癌化学療法用試薬と共に投与されてもよい。

30

## 【 0 0 1 3 】

本発明では例えば、血管形成阻害方法も提供する。上記方法は、細胞を、血管形成の阻害に充分な量のポリペプチド薬と接触させるステップを含み、該ポリペプチド薬は下記群から選ばれる：(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、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する；(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、高親和でEphB4ポリペプチドへ結合する；(c) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び(d) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制

40

50

する抗体。

【 0 0 1 4 】

本発明では例えば、下記群から選ばれるポリペプチド薬を患者へ投与するステップを含む、血管形成関連障害の患者の治療方法を提供する：( 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、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する；( 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、高親和でEphB4ポリペプチドへ結合する；( c ) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び( d ) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。上記可溶性ポリペプチドは、医薬的に適用可能なキャリアと配合されてもよい。上記血管形成関連障害又は、望ましくない血管形成関連障害は、血管形成依存性癌、良性腫瘍、炎症性障害、慢性間接リューマチ及び乾癬、眼性血管形成病、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、纖維血管腫、外傷性顆粒化、創傷治癒、毛細血管拡張乾癬強皮症、化膿性肉芽腫、冠状側副 (coronary collaterals)、虚血性血管形成、ルベオーシス、関節炎、糖尿病性新生血管形成、骨折、脈管形成、並びに血液新生の群から選ばれてもよい。本発明のポリペプチド薬は、可溶性ポリペプチドと添加的又は相乗的に血管形成を抑制する、少なくとも1の追加的抗血管形成試薬と共に投与されてもよい。

10

20

30

40

【 0 0 1 5 】

本発明では例えば、癌又は血管形成関連障害の治療用医薬品の製造におけるポリペプチド薬の使用も開示し、上記ポリペプチド薬は下記群から選ばれる：( 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、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する；( 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、高親和でEphB4ポリペプチドへ結合する；( c ) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び( d ) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。

【 0 0 1 6 】

本発明では例えば、下記ステップを含有する癌患者の治療方法を提供する：( 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 ) 下記群から選ばれるポリペプチド薬を患者へ投与するステップ：( i ) 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、特異的にエフリンB2ポリペプチドへ結合する；( ii ) 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、高親和でEphB4ポリペプチドへ結合する；( iii ) EphB4蛋白質の細胞外領域へ結合し、EphB4の活性を抑制する抗体；及び( iv ) エフリンB2蛋白質の細胞外領域へ結合し、エフリンB2の活性を抑制する抗体。本発明の方法は、任意で、患者中のEphB4及び/又はエフリンB2遺伝子の遺伝子増幅を含む複数の癌細胞を有する腫瘍を特定するステップを含有してもよい。

【 0 0 1 7 】

本発明では例えば、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；又は( d ) エフリンB2遺伝子の遺伝子増幅。1以上の上記特徴( a ) ~ ( d ) 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ってもよい。

【 0 0 1 8 】

図面の簡単な説明

図1はB4ECv3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

50

む前駆体の推定配列を示す)。

図2はB4Ecv3NT蛋白質のアミノ酸配列を示す(非開裂EphB4リーダーペプチドを含む前駆体の推定配列を示す)。

図3はB2ECC蛋白質のアミノ酸配列を示す(非開裂エフリンB2リーダーペプチドを含む前駆体の推定配列を示す)。

図4はB4Ecv3-FCC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)。

図5は、B2ECC-FCC蛋白質のアミノ酸配列を示す(非開裂エフリンB2リーダーペプチドを含む前駆体の推定配列を示す)。

図6はB4ECC-FCC結合アッセイ(プロテインA-アガロースベース)を示す。10

図7はB4ECC-FCC阻害アッセイ(溶液中阻害)を示す。

図8はB2ECC-FCC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。15

図9はB4Ecv3に応答するHUAECC走化性を示す(縦軸は0.8ミクロン径の孔通過移動した細胞数。横軸は添加したB4Ecv3量、ng/ml)。

図10はB2ECC-FCCに応答するHHHECCの走化性を示す(縦軸は孔通過移動した細胞数。横軸は添加したB2ECC-FCC量、ng/ml)。

図11はB2ECCに応答するHHAECCの走化性を示す(縦軸は孔通過移動した細胞数。横軸は添加したB2ECC量、ng/ml)。

### 【0019】

図12は、HUAECC細管形成に対するB4Ecv3の効果を示す。20

図13は、HUAECC細管形成に対するB2ECC-FCCの効果を示す。

図14はヒトエフリンB2構成の概略図である。ベクター及び詳細は上から、pET15b(E.Coli)、pGEX(E.Coli)、pEF6(ほ乳類、CMVプロモーター、一過性)、pAPtag-2(ほ乳類、プラストサイジンS、EF-1aプロモーター、一過性及び安定)、pRK5(ほ乳類、CMVプロモーター、一過性)、pcDNA3(ほ乳類、G418、CMVプロモーター、一過性及び安定)、pEF6(ほ乳類、プラストサイジンS、EF-1aプロモーター、一過性及び安定)、pEF6(ほ乳類、プラストサイジンS、EF-1aプロモーター、一過性及び安定)、pEF6(ほ乳類、プラストサイジンS、EF-1aプロモーター、一過性及び安定)、pIG-Fc(ほ乳類、CMVプロモーター、一過性)である。30

図15はヒトEphB4構成の概略図である。ベクター及び詳細は上から、pET15b(E.Coli)、pET15b(E.Coli)、pGEX(E.Coli)、pGEX(E.Coli)、pEF6(ほ乳類、プラストサイジンS、EF-1aプロモーター)、pEF6(ほ乳類、プラストサイジンS、EF-1aプロモーター)、pAPtag-2(ほ乳類、CMVプロモーター)、pAPtag-2(ほ乳類、CMVプロモーター)、pAPtag-2(ほ乳類、CMVプロモーター)、pRK5(ほ乳類、CMVプロモーター)、pcDNA3(ほ乳類、G418、CMVプロモーター)、pEF6(ほ乳類、プラストサイジンS、EF-1aプロモーター)、pEF6(ほ乳類、プラストサイジンS、EF-1aプロモーター)、pEF6(ほ乳類、プラストサイジンS、EF-1aプロモーター)、pEF6(ほ乳類、プラストサイジンS、EF-1aプロモーター)、pEF6(ほ乳類、CMVプロモーター、一過性)、pIG-Fc(ほ乳類、CMVプロモーター、一過性)である。40

図16は組み換え型可溶性EphB4ECC蛋白質の領域構造を示す。領域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 = Cysリッチ領域、F1、F2 = フィブロネクチン型IIIリピート、H = 6 x His 標識。

### 【0020】

図17は、EphB4ECC蛋白質の精製及びリガンド結合性を示す。図17Aは(クマシ-染色され)精製されたEphB4由来の組み換え型可溶性蛋白質のSDS-PAGEゲル電気泳動を示す。図17Bは、Ni-NTA-アガロースビーズ上に固定化したEphB4由来の組み換え型蛋白質へのエフリンB2-AP融合体の結合性を示す。三個の複製物の独立した試験結果をそれぞれの蛋白質ごとに示す。縦軸は420nmでの光学密度。50

図18は、EphB4v3が走化性を抑制することを示す。上のグラフは増殖因子存在下でのB4v3に応答するHUACE侵襲を示し、縦軸は0.8μm径のマトリゲル被覆された孔を通過してウェル間を移動した細胞数、横軸は添加したB4v3量ng/mlを示す。in vitro侵襲アッセイ：HUACE走化性（移動及び基底膜能の劣化の測定）は、modifiedボイデン（商標）チャンバー（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厚ポリマーカーボネート膜）を使用して評価した。トランスウェルの上部表面はマトリゲルで予備コートした。0.25%BSAの200uIのEBM溶液中のHUACE細胞の懸濁液（ $2 \times 10^5$ 細胞/ml）を、上室チャンバーに接種し、B4v3蛋白質を刺激剤（VEGF又はbFGF）と同時に共にチャンバーの下室へ添加し、100nM～1uM試験化合物の存在又は非存在下で10～20ng/mlのVEGFに応答してそれらのポリカーボネートフィルターを通過する移動を測定した。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。3個の複製物について行った。200×倍率で10のランダム視野を計測し、結果を視野当たりの平均数として示した。

#### 【0021】

図19は、EphB4v3がマトリゲル（商標）上の細管形成を抑制することを示す。

Aは代表的試験でのB4v3による細管形成の強い阻害を示す。

Bは、濃度増加するB4v3で得られる、蛋白質なしの細胞と比較しての管長さの減少及び結合数の減少の評価を示す。その結果は、複製ウェルで行われた3個の複製物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。

HUACE培養物を800、2000及び4000ng/mlのB4v3で培養し、次に刺激条件の増殖因子を有するSTDマトリゲル上に接種して細管形成を分析した。接種6時間及び24時間後、細胞の画像を20×倍率でとり、ウェル中に形成された細管状ネットワークの合計長さ及び連結部の数を測定した。Aは、代表的実施例でのB4v3による細管形成の強い阻止を示す。Bは、蛋白質のない細胞と比較した、B4v3の濃度増加で得られた管長さの減少及び連結部の数の減少についてAngiogenesisソフトウェア（商標）での評価を示す。結果を複製したウェルで実施した3個の独立した試験から得られた平均値±S.D.として示す。左側グラフの縦軸は細管合計長さ（二量体）、右側グラフの縦軸は細管連結部数である。

#### 【0022】

図20は、可溶性EphB4は、MTSアッセイで評価した細胞毒性効果は検出されなかったことを示す。セルタイター96HUACEw/B4v3を蛋白質濃度（横軸）に対する492nm吸光度を示す細胞生存率アッセイである。細胞生存率は、(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム、分子内塩（MTS）アッセイを使用して製造者の取り扱い説明書に従い決定した。

図21は、ネズミマトリゲル（商標）アッセイにおいてB4v3は、内皮細胞による侵襲及び細管形成を抑制することを示す。

B4v3(50nM)をECGS(150ng/ml)を含有するマトリゲル溶液へ添加し、Balb/C nu/nuマウスへ皮下注射した。6日後、プラグを取り出してパラフィン中で処理した。個々の断片を、ヘマトキシリソ（A）又はトリクローム（商標、マッソン社製）のいずれかで染色して合計侵襲細胞を検出して20×倍率で画像をとった。（A左上はGFなしのマトリゲルプラグの断片を示し、Aの右上はGFを含むB4IgGを有する断片を示し、左下の断片はGFを含有し、右下はB4v3の存在下でのGFを示す。内皮細胞の顕著な侵襲はGF含有マトリゲルのみで観察された。

右上はB4IgGにより誘起され侵襲された多数の細胞を有する区域を示し、それはB4v3の二量体を示す。画像の左上部は、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へ配置されたプラグの中央に向かって侵襲する。マトリゲルプラグの断片中の全細胞はScion Imageソフトウェア（商標）で定量化された。複

10

20

30

40

50

製したプラグでの2個の複製物の試験から得られた結果を、平均値±S.D.として示す。下のグラフは、*in vivo*のB4グループのマトリゲルプラグについて、50nM蛋白質で処理したグループを示す。

### 【0023】

図22は、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融合での刺激に応答する、PC3細胞中のEphB4レセプターのチロシンリン酸化を示す。

図23は、生存能力(生存率)及び細胞周期に対する可溶性EphB4-EC-Dの効果を示す。Aは、2個のHN SCC(-15及び-4)細胞系の3日間細胞生存能力アッセイを示す。Bは、A中で処理されるHN SCC-15細胞中の細胞周期のFACS分析を示す。これらの細胞の処理は、矢印により示されるようにサブG0/G1及びS/G2期中の蓄積を生じた。

図24は、B4v3は、ネズミ角膜hydron(商標)マイクロポケットアッセイ中の新血管応答を阻害することを示す。

B4v3(180ng)を、纖維芽細胞増殖因子(bFGF)(100ng)の存在又は非存在下でhydron及びスクラルフェート(45ug)へ添加し、ペレットを形成した。ペレットを選択し、Balb/C nu/nuマウスの角膜中のマイクロポケット中に挿入した。3日後、ペレットを取り出し、化合物を凍結処理した。bFGFR-スクラルフェートペレット(左上)のみが、移植3日後に角膜輪部脈管から発生してペレットへ達する激しい血管新生反応を誘起した。bFGF及びスクラルフェートを含有する、B4v3及びB\$f(それぞれ右上及び左下)を有するペレットは、移植3日後にバックグラウンド(左下)を超える血管形成応答を生成しなかった。

### 【0024】

図25は、sB4v3とのSCC15(左側グラフ)、B16(右側グラフ)及びMCF-7(中央グラフ)の共注射は、マトリゲル及び増殖因子の存在下で、これらの細胞の*in vivo*腫瘍増殖を抑制することを示す。

Aは、sB4v3を、マトリゲル製剤中×10<sup>6</sup>細胞で、40mg/kg体重で皮下に共注射した。代表的画像は、PBSコントロール処理(右側腹部)と比較して、sB4の存在下(左側腹部)で腫瘍増殖を阻害したことを示す。

Bは、sB4(v3)での処理は、コントロール処理マウスと比較して*in vivo*(ヌードマウス)で顕著にヒトSCC、B16及びMCF-7腫瘍増殖(腫瘍サイズ)を阻害した(p<0.05)。

Cは、sB4(v3)での処理は、コントロール処理マウスと比較して*in vivo*で腫瘍重量を顕著に抑制した(p<0.05)。データは平均±SEM(標準偏差)として示す。<sup>\*</sup>p<0.05。

### 【0025】

図26は、SCC15の腫瘍組織を示し、可溶性EphB4は3種の腫瘍種、B16黒色腫(中央部画像2枚)、SCC15(頭部癌及び頸部癌、上部画像12枚)、及びMCF-7(乳癌、下部画像2枚)でアポトーシス、壊死及び血管形成減少を生じることを示す。腫瘍はマトリゲル(商標)プラス増殖因子及び可溶性EphB4と予備混合して皮下注射される。10~14日後、マウスにFITC(フルオレセインイソチオシアネート)-レクチン(緑)を静脈注射して血管かん流を評価した。コントロールPBSで処理された腫瘍は、高い腫瘍密度及び活発な血管形成応答を示した。sEphB4で処理された腫瘍は、腫瘍細胞密度の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27は、前立腺細胞系でのEphB4の発現を示す。

Aは、種々の前立腺癌細胞系、細胞系(MLC)由来の正常前立腺及び、EphB4モノクローナル抗体でプローブされる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プロット法を示す。上段はEphB4、下段は-アクチン(標準蛋白質)。Bは、ウェスタンプ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。左は

10

20

30

40

50

10% P B S、右は血清飢餓状態。

【0026】

図28は前立腺癌組織中のEphB4の発現を示す。EphB4モノクローナル抗体で染色された、代表的前立腺癌凍結断片（左上）又はイソタイプ特異的コントロール（左下）。隣接するBPH組織（良性肥大性前立腺上皮由来の）は、EphB4モノクローナル抗体で染色された（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。腫瘍組織中の染色の膜局在化は、EphB4の膜貫通局在化と一致することは注意すべきである。右下グラフは、癌標本（右）及び隣接するBPH組織（左）から抽出されたEphB4：-アクチンRNAの代表的QRT-PCR（定量的RT-PCR法）を示す。下の表は前立腺組織アレイ中のEphB4染色結果を示す。

図29は、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（レチノイドXレセプター）発現を示す。Aでは、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された。24時間後、CD4-分類された細胞を採取し、溶解し、ウェスタンプロット法でEphB4及び、標準蛋白質として-アクチンの発現を逐次的に分析した。Bは、種々の安定な細胞系の上記（A）のウェスタンプロット法を示す。LNCaP-FGFはFGF-8の安定なトランスフェクションクローニングであり、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された。

【0027】

図30は、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。Aは、EGFRを特異的に阻害剤AG1478（1nM）で36時間処理又は処理なしでのPC3細胞のウェスタンプロット法を示す。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。Bは、IGFR-1を特異的に中和する抗体MAB391（2μg/ml；一晩）処理し又は処理しないPC3細胞の3個の複製サンプルを試験したウェスタンプロット法を示す。膜を、EphB4、IGFR-1及び-アクチン抗体で逐次的にプローブした。IGFR-1シグナルは、MAB391処理によるシグナルの予測された抑制を示す。

【0028】

図31は発現及び前立腺細胞機能に対して特別なEphB4 AS-ODN（アンチセンスオリゴヌクレオチド）及びsiRNAの効果を示す。

Aでは、EphB4の完全長構築物を安定して発現する293細胞を、EphB4発現を阻害するためのsiRNA472の能力を評価するために使用した。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siRNA（緑蛍光蛋白質；GFPsiRNA）又はEphB4 siRNA472でトランスフェクション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プロット法を示す。

Bは、完全長EphB4を一時的に発現する293中の発現に対する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、上記（A）のウェスタンプロット法により分析した。

Cは、方法段落記載のようにsiRNAで処理されたPC3細胞の48h生存能力アッセイを示す。三個の複製サンプルの平均±s.e.m.を示す。

Dは、方法段落記載のようにODNで処理したPC3細胞の5日間生存能力アッセイを示す。三個の複製サンプルの平均±s.e.m.を示す。

Eは、上記（A）中でトランスフェクトされた50nMのsiRNAの存在下での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成された直後（0h）及び連続培養で作成された20時間後に得られた代表的20×視野の顕微鏡写真を示す。

20時間後のスクレープでは大量の細胞にEphB4siRNA472ではなくコントロールsiRNAで充填されていた。

Fは、AS-10又はセンスODN（両方10μM）で処理した細胞と同様のアッセイ

10

20

30

30

40

50

を示す。

Gは、方法段落記載のようにsiRNA又はコントロールsiRNAでトランスフェクトされたP C 3細胞のマトリゲル（商標）侵襲アッセイを示す。下室チャンバー中で5mg/mlフィプロネクチンに応答するマトリゲル（商標）被覆されたインサートの下側への細胞移動を固定化し、ギムザ染色した。コントロールsiRNA及びsiRNA472処理した細胞の代表的顕微鏡写真を示す。細胞数を5個の高性能視野で計測し、平均±s.e.m.をグラフに示す（右下）。

#### 【0029】

図32は、細胞周期及びアポトーシスに関するEphB4 siRNA472の効果を示す。

Aでは、方法段落記載のようにsiRNAでトランスフェクトされたP C 3細胞を、上記トランスクレクション24時間後にフローサイトメトリーにより細胞周期段階について分析した。プロビジウムアイオダイド蛍光強度に対する細胞数のプロットを示す。siRNA472で処理した場合に1%のコントロールsiRNAでのものと比べ、7.9%の細胞母集団はアポトーシス性である（サブG0ピーク中）。

Bは、方法段落記載のように細胞死検出ELISAプラスキットにより検出されたP C 3細胞のアポトーシスを示す。405nmでの吸光度は、核フリー細胞フラクション中のヒストン及びDNA-POD量に比例して増加した。siRNA472及びGFP siRNA（コントロール）表示濃度での三個の複製サンプルの平均±s.e.m.を示す。

図33は、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（A）及びウェスタンプロット法（B）で確認されることを示す。

図34は、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やすかった（最上列）。それぞれのハイブリダイゼーション用コントロールは、センス（最下列）である。陽性反応は暗青の細胞質染色である。

#### 【0030】

図35は、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主な細胞の単離体、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標識化第二抗体の陽性シグナルである。免疫蛍光染色法の特異性により、一次抗体が無い場合シグナルの欠落を示した（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×。

図36は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染色された断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特異的染色法は茶色である。オリジナル倍率200×。

図37はH28細胞の増殖に対するEphB4アンチセンスODNプローブの効果（Aのグラフ）及びH28細胞の増殖に対するEphB4 siRNAの効果（Bのグラフ）を示す。いずれも縦軸は生存度、横軸は濃度を表す。

図38は、細胞移動に対するEphB4アンチセンス（AS）プローブの効果（Aのグラフ）及びH28の移動に対するEphB4 siRNAの効果（ボイデンチャンバー、Bのグラフ）を示す。

#### 【0031】

図39は、EphB4はHNSCC主要組織及び転移で発現したことを示す。

Aは、上段が本発明のEphB4モノクローナル抗体で染色され、腫瘍細胞に局在化したことをDAB（茶色）で画像化された代表的保存用断片の免疫組織化学を示す。下段は、隣接する断片のヘマトキシリントラス（H&E）染色を示す。濃紫染色法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され（右上）、DABで画像化されたリンパ節転移の凍結断片である。コントロール（中央）はヤギ血清でのイン

10

20

30

40

50

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。

Bは、ランオフ転写により生成された、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されたHNSCCケースの連続凍結断片の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され、断片はNuclear Fast Red（商標）で対比染色された。H & Eで染色された連続断片を、腫瘍構造を示すために示す（左下）。

Cは、腫瘍（T）、単純な（包含されていない）正常組織（N）及びリンパ節バイオプシー（LN）から構成される患者サンプルの蛋白質抽出物のウェスタンプロット法を示す。サンプルは、4～20%トリス-グリシンゲル中でポリアクリルアミドゲル電気泳動されて分離され、次にナイロン膜上で電気プロッティングされた。膜は、EphB4モノクローナル抗体及び-アクチンMoAbで逐次的にプローブされた。化学発光シグナルをオートラジオグラフィルム上で検出した。120kD位に移動するEphB4特異バンド及び40kD位に移動する-アクチンを示す。-アクチンシグナルをそれぞれのサンプルの担持及び転移のコントロールとして使用した。

#### 【0032】

図40は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。

Aは、SCC細胞系中のEphB4発現の測定を示す。図39Cで示されるように、逐次的にEphB4モノクローナル抗体でプローブされ、ストリップされ、-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プロット法を示す。

Bは、EphB4発現に対する特異的EGFR阻害剤AG1478の効果を示す。SCC15の疎細胞溶解産物のウェスタンプロット法は、10%FCSを補充された培地で0～1000nM AG1478で24時間処理（左）、又は1mM AG1478で4、8、12又は24時間処理（右）した。膜は逐次的にEphB4及びアクチンをプローブしたことを示す。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、1μM AG1478で24時間処理し、その後疎細胞溶解産物を、EGFR、EphB4、エフリンB2及び-アクチン抗体で逐次的にプローブした細胞溶解産物のウェスタンプロット法により分析した。EGFRの特異的シグナルが170kD位に検出され、エフリンB2が37kD位に、更にEphB4及び-アクチンが図1C中に示されるように検出された。-アクチンはロード及び移動コントロールとして使用した。

#### 【0033】

図41は、EGFによるEphB4のレギュレーション機構を示す。

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特別なキナーゼ抑制剤の名前を赤で示す。

Bでは、SCC15細胞は、追加的24インキュベーション前に、図示されたようにEGF（10ng/ml）、3μM U73122、又は5μM SH-5、5μM SP600125、25nM LY294002、-μM PDO98095又は5μM SB203580の存在又は非存在下で24時間血清飢餓状態だった。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プロット法で分析した。-アクチンシグナルは、蛋白質ロード及び移動コントロールとして使用した。

#### 【0034】

図42は、特異的EphB4 siRNAは、EphB4発現、細胞生存能力を阻害し、細胞周期停止を引き起こすことを示す。

Aでは、安定して完全長EphB4を発現する293細胞を、リポフェクタミン2000（商標）を使用して50nM RNAiでトランスクレクションした。トランスクレクション40時間後、細胞を採取し、溶解してウェスタンプロット法用に処理した。膜をEphB4モノ

10

20

30

40

50

クローナル抗体でプロープし、ストリップし、蛋白質ロード及び移動コントロールとして - アクチンモノクローナル抗体で再プロープした。スクランブルされた緑蛍光蛋白質 ( G F P ) 配列に対する陰性試薬コントロールは R N A i 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。

B は、方法段落記載のように siRNA で 48 時間処理した S C C 細胞系の M T T 細胞生存能力アッセイを示す。三個の複製サンプルの平均  $\pm$  s.e.m. を示す。

C では、 siRNA で上記のようにトランスフェクトされた S C C 15 細胞を、トランスフェクション 24 時間後、記載のようにフローサイトメトリーにより細胞周期段階を分析した。プロピジウムアイオダイド蛍光強度に対する細胞数のプロットを示す。上列及び及び中央列は、 siRNA トランスフェクション 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 36 時間後の細胞のプロットを示す。特異的 siRNA 及び濃度は、それぞれのプロットで示される。 L i p o = リポフェクタミン ( 商標 ) 200 m o c k トランスフェクション。

#### 【 0035 】

図 43 は、 S C C 細胞に対する特別な EphB4 A S - O D N の in vitro 効果を示す。 A では、 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 6 時間後上記アンチセンス O D N で処理した。細胞溶解産物を A S - O D N 処理 24 時間後採取してウェスタンプロット法を適用した。

B では、 S C C 25 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  $\mu$  M の EphB4 A S - O D N で 2 及び 4 日処理した。細胞生存能力を第 5 日に M T T アッセイで測定した。三個の複製サンプルの平均値  $\pm$  s.e.m. を示す。 EphB4 蛋白質レベル阻害活性を示した A S - O D N も又、 S C C 15 細胞生存能力の効果的抑制剤であった。

C は、未処理細胞 ( 上部 ) と比較した 36 時間 A S - 10 で処理した S C C 15 細胞 ( 底部 ) の細胞周期分析を示す。

D は、プラスチックパスツールピペットでスクレープして单層中に 3 mm 幅裂け目を作成した S C C 15 細胞の融合培養物を示す。 EphB4 A S - O D N ( A S - 10 ) の阻害及び A S - O D N ( A S - 1 ) の非阻害の存在下で細胞の移動能力及び創傷への近接能力を、 48 時間後評価した。スクランブルされた O D N は陰性コントロール O D N として含まれた。標識化未処理培養物は O D N 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  $\mu$  M 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、最初のスクレープ幅を表す。

E は、方法段落記載の 2 室アッセイ中の、 20 mg / ml E G F での S C C 15 細胞の移動を示す。未処理 ( N T ) 、 A S - 6 及び A S - 10 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。

F では、細胞数を 5 個の高性能視野中で計測し、平均  $\pm$  s.e.m. をグラフ中に示す。

#### 【 0036 】

図 44 は、 EphB4 A S - O D N は in vivo 腫瘍増殖を抑制することを示す。 20 mg / kg / 日で、 EphB4 AS-10 処理又は O D N スクランブルされた Balb/C ヌードマウス中への S C C 15 皮下腫瘍異種移植の増殖曲線は、  $5 \times 10^6$  細胞の移植の次の日から始まる。コントロールマウスは同体積の希釈剤 ( P B S ) を投与された。 6 マウス / グループの平均  $\pm$  s.e.m. を示す。 \* P = 0.0001 ( スクランブルされた O D N 処理したグループと比較したスチューデント t - t e s t による。 )

#### 【 0037 】

図 45 は EphB4 ではなくエフリン B2 が K S バイオプシー組織中で発現したことを示す。 A は、エフリン B2 及び EphB4 用アンチセンスプローブとの in situ ハイブリダイゼーション、及び腫瘍構造を示すために H & E 染色された対応する断片を示す。 I S H 中の暗青色は、エフリン B2 の陽性反応を表す。 EphB4 に対するシグナルは、カポジ肉腫バイオプシーでは検出されなかった。反対に、 EphB4 に対する I S H シグナルは、扁平上皮細胞癌腫細胞中で強い。エフリン B2 も又 EphB4 - A P 融合蛋白質を使用して K S 中に検出された ( 左下 ) 。 B は、 EphB4 / Fc 融合蛋白質でのエフリン B2 の検出を示す。隣接する断片は腫瘍構造

10

20

30

40

50

を示すために H & E で染色され（左）、黒い長方形は、方法段落記載のように F I T C 標識化抗ヒト F c 抗体で検出された EphB4 / F c 処理した断片（中央）中に示される範囲を表す。コントロールとして、隣接する断片をヒト F c フラグメントで処理した（右）。その断片へ結合する EphB4 / F c 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。C は、エフリンB2及び H H V 8 潜伏蛋白質 L A N A ( 潜伏感染関連核抗原 ) 1 の共発現を示す。冷凍 K S バイオプシー材料のエフリンB2（赤）、L A N A 1 ( 緑 ) 又は EphB4 ( 赤 ) に対する抗体での二重標識法 - 共焦点免疫蛍光学顕微鏡分析は、K S バイオプシー中の L A N A 1 及びエフリンB2の共発現を直接的に示す。共発現は黄色で示される。プロピジウムアイオダイド染色（赤）された核を有する細胞中の P E C A M - 1 ( 緑 ) に対する抗体を有するバイオプシーの二重標識法 - 共焦点画像は、腫瘍の血管の特性を示す

10

## 【 0 0 3 8 】

図 4 6 は H H V - 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。A は、動脈 / 静脈マーカー及びウィルス性蛋白質用の H U V E C 及び H U V E C / B C - 1 の培養物の免疫蛍光を示す。材料及び方法段落中に示されるように、培養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 ) 、CD 1 4 8 ( j, v ) 、及び H H V - 8 蛋白質 L A N A 1 ( b, f, m ) 又は ORF 5 9 ( 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 L A N A 又はエフリンB2及び CD 1 4 8 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 D A P I ( 青 ) での核染色法により明らかになった。顕微鏡写真は、代表的視野である。B は、H U V E C 及び 2 個の 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 ) の、エフリンB2及び EphB4に対する R T - P C R を示す。エフリンB2生成物 ( 2 0 0 b p ) は H U V E C / B C - 1 中で観察され、H U V E C / B C - 3 及び EphB4生成物 ( 4 0 0 b p ) は H U V E C 中で観察される。又インプット RNA の量及び完全性のコントロールとして - アクチン R T - P C R を示す。

20

## 【 0 0 3 9 】

図 4 7 は、H H V - 8 はカポジ肉腫細胞中の動脈性マーカー発現を誘起することを示す。A は、種々の細胞溶解産物に対するエフリンB2のウェスタンプロット法を示す。S L K - v G P C R は H H V - 8 v G P C R を発現する S L K の安定なクローニングであり、S L K - p C E F L はエンプティ発現ベクターでトランスフェクトされた安定なクローニングのコントロールである。L A N A 又は L A N A 4 4 0 でトランスフェクトされた S L K 細胞は、それぞれ S L K - L A N A 及び S L K - 4 4 0 である。蛋白質ロード及び移動量を - アクチンモノクローナル抗体での膜の再プローブにより決定した。B は、発現ベクター p v G P C R - C E F L での K S - S L K 細胞の一時的トランスフェクションは、F I T C ( 緑 ) で示されるように免疫蛍光染色法によるエフリンB2の発現を生じた。一方、コントロールベクター p C E F L は変化がなかった。K S - S L K 細胞 ( 0 . 8 × 1 0 <sup>5</sup> / ウエル ) を 0 . 8 μ g D N A でリポフェクタミン 2 0 0 0 ( 商標 ) を使用してトランスフェクトした。2 4 時間後、方法段落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 F I T C 複合第二抗体で染色した。C では、H U V E C の v G P C R での一時的トランスフェクションは、エフリンB2ルシフェラーゼ構築物からの転写を誘導した。グラフ右側の数字は誘導倍率である。2 4 ウエルプレート中の 8 × 1 0 <sup>3</sup> H U V E C を、Superfect ( 商標 ) を使用して、翻訳開始部位に関する - 2 9 4 1 ~ - 1 1 、又は記載のような 2 個の 5 ' - 欠失の配列を含有する 0 . 8 μ g / ウエルのエフリンB2プロモーター構築物で、8 0 n g / ウエル p C E F L 又は p v G P C R - C E F L 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 4 8 時間後に測定され、誘導割合はグラフの右側に示される。p G L 3 B a s i c 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、G P C R が共トランスフェクトされた - ガラクトシダーゼの発現を誘起したために、蛋白質へ中和された。グラフは、複製物 6 個の平均 ± S E M である。3 個の複製物の同様な試験の 1 例を示す。

30

## 【 0 0 4 0 】

図 4 8 は、V E G F 及び V E G F - C がエフリンB2発現をレギュレートすることを示す

40

50

。 A 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、抗体へ (100 ng / ml) 36 時間曝されてから採取及びウェスタンプロット法用の溶解が行われた。B 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。個々の増殖因子を記載のように添加し、細胞を 36 時間後に採取した。蛋白質ロード及び移動量を膜の - アクチンモノクローナル抗体の再プローブで測定した。

#### 【 0 0 4 1 】

図 49 は、特異的 siRNA でのエフリンB2ノックダウンは、VEGF の存在下であり、IGF、EGF 又は bFGF の非存在下での KS 細胞中の生存能力及び HUVE 増殖を抑制することを示す。A 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、疎細胞溶解産物を 4 ~ 20% SDS-PAGE でフラクション分離した。ウェスタンプロット法を、インハウスで生成されたエフリンB2に対するモノクローナル抗体で行った。膜をストリップし、- アクチンモノクローナル抗体 (シグマ社製) で再プローブすると等価ロード及び移動が示された。B は、エフリンB2及び EphB4 siRNA の存在下での KS-SLK 培養物の 3 日細胞生存能力アッセイを示す。24-ウェルプレート中の  $1 \times 10^5$  細胞 / ウェルを 0、10 及び 100 ng / ml siRNA で上記グラフ上の様に処理した。方法段落記載のように、培養物の生存能力を MTT アッセイで測定した。複製したサンプルの平均 ± 標準偏差を示す。C では、HUVE 細胞をフィプ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。HUVE 細胞を、全成長補充剤を含む EGM-2 培地中で一晩増殖した。翌日、培地を上記 VEGF (10 ng / ml) 又は EGF、FGF 及び IGF を含有する培地で交換した。37 でインキュベーション 2 時間後、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 10 × 倍率で画像を撮った。

#### 【 0 0 4 2 】

図 50 は、可溶性 EphB4 は、KS 及び EC コード形成及び in vivo 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 HUVEC のコード形成アッセイを示す。指數関数的成長期の細胞を、マトリゲル (商標) 上にプレートする前に表示濃度の EphB4 細胞外領域 (ECM) で一晩処理した。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-ウェルプレート中にプレートした ( $1 \times 10^5$  細胞 / ウェル)。記載の試験化合物の連続した存在下でマトリゲル (商標) 上にプレートした 8 時間後のコード形成の代表的 20 × フェースの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 in vivo マトリゲル (商標) アッセイを示す。即ち、増殖因子及び EphB4 ECM 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画像化した。大型管腔を有する変化しない脈管がコントロール中に観察される一方、EphB4 ECM 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。

#### 【 0 0 4 3 】

図 51 は膀胱癌細胞系中の EphB4 の発現 (A) 及び EGF 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 52 は、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 は 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。縦軸は生存能力を示す。

図 54 は 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研

10

20

30

40

50

究の結果を示す。下のグラフの縦軸は 405 nm での吸光度である。

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。左側から 0 、 6 、 9 時間後の画像である。 5637 細胞は、 EphB4 AS-10 (10 μM) で処理された。

図 5 6 は、 EphB4 siRNA の細胞侵襲に対する効果を示す。 5637 細胞は siRNA 472 又はコントロール siRNA でトランスフェクトされた。

#### 【 0044 】

図 5 7 は、 G250 及びブルダウンアッセイによる EphB4 モノクローナル抗体の比較結果を示す。下にクローニ番号を示す。

図 5 8 は、 EphB4 抗体はヌードマウスにおいて、 VEGF の存在又は非存在下で、 SCC 15 / MG 異種移植腫瘍の増殖を阻害することを示す。グラフの縦軸はマトリゲルプラグの大きさ (mm<sup>3</sup>) である。 10

図 5 9 は、 EphB4 抗体は SCC15 、頭部癌及び頸部癌腫瘍種の、アポトーシス、壊死及び血管形成減少を引き起こすことを示す。 B4 抗体の SCC15 腫瘍組織に対する効果を示す。左から、アポトーシス、増殖、血管、 MT 、 H & E 染色を示す。

図 6 0 は、 EphB4 抗体の全身的投与は腫瘍退縮を導くことを示す。 SCC15 / IP での、 SCCB4 抗体処理された異種移植腫瘍退縮を示す。上のグラフは in vivo での SCC15 に対する Ab-47 及び 138 の効果を示し、縦軸は腫瘍の大きさ (mm<sup>3</sup>) 、横軸は移植後日数である。下のグラフは in vivo (ヌードマウス) での SCC15 に対する Ab-47 及び 138 の効果を示し、縦軸は腫瘍の大きさ (mm<sup>3</sup>) を表す。 20

#### 【 0045 】

図 6 1 はヒト EphB4 のゲノムスクレオチド配列を示す。

図 6 2 はヒト EphB4 の cDNA スクレオチド配列を示す。

図 6 3 はヒトエフリン B2 のゲノムスクレオチド配列を示す。

図 6 4 はヒトエフリン B2 の cDNA スクレオチド配列を示す。

図 6 5 はヒト EphB4 のアミノ酸配列を示す。

図 6 6 はヒトエフリン B2 のアミノ酸配列を示す。

#### 【 発明を実施するための最良の形態 】

#### 【 0046 】

本発明の詳細な説明

##### I. 概説

本発明の一部は、エフリン / エフリンレセプター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、本発明は例えば、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障害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。 30

#### 【 0047 】

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。 40

#### 【 0048 】

本発明の研究は、好ましい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 50

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。

【0049】

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。

【0050】

Ephレセプターは、リガンド結合球状領域、その次に一対のフィブロネクチンタイプIIIリピートが続くシティンリッチ領域から構成される細胞外領域を有する（例えは、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。

【0051】

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B2を経由して発生できる。エフリンのEph結合（engagement）は、保存された細胞内チロシンの急速なリン酸化を生じ（Bruckner K、1997）、PDZ結合蛋白質のレクルートメントをいくらか遅延させる（Palmer A 2002）。近年、いくつかの研究でEph/エフリンの高い発現は腫瘍増殖、腫瘍原性、及び転移の可能性の増大に関係することが示された（Easty DJ、1999; Kiyokawa E、1994; Tang XX、1999; Vogt T、1998; Liu W、2002; Stephenson SA、2001; Steube KG 1999; Bercia G、1996）。

【0052】

例えば、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。

【0053】

II. 可溶性ポリペプチド

例えば本発明は、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

10

20

30

40

50

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。

【0054】

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、機能的変異体及び改質体を含む。これらの本発明の可溶性ポリペプチドのフラグメント、機能的変異体及び改質体は、EphB4、エフリンB2又は両方の機能をアンタゴナイズする。

【0055】

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

【0056】

例えば、EphB4可溶性ポリペプチドの機能的変異体は、図65により特定されるアミノ酸配列の残基1～522、残基1～412、又は残基1～312と少なくとも90%、95%、97%、99%又は100%相同性を有するアミノ酸配列を有してもよい。例えば、エフリンB2可溶性ポリペプチドの機能的変異体は、図66により特定されるアミノ酸配列の残基1～225の少なくとも90%、95%、97%、99%又は100%相同性を有する配列を有する。

【0057】

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

【0058】

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

10

20

30

40

50

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。

【0059】

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

【0060】

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

【0061】

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は必要な、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

【0062】

例えば、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

10

20

30

40

50

イックのライブラリーを含むデータベースのスクリーニングを含む。例えば、ケンブリッジ構造データベースは、公知の結晶構造を有する300000を超える化合物のコレクションを含む(Allenら、Acta Crystallogr.セクションB、35:2331(1979))。ターゲット分子の非結晶構造が可能な場合、ある構造は例えばプログラムCONCORD(商標)(Rusinkoら、J.Chem.Inf.Comput.Sci.29:251(1989))を使用して製造できる。別のデータベース、「Available Chemicals Directory」(Molecular Design Limited社製、情報システム;サンレアンドロ カリフォルニア)は、市販されている約100000の化合物を含有し、それらも又、EphB4又はエフリンB2可溶性ポリペプチドの能力のあるペプチドミメティックを特定できる。

## 【0063】

10

例示のために、別の蛋白質へ結合している可溶性ポリペプチドのアミノ酸残基をマップする突然変異誘発のスキャニングを採用して、結合中に含まれるそれら残基を擬態するペプチドミメティック化合物が生成できる。例えばこれら残基の非加水分解可能なペプチドアナログは下記を使用して生成できる:ベンゾジアゼピン(例えば、Freidingerら、in peptide:Chemistry and Biology、G.R.Marshall編、ESCOM発行者:ライデン、オランダ、1988参照)、アゼピン(例えば、Huffmanら、in peptide:Chemistry and Biology、G.R.Marshall編、ESCOM 発行者:ライデン、オランダ、1988参照)、置換された-ラクタム環、(Garveyら、in peptide:Chemistry and Biology、G.R.Marshall編、ESCOM発行者:ライデン、オランダ、1988)、ケト-メチレンプソイドペプチド(Ewensonら、(1986)J.Med.Chem.29:295;及びEwensonら、inペプチド:構造及び機能(第9回米国ペプチドシンポジウムの手続き)Pierce Chemical Co社、Rockland、IL、1985)、b-turnジペプチドコア(Nagaiら、(1985)tetrahedron Lett 6:647;及びSatoら、(1986)J Chem Soc Perkin Trans 1:1231)、及びb-アミノアルコール(Gordonら、(1985)Biochem Biophys Res Commun 126:419;及びDannら、(1986)Biochem Biophys Res Commun 134:71)。

20

## 【0064】

例えば、本発明の可溶性ポリペプチドは、更に翻訳後の改質体を含有してもよい。これら改質として、本発明を限定するものではないが、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化及びアシル化が挙げられる。その結果、改質可溶性ポリペプチドは、ポリエチレングリコール、脂質、ポリ-又はモノ-サッカリド、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。

30

## 【0065】

例えば、本発明の可溶性ポリペプチドの機能的変異体又は改質体として、少なくとも可溶性ポリペプチドの一部及び1以上の融合領域を有する融合蛋白質が挙げられる。これら融合領域の公知例として、本発明を限定するものではないが、ポリヒスチジン、Glu-Glu、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシン、プロテインA、プロテインG、免疫グロブリン重鎖定常領域(Fc)、及びマルトース結合蛋白質(MBP)が挙げられ、これらはアフィニティクロマトグラフィーによる融合蛋白質の単離に好ましく使用できる。親和性精製の目的のために、グルタチオン-、アミラーゼ-、及びニッケル-又はコバルト-複合樹脂等の、アフィニティクロマトグラフィー用に適切なマトリックスが使用される。別の公知の融合領域として、緑蛍光性蛋白質(GFP)が挙げられる。融合領域として又、特異的抗体が適用可能な、通常短いペプチド配列である「エピトープ標識」が挙げられる。特異的モノクローナル抗体が容易に適用できる公知のエピトープ標識として、FLAG、インフルエンザウイルス赤血球凝集素(HA)、及びc-myc標識が挙げられる。時には、融合領域はファクターXa又はトロンビン等用のプロテアーゼ切断部位を有し、それは適切なプロテアーゼが融合蛋白質を部分的に消化して、それから組み換え型蛋白質を遊離させることを可能とする。遊離された蛋白質は、次にクロマトグラフィー分離により融合領域から単離できる。例えば、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できる1以上の改質部を含有してもよい。例えば、これら

40

50

改質は、可溶性ポリペプチドの *in vitro* 半減期を延ばし、可溶性ポリペプチドの循環系半減期を延ばし、又は可溶性ポリペプチドの蛋白質分解性変質を減少させる。

【0066】

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

10

【0067】

III. 可溶性ポリペプチドをエンコードする核酸

例えば、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。

20

【0068】

例えば、本発明は、図 62 又は 63 中に示されたヌクレオチド配列の領域と少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 又は 100% 同一である単離型又は組み換え型核酸配列を提供する。当業者は、本発明の核酸と相補的な核酸配列及び本発明の核酸の変異体も又本発明の範囲内であることを理解できる。更に、本発明の核酸配列は、単離され、組み換えられ、及び / 又は非相同的のヌクレオチド配列と融合されてもよく、DNA ライブライアリ中のものでもよい。

【0069】

例えば、本発明の核酸は又、高い緊縮条件下で図 62 又は 63 中に示されたヌクレオチド配列、又はそれらの補体配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。上記のように、当業者は DNA ハイブリダイゼーションを促進する適切な緊縮条件は変化できることが容易に理解できる。例えば、 $6.0 \times$  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 での高い緊縮まで選択出来る。更に、洗浄ステップ中の温度は、室温（約 22）での低い緊縮条件から、約 65 での高い緊縮条件へ増加できる。温度及び塩の両方は変化してもよく、又温度若しくは塩濃度は他の変更可能な因子が変化する間に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でハイブリダイズされ、次に  $2 \times$  SSC 室温で洗浄される核酸も提供する。

30

【0070】

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、CAU 及びCAC 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 DNA 配列多型性は、乳類細胞間に存在することが予測されている。当業者は、特別な蛋白質をエンコードする核酸の 1 以上のヌクレオチド（約 3 ~ 5 %までのヌクレオチド）中のこれらの変異は、天然対立遺伝子的変異により所定の種の被験体間に存在することを理解できる。これらヌクレオチド変異及び得られるアミノ酸多型性のいずれか及び全ては本発明の範囲内である。

40

【0071】

例えば、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

50

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

【0072】

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

【0073】

例えば本発明の核酸は、EphB4又はエフリンB2可溶性ポリペプチドをエンコードし、作動可能なように少なくとも1の調節配列へ結合されたヌクレオチド配列を含有する発現ベクター中に提供される。調節配列は当分野で認識され、可溶性ポリペプチドの直接的発現のために選択される。従って、用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現調節要素を含有する。例示的調節配列は、Goeddel「遺伝子発現技術：酵素学的方法」Academic Press、サンディエゴ、CA(1990)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DNA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DNA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、SV40の上流(early)及び下流(late)プロモーター、tetプロモーター、アデノウィルス又はサイトメガロウィルス直前プロモーター、lacシステム、trpシステム、TAC又はTRCシステム、その発現はT7RNAポリメラーゼにより誘導されるT7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、fd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、Pho5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、バキュロウィ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ィルスの遺伝子の発現を調節することが知られている他の配列、並びにこれらの種々の組み合わせが挙げられる。発現ベクターの設計は、形質変換されるホスト細胞、及び/又は発現されることを目的とする蛋白質の種類等の選択の因子に依存すると考えられる。更に、ベクターのコピー数、コピー数調節能力及び抗生物質マーカー等のベクターによりエンコードされる他の蛋白質の発現を調節する能力も又考慮される必要がある。

【0074】

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

【0075】

又、本発明は更に本発明の可溶性ポリペプチドの製造方法に関する。例えば、EphB4可溶性ポリペプチドをエンコードする発現ベクターでトランスフェクトされたホスト細胞は、適切な条件下で培養され、EphB4可溶性ポリペプチドの発現を行うことができる。EphB4可溶性ポリペプチドは、細胞及び可溶性ポリペプチドを含有する培地の混合物から分泌されて単離される。可溶性ポリペプチドは細胞質中又は膜フラクション中に保持され、細胞が採取され、溶解され蛋白質が単離される。細胞培養物はホスト細胞、培地及び他の副成物を含む。細胞培養物用の適切な培地は当分野で公知である。可溶性ポリペプチドは、蛋

10

20

30

40

50

白質精製用の公知技術を使用して、細胞培養培地、ホスト細胞又はそれら両方から単離できる。その技術としてイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、超ろ過、電気泳動、及び可溶性ポリペプチドの特別なエピトープに特異的な抗体との免疫親和性精製等が挙げられる。好ましくは、可溶性ポリペプチドは、その精製を容易にする領域を含有する融合蛋白質である。

## 【0076】

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ニングされた遺伝子又はそれらの一部をライゲートすることにより生産できる。組み換え型可溶性ポリペプチドの作成用の発現ビヒクルとして、プラスミド及び他のベクターが挙げられる。例えば、適切なベクターとして下記種類のプラスミドが挙げられる：E. coli等の原核細胞中の発現用の、p B R 3 2 2 由来プラスミド、p E M B L 由来プラスミド、p E X 由来プラスミド、p B T a c 由来プラスミド及びp U C 由来プラスミド。

## 【0077】

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

## 【0078】

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D N A フラグメントの結合は、従来技術に従い行うことができ、例えばライゲーション用のプラントエンド末端又は相補末端（s t a g g e r - e n d e d ）の採用、適切な末端を得るために制限酵素消化、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D N A 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P C R 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）。

## 【0079】

## IV. 抗体

例えば本発明は、エフリンB2又はEphB4に対するアンタゴニスト抗体を提供する。ここで、用語「アンタゴニスト抗体」は、エフリンB2又はEphB4の機能を抑制する抗体を言う。好ましくは、アンタゴニスト抗体は、エフリンB2又はEphB4の細胞外領域へ結合する。本発明の抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよく；完全体又は短縮されてもよ

10

20

30

40

50

く（例えば、 $F(ab')、 $Fab$ 、 $Fv$ ）；異種、同種異系、同系、又はそれらの改質体（例えば、ヒト化、キメラ化等）でもよいのは当然である。$

#### 【0080】

例えば、エフリンB2又はEphB4ポリペプチド由来の免疫原を使用して、抗蛋白質／抗ペプチド抗血清又はモノクローナル抗体が、標準プロトコルにより作成できる（例えば、抗体：「実験マニュアル」Harlow及びLane編（コールドスプリングハーバー出版：1988）参照）。マウス、ハムスター又はウサギ等のほ乳類は、ペプチドの免疫原体で免疫化できる（例えば、抗体応答を誘導できるポリペプチド若しくは抗原性フラグメント、又は融合蛋白質）。蛋白質又はペプチドに対する免疫原性付与技術として、キャリアの結合又は他の公知の技術が挙げられる。エフリンB2又はEphB4ポリペプチドの免疫原性部は、アジュvantの存在下で投与できる。免疫化の過程は、血漿又は血清中の抗体タイマーの検出により監視できる。標準ELISA又は他の免疫アッセイも、抗体のレベルを評価するために抗原として免疫原を使用できる。例えば、本発明の抗体は、エフリンB2又はEphB4蛋白質の細胞外部位に特異的でもよい。又、本発明の抗体は、エフリンB2又はEphB4蛋白質の細胞内部位又は膜貫通部位に特異的でもよい。更に、本発明の抗体はエフリンB2又はEphB4蛋白質の細胞外部位に特異的でもよい。

#### 【0081】

エフリンB2又はEphB4ポリペプチドの抗原製剤を使用した動物の免疫化後に、抗血清が得られ、必要ならポリクローナル抗体が血清から単離できる。モノクローナル抗体を生産するために、抗体生産細胞（リンパ球）が免疫化された動物から採取され、骨髄腫細胞等の不死化細胞との標準的な体細胞融合手順により融合されてハイブリドーマ細胞を生じる。これら技術は当分野で公知であり、例えばハイブリドーマ技術（Kohler及びMilsteinにより開発された（1975）Nature、256:495-497）、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbarら、（1983）Immunology Today、4:72）及びヒトモノクローナル抗体生産のためのEBV-ハイブリドーマ技術（Coleら、（1985）モノクローナル抗体及び癌治療法、Alan R.Liss、Inc. pp.77-96）が挙げられる。ハイブリドーマ細胞は、エフリンB2又はEphB4ポリペプチドと特異的に反応する抗体を免疫化学的に作成するためスクリーンされ、モノクローナル抗体がこれらハイブリドーマ細胞等を含有する培養物から単離される。

#### 【0082】

ここで使用される用語「抗体」は、エフリンB2又はEphB4ポリペプチドと特異的に反応するそのフラグメントも含むことを意図する。抗体は従来の技術を使用してフラグメント化され、そのフラグメントは抗体全体に対して使用するため、上記方法同様にスクリーンできる。例えば、 $F(ab)_2$ フラグメントは抗体をペプシンと処理して生成できる。得られた $F(ab)_2$ フラグメントは、 $Fab$ フラグメントを生産するためにジスルフィド架橋を還元処理出来る。本発明の抗体は更に、抗体の少なくとも1のCDR領域により付与されたエフリンB2又はEphB4ポリペプチドに対する親和性を有する、二重特異性、単鎖、及びキメラ性かつヒト化分子を含むことを意図する。単鎖抗体の製造技術（米国特許番号第4946778号）も又、単鎖抗体を生産するために適用できる。同様に、遺伝子導入マウス又は他のほ乳類を含む他の有機体も、ヒト化抗体を発現するために使用できる。好ましくは、抗体は更にそれに結合される標識を含有し、検出可能とされる（例えば、標識は放射性同位体、蛍光性化合物、酵素又は酵素補因子でもよい）。

#### 【0083】

好ましくは、本発明の抗体は、モノクローナル抗体であり、例えば本発明は新規な抗体の製造方法を適用可能とする。例えば、特異的にエフリンB2又はEphB4ポリペプチドへ結合するモノクローナル抗体の生産方法は、下記ステップを含有してもよい；検出可能な免疫応答を刺激するために有効なエフリンB2又はEphB4ポリペプチドを含有する免疫原性組成物量をマウスへ投与するステップ；そのマウスから抗体生産細胞（例えば脾臓細胞）を得てその抗体生産細胞を骨髄腫細胞と融合して抗体生産ハイブリドーマを得るステップ；更に、エフリンB2又はEphB4ポリペプチドへ特異的に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを特定する抗体生産ハイブリドーマを試験するステップ。一旦得られ

10

20

30

40

50

ると、ハイブリドーマは細胞培養物中で増殖でき、その培養条件は、ハイブリドーマ由来細胞が、エフリンB2又はEphB4ポリペプチドへ特異的に結合するモノクローナル抗体を生産する条件でもよい。モノクローナル抗体は細胞培養物から精製できる。

#### 【0084】

更に、目的の抗体を特定するための抗体スクリーン技術は、得られた抗体の性質に影響を与える場合がある。例えば、所定の治療用目的に使用される抗体は、好ましくは特別な細胞種をターゲットとできる。従って、この種の抗体を得るためにには、目的の抗原を発現する細胞へ結合する抗体を（例えば、蛍光活性化した細胞分離により）スクリーンすることが好ましい。同様に、抗体が溶液中の抗原への結合に使用される場合、溶液結合を試験することが好ましい。種々の異なる技術が、特に目的とする抗体を特定するための抗体＝抗原相互作用を試験するために利用できる。これら技術として、ELISA、表面プラズモン共鳴結合アッセイ（例えば、Biacore結合アッセイ（商標）、Bia-core AB社製、ウプサラ市、スウェーデン）、サンドイッチアッセイ（例えばIGENインターナショナル社製の常磁性ビーズシステム（商標）、ゲイザーズバーグ、メリーランド）、ウェスタンプロット法、免疫沈殿アッセイ及び免疫組織化学法が挙げられる。

#### 【0085】

##### V ドラッグスクリーニングアッセイ

ポリペプチド治療薬を、EphB4、エフリンB2又は両方のアンタゴニストとしてスクリーニングする数多くのアプローチがある。例えば、化合物又は分子の高スループットスクリーニングが、血管形成を阻害するか腫瘍増殖を阻害する試薬又はドラッグを特定するために実施できる。試験試薬は、（化学）合成的に製造され、組み換え型技術により製造され、又は天然原料から単離されたいずれの化学製品（元素、分子、化合物、ドラッグ）でもよい。例えば、試験試薬はペプチド、ポリペプチド、ペプトイド、糖類、ホルモン類、又は核酸分子でもよい。更に、試験試薬は、小分子又は化学的組み合わせにより、例えばライ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。

#### 【0086】

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。

#### 【0087】

例えば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。

#### 【0088】

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

10

20

30

40

50

化合物と競合しない成分（例えば、細胞、融合蛋白質及び結合活性部位を含む精製蛋白質）を使用して、固体担持体へ結合されて行うことが出来る。固体担持体は、いずれの適切な固体相又はマトリックスでもよく、例えばビーズ、プレート壁又は他の適切な表面等（例えば、マイクロタイプレートのウェル）、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もよい。

## 【0089】

例えば、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。

## 【0090】

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、適切な発現用ホスト細胞中へ導入できる。ホスト細胞は破壊され、融合蛋白質を含有する細胞材料は、融合蛋白質の親和性リガンド部位が親和性マトリックスへ結合するのに適切な条件下で、細胞材料を親和性マトリックスと接触させることにより、適切な親和性マトリックスへ結合できる。

## 【0091】

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

10

20

30

40

50

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ピ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。

#### 【0092】

##### VI. 治療方法

例えば、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。

10

#### 【0093】

ここで示される血管形成関連障害は、本発明を限定するものではないが、下記が挙げられる；充実性腫瘍等の血管形成依存性癌、白血病等の血液性腫瘍、及び腫瘍転移；良性腫瘍、例えば血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トロコーマ、及び化膿性肉芽腫；免疫及び非免疫性炎症等の炎症性障害；慢性間接リューマチ及び乾癬；眼性血管形成病、例えば糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、黄斑改質、角膜移植拒絶、新血管の縁内症、後水晶体纖維増殖症、ルベオーシス；オスマーラー症候群；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；纖維血管腫；及び外傷性顆粒化及び創傷治癒；毛細血管拡張乾癬強皮症、化膿性肉芽腫、冠状側副（coronary collateral vessels）、虚血性血管形成、角膜障害、ルベオーシス、関節炎、糖尿病性新生血管形成、骨折、脈管形成、血液新生。

20

#### 【0094】

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。

30

#### 【0095】

本発明の方法で例えば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。

例えば、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。

40

#### 【0096】

広い範囲の従来の化合物が抗新生物性活性を有することが示された。これらの化合物は、化学療法中で充実性腫瘍を縮小させ、転移及び更なる増殖を防止し、又は白血病又は骨髄悪性腫瘍での悪性細胞数を減少させるための医薬的試薬として使用されてきている。化学療法は種々の悪性疾患の治療に効果的ではあるが、多くの抗新生物性化合物は望ましくない副次的効果を誘起する。2以上の異なる治療が組み合わされた場合に、こ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。

50

#### 【0097】

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。

## 【0098】

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下記が挙げられる：アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アスパラギナーゼ、b c g、ビカルタミド、ブレオマイシン、ブセレリン、ブスルファン、カンプトテシン (camptothecin)、カベシタビン、カルボプラチニン、カルムスチン、クロラムブシリル、シスプラチニン、クラドリビン、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、エトボシド、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 (irinotecan)、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、レバミゾール、ロムスチン、メクロレタミン、メドロキシプロゲステロン、メゲストロール、メルファラン、メルカブトブリニン、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tron、ニルタミド、ノコダゾール、オクトレオチド、オキサリプラチニン、パクリタキセル、パミドロネート、ペントスタチン、ブリカマイシン、ポルフィマー、プロカルバジン、ラルチトレキセド、リツキシマブ、ストレプトゾシン、スラミン、タモキシフェン、テモゾロマイド、テニポシド、テストステロン、チオグアニン、チオテパ、チタノセンジクロリド、トポテカン、トラスツヅマブ、トレチノイン、ビンプラスチニン、ビンクリスチニン、ビンデシン及びビノレルビン。

## 【0099】

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、カベシタビン、ゲムシタビン及びシタラビン) 及びブリンアナログ、葉酸アンタゴニスト並びに関連する抑制剤 (メルカブトブリニン、チオグアニン、ペントスタチン及び2-クロロデオキシアデノシン (クラドリビン) ) 等の代謝拮抗物質 / 抗癌試薬；ビンカアルカロイド (ビンプラスチニン、ビンクリスチニン及びビノレルビン) 等の天然生成物、タキサン (パクリタキセル、ドセタキセル)、ビンクリスチニン、ビンプラスチニン、ノコダゾール、エポチロン及びナベルビン等の微少管破壊剤、エピジ (epidi) ポドフィロトキシン系 (エトボシド、テニポシド)、DNA 損傷剤 (アクチノマイシン、アムサクリン、アンスラサイクリン系、ブレオマイシン、ブスルファン、カンプトセシン、カルボプラチニン、クロラムブシリル、シスプラチニン、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ニン、イフオスファミド、メルファラン、merchlorehtamine、マイトマイシン、ミトキサンtron、ニトロソウレア、ブリカマイシン、プロカルバジン、タキソール、タキソテール、テニポシド、トリエチレンチオホスホルアミド及びエトボシド (VP 16) ) 等の抗増殖性 / 細胞分裂抑制剤；ダクチノマイシン (アクチノマイシンD)、ダウノルビシン、ドキソルビシン (アドリアマイシン)、イダルビシン、アンスラサイクリン系、ミトキサンtron、ブレオマイシン、ブリカマイシン (ミトラマイシン) 及びマイトマイシン等の抗生物質；酵素 (L-アスパラギンを全身的に新陳代謝させ、それら自身アスパラギンの合成能力を有さない細胞を除去するL-アスパラギナーゼ)；抗血小板試薬；窒素マスター (メクロレタミン、シクロホスファミド及びアナログ、メルファラン、クロラムブシリル)、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)、アルキルスルホネット-ブスルファン、ニトロソウレア類 (カルムスチン (BCNU) 及びアナログ、ス

10

20

30

40

50

トレプトゾシン)、トラゼン-ダカルバジニン(DTIC)等の抗増殖性/細胞分裂抑制アルキル化試薬;葉酸アナログ(メトトレキサート)等の抗増殖性/細胞分裂抑制代謝拮抗物質;白金配位錯体(シスプラチン、カルボプラチン)、プロカルバジン、ヒドロキシウレア、ミトーテン、アミノグルテチミド;ホルモン類、ホルモンアナログ(エストロゲン、タモキシフェン、ゴセレリン、ビカルタミド、ニルタミド)及びアロマターゼ阻害薬(レトロゾール、アナストロゾール);抗凝血剤(ヘパリン、合成ヘパリン塩及び他のトロンビン阻害薬);フィブリン溶解性試薬(組織プラスミノゲン活性化剤、ストレプトキナーゼ及びウロキナーゼ等)、アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ;抗遊走性試薬;抗分泌性試薬(breveldin);免疫抑制剤(シクロスボリン、タクロリムス(FK-506)、シロリムス(ラパマイシン)、アザチオプリン、ミコフェノレート・モフェチル);抗血管形成化合物(TNP-470、ゲニステイン)及び増殖因子抑制剤(血管の内皮性増殖因子(VEGF)抑制剤、纖維芽細胞増殖因子(FGF)抑制剤);アンギオテンシンレセプターブロッカー;一酸化窒素ドナー類;アンチセンスオリゴヌクレオチド;抗体(トラスツヅマブ);細胞周期停止剤及び分化誘起剤(トレチノイン);mTOR抑制剤、トポイソメラーゼ抑制剤(ドキソルビシン(アドリアマイシン)、アムサクリン、カンプトセシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、エニポシド(eniposide)、エビルビシン、エトポシド、イダルビシン及びミトキサンtron、トポテカン、イリノテカン)、コルチコステロイド類(コーチゾン、デキサメタゾン、ハイドロコーチゾン、メチルペドニソロン、プレドニゾン及びプレニソロン);増殖因子シグナル変換キナーゼ抑制剤;ミトコンドリア性機能障害誘起剤及びカスパー活性化剤;及びクロマチンかく乱剤。10 20

#### 【0100】

例えば、組み合わせ抗血管形成治療法に使用できる医薬的化合物として下記が挙げられる。(1) bFGF(基本的纖維芽細胞増殖因子)等の「血管形成分子」の放出抑制剤;(2)抗 bFGF抗体等の血管形成分子中和剤;並びに(3)コラゲナーゼ阻害剤、基底膜代謝回転抑制剤、血管新生阻害ステロイド、菌由来血管形成抑制剤、血小板因子4、トロンボスポンジン、D-ペニシルアミン及びチオリンゴ酸金塩等の関節炎薬、ビタミンD<sub>3</sub>アナログ、-インターフェロン等の血管形成刺激への内皮細胞応答抑制剤。更に血管形成抑制剤として、Bloodら、Bioch.Biophys.Acta、1032:89-118(1990)、Mosesら、Science、248:1408-1410(1990)、Ingberら、Lab.Invest.59:44-51(1988)、及び米国特許番号第5092885号、5112946号、5192744号、5202352号、及び6573256号に記載されているものが挙げられる。更に、血管形成を阻害するために使用できる広い範囲の化合物があり、下記に例示される: VEGF-仲介された血管形成経路をブロックするペプチド又は試薬、エンドスタチン蛋白質又は誘導体、アンギオスタチンのリシン結合フラグメント、メラニン又はメラニン-促進化合物、プラスミノゲンフラグメント(例えばプラスミノゲンのクリングル1~3)、トロポイン(tropoin)サブユニット、ビトロネクチン<sub>v-3</sub>のアンタゴニスト、サボシン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MettAP-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NAA-LADase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。30 40

#### 【0101】

組み合わせ治療法の性質に応じて、本発明のポリペプチド治療薬の投与は、他の治療法の実施中及び/又はその後に続けられてもよい。このポリペプチド治療薬の投与は、単回投与でも複数回投与でもよい。例えば、本発明のポリペプチド治療薬の投与は、従来の治療法の少なくとも数日前に開始されてもよく、又その投与は従来の治療法の直前又はその投与時のいずれかで開始されてもよい。50

## 【0102】

## VII. 投与方法及び医薬的組成物

例えば、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。

## 【0103】

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／又は膣内投与へ適切なものが含まれる。配合物は単位剤形の形で便利に提供でき、製薬分野で公知の方法により調製できる。単一剤形を生産するためにキャリア材料へ組み合わせできる活性成分量は、治療されるホスト、特別な投与モードに応じて変化できる。単一剤形を生産するためにキャリア材料へ組み合わせできる活性成分量は、一般的に治療的効果を得られる化合物量である。

## 【0104】

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。

## 【0105】

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。

## 【0106】

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

## 【0107】

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

10

20

30

40

50

(特に、綿実油、ピーナッツ油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ひまし油及びゴマ油)、グリセロール、テトラヒドロフルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル、並びにそれらの混合物等の他の溶剤、可溶化剤及び乳化剤が挙げられる。一方、不活性希釈剤、経口組成物も又湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、甘味剤、矯味剤、着色剤、香料及び保存薬等の添加剤を含有してもよい。

【0108】

懸濁液は活性化合物に加え、エトキシル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、アルミニウムメタハイドロオキシド、ベントナイト、寒天及びトラガカント並びにそれらの混合物等の懸濁剤を含有してもよい。

10

【0109】

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

20

【0110】

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、バッファ又は噴射剤と混合されてもよい。軟膏、ペースト、クリーム及びゲルは、本発明のポリペプチド薬へ加え更に、動物性及び植物性脂肪、オイル、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン樹脂、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。

30

【0111】

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。

【0112】

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

40

【0113】

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

50

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。

【0114】

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

【0115】

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

【0116】

例えば、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、レトロウイルス、アデノウイルス、又はアルファウイルスをベースとして構成できる。好ましくは、ベクターは確実にターゲット細胞中に導入されその中で存続する。又、ウィルス性ベクターは一時的発現を起こすためにも使用できる。これらのベクターは必要に応じて繰り返して投与できる。本発明のポリペプチド治療薬をエンコードするベクターのデリバリーは、静脈内又は筋肉内投与により全身的に行える。それは、患者から外植されたターゲット細胞内へ導入してから患者中へ再投入することにより、又は目的とするターゲット細胞を導入することを可能とする他の手段により行える(Coutureら、1996、TIG、12、510参照)。

【実施例】

【0117】

例示

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。

【0118】

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。

【0119】

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

10

20

30

40

50

された（例えば図6～8参照）。

【 0 1 2 0 】

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（ $\wedge$ その緒及び肝臓性AEC又はVECで試験した）、細胞外マトリックス（マトリゲル、商標）の変質の減少及び増殖因子刺激に対する応答における移動を減少させた（図9～11）。B4EcV3及びB2Ec-Fc蛋白質はそれらの内皮細胞管形成阻害により示される抗血管形成効果の能力を有する（図12～13）。

[ 0 1 2 1 ]

## 材料及び方法

## 1) エフリンB2及びEphB4の組み換え型可溶性誘導体生産用のほ乳類発現ベクター

エフリンB2及びEphB4の組み換え型可溶性誘導体を発現するためのプラスミドベクターは、pEF6 / V5-His-TOP0ベクター（インビトロジエン社製）、pIG（Novagen社製）又はpRK5をベースとした。pEF6 / V5-His-TOP0は、ヒト延長因子1aエンハンサー/プロモーター及びプラスチックサイジン耐性マーカーを含有する。pIGベクターは、CMVプロモーター調節下でヒトIgG1のFc部位との高レベル発現の蛋白質融合をするように設計され、pRK5は一般的目的CMVプロモーター含有ホモ乳類発現ベクターである。プラスミド構築物pEF6-B4EC-NTを生成するために、ヒトEphB4のcDNAフラグメントを、オリゴプライマー5'-GGATCCGCCATGGAGCTC CGGGTGCCTGCT-3'及び5'-TGGATCCCTGCTCCCCGC CAGCCCCTCG CTCATCCAA-3'を使用してPCR法で增幅し、pEF6 / V5-His-TOP0ベクターへTOP0-クローニングした。pEF6-hB4ECv3は、pEF6-B4ECNTに由来し、プラスミドDNAをEcoRV及びBstBIで消化して、Klenow酵素及びリライゲートベクターで末端を補完した。pEF6-B4EC-NTによりエンコードされた組み換え型EphB4誘導体は、エピトープ-又は精製標識を含有しない一方、pEF6-hB4ECv3によりエンコードされた類似のB4ECv3蛋白質は、そのC-末端にV5エピトープ標識及び6xHis標識を含有し、条件付けした培地からの精製を促進する。プラスミド構築物pEF6-hB2ECを、オリゴプライマー5'-TGGATCCAC CATGGCTGT GAGAAG

GGAC-3' 及び 5'-ATTAATGGT GAT GGT GAT GAT GACTAC  
 CCACTT CGG AACCGAGGATGTTGTT-3' を使用した、エフリンB2c DNA の PCR 増幅をし、pEF6 / V5-His-TOP0ベクター中へのTOP0-クローニングにより製造した。プラスミド構築物pIG-hB2EC-Fcを、オリゴプライマー 5'-TAAAGCTTCCGCCATGG CTG TGAGAAGGGAC-3' 及び 5'-TGGATCCACTT CGGA ACCCGAGGATGTTGTT CCC-3' を使用した、エフリンB2c DNA の PCR 増幅をし、それに続くTOP0-クローニングにより製造し、次に得られた PCR フラグメントを BamHI 及び HindIII により切断したpIGH IgG1Fc融合発現ベクター内でサブクローニングして塩基配列決定した。同様に、pIG-hB2EC 及び pIG-hB4ECv3をオリゴプライマー 5'-ATAAGCTTCC

GCCTCATGGAGC TCCGGGTGCTG-3' 及び 5'-TTGGATCCCTGCTCCCCG CCAGCCCTCGC TCTCATC-3' を使用して、EphB4 ECD cDNA の PCR 増幅部位を製造し、次に BamH I 及び Hind III により切断した pIGH IgG1 Fc 融合発現ベクター内へ続いてサブクローニングした。上記ベクターによりエンコードされた蛋白質の推定配列を図 1 ~ 5 に示す。

【 0 1 2 2 】

## 2) ほ乳類細胞培養及びトランスフェクション；

HEK293T(ヒト胎児腎臓系)細胞を10%半透膜ろ過した(dialyzed)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と共にD MEM中に保持した。細胞を5%CO<sub>2</sub>/95%空気湿生霧圏気下37℃で保持した。トランスフ

エクションをリポフェクタミン 2000 試薬（商標、インビトロジエン社製）を使用して製造者のプロトコルに従い行った。トランスフェクション 1 日前、293T 細胞をトランスフェクション時に 80% 接触（confluence）となるように高密度で接種した。プラスミド DNA 及びリポフェクタミン（商標）試薬（1:3 比）を Opti-MEM I 血清使用量低減培地（商標、インビトロジエン社製）中で 5 分間稀釀し、一緒に混合して DNA；リポフェクタミン（商標）複合体を形成した。10cm 培養皿それぞれには、10μg のプラスミド DNA を使用した。20 分後、上記複合体を培養培地中の細胞へ直接添加した。トランスフェクション 16 時間後、培地を吸引し、血清フリー DMEM で 1 回洗浄し、血清フリー DMEM で置換した。分泌された蛋白質を 48 時間に後条件付き培地を採取することにより採取した。条件付き培地を 10000g で 20 分間遠心分離して清澄化し、0.2μm フィルターを通してろ過して精製用に使用した。  
10

## 【0123】

## 3) 安定な細胞系の構築；

EphB4ECv3 及び EphB4ECnt HEK293 又は HEK293T を生産する安定な細胞系を構築するために、細胞を、pEF6-B4ECv3 又は pEF6-B4EC-Nt プラスミド構築物のいずれかで上記のようにトランスフェクトし、抗生物質プラストサイジンを使用して選択した。トランスフェクション 24 時間後、細胞を低密度で接種した。翌日、細胞を 10μg/ml のプラストサイジンで処理した。ドラッグ選択 2 週間後、生存細胞をプールし、更に単一細胞クローニング展開を選択した。安定細胞確立後、それらを 4μg/ml プラストサイジン中で維持した。条件付け培地を試験して、組み換え型蛋白質それぞれの発現及び分泌を確認した。発現の特異性を、抗 B4モノ-又はポリクローナル AB を使用したウェスタンプロット法及び B2EC-Ap 試薬結合競合アッセイで確認した。  
20

## 【0124】

## 4) 蛋白質精製；

HEK293 細胞を EphB4 外部ドメイン（B4ECv3）の分泌型をエンコードするプラスミドで一時的にトランスフェクトした。条件付き培地を採取し、10mM イミダゾール、0.3M NaCl を補充し、20000g で 30 分間遠心分離して細胞片及び不溶性粒子を除去した。80ml の得られた上澄みを、1ml の Ni-NTA-アガロース（QIAGEN 社製）を有する予め平衡化したカラム上に流速 10ml/h で添加した。カラムを 10ml の 50mM Tris-HCl、0.3M NaCl 及び 10mM イミダゾール、pH 8 で洗浄後、残っている蛋白質を 3ml の 0.25M イミダゾールで溶離した。溶離した蛋白質を 20mM Tris-HCl、0.15M NaCl、pH 8 に対して一晩透析した。B4ECv3 の純度及び特性を、PAGE / クマシーグ -250 法及び抗 EphB4 抗体を使用したウェスタンプロット法により評価した。最後に、B4ECv3 の濃度を測定し、蛋白質をアリコートにして -70 で保存した。  
30

B4EC-Fc 蛋白質及び B2EC-Fc 蛋白質も同様に精製した。

## 【0125】

## 5) 生物化学的アッセイ；

## A. 結合アッセイ：

10μl 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 pH 8) 中で稀釀した 50μl 表示量の B4ECv3 を使用してインキュベートした。  
40  
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 50μl 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 PNP 处理後に比色分析で測定した。

## 【0126】

## B. 阻害アッセイ；

（溶液中の阻害）

50μl の BB 中に稀釀された異なる量の B4ECv3 を、50μl の 5nM B2E  
50

C-A P 試薬で予備インキュベートした（エフリンB2外部ドメインの胎盤性アルカリホスファターゼとの蛋白質融合）。1時間インキュベーション後、結合していないB2 E C-A P 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。

## 【0127】

(細胞ベースの阻害)

B4 E C v 3 を 20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl、0.1% BSA、pH 8 中に連続的に稀釈し、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 μlの5 nM B4 E C-A P 試薬(EphB4外部ドメインと胎盤性アルカリホスファターゼとの蛋白質融合)をそれぞれの試験管中へ30分間添加し、未結合のエフリンB2結合部位を検出した。結合反応を1.2mlのBBでの希釈により停止し、遠心分離した。細胞-沈降したA P の比色分析的反応をPNPP基質で展開した。

## 【0128】

C . B4 E C - F C 結合アッセイ；

(プロテインA-アガロースベースアッセイ) 10 μlのプロテインA-アガロースをエップendorf型試験管中で、結合バッファBB(20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl、0.1% BSA、pH 8)中に稀釈した50 μlの表示量のB4 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30分間後、プロテインAアガロースビーズを1.4mlのBBで2回洗浄し、次に50 μlのB2 E C A P 試薬を適用して最終濃度50 nMとした。結合を30分間振とう台上で行い、次に試験管を遠心分離し、1.4mlのBBで1回洗浄した。沈降したA P の比色分析的反応をPNPPの適用後に測定した(図6)。

## 【0129】

(ニトロセルロースベースのアッセイ) B4 E C - F C を連続的に20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl、50 μg/ml BSA、pH 8 中に稀釈した。2 μlのそれぞれのフラクションをニトロセルロースストリップ上に適用し、スポットを3分間乾燥させた。ニトロセルロースストリップを5%無脂肪乳で30分間ブロックし、次に5 nM B2 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45分後、ニトロセルロースを20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl、50 μg/ml BSA、pH 8 で2回洗浄し、アルカリホスファターゼ基質シグマFast(シグマ社製)を適用して色を展開した。

## 【0130】

D . B4 E C - F C 阻害アッセイ；

(溶液中阻害) B4 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) B4 E C v 3 について記載した上記参照。

E . B2 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) B4 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) B4 E C - F C について記載した上記参照。

## 【0131】

6) 細胞-ベースのアッセイ；

A . 増殖阻害アッセイ：

ヒトヘその緒静脈内皮細胞(HUVEC)(1.5 × 10<sup>3</sup>)を100 μlのEBM-2(Clontech社製、番号CC3162)を含む96-ウェルプレート中にプレートする。24時間後(第0日)、試験用組み換え型蛋白質(100 μl)をそれぞれのウェルへEBM-2培地中に2×目的濃度(5~7濃度レベル)で添加する。第0日に、1のプレートを20%メタノール中0.5%クリスタルバイオレットで10分間染色し、水で洗浄し、

10

20

30

40

50

空気乾燥する。残っているプレートを72時間37でインキュベートする。72時間後、プレートを20%メタノール中0.5%クリスタルバイオレットで染色し、水で洗浄し、空気乾燥する。染色は、エタノール：0.1M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ラボラトリーズ社製）を使用して測定する。第0日吸光度を72時間プレート結果から減じ、データをコントロール増殖（ビヒクル処理した細胞）割合としてプロットする。IC<sub>50</sub>（50%阻害を発生する薬剤濃度）をプロットしたデータから算出する。

## 【0132】

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）（60μlの10mg/ml；Collaborative Lab社製、番号35423）を氷冷96-ウェルプレートのそれぞれのウェル中に配置した。プレートを室温で15分間放置し、次に37-30分間インキュベートし、マトリゲルをポリマー化した。その間に、H U V E CをEGM-2（Clonetic社製、番号CC3162）中に濃度2×10<sup>5</sup>細胞/mlで調製する。試験化合物を2×目的濃度（5濃度レベル）で同一の培地中に調製する。細胞（500μl）及び2×ドラッグ（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<sub>50</sub>）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。

## 【0133】

C. 細胞移動アッセイ；

移動を、48-ウェルボイデンチャンバー（商標）及び8μm孔径のコラーゲン被覆された（10μg/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27~29μlのD M E M 培地のみ（ベースライン）又は化学走性誘因物質含有培地（b F G F、V E G F又はスイス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D M E M + 1% B S A 中で調製される45μlのH U V E C 細胞懸濁液（1×10<sup>6</sup>細胞/ml）を配する。37で5時間インキュベーション後、膜をP B S 中で洗浄し、D i f f - Q u i c k 溶液中に固定化して染色する。フィルターをガラススライド上に、移動した細胞を下向きに配置し、上部の細胞をK i m w i p e（商標）を使用して除去する。試験は4~6複製物及びそれぞれのウェルからの5視野を計測して行う。陰性無刺激コントロール値を刺激されたコントロール及びドラッグ処理した値から除き、データを平均移動細胞±S.D.としてプロットする。IC<sub>50</sub>をプロットしたデータから算出する。

## 【0134】

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

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

レセプターの可溶性組み換え型誘導体の抗血管形成活性に必要十分なEphB4の異所性部位のサブドメインを特定するために、EphB4E Cの4種の組み換え型欠失変異体を生産し、試験した（図16）。EphB4の細胞外部位は、Eph B 及びEph A レセプターファミリーの他の構成員と同様に、N-末端リガンド結合球状領域、次にシステイン-リッチ領域及び2個のフィプロネクチン型IIIリピート（F N III）を含有する。EphB4の完全異所性部位を含有する組み換え型B 4 - G C F 2 蛋白質に加え、球状領域及びC y s -リッチ領域（B 4 - G C ）を含有するEphB4E Cの3個の欠失変異体を構築した；即ち、球状、C y s -リッチ及び第一のF N III領域（G C F 1）並びに削除された球状領域（C F 2）を有するE C D 变異体。球状領域のみを含有する短縮されたEphB4E C蛋白質の数個のバージョンを生産するための試みは成功せず、その理由はこれら全ての構築物から発現した蛋白質の分泌の欠如、及び細胞内で発現された組み換え型蛋白質により結合されたリガンドの不存在

10

20

30

40

50

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。

【0135】

4個全てのC末端6×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ホ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<sup>2+</sup>キレート樹脂上のクロマトグラフィーを使用して親和性精製して均質化した（図17）。明らかにこれらのグリコシル化を原因として、この蛋白質は34.7kDa（GCF）、41.5（C2）、45.6kDa（GCF1）及び57.8kDa（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。

【0136】

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、C2ではなくGCF1及びGCF2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-AP）融合蛋白質とNi<sup>2+</sup>樹脂又はニトロセルロース膜上に固定化されたB4蛋白質との相互作用により確認される（図17）。

【0137】

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PC3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。PC3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。PC3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C2ではなくGCF2、GCF1又はGCF蛋白質とのプレインキュベーションは、その次に続くEphB4自動リン酸化を抑制する。蛋白質単独のPC3細胞への添加又は細胞の蛋白質とのプレインキュベーション及び次の培地交換及びリガンド添加は、EphB4リン酸化段階に作用しない。

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。

【0138】

B. HUV/AEC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、HUV/AECによるin vitroの移動/侵襲、増殖及び細管形成への可溶性EphB4の効果を確定することにより実施した。可溶性EphB4への曝露は、投薬量依存性拳動でのボイデンチャンバー（商標）アッセイ中のbFGF及びVEGF-両方の誘起移動を非常に阻害し、nMでの重要性を確定した（図18）。マトリゲル（商標）被覆されたウェル上の、HUV/AECによる細管形成は、bFGF及びVEGFの不存在及び存在のいずれでも可溶性EphB4により投薬量依存性拳動で非常に阻害された（図19）。又in vitroで可溶性EphB4のnMはHUV/ECへ細胞毒性であったか否かを評価した。

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

【0139】

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。bFGF及びVEGF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

10

20

30

40

50

った(図21)。反対に、bFGF及びVEGFを補充されたプラグは、プラグ全体に充分な血管形成及び脈管を生じた。 $\mu$ gの可溶性EphB4で処理したマウスから取り出されたプラグでは、増殖因子なしのプラグと比較してプラグの血管形成が顕著に減少した(図21)。更に、プラグの組織試験は脈管染色が減少したことを示した(図21)。

#### 【0140】

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

10

#### 【0141】

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SCC15腫瘍の増殖を抑制することが発見された(図23)。

E. 可溶性EphB4は角膜新生血管形成を阻害した;

可溶性EphB4のin vivo抗血管形成活性を更に検討するために、bFGFで誘起されたマウス角膜中の新生血管形成に対する可溶性EphB4投与の阻害的効果を試験した。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、bFGFによりマウス角膜中で誘起された新生血管形成は、可溶性EphB4-処理したグループ中で顕著に阻害された(図24)。

20

#### 【0142】

F. 腫瘍増殖に対する可溶性EphB4のin vivo効果;

同一のモデルを、可溶性EphB4のin vivo効果を決定するために使用した。

SCC15腫瘍をマトリゲルと共に増殖因子有り又は無しでプレインキュベートして皮下移植し、又sc単独で移植し、マウスを一日1~5ugの可溶性EphB4でsc又はip処理して実験した。

30

#### 【0143】

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 $\text{mm}^3$ 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 $\text{mm}^3$ 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でき明らかになった(昏睡、断続的な背中の曲げ、震え又は不安定な呼吸パターンの不存在により決定された)。

#### 【0144】

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 $1\text{mm}$ 幅で囲まれている、全SCC15腫瘍中の壊死の中心面積の存在を明らかにした。中心壊死面積はしばしば大きく接触性(confluent)であり、細胞詳細部の喪失を示した。腫瘍断片面積の割合として評価した壊死は、可溶性EphB4-処理したグループで非常に( $p < 0.02$ )多かった(コントロールに対する処理体の%壊死)。可溶性EphB4処理した腫瘍体積の減少はこの蛋白質の腫瘍血管供給に対する効果によるのか否かを決定するために、血管中の内皮細胞を、腫瘍断片中で抗血小板細胞付着分子(PECAM-1; CD31)抗体を使用した免疫染色法を使用して特定し、微細血管の密度を評価した(図26)。微細血管密度は、コントロール中及び可溶性EphB4-処理した腫瘍中の、腫瘍細胞の外側の生存縁部(よく区別される核を有する腫瘍の周辺部へ隣接する細胞の均一層)と類似した。微細血管密度は非常に内側にあり、コントロ

40

50

ール腫瘍より可溶性EphB4-処理した壊死性中心面積に接触する腫瘍細胞の生存領域がより少なかった。マッソン社製トリクローム（商標）染色で特定されるように、纖維素沈着はコントロール腫瘍より、内側生存縁部中の血管中及び周囲並びに可溶性EphB4処理した中心壊死性コアで増加した。可溶性EphB4処理した腫瘍の生存縁部の外側では、脈管管腔は空腔を保持し、赤血細胞を含有するが、纖維素沈着は多くの脈管周囲で顕著であった。可溶性EphB4は、試験された正常組織（肺、肝臓及び腎臓）中の内皮に対してはこれらの効果が無いことが発見された。

## 【0145】

H. 材料及び方法；

## 1) 発現構築物；

10

可溶性用発現ベクターを生産するために、 $6 \times His$  標識化EphB4-EC-D変異体、クローン化された完全長ヒトEphB4 cDNAを下記オリゴプライマーを使用してPCR法で増幅した：T A C T A G T C C G C C A T G G A G C T C C G G G T G C T G C T (通常のEphB4 N-末端プライマー) 及びG C G G C C G C T T A A T G G T G A T G G T G A T G A T G A G C C G A A G G A G G G G T G G T G C A (B4-GC)、A G C G G C C G C T T A A T G G T G A T G G T G A T G A T G G A C A T T G A C A G G C T C A A A T G G G A (B4-GCF1) 又はT G C G G G C C G C T T A A T G G T G A T G G T G A T G A T G A T G A T G C T G C T C C C G C C A G C C C T C G C T C T C A T (B4-GCF2)。得られたPCRフラグメントを、EF-1プロモーター調節下でホモ乳類発現ベクターpEF6/V5-His-TOP0（インビトロジェン社製）中でTA-クローン化した。発現した組み換え型蛋白質は、ヒトEphB4の成熟細胞外部の下記フラグメントをエンコードする：アミノ酸位置1～522 (GCF2)、1～412 (GCF1) 及び1～312 (GC)。pEF6クローニング用のB4-CF2欠失（アミノ酸13-183）PCRフラグメントを生成するために、EphB4 cDNAを下記オリゴプライマーを使用して2ステップオーバーラップPCR法により増幅した：T A C T A G T C C G C C A T G G A G C T C C G G G T G C T G C T、C A G C T G A G T T C C A A T T T G T G T T C、G A A C A C A A A A T T G G A A A C T C A G C T G A C T G T G A A C C T G A C 及びG C G G C C G C C T G C T C C C G C C A G C C C T C G C T 。

20

## 【0146】

分泌されたヒトエフリンB2-アルカリホスファターゼ (B2-AP) 試薬の生産用ベクターは、下記プライマーを使用してヒトエフリンB2 cDNAのPCR増幅により構成された：T A A A G C T T C C G C C A T G G C T G T G A G A A G G G A C 及びT A G G A T C C T T C G G A A C C G A G G A T G T T G T T C C C : 得られたフラグメントをクローニングし、Hind III及びBamH Iで消化して、Hind III-Bg1 II消化されたpAPT2ベクター（GenHunter、Inc.社製）とする。それぞれの場合、発現ベクター中の挿入部分は、完全塩基配列決定により確認した。

30

## 【0147】

2) 抗体及び他の試薬；

抗EphB4モノクローナル抗体mAB79及びmAB23をマウス中で、成熟ヒトEphB4のGCF2蛋白質含有アミノ酸1～522に対して増殖し、プロテインAクロマトグラフィーによりハイブリドーマ上澄みから精製した。抗ホスホチロシン抗体4G10はUBI社（レイクプラシッド、NY）から得た。プロテインG-HRP複合体はBio-Rad社から購入した。

40

## 【0148】

3) EphB4由来の組み換え型蛋白質の発現及び精製；

EphB4-EC-D可溶性蛋白質を生産するために、培養されたヒト胎児腎臓細胞HEK293Tを対応するプラスミド構築物で、標準リン酸カルシウム又はリポフェクタミン2000試薬（商標、インビトロジェン社製）プロトコルを使用してトランスフェクトした。12～16時間トランスフェクション後、増殖培地（DMEM+10%胎児ウシ血清）を吸引し、細胞を血清フリーDMEMで1回洗浄し、血清フリーDMEMで置換した。分泌さ

50

れた蛋白質を含有する条件付け培地を 72 ~ 96 時間後採取し、遠心分離で清澄化し、Ni - NTA アガロース (QIAGEN社製) を使用して His 標識化蛋白質の精製に使用した。純度及び組み換え型蛋白質の量を、クマシープルー又は銀染色法を使用した SDS-PAGE 電気泳動、ウェスタンプロット法及び UV 分光法により試験した。精製された蛋白質を、20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl、pH 8 に対し透析し、-70°で貯蔵した。

#### 【0149】

蛋白質のリガンド結合性を試験するために、10 μl の Ni - NTA - アガロース (QIAGEN社製) をマイクロ遠心機用試験管中で、0.5 ml の結合バッファ BB (20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl、0.1% ウシ血清アルブミン、pH 8) 中に稀釀した 10 ~ 500 ng サンプルの B4-EC-D 蛋白質でインキュベートした。振とう台上でインキュベーション 30 分間後、Ni - NTA ビーズを 1.4 ml の BB で 2 回洗浄し、次に B2-AP 融合蛋白質を濃度 50 nM で添加した。結合を振とう台上で 30 分間行った。試験管を遠心分離し、1.4 ml の BB で 1 回洗浄した。沈降した AP 量を、p-ニトロフェニルホスフェート (PNPP) 処理及び 5 ~ 30 分間インキュベーション後 420 nm で比色分析で測定した。

#### 【0150】

##### 4) 免疫沈殿；

全溶解産物を 4° で処理した。細胞を、20 mM HEPES (pH 7.4)、100 mM 塩化ナトリウム、50 mM フッ化ナトリウム、2 mM の EDTA、2 mM の EGTA、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、1% (v/v) NP-40、0.5% (w/v) デオキシコール酸ナトリウム、1 mM フェニルメチルスルホニルフルオライド (新規に添加) 及び 100 U トライジロール (商標) を含有する 1 ml のバッファ中で溶解した。溶解産物をエッペンドルフ型試験管中へスクレープし、50 μl の煮沸した、ホルマリン-固定化した黄色ブドウ球菌を添加した (Calbiochem社製、サンディエゴ)。混合 30 分後、溶解産物を 5 分間、25000 g で minifuge (商標) 中で遠心分離し、上澄みを適切な抗体を含有する新しい試験管中へ移した。溶解産物を抗体と 1 時間混合し、その後 50 μl のプロテイン A - Sepharose (商標) ビーズを添加し、試験管の内容を 1 時間混合して免疫沈降物を収集した。プロテイン A ビーズを 25000 g で 30 秒の遠心分離で採取した。上澄みを廃棄し、ビーズを 1 ml の溶解バッファマイナスデオキシコレートで 3 回洗浄した。

#### 【0151】

##### 5) 細胞 - ベースの EphB4 チロシンキナーゼアッセイ；

ヒト前立腺癌細胞系 PC3 細胞を 10% 半透膜ろ過したウシ胎仔血清及び 1% ペニシリン / ストレプトマイシン / ネオマイシン抗生物質混合物と共に RPMI 培地中で維持した。細胞を 5% CO<sub>2</sub> / 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 60 mM ディッシュ中で増殖し、10 分間 1 μg / ml の RPMI 中でマウスエフリン B2-Fc 融合で処理して EphB4 レセプター活性化するか、コントロールとして単純 (plain) 培地で処理した。EphB4 レセプター活性化に対する可溶性 EphB4 ECD 蛋白質の異なる誘導体の効果を試験するために、3 セットの細胞を使用した。第一のセットで、細胞を種々の蛋白質 (5 蛋白質 ; GC、GCF1、GCF2、GCF2-F、CF2) で 5 μg / ml 20 分間処理した。第二セットの細胞では、適用前に、蛋白質を 1 : 5 (EphB4 蛋白質 : B2-Fc) モル比でエフリン B2-Fc と予備混合し、20 分間インキュベートし、細胞上に 10 分間適用した。第三セットの細胞では、細胞を最初に蛋白質と 20 分間 5 μg / ml で処理し、培地を 1 μg / ml のエフリン B2-Fc を含有する新しい培地で置換し、更に 10 分間インキュベートした。

#### 【0152】

刺激後、細胞を直ちに、20 mM Tris-HCl、pH 7.4、150 mM NaCl、1% (v/v) Triton X100 (商標)、1 mM の EDTA、1 mM の PMSF、1 mM バナジン酸ナトリウムを含有する蛋白質抽出バッファで採取した。蛋白質抽出物を、14000 rpm、20 分間 4° 遠心分離で清澄化した。清澄化蛋白質サンプルを抗 EphB4 モノクロー

10

20

30

40

50

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%TritonX100(商標)を含有する抽出バッファで2回洗浄した。免疫沈降した蛋白質を1X SDS-PAGEサンプルローディングバッファ中で可溶化し、10%SDS-PAGEで分離した。EphB4レセプター活性化試験のために、電気プロッティングした膜を1:1000希釈の抗pTyr特異的抗体4G10、次に1:5000希釈のプロテインG-HRP複合体でプロープした。

## 【0153】

## 6) 細胞培養;

正常H U V E CはCambrex(商標、Bio Whittaker社)として得て、0.1mg/ml内皮性成長補充物(ウシ脳からの疎抽出物)、ペニシリン(50U/ml)、ストレプトマイシン(50U/ml)、2mmol/lグルタミン及び0.1mg/mlヘパリンナトリウムを補充したEBM2培地内で維持した。細胞のアリコートをパッセージ(継代)1及び3間は冷凍保存した。全実験中、H U V E Cはパッセージ4以下で使用し、接触性ディッシュから採取した。

## 【0154】

## 7) 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(Clontech社製、カタログ番号CC3162)中、濃度 $2 \times 10^5$ 細胞/mlで調製した。試験蛋白質を同じ培地中の $2 \times$ 目的濃度(5濃度レベル)で調製した。細胞(500μl)及び $2 \times$ 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(ICI<sub>50</sub>)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。

## 【0155】

## 8) 細胞移動アッセイ;

H U V E CのV E G Fへの走化性を、modifiedボイデンチャンバー(商標、マトリゲルでコートしたトランスウェル膜フィルターインサート; 24ウェルプレート、6.5mm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H U V E C細胞の懸濁液( $2 \times 10^5$ 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(V E G F又はb F G F)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V E G Fに応答してポリカーボネートフィルターを通過するそれらの移動を測定した。37℃で4~24時間インキュベーション後、フィルターの上部表面を綿棒でスクレーブし、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。ICI<sub>50</sub>をプロットしたデータから算出した。

## 【0156】

## 9) 増殖阻害アッセイ;

H U V E C( $1.5 \times 10^3$ 細胞)を100μlのEBM-2(Clontech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(100μl)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

10

20

30

40

50

%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ラボラトリーズ社製）を使用して測定した。第0日吸光度を72時間プレート結果から減じ、データをコントロール増殖（ビヒクル処理した細胞）割合としてプロットした。IC<sub>50</sub>値をプロットしたデータから算出した。

## 【0157】

## 10) 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。3μm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。

## 【0158】

## 11) 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40μg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、改良フォンゲーレーフェ刀（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±7±1±0mm及びVEGFペレット用に0±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。

## 【0159】

## 12) In vitro侵襲アッセイ；

「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8μm；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-ウェルプレート中に配置した。HUV4EC細胞を密度 $5 \times 10^3$ /ウェル細胞で培養インサートの上層中に接種し、24時間EphB4ECMの存在下で血清フリーEBM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0.5mlのヒトSCC15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8μm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、侵襲インデックスとして規定した（細胞数/面

10

20

30

40

50

積)。

【0160】

13) 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 $5 \times 10^6$ 細胞密度で、EphB4 E C Dの存在又は非存在下で、ヒトb F G Fの存在又は非存在下で、胸腺欠損マウスBalb/cヌードマウス中に、マトリゲル(商標、BD Biosciences社製)合成基底膜(1:1 v/v)と共に皮下注射し、2週間腫瘍を検査した。EphB4 E C Dグループ中の腫瘍体積は、ビヒクルグループ中のそれよりも移植後の増殖因子の存在及び不存在で3倍小さかった。グループ間に体重の違いはなかった。切除された腫瘍の横断面の免疫組織化学試験及びT U N E L-陽性アポトーシス又は壊死、C D 3 4 免疫染色法、及びBrdU増殖速度試験を、脱バラフィン化後、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。

【0161】

30 胸腺欠損ヌードマウス、B A L B / c (nu/nu)へ、0.1m lマトリゲルと混合した0.1m lP B S中の $1 \times 10^6$  B 1 6 黒色腫細胞をそれぞれ注射し、又は200 $\mu$  lのD M E M 血清フリー培地中に再懸濁した $1.5 \times 10^6$  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 $\mu$  g / m gで腫瘍周囲に静脈内又は皮下注射し、2 $\mu$  g / m gの注射を週間毎に行い(10 $\mu$  g / g、50 $\mu$  g / k g / 日)、接種後2週間検査した。マウスは14日目に犠牲にされた。コントロールマウスはP B S 5 0  $\mu$  lを毎日投与された。

【0162】

14) 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( $5 \times 10^6$ )をヌードマウスの背中皮膚に皮下接種した。腫瘍が約100 $\text{mm}^3$ 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。

【0163】

15) 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 $\mu$  mに断片化し、ヘマトキシリソエオシンで染色した。脈管密度をコンピュータベースの画像分析機を使用して半定量化した(それぞれのグループのマウス3頭からの断片当たり5視野)。

【0164】

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

A. 前立腺癌細胞系中のEphB4の発現;

最初にウェスタンプロット法により種々の前立腺癌細胞系中でEphB4蛋白質の発現について試験した。前立腺癌細胞系は顕著な変異体を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)。

【0165】

B. 臨床性前立腺癌サンプル中のEphB4の発現;

EphB4が臨床性前立腺サンプル中で発現したか否かを決定するために、前立腺癌外科的標本からの腫瘍組織及び隣接した正常組織を試験した。前立腺標本中のEphB4の組織的分布を免疫組織化学法により決定した。明らかに、EphB4発現は新生物性上皮に限定され(図28、左上)、間質性及び正常前立腺上皮では存在しない(図28、右上)。前立腺組

10

20

30

40

50

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）。

【0166】

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）。

【0167】

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

発明者らは以前に RXR は前立腺癌細胞系中でダウンレギュレーションされることを発見したが（Zhangら、2003、Cancer Biol Ther.2:179-184）、EphB4 発現は、「正常」前立腺（MLC）、前立腺癌（PC3）及び転移性前立腺癌（PC3M）を検討した時には逆の発現パターンを有することを今回発見し（図 27A）、RXR は EphB4 の発現をレギュレートするのではないかと考えた。この関係を確認するために、EphB4 の発現を構成的に RXR を発現する 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）。

【0168】

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

EGFR 及び IGF-1R は両方共 PC3 細胞増殖に対するオートクリン及びパラクリン作用を有することを示した。EphB4 発現はより悪性の細胞系ではより高いために、EphB4 発現はこれらの p53-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 EGF-R 及び IGF-1R シグナルをブロッキングすることによりその関係を試験した。EphB4 は、EGFR キナーゼ阻害剤 AG1478 を使用した EGF-R シグナルのブロッキング後（図 30A）又は IGF-1R 中和抗体を使用した IGF-1R シグナル経路のブロックにおいて（図 30B）ダウンレギュレーションされた。

【0169】

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-100ODN の両方は、投薬量依存性拳動で PC3 細胞の生存能力を減少した（図 31C、D）。関係のない siRNA 又はセンスオリゴヌクレオチドは生存能力に効果がなかった。

【0170】

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

10

20

30

40

50

傷治癒アッセイを行った。創傷がP C 3 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siRNA472でトランスクレクトされ、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)。P C 3 細胞の10 μM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、siRNA472を有するP C 3 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-チャンバー侵襲アッセイにより評価された(図31G)。

#### 【0171】

H. EphB4 siRNAは、P C 3 細胞中で細胞周期停止及びアポトーシスを誘起する；

EphB4のノックダウンは細胞生存能力減少を生じたために(図31C)、これが細胞周期に対する効果に起因するのかを検討した。コントロールsiRNAトランスクレクトした細胞との比較において、siRNA472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siRNA472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、P C 3 細胞がコントロールsiRNAではなくsiRNA472でトランスクレクトされた場合に確認された(図32B)。100nMで、siRNA472トランスクレクトされた細胞中ではコントロールsiRNAトランスクレクトされたP C 3 細胞中よりも15倍多くアポトーシスを生じた。

#### 【0172】

##### I. 材料及び方法

###### 1) 試薬

中和IGF-1R抗体はR&Dシステム社(ミネアポリス、MN)から購入した。抗IGF-1R( )、-EGFR、-EphB4(C-16)はサンタクルスバイオテック社(サンタクルス、CA)から購入した。-アクチンモノクローナル抗体はシグマ化学社(セントルイス、MO)から購入した。培地及びウシ胎仔血清(FBS)はインビトロジエン社(カールスバッド、CA)から購入した。AG1478(4-(3'-クロロアニリノ)-6,7-ジメトキシ-キナゾリン)はカルビオケム社(サンディエゴ、CA)から購入した。

#### 【0173】

###### 2) アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド及びEphB4siRNA

EphB4特異的アンチセンスホスホロチオアート-改質オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)及びセンスODNは、Qiagen社(アラメダ、CA)により合成され精製された。配列は下記の通り:センス、5'-TCC-TGC-AAG-GAG-ACC-TTC-AC-3'；AS1:5'-GTG-CAG-GGA-TAG-CAG-GGC-CAT-3'；AS10:5'-ATG-GAG-GCC-TCG-CTC-AGA-AA-3'。siRNAは、USC/Norris Comprehensive Cancer Center Microchemical Core laboratory社により合成された。EphB4 siRNAの配列は、siRNA472の5'-GGU-GAA-UGU-CAA-GAC-GCU-GUU-3'及びsiRNA2303の5'-cuc-uuc-cga-ucc-cac-cua-cuu-3'である。スクランブルされたGAPDHに対する陰性コントロールsiRNAは、Ambion社(オースチン、TX)から購入した。

#### 【0174】

###### 3) 細胞系及び培養物

前立腺癌細胞系、P C 3 、P C 3 M、D U 1 4 5 、A L V A 3 1 、L A P C - 4 、L N C a P 、C W R 2 2 R 及び大人ヒト正常前立腺上皮細胞系M L C S V 4 0 及びB P H - 1 を得て、上記記載のように培養した(7)。安定な細胞系C W R 2 2 R - R X R 、L N C a P - F G F 8 を確立して、上記記載のように培養した(7、33)。

#### 【0175】

###### 4) EphB4モノクローナル抗体の発生；

EphB4の細胞外領域(EC D)をp G E X - 4 T - 1 中でクローニングし、GST-融合EC D(GST-EC D)を生成した。B L 2 1 E. coli中でGST融合蛋白質として発現したEphB4 EC Dを、アフィニティクロマトグラフィーにより精製し、GST領域をトロン

10

20

30

40

50

ビンにより開裂した。モノクローナル抗体を生成し、抗体の感応性及び特異性を、確実に EphB4でトランスフェクトされた 293 細胞の全細胞溶解産物を使用してウェスタンプロット法により再確認した。

【 0 1 7 6 】

5 ) ワンステップ R T - P C R 及び量的 R T - P C R ;

合計 R N A を RNA STAT-60 (商標、 Tel-Test、 Inc. 社製、 フレンズウッド、 TX ) を使用して前立腺癌標本及び隣接した正常標本から抽出した。量的 R T - P C R 用にファーストストランド c D N A を 5  $\mu$  g の合計 R N A から SuperScriptIII (商標、 インビトロジェン社製、 カールスバッド、 CA ) を使用して合成した。量的 R T - P C R を Stratagene M X 3 0 0 0 P システム (商標、 Stratagene 社製、 ラホーヤ、 CA ) で SYBR Green I Brilliant Mastermix (商標、 Stratagene 社製) を使用して製造者の取り扱い説明書に従い行った。EphB4及び - アクチン (正常化遺伝子として使用) 用の最適化反応は、 150 nM のフォワードプライマー ( - アクチン、 5' - G G A - C C T - G A C - T G A - C T A - C C T - A - 3' ; EphB4、 5' - A A G - G A G - A C C - T T C - A C C - G T C - T T - 3' ) 及びリバースプライマー ( - アクチン 5' - T T G - A A G - G T A - G T T - T C G - T G G - A T - 3' ; EphB4、 5' - T C G - A G T - C A G - G T T - C A C - A G T - C A - 3' ) それぞれを用いて 95 で 10 分間、 次に 95 で 30 秒、 60 で 1 分間、 72 で 1 分間のサイクル 40 回によるポリメラーゼの D N A 変性 / 活性化であった。遺伝子 - 特異的増幅の特異性を、 単一解離ピークの存在により確認した。全反応を三個の複製物の試験において R T でテンプレートなしの陰性コントロールを使用して行った。

10

20

30

40

【 0 1 7 7 】

6 ) 免疫組織化学法 ;

O C T - 包埋した組織を 5  $\mu$  m に断片化し、 リン酸緩衝 4 % パラホルムアルデヒド中で固定化した。断片を 3 × 5 分間 P B S 中で洗浄し、 内因性ペルオキシダーゼを 0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の P B S 溶液中 10 分間室温でインキュベーションすることによりブロックした。断片を Eph4 (C-16) 抗体 (1 : 50) と共に 1 時間室温でインキュベートし、 次に P B S で 3 回洗浄し、 ロバ抗ヤギ第二抗体 (サンタクルスバイオテック社製) で 1 時間室温でインキュベーションした。3 回の P B S での洗浄後、 ペルオキシダーゼ活性を D A B 基質溶液 (ベクターラボラトリーズ社製、 バーリンガム、 CA ) 中 10 分間室温でインキュベーションすることにより局在化した。断片をヘマトキシリンで 20 秒間対比染色し、 脱水してマウントした。染色用の陰性コントロールは、 一次抗体用の正常ヤギ血清の代用であった。前立腺アレイ (Bio Meda 社製、 フォスター・シティ、 CA ) の免疫組織化学染色を、 製造者の取り扱い説明書に従いヤギ A B C 染色法システム (商標、 サンタクルスバイオテック社製) を使用して行った。

【 0 1 7 8 】

7 ) ウェスタンプロット法 ;

全細胞溶解産物を、 特記しない限り、 プロテアーゼ阻害剤カクテル (Pierce 社製、 ロックフォード、 IL) を補充した細胞溶解バッファ (GeneHunter 社製、 Basgvukke、 TN) を使用して調製した。合計蛋白質を D C 試薬システム (商標、 Bio-Rad 社製、 Hercules、 CA ) を使用して決定した。通常、 20  $\mu$  g 全細胞溶解産物を 4 ~ 20 % トリス - グリシン勾配ゲル上で測定した。サンプルを P V D F 膜へ電子転移させ、 非特異的結合を 5 % 脱脂乳を含有する T B S T バッファ (0.5 mM Tris-HCl、 4.5 mM NaCl、 0.05 % Tween-20 (商標) 、 pH 7.4) 中でブロックした。膜を一次抗体で一晩最初にプローブし、 Restore ウェスタンプロットストリッピングバッファ (商標、 Pierce 社製、 ロックフォード、 IL) でストリップし、 - アクチンで再プローブして等価ロード及び蛋白質の移動を確認した。シグナルをスーパーシグナルウェストフェムト最大感応性基質 (商標、 Pierce 社製) を使用して検出した。

【 0 1 7 9 】

8 ) リン酸化分析 ;

60 mm ディッシュ中で成長する細胞を血清飢餓状態 (1 % F B S 補充した R P M I 1 50

640、24時間)又は正常条件(10%FBS)中で培養し、次に1 $\mu$ g/mlマウスエフリンB2/Fcの存在又は非存在下で10分間処理してEphB4レセプターを活性化した。清澄化細胞溶解産物をEphB4モノクローナル抗体で一晩4でインキュベートした。抗原-抗体複合体を、20mMリン酸ナトリウム、pH7.0中の100 $\mu$ lのプロテインG-Sepharose、を添加して、一晩4でインキュベーションして免疫沈降させた。免疫沈降物を1:1000希釈したpTyr特異的抗体(Upstate社製、クローン4G10)を使用したウェスタンプロット法により分析し、次に1:5000希釈したプロテインG-HRP(Bio-Rad社製)でインキュベーションした。免疫沈殿効率を監視するために、複製した膜をEphB4特異的モノクローナル抗体でプローブした。

## 【0180】

10

9)一時的トランスフェクション及びトランスフェクトされた細胞の分類;

PC3細胞をCD4をコードするpMACS4.1及び野生型p53(pC53-SN3)若しくはPTENベクター又は両方を、製造者の取り扱い説明書に従いリポフェクタミン2000(商標、インビトロジエン社製)を使用して共トランスフェクトした。CD4のp53又はPTEN又はベクターに対するモル比は1:3であり、合計プラスミドは90%接触性細胞の10cm<sup>2</sup>ディッシュ当たり、60 $\mu$ lのリポフェクタミン2000(商標)を使用して24 $\mu$ gであった。トランスフェクション24時間後、単一細胞懸濁液を作成し、短縮されたCD4(Miltenyl Biotec社製、ドイツ国)を製造者のプロトコルに従い表面マーカーとして使用して分類した。分類された細胞を1×SDSサンプルバッファ中に溶解し、ウェスタンプロット法により分析した。

20

## 【0181】

10)EphB4の発現におけるIGF及びEGFシグナル経路の研究;

PC3細胞を6-ウェルプレート中に接種し、80%接触するまで培養し、2 $\mu$ g/ml中和IGF-1Rモノクローナル抗体、MAB391(Haileyら、2002、Mol Cancer Ther.11:1349-1353)、又は1nM AG1478、強いEGFR阻害剤(Liuら、1999、J Cell Sci.112(Pt14):2409-2417)と共に24時間処理した。疎細胞溶解産物をウェスタンプロット法により分析した。バンド密度をBio-Rad社製Quantity Oneシステムソフトウェア(商標)により定量化した。

## 【0182】

30

11)細胞生存能力アッセイ;

PC3細胞を48-ウェルプレート上に密度約1×10<sup>4</sup>細胞/ウェルで合計体積200mlで接種した。培地を細胞が接触した後交換し、細胞を種々の濃度(1~10 $\mu$ M)のEphB4アンチセンスODN又はコントロールとしてのセンスODNで処理した。培地交換3日後、新しいODNを添加した。更に48時間インキュベーション後、細胞生存能力をMTTにより上記のように評価した(36)。EphB4siRNA(10~100nM)を2×10<sup>4</sup>PC3細胞/ウェル、48-ウェルプレートで製造者の取り扱い説明書に従い2 $\mu$ lのリポフェクタミン2000(商標)を使用して導入した。4時間トランスフェクション後、細胞を増殖培地(10%FBSを補充されたRPMI1640)へ戻した。生存能力をMTTでトランスフェクション48時間後にアッセイした。

## 【0183】

40

12)創傷治癒移動アッセイ;

PC3細胞を6-ウェルプレート中に接種し、接觸するまで培養した。10 $\mu$ MのAS-10又はコントロールとしてのセンスODNを、それを無菌性ピペットチップでスクレープすることにより単層を創傷する12時間前に、生存能力アッセイでウェル中へ記載されたように導入した。培地を5%FBS補充されたRPMI1640及び新しいODNへ交換した。創傷12時間前に、50nMのsiRNA472又はGAPDH陰性コントロールsiRNAでトランスフェクトした接觸性培養物も又試験した。治癒プロセスを動的に試験し、顕微鏡アダプター付きのニコン社製Coolpix5000(商標)デジタルカメラで記録した。

## 【0184】

13)侵襲アッセイ;

50

P C 3 細胞をリポフェクタミン 2 0 0 0 (商標) を使用して siRNA 4 7 2 又はコントロール siRNA でトランスフェクトし、6 時間後、 $0.5 \times 10^5$  細胞を  $8 \mu\text{m}$  マトリゲル (商標) プレコートされたインサート (BD Biosciences社製、パロアルト、CA) 中に移動させた。インサートを 5 % F B S を補充された R P M I 及び化学走性誘因物質として 5  $\mu\text{g}$  / ml フィブロネクチンを含有するコンパニオンウェル中に設置した。22 時間インキュベーション後、インサートを除去し、上部表面上の非侵襲細胞も綿棒で除去した。膜の下側表面上の細胞を 100 % メタノール中で 15 分間固定化して空気乾燥し、ギムザ染色で 2 分間染色した。細胞を光学顕微鏡によりそれぞれの膜について 5 個のそれぞれ高性能視野で計測した。アッセイを、それぞれの処理グループの三個の複製物において行った。

【0185】

10

14) 細胞周期分析;

6 - ウェルプレート中の P C 3 細胞の 80 % 接触性培養物を siRNA 4 7 2 (100 nM) で、リポフェクタミン 2 0 0 0 (商標) を使用してトランスフェクトした。トランスフェクション 24 時間後、細胞をトリプシン処理し、P B S 中で洗浄し、1 時間 4 度、50 g / ml プロビジウムアイオダイド、0.1 % クエン酸ナトリウム、0.1 Triton X100 (商標) 及び 20  $\mu\text{g}$  / ml D n a s e - f r i e R n a s e A を含有する 1 ml の低張性溶液中でインキュベートした。細胞を U S C フローサイトメトリー設備で直線状モード中で分析した。結果を細胞周期の異なる期、即ちサブ G 0 ピーク (アポトーシス)、G 0 / G 1 (D N A 合成無し)、S (活発な D N A 合成)、G 2 (前有糸分裂) 及び M (有糸分裂) 中に検出された要素の割合として表した。

【0186】

20

15) アポトーシス E L I S A;

アポトーシスを、製造者の取り扱い説明書に従い細胞死検出 E L I S A プラスキット (商標、Roche社製、ピスカタウェイ、N J) を使用して試験した。簡潔には、24 - ウェルプレート中の P C 3 の 80 % 接触性培養物を、リポフェクタミン 2 0 0 0 (商標) を使用して種々の濃度の (0 ~ 100 nM) siRNA 4 7 2 又は 100 nM コントロール siRNA でトランスフェクトした。16 時間後、細胞を分離し、 $1 \times 10^4$  細胞を 200  $\mu\text{l}$  溶解バッファ中でインキュベートした。核を遠心分離によりペレット化し、モノ-又はオリゴヌクレオソームを含有する 20  $\mu\text{l}$  の上澄みを E L I S A 分析のために採取した。簡潔には、上澄みをストレプトアビシン被覆された 96 - ウェルプレート中の抗ヒストン - ビオチン及び抗 D N A - P O D で 2 時間室温でインキュベートした。色を A B S T で展開し、405 nm での吸光度をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices社製、サンベイル、CA) で測定した。

30

【0187】

40

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 (M M) 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。

50

## 【0188】

A . EphB4及びエフリンB2は中皮腫細胞系中で発現した ;

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

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

## 【0189】

B . 臨床性サンプル中のEphB4及びエフリンB2の発現の証拠 ;

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

## 【0190】

C . EphB4は中皮腫の細胞増殖及び移動に関係する ;

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

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

## 【0191】

D . 材料及び方法 ;

1 ) 細胞系及び試薬 ;

NCI-H28、NCI-H2052、NCI-H2373、MSTO-211H中皮腫細胞系及び293ヒト胎児腎臓細胞をATCC社(マナサス、VA)から得た。細胞を10%熱不活性化胎児ウシ血清(FBS; Life Technologies社製、ゲイザーズバーグ、MD)及び抗生素質を補充したRPMI1640培地中に維持した。一次細胞を中皮腫患者の胸水から得た。大量のEphB4ホスホチオアート改質アンチセンスオリゴヌクレオチドを生成した。同様に多くのEphB4特異的siRNAを生成した。EphB4に対して生産されたモノクローナル抗体をウェスタンプロット法に使用した。エフリンB2及びEphB4(C-16)に対する

10

20

30

40

50

ポリクローナル抗体（免疫組織化学染色法用）はサンタクルス社から得た。

【0192】

2) R T - P C R ;

合計RNAをランダム六量体（インビトロジエン社製）を使用して逆転写した。EphB4及びエフリンB2用プライマーをプライマー3ソフトウェアで設計した。全プライマー用配列は下記の通りである：EphB4フォワードプライマー及びEphB4リバースプライマー（例えば、実施例2参照）；エフリンB2フォワードプライマー及びエフリンB2リバースプライマー（例えば、実施例6参照）；G3PDHフォワードプライマー、5'-G G A G C C A A A A G G G T C A T C A T - 3'；G3PDHリバースプライマー、5' - G G C A T T G C T G C A A A G A A A G A G - 3'；Clonetechs（商標）キットをPCR用に使用した。PCRをABI PCRシステム2700（商標、Applied Bioシステム社製）を使用して行った。PCR条件は95℃5分間、次に95℃で30秒間、60℃で30秒間及び72℃で1分間のサイクル35回であった。

【0193】

3) ジゴキシゲニン標識化RNAプローブ調製；

エフリン-B2及びEphB4PCR生成物を、製造者の取り扱い説明書に従いpGEM-T Easyシステム（商標、Promega社製、マジソン、WI）を使用してクローニングした。プライマー及びPCR生成物は、5'-t c c g t g t g g a a g t a c t g c t g - 3'（フォワード）、5'-t c t g g t t t g g c a c a g t t g a g - 3'（リバース）ではエフリン-B2用に、296-bp生成物を生成し、5'-c t t t g g a a g a g a c c c t g c t g - 3'（フォワード）、5'-a g a c g g t g a a g g t c t c c t t g - 3'ではEphB4用に297-bp生成物を生成した。DNA塩基配列決定により確実性及びインサート方向を再確認した。

ヒトエフリンB2又はEphB4遺伝子のPCR生成物を含有するpGEM-T EasyプラスミドをSpe I又はNco Iで直鎖化した。アンチセンス又はセンスジゴキシゲニン（DIG）標識化RNAプローブを、T7又はSP6プロモーターから、DIG RNAラベリングキット（商標、Roche社製、インディアナポリス、IN）を使用してランオフ転写により転写した。RNAプローブを、DIG RNAラベリングキット取り扱い説明書に従いスポットアッセイにより定量化した。

【0194】

4) In situハイブリダイゼーション；

細胞をLabtech II 4-ウェルチャンバースライド（商標、Nalge Nuncインターナショナル社製、ナバービル、IL）中で培養した。細胞をPBS（37℃）中で洗浄し、次に30分間25℃で4%（w/v）ホルムアルデヒド、5%（v/v）酢酸及び0.9%（w/v）NaClの溶液中で固定化した。固定化後、スライドをPBSで洗浄し、70%エタノール4℃中に使用するまで貯蔵した。in situハイブリダイゼーション前に、細胞を脱水し、100%キシレンで洗浄して残っている脂質を除去し、次に再水和し、最後にPBSを加えた。細胞を、37℃で0.1%（w/v）ペプシンの0.1N HCl溶液で20分間インキュベートすることにより透過化し、1%ホルムアルデヒド中10分間、後固定化処理をした。プレハイブリダイゼーションを、30分間37℃で50%（v/v）脱イオン化ホルムアミドを含有する4×SSC溶液中で行った。スライドを一晩42℃で、25ngアンチセンス又はセンスRNAプローブの40%脱イオン化ホルムアミド、10%デキストラン硫酸塩（硫酸エステル）、1×Denhardt溶液、4×SSC、10mMのDTT、1mg/ml酵母t-RNA及び1mg/ml変性化及びせん断したサケ精子DNAの合計体積40μlを使用してハイブリッド化した。スライドを次に37℃で下記の通り洗浄した：2×15分の2×SSC、2×15分の1×SSC、2×15分の0.5×SSC及び2×30分の0.2×SSC。ハイブリダイゼーションシグナルを製造者の取り扱い説明書に従いアルカリ-ホスファターゼ-複合抗DIG抗体（Roche社製）を使用して検出した。着色を0.1M Tris-HCl、1mMのEDTA、pH 8.0中で10分間2回洗浄して停止した。細胞を核酸のNuclear Fast Red（商標、ベクターラボラトリーズ社製、バ

10

20

30

40

50

ーリンガム、C A )を使用した対比染色法により画像化し、スライドをIMMUMOUNT(商標、Shandon社製、アストムーア、UK)でマウントした。

【0195】

5) ウエスタンプロット法；

疎細胞溶解産物を細胞溶解バッファ(10 mMトリス、pH 7.5、1 mMのEDTA、150 mM NaCl、1% TritonX100(商標)、1 mMのDTT、10%グリセロール)中のインキュベーションにより調製した。溶解産物を10000×gで10分間の遠心分離により清澄化した。合計蛋白質をBradfordアッセイ(商標、Bio-Rad社製)により決定した。サンプル(20 µg蛋白質)を4-20%トリス-グリシンポリアクリルアミドゲル上でフラクション分離化し、ポリビニリデンジフルオライド(PVDT)膜(Bio-Rad社製)へ電気プロッティング法により移動させた。膜を、5%無脂肪乳でブロックし、次にEphB4に対する抗体(1:5000希釈)で4、16時間のインキュベーションした。ホースラディッシュペルオキシダーゼと結合している第二抗体(1:100000希釈)を1時間25で適用した。膜を製造者の取り扱い説明書に従いスーパーシグナルウェストフェムト最大感応性化学発光基質(Pierce社製、ロックフォード、IL)を使用して展開した。

【0196】

6) 免疫組織化学法；

ホルマリン-固定化した組織断片を脱パラフィン化し、10%ヤギ血清で-70で10分間インキュベートし、更にエフリンB2又はEphB4のいずれかへのウサギ一次抗体(サンタクルス、Biotechnologies; 1:100)で4一晩インキュベートした。イソタイプ特異的ウサギIgGをコントロールとして使用した。これらのレセプター用の免疫活性を、アビジン-ビオチンキット(ベクターラボラトリーズ社製)を使用して測定した。ペルオキシダーゼ活性をジアミノベンジジン(シグマ社製)細胞化学反応により測定した。スライドを次にH & Eで対比染色した。

【0197】

7) 免疫蛍光研究；

細胞をLabtech II(商標)4-ウェルチャンバースライド上で培養し、4%パラホルムアルデヒドのダルベッコリン酸緩衝生理食塩水pH 7.4(PBS)溶液中で30分間固定化した。スライドをPBSで2回洗浄し、ブロッキングバッファ(0.2% TritonX100(商標)、1%BSAのPBS溶液)で20分間プレインキュベートした。スライドを次にブロッキングバッファ中EphB4又はエフリンB2への抗体(1:100希釈PBS溶液)で4で16時間インキュベートした。洗浄3回後、スライドを適切なフルオレセイン-複合第二抗体(シグマ-アルドリッヂ社製、セントルイス、MO)を使用してインキュベートした。核を4'，6-ジアミジノ-2-フェニルインドール塩酸塩(DAPI)で対比染色し、充分にPBSで洗浄し、Vecta shield antifade mounting溶液(商標、ベクターラボラトリーズ社製)でマウントした。画像をオリンパスAX70蛍光学顕微鏡及びSpot v2.2.2(商標、Diagnostic Instruments Inc.社製、スターリングハイツ、MI)デジタル画像化システムを使用して得た。

【0198】

8) 細胞生存能力アッセイ；

細胞を密度 $5 \times 10^3$ /ウェル(48-ウェルプレート)で0日目に2%ウシ胎仔血清(FCS)を含有する適切な増殖培地中に接種した。翌日、培地を交換し、細胞を種々の濃度(1~10 µM)のEphB4アンチセンスで処理した。第4日目に、生存能力を3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド(MTT)を使用して最終濃度0.5 mg/mlで評価した。細胞を2時間インキュベートし、培地を吸引し、細胞を酸性イソプロパノール(90%イソプロパノール、0.5% SDS及び40 mM HCl)中に溶解した。光学密度はELISAリーダーで490 nmで、イソプロパノール(Molecular Devices社製、CA)をプランクとして使用して測定した。

【0199】

10

20

30

40

50

## 9) 細胞移動；

In vitro創傷治癒アッセイを採用した。簡潔には、細胞を完全培養培地中 6 cm プレート上に 24 時間接種し、次に 5 % F B S 含有培地へスイッチした。EphB4アンチセンス 10 (10 μM) も又処理したウェルへ添加した。24 時間後、p-200 ピペットマン(商標)のチップを使用して創傷を作った。即ち、プレート中央を貫通する線を引いた。プレートを 0、12、24 時間後に画像化した。実験は 3 回繰り返した。

## 【0200】

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

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

## 【0201】

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、侵襲及び血管形成を調節する。頭部癌及び頸部癌に関して、3 個のシグナル経路の変更は充分な頻度で発生し、この病気の決定的な形質変換事由であると考えられる劇的な表現型変化を生じる。これらの変化として、p53 腫瘍サプレッサーの突然変異、表皮増殖因子レセプター (E G F R) 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、H N S C C 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、H N S C C 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。

## 【0202】

## A. H N S C C 腫瘍は EphB4 を発現する；

免疫組織化学法 (in situハイブリダイゼーション) 及びウェスタンプロット法によりヒト腫瘍組織中で EphB4 の発現を研究した。12 個の採取された有望な腫瘍組織を、IR B 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 39 A (左上) は代表的ケースを示し、H & E 腫瘍構造で明らかのように、EphB4 は腫瘍領域中のみで発現したことを示す (図 39 A 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 39 A、右上)。

## 【0203】

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 39 B、左上)。腫瘍構造を示す H & E 染色 (図 39 B、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 39 B、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。

## 【0204】

## B. H N S C C の主要な転移性部位での高い EphB4 の発現；

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

10

20

30

40

50

。同様に、全腫瘍陽性リンパ節は主要な腫瘍以上のEphB4発現を示した。正常な隣接組織中には発現は無いか最小で観察された。

#### 【0205】

##### C. H N S C C 細胞系中の E G F R 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H N S C C 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H N S C C 細胞系をEphB4蛋白質発現についてウェスタンプロット法により検討した(図40A)。これらの大部分は強いEphB4発現を示し、その結果次の研究の基礎を確立した。E G F R は強くH N S C C と関係するために、EphB4発現はE G F R の活性化と関係するかを検討した。E G F R 陽性細胞系であるS C C - 1 5 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E G F R キナーゼ阻害剤 A G 1 4 7 8 (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E G F R 発現があるが、S C C - 4 では検出可能であるが強くないことを示された(図40C、上段)。E G F R 阻害剤 A G 1 4 7 8 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-71)。従って、S C C - 1 5 及び-25は、E G F R 活性によりレギュレートされるEphB4のモデルとして使用できる一方、S C C - 9 、 - 1 2 、 - 1 3 及び-71は、E G F R 活性とは関係のないH N S C C 中のEphB4のレギュレーションのモデルであり、その場合、p 5 3 、 P T E N 、 I L - 6 等の他の因子からインプットされてもよい、又、試験された全ての細胞系中でEphB4のリガンド、即ちエフリンB2の発現を表した。いくつかの系でEphB4と共に、エフリンB2発現はE G F R 活性によりレギュレートされる一方、それは他の細胞系とは関係ないことを示した。

#### 【0206】

明らかに、構成的E G F R シグナルの阻害はS C C 1 5 細胞中のEphB4レベルを抑制した。次にE G F はEphB4を誘起できるかを試験した。その結果、図41Bに示すようにEphB4レベルは、10ng / ml E G F での24時間処理の前に24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41A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 介したEphB4の誘導へのそれらのインプットを検討した。特異的キナーゼ抑制剤U 7 3 1 2 2 、S H - 5 及びS P 6 0 0 1 2 5 での、P L C g 、A K T 及びJ N K リン酸化のブロッキングはそれぞれ基底レベルを減少し、E G F 刺激されたEphB4の誘導をブロックした(図41B、列3~8)。反対に、E R K 1 / 2 のP D 0 9 8 0 9 5 での阻害及びP 1 3 - K のL Y 2 9 4 0 0 2 又はウォルトマニンでの阻害は、EphB4レベルのE G F 誘導に対する検出可能な効果を示さなかった。しかし、E R K 1 / 2 リン酸化が阻害された時に、EphB4基底レベルは減少した。興味深いことには、S B 2 0 3 5 8 0 でのp 3 8 M A P K 活性の阻害は基底を増加したが、E G F はEphB4レベルを誘起しなかった。類似の結果がS C C 2 5 細胞系でも見られた(データは記載しない)。

#### 【0207】

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

次に、s i R N A 又はA S - O D N 法を使用して発現除去効果を検討して、H N S C C におけるEphB4発現作用を研究した。EphB4配列への数個のs i R N A を展開し(表1)、それは、図42Aで表示したように程度を変化させるEphB4発現をノックダウンした。s i R N A 5 0 及び4 7 2 でトランスフェクトされたS C C - 1 5 、 - 2 5 及び-71細胞系で、生存能力は減少し、それはEphB4発現のブロッキングに最も効果的であった(図42B)。EphB4 s i R N A 1 5 6 2 及び2 3 0 2 又はエフリンB2s i R N A 2 5 4 では生存能力への影響はほとんど観察されなかった。EphB4を発現しないS C C - 4 中では(参照図40A)、細胞生存能力の減少は生じなかった。s i R N A 5 0 及び4 7 2 処理で見られた細胞生存能力減少はサブG 0 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42C及び表2)。反対に、EphB4レベルを減少するのに効果的でなく、生存能力にわずかな影響しか示さなかったs i R N A 2 3 0 2 は、m o c k リポフェクタミン2

10

20

30

40

50

000（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。表1はEphB4及びsiRNA類を示す。表2は異なるEphB4 siRNAの細胞周期に対する効果を示す。

【0208】

【表1】

Table 1: EphB4 siRNAs

名 前	siRNA配列	
Eph B4 50:	5' -GAGACCCUGCUGAACACAAUU-3' 3' -UUCUCUGGGACGACUUGUGUU-5'	10
Eph B4 472:	5' -GGUGAAUGUCAAGACGCUGUU-3' 3' -UUCCACUUACAGUUCUGCGAC-5'	
Eph B4 1562:	5' -CAUCACAGCCAGACCCAACUU-3' 3' -UUGUAGUGUCGGUCUGGGUUG-5'	
Eph B4 2302	5' -CUCUUCCGAUCCCACCUACUU-3' 3' -UUGAGAAGGCUAGGGUGGAUG-5'	

20

【0209】

## 【表2】

Table 2: Effect of different EphB4 siRNA on Cell Cycle

処理	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
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
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

## 【0210】

30

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 A S - O D N 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 43 A は、これら A S - O D N のいくつかの EphB4発現に対する効果の代表的例を示す。A S - 1 0 で発現は完全に阻止され、A S - 1 1 はわずかな効果のみを示したことは重要である。S C C 1 5 細胞中の細胞生存能力への効果は、図 43 B に示されるように EphB4発現の阻害に最も効果的である A S - O D N で最も顕著であった。A S - 1 0 用の I C<sub>50</sub> は約 1 μM であった一方、10 μM の A S - 1 1 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。A S - 1 0 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 43 C)。

40

## 【0211】

E . EphB4は細胞移動をレギュレートする；

次に EphB4が H N S C C 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 S C C 1 5 及び S C C 2 5 培養物を、無菌性プラスチックパストールピペットを使用した単回スクレープにより創傷し、境界を明確に定める 3 mm 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 43 D に示されるように、細胞移動は EphB4発現をプロックする A S - 1 0 へ応答して顕著に減少した一方、不活性化合物の A S - 1 及びスクランプ

50

ルされたODNは効果が無いかほとんどなかった。AS-10による移動の阻害も又ボイデンダブルチャンバー(商標)アッセイを使用して示された(図43E)。

【0212】

F. EphB4 AS-10のin vivo抗腫瘍活性;

細胞生存能力及び運動性を減少するEphB4 AS-10の効果を、Balb/Cヌードマウス中のSCC15腫瘍異種移植で決定した。マウスへ毎日20mg/kg AS-10、センスODN又は同体積のPBSをI.P.注射する処理を、腫瘍細胞移植の翌日から開始した。AS-10を投与されるマウス中の腫瘍の成長は、センスODN又はPBS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44)。センスODN処理した及びPBS処理したグループ間に相違がないため、ODNを原因とする非特異的効果は観察されなかった。

【0213】

G. 材料及び方法;

1) 細胞系及び試薬;

HNSCC-4、-9、12、-13、-15、-25及び-71並びに293ヒト胎児腎臓細胞はATCC社(マナサス、VA)から得られた。細胞を、10%熱不活性化胎児ウシ血清(FBS;インビトロジエン社製、カールスバッド、CA)及び抗生物質を補充した RPMI1640培地中に維持した。EGFR、EphB4(C-16)ポリクローナル抗体はサンタクルスバイオテック社(サンタクルス、CA)から得た。-アクチンモノクローナル抗体はシグマ化学社(セントルイス、MO)社から購入した。エフリンB2及びEphB4ポリクローナル抗体及びそれらの対応するプロッキングペプチドはサンタクルスバイオテックノロジー社(サンタクルス、CA)から得た。AG1478(4-(3'-クロロアニリノ)-6,7-ジメトキシ-キナゾリン)をCalbiochem社(サンディエゴ、CA)から得た。キナーゼ抑制剤SH-5及びSP600125をA.G.サイエンティフィック社(サンディエゴ、CA)から得た。PD98095、U73122、SB203580、LY294002及びウォルトマニンをシグマ社から得た。

【0214】

2) ジゴキシゲニン標識化RNAプローブの調製;

例えば、実施例3参照。

3) in situハイブリダイゼーション

例えば、実施例3参照。

【0215】

4) 免疫組織化学法;

ホルマリン-固定化した組織断片を脱パラフィン化し、10%ヤギ血清で70-10分間インキュベートし、EphB4モノクローナル抗体で4-一晩インキュベートした。イソタイプ特異的ウサギIgGをコントロールとして使用した。これらのレセプター用の免疫活性は、ベクターラボラトリーズ社製アビジン-ビオチンキットを使用して測定した。ペルオキシダーゼ活性はジアミノベンジン(シグマ社製)細胞化学反応により測定した。次にスライドを0.12%メチレンブルー又はH&Eで対比染色した。凍結断片用にOCT-包埋した組織を5μmに断片化し、リン酸緩衝4%パラホルムアルデヒド中に固定化した。断片を3×5分PBS中で洗浄し、内因性ペルオキシダーゼを0.3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>のPBS溶液中10分間室温でのインキュベーションによりプロックした。断片をEph4(C-16)抗体(1:50)で1時間室温でインキュベートし、次にPBSで3回洗浄し、ロバ抗ヤギ第二抗体(サンタクルスバイオテック社製)で1時間室温でインキュベーションした。PBSでの3回の洗浄後、ペルオキシダーゼ活性をDAB基質溶液(ベクターラボラトリーズ社製、バーリンガム、CA)中10分間室温でインキュベーションにより局在化した。断片をヘマトキシリソで20秒間、対比染色し、脱水し、マウントした。染色法の陰性コントロールを一次抗体用正常ヤギ血清の代用とした。前立腺アレイ(Bio Meda社製、フォスター・シティ、CA)の免疫組織化学染色法を、製造者の取り扱い説明書に従いヤギABC染色法システム(商標、サンタクルスバイオテック社製)を使用して行った。

10

20

30

40

50

## 【0216】

5) ウエスタンプロット法；

例えば、上記実施例3参照。

6) EphB4 siRNAの *in vitro* 転写による合成；

サイレンサー-siRNA構築キット（商標、Ambion社製、オースチン、TX）をsiRNAをEphB4へ合成するために使用した。簡潔には、19 bp下流の5'-AAAジヌクレオチドを含有する21 bpターゲット配列を、GenBankデータベース中の他の配列と明らかな相同意を示さないことを特定した。センス及びアンチセンスsiRNA 29マ-DNAオリゴヌクレオチドテンプレートを、USC Norris Micro化学コア設備において合成した。

アンチセンステンプレートはターゲット配列へ対応し、次に8 bp (5'-CCTGTC T C-3')をサイレンサー-siRNA構築キット（商標）により提供されたT7プロモータープライマーと相補的な3'末端部位へ添加した。センステンプレートは上記のように、5'-AAA、次にターゲット19 bpの補体、更に次にT7 8 bp配列の補体を含有する。

## 【0217】

分離反応中、2個のsiRNAオリゴヌクレオチドテンプレートをハイブリッド化してT7プロモータープライマーとした。ハイブリッド化されたオリゴヌクレオチドの3'末端を、DNAポリメラーゼのKlenowフラグメントにより延長して二重鎖siRNA転写テンプレートを形成した。センス及びアンチセンスsiRNAテンプレートをT7 RNAポリメラーゼにより転写し、得られたRNA転写物をハイブリッド化してdsRNAを形成した。リーダー配列は、単鎖を有する特異的リボヌクレアーゼによるdsRNAの消化により除去され、オーバーハングUUジヌクレオチドを残した。DNAテンプレートはRNaseフリーdeoキシリボヌクレアーゼによる処理と同時に除去された。得られたsiRNAは、ガラス繊維フィルター結合により精製され、反応中の過剰のヌクレオチド、短いオリゴマー、蛋白質及び塩を除去した。最終生成物（表3に示す。）は、細胞中にトランスフェクトされた場合にターゲットmRNAの発現を効果的に減少できる3'末端ウリジンで二重鎖となった21マ-siRNAであった。多くのホスホロチオアートAS-ODNも又EphB4発現の阻害試験用に合成した（オペロン社製、バレンシアCA）（表3）。表3はEphB4アンチセンスODNを示す。

## 【0218】

## 【表3】

Table 3: EphB4 Antisense ODNs

名 前	位 置	配列 (5' → 3')
Eph B4 AS-1	(552-572)	GTG CAG GGA TAG CAG GGC CAT
Eph B4 AS-2	(952-972)	AAG GAG GGG TGG TGC ACG GTG
Eph B4 AS-3	(1007-1027)	TTC CAG GTG CAG GGA GGA GCC
Eph B4 AS-4	(1263-1285)	GTG GTG ACA TTG ACA GGC TCA
Eph B4 AS-5	(1555-1575)	TCT GGC TGT GAT GTT CCT GGC
Eph B4 AS-6	(123-140)	GCC GCT CAG TTC CTC CCA
Eph B4 AS-7	(316-333)	TGA AGG TCT CCT TGC AGG
Eph B4 AS-8	(408-428)	CGC GGC CAC CGT GTC CAC CTT
Eph B4 AS-9	(1929-1949)	CTT CAG GGT CTT GAT TGC CAC
Eph B4 AS-10	(1980-1999)	ATG GAG GCC TCG CTC AGA AA
Eph b4 AS-11	(2138-2158)	CAT GCC CAC GAG CTG GAT GAC

## 【0219】

## 7) 細胞生存能力アッセイ;

細胞を、0日目に密度 $5 \times 10^3$  / ウェル (48-ウェルプレート中) の2%ウシ胎仔血清 (FCS) を含有する適切な増殖培地中に接種した。細胞を種々の濃度 (1 ~ 10  $\mu$ g / ml) のODNで2及び4日目に処理した。5日目に、文献に記載されたように (Masoodら、03)、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド (MTT) を使用して、生存能力を評価した。siRNAとの生存能力では、SCC-4、-15、-25又は-71の $2 \times 10^4$ 細胞 / ウェル (48-ウェルプレート中) が、製造者の取り扱い説明書に従い $2 \mu$ lのリポフェクタミン2000 (商標) を使用してsiRNA (10 ~ 100 nM) と共にトランスフェクトされた。4時間トランスフェクション後、細胞を増殖培地 (10% FBSを補充されたRPMI1640) へ戻した。トランスフェクション後、MTT 48時間により生存能力をアッセイした。

## 【0220】

## 8) 細胞周期分析;

SCC15細胞の80%接触性培養物 (6-ウェルプレート中) を、リポフェクタミン2000 (商標) を使用してsiRNA472 (100 nM) とトランスフェクトした。トランスフェクションの16又は36時間後、細胞をトリプシン処理し、PBSで洗浄し、1時間4で、 $50 \mu$ g / mlプロピジウムアイオダイド、0.1%クエン酸ナトリウム、0.1 TritonX100 (商標) 及び $20 \mu$ g / mlDNase-free RNase Aを含有する1mの低張性溶液中でインキュベートした。細胞をUASCフローサイトメトリー設備で直線状モードで分析した。結果を、異なる期の細胞周期、即ちサブG0ピーク (アポトーシス)、G0/G1 (DNA合成無し)、S (活発なDNA合成)、G2 (前有糸分裂) 及びM (有糸分裂)、中で検出した要素の割合として表した。AS-ODN実験として、細胞をプロセシング36時間前に $5 \mu$ MODNへ曝した。

10

20

30

40

50

## 【0221】

## 9) 創傷治癒移動アッセイ；

S C C 1 5 細胞を 6 - ウェルプレート中に接種し、接触するまで培養した。10  $\mu$  M の A S - 1 、 A S - 1 0 又はコントロールとしてのセンス O D N を、それを無菌性ピペットチップでスクレープすることにより単層を創傷して、記載されたような 1 2 時間生存能力アッセイでウェル中へ導入した。培地を 5 % F B S 及び新しい O D N を補充された R P M I 1 6 4 0 へ交換した。治癒プロセスを動的に試験し、顕微鏡アダプター付きのニコン社製 Coolpix5000 ( 商標 ) デジタルカメラで記録した。

## 【0222】

## 10 10) 移動のボイデンチャンバー ( 商標 ) アッセイ；

細胞移動アッセイを、1  $\mu$  M の A S - 1 0 又は A S - 6 を上室チャンバーへ加えた以外は文献 ( Masood A N U P p a p e r ' 9 9 ) に記載されたように行った。 E G F ( 2 0 n g / m l ) を下室チャンバー中の化学走性誘因物質として使用した。10 n g / m l のタキソールを陰性コントロールとして使用した。

## 【0223】

## 11) In vivo 研究；

S C C 1 5 ( 5  $\times$  1 0  $^6$  細胞 ) を 5 週齢オス Balb / C N u <sup>+</sup> / n u <sup>+</sup> A 胸腺欠損マウスの背中下部へ皮下注射した。 O D N ( 合計体積 1 0 0  $\mu$  l 中 2 0 m g / k g ) 又は希釈剤 ( P B S ) を毎日腹腔内注射することからなる処理を、腫瘍細胞移植の翌日から開始し、2 週間続けた。マウス中の腫瘍増殖を、文献に記載されたように ( Masood C C R ' 0 1 ) 測定した。実験終結時にマウスを犠牲にした。全マウスは実験用マウス管理用の南カリフォルニア大学動物管理使用協会ガイドラインに従い取り扱った。

## 【0224】

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

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

## 【0225】

40 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 感染後の骨髄内皮細胞の形質転換 ( 改質 ) である ( 7 ) 。多くの H H V - 8 エンコードする遺伝子は、細胞性形質転換 ( 改質 ) をもたらす ( 8 参照 ) 。しかし、最大の証拠は、この役割における G プロテイン結合セプター ( v G P C R ) について蓄積された ( 9 ) 。

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

10

20

30

40

50

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。KS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、KS及び内皮細胞系中のHHV-8 v G P C Rにより誘起された。エフリンB2は、エフリンB2発現又はシグナルの阻害は、KS細胞の生存能力及び機能に有害であるため、KS処理用の可能なターゲットである。

#### 【0226】

A. KS腫瘍は、EphB4ではなくエフリンB2を発現する；

KS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た。EphB4転写物ではなくエフリンB2は、KS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KS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）。KS腫瘍組織中のエフリンB2の発現の追加的証拠は、FITC複合抗ヒトFc抗体により検出された、EphB4/Fcシグナルの腫瘍細胞への局在化により与えられる。エフリンB2はEphB4用のたった一つのリガンドであるために、この試薬はエフリンB2の発現に特異的である（図45B、左）。第二試薬のみで処理した隣接する断片は、特異的シグナルを示さない。二色共焦点顕微鏡は、エフリンB2陽性細胞中にHHV-8潜伏蛋白質LANA1の存在を表し（図45C、左）、それは腫瘍細胞であり、腫瘍脈管ではなくこの動脈性マーカーを発現していることを示した。腫瘍バイオプシーのPECAM-1抗体での染色は、この腫瘍の高度な血管的性質を明らかにした（図45C、右）。KSバイオプシーに対するエフリンB2及びEphB4発現パターンの有病率のパイロット研究はRT-PCR分析により行った。6例のサンプル全部がエフリンB2に陽性であった一方、ただ2例がEphB4に弱陽性であった（データは記載しない）。

#### 【0227】

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

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

#### 【0228】

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

10

20

20

30

40

50

。エフリンB2及びCD148共クラスターの発現は、併合画像中に黄色シグナルで示される（図46A（1））。未感染の、EphB4発現HUVECはCD148に陰性であった（記載せず）。

### 【0229】

C. HHV-8 vGPCR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、KS-SLK細胞をHHV-8 LANA、又はLANA 440又はvGPCRで確実にトランスフェクトした。安定なクローンのウェスタンプロット法で、vGPCRでトランスフェクトされたKS-SLK中では、SLK-LANA又はSLK-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（pCEF-L）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-pCEF-L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-pCEF-Lと比較してSLK-vGPCR細胞中でより高いエフリンB2発現を示す。SLK-pCEF-Lと比較してSLK-vGPCR中ではEphB4について変化は観察されなかった。これは明らかにSLK-vGPCR細胞はSLK-pCEF-L細胞と比較して高レベルのエフリンB2を発現したことを示す。これは、HHV-8のvGPCRは、KS中でエフリンB2の誘導及び動脈性フェノタイプ変換に直接含まれることを示唆する。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B25'-フランки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B25'-フランки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 pCEF-Lと比較してエフリンB2転写を約10倍誘起する。だいたい同等な誘導がエフリンB2配列-2491/-11、-1242/-11、又は-577/-11で観察され、それは、最大活性は-1242/-11ルシフェラーゼ構築物で観察されるにもかかわらず、-577及び-11間の要素がvGPCRへの応答を媒介するのに充分であることを表す。

### 【0230】

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培地で48時間増殖した。VEGF-A又はVEGF-Cのみが投薬量依存性拳動でエフリンB2発現を誘起した（図48B）。反対に、EGFはエフリンB2の発現に効果がなかった。

### 【0231】

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発現をウェスタンプロット法により決定した。エフリンB2siRNA137又は254は、siRNA EphB4 50又はsiRNAGFP等のコントロールsiRNAと比較して、エフリンB2発現を約70%阻害した。エフリンB2 63s

10

20

30

40

50

iRNAは、上記2種のsiRNAエフリンB2よりも効果が低かった（図49A）。

【0232】

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、HUVECはVEGF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B2siRNA264は、単独の増殖因子としてVEGFと共に培養されたHUVECの成長を劇的に減少した。反対に、HUVECをIGF、EGF及びbFGF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 siRNA50は、どちらの培養条件下でもHUVECへ有害な効果を示さなかった（図49C）。KS及び主要な内皮細胞の生存能力の阻害に加えて、EphB4-ECDはHUVEC及びKS-SLK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50）。

【0233】

G. 方法及び材料；

1) 細胞系及び試薬

ヒト血管内皮細胞（HUVEC）をClonetic社（サンディエゴ、CA）から入手し、EGM-2及びEGM-2MV培地でそれぞれ維持した。T1ヒト纖維芽細胞系は、Peter Jones博士から提供され、USC.BC-1及びBC-3ヒト胸水リンパ腫細胞系及び、LANA1及びORF59に対するモノクローナル抗体はDharam Ablashi博士（Advanced Biotechnologies Inc社、コロンビア、MD）から贈与された。KS-SLKを典型的カポジ肉腫患者から単離した（15）。EphB4、エフリンB2、CD148、PECAM-1に対するポリクローナル抗体をサンタクルスバイオテクノロジー社（サンタクルス、CA）から得た。マウスEphB4/Fc'並びに、ヒト血管の内皮性増殖因子（VEGF）に対するモノクローナル抗体、VEGF-C、インターロイキン-（IL）6、IL-8及びオンコスタチン-MはR&Dシステムズ社（ミネアポリス、MN）から購入した。発現ベクターpKSvGPCR-CEF-L及びpCEF-LはEnrique Mesri博士（コーネル大学、ニューヨーク、NY）から贈与された。HHV-8潜伏関連核抗原（LANA）用発現ベクターはMatthew Rettig博士（Veteran's Administration Greater Los Angeles Healthcare System社）から提供された。

【0234】

2) ヒト組織の採取及び調製；

ヒト皮膚性カポジ肉腫バイオプシー材料を、IRB承認承諾書を使用したインフォームドコンセントを行ってLAC/USC医療センターの患者から局部的麻酔下で得た。バイオプシーを合計RNAパラフィンブロック又は OCT中の冷凍組織ブロックのいずれかに処理した。合計RNAをグアニジンイソチオシアナート（RNazol（商標）：Tel-Test、Inc社、フレンズウッド、TX）中の均一化により抽出した。cDNAを、逆転写酵素によりランダム6量体プライマー（Superscript II、商標、インビトロジェン社製、カールスバッド、CA）を使用して合成した。

【0235】

3) ディゴキシゲニン標識化RNAプローブの調製；

表4に示されたin situハイブリダイゼーション用プライマーからのエフリンB2及びEphB4PCR生成物を、製造者の取り扱い説明書に従いpGEM-T Easyシステム（商標、Promega社製、マジソン、WI）を使用してクローン化した。確実性及びインサート方向をDNA塩基配列決定により再確認した。ヒトエフリンB2又はEphB4遺伝子のPCR生成物を含有するpGEM-T EasyプラスミドをSpe I又はNco Iで直鎖化した。アンチセンス又はセンスジゴキシゲニン（DIG）標識化RNAプローブを、T7又はSP6プロモーター

10

20

30

40

50

から、DIG RNA ラベリングキット（商標、Roche社製、インディアナポリス、IN）を使用してランオフ転写により転写した。RNA プローブを、DIG RNA ラベリングキット取り扱い説明書に従いスポットアッセイにより定量化した。

表4はエフリンB2及びEphB4用のプライマーを示す。

【0236】

【表4】

Table 4: Primers for Ephrin B2 and EphB4.

遺伝子	プライマー配列	生成物サイズ (bp)
ISH Probe Primers		
	5'-TCC GTG TGG AGT ACT GCT G-3'	296
	5'-TCT GGT TTG GCA CAG TTG AG-3'	
	5'-CTT TGG AAG AGA CCC TGC TG-3'	297
RT-PCR Primers	5'-AGA CGG TGA AGG TCT CCT TG-3'	
	5'-AGA CAA GAG CCA TGA AGA TC-3'	200
	5'-GGA TCC CAC TTC GGA CCC GAG-3'	
	5'-TCA GGT CAC TGC ATT GAA CGG G-3'	400
β-actin	5'-AAC TCG CTC TCA TCC AGT T-3'	
	5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3'	546
	5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'	

10

20

30

40

50

【0237】

4) *in situ*ハイブリダイゼーション；

例えば、上記実施例3参照。

5) H U V E C 及び B C - 1 の共培養；

H U V E C 細胞をゼラチン被覆されたLabtech II (4 - ウェル) チャンバースライド（商標、Nalge Nuncインターナショナル社、ナバービル、IL）上でEGM-2と50~70%接触まで増殖した。B C - 1 又はB C - 3との共培養は、本質的にSakuradaら(16)により示されたように行った。簡潔には、B C - 1 又はB C - 3 細胞をTPA (20ng/ml)で予備処理し、48時間ウイルス誘起し、次にH U V E C 培養物へ10:1の割合で添加し、共培養を2日間行った。H U V E C を充分にPBSで洗浄して付着したB C - 1 又はB C - 3 細胞を除去した。

【0238】

6) c D N A 及び R T - P C R の調製；

チタニウムワンステップR T - P C R キット（商標、Clontech社、パロアルト、CA）を $1 \times 10^5$ 細胞からR T - P C R 用に使用した。EphB4增幅用のプライマー対、エフリンB2及び-アクチンを表4に示す。それぞれのP C R サイクルは、94で30秒間の変性、60で30秒間のプライマーアニール及び72で30秒間の延長化(extension)から構成される。サンプルを30サイクル間増幅した。P C R 生成物を1.5%アガロースゲル上で分離し、臭化エチジウムで染色した。

## 【0239】

## 7) 細胞生存能力アッセイ；

K S - S L K 細胞を密度  $1 \times 10^4$  / ウェル (48-ウェルプレート) で 0 日目に 2 % ウシ胎仔血清 (F C S) を含有する適切な増殖培地中に接種した。翌日、培地を交換し、細胞を 0、10 又は 100 n M siRNA で処理した。3 日目に、生存能力を 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド (MTT) を使用して文献に記載されたように評価した (17)。

## 【0240】

## 8) 免疫蛍光研究；

Labtech II (4-ウェル) チャンバースライド上で培養した細胞又は、K S バイオプシー材料の凍結断片を、4 % パラホルムアルデヒドのダルベッコ-リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.4 (PBS) 溶液中で 30 分間固定化した。スライドを 2 回 PBS で洗浄し、プロッキングバッファ (0.2 % TritonX100、1 % BSA の PBS 溶液) で 20 分間プレインキュベートし、次に EphB4、エフリンB2、CD148、LANA1 又は ORF59 (1:100 希釈の PBS 溶液) に対する抗体で、プロッキングバッファ中、4 度 16 時間インキュベーションした。洗浄 3 回後、スライドを適切なフルオレセイン又はローダミン複合第二抗体 (商標、シグマ-アルドリッヂ社製、セントルイス、MO) でインキュベートした。核を 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール塩酸塩 (DAPI) で対比染色し、充分に PBS で洗浄して Vecta shield antifade mounting 溶液 (商標、ベクターラボラトリーズ社製、バーリンガム、CA) でマウントした。画像をオリンパス社製 AX70 蛍光学顕微鏡及び Spot v2.2.2 (商標、Diagnostic Instruments 社、スターリングハイツ、MI) デジタル画像化システムを使用して得た。

## 【0241】

エフリンB2のEphB4-Fcでの免疫蛍光検出を下記の通り行った。4 % パラホルムアルデヒド中で固定化し、20 % FBS でブロックした凍結断片を、5 μg / ml の EphB4 / Fc (R & D システムズ社製) で 1 時間室温でインキュベートした。次に断片を、10 μg / ml ウサギ抗ヒト IgG-FITC の PBS 溶液 (Jackson ImmunoResearch ラボラトリーズ社製、ウェストグローブ、PA) で室温で 1 時間インキュベートした。核を DAPI で対比染色し、断片を上記のようにマウントした。ヒト Fc (Jackson ImmunoResearch 社製) を陰性コントロールとして使用した。

## 【0242】

## 9) ウエスタンプロット法；

上記のように、疎細胞溶解産物を調製し、定量化し、フラクション分離化して膜へ移した (17)。膜を 5 % 無脂肪乳でブロックした後に、エフリンB2に対する抗体と (1:5000 希釈) 4 度 16 時間インキュベーションした。ホースラディッシュペルオキシダーゼと結合している第二抗体 (1:100000 希釈) を、1 時間 25 度で適用した。膜を製造者の取り扱い説明書に従いスープーシグナルウェストフェムト最大感應性化学発光基質 (商標、Pierce 社製、ロックフォード、IL) を使用して展開した。膜を Restore ウエスタンプロット法ストリッピングバッファ (商標、Pierce 社製) を使用してストリップし、EphB4 又は - アクチンで再プローブした。

## 【0243】

## 10) コード形成アッセイ；

マトリゲル基底膜マトリックス (商標、BD Biosciences 社製、Discovery Labware、ベッドフォード、MA) を氷上の増殖培地 (3:1) 及び 24-ウェルプレート中に配置した 0.5 ml 液体と混合した。プレートを 37 度で 15 分間インキュベーションしてマトリゲル (商標) を重合させた。指數関数的成長をする H U V E C 又は K S - S L K を、2 又は 8 μg / ml の EphB4-ECM 又はコントロールとしての PBS で 16 時間処理し、その後トリプシン処理してマトリゲル (商標) 上にプレートした。マトリゲル (商標) 上の培養を、組み換え型融合蛋白質の存在下で 6 時間続けた。培養物を 4 % パラホルムアルデヒド中で 30 分間固定化し、倒立型位相差光学顕微鏡により評価した。

10

20

30

30

40

50

## 【0244】

11) エフリンB2及びEphB4 siRNAのin vitro転写による合成；

サイレンサー-siRNA構築キット（商標、Ambion社、オースチン、TX）を使用してエフリンB2及びEphB4へのsiRNAを合成した。簡潔には、19bp下流の5'-AAジヌクレオチドを含む3個の21bpターゲット配列が、エフリンB2 cDNA（登録番号NM004093）内で特定され、それはGenBankデータベース中の他の配列と顕著な相同意を示さなかった。センス及びアンチセンスsiRNA 29マー-DNAオリゴヌクレオチドテンプレートは、USC Norris Micro化学コア設備で合成された。アンチセンステンプレートはターゲット配列に対応し、その次に、サイレンサー-siRNA構築キット（商標）として提供されるT7プロモータープライマーと相補的な、3'末端部位の8bp添加物（5'-CTGTCTC-3'）が続く。センステンプレートは、上記のように5'-AA、次にターゲット19bpの補体、次にT7 8bp配列を含む。分離反応において、2個のsiRNAオリゴヌクレオチドテンプレートを、T7プロモータープライマーに対してハイブリッド化した。ハイブリッド化されたオリゴヌクレオチドの3'末端をDNAポリメラーゼのKlenowフラグメントにより延長し、二重鎖siRNA転写テンプレートを生成した。センス及びアンチセンスsiRNAテンプレートをT7 RNAポリメラーゼにより転写し、得られたRNA転写物をハイブリッド化してdsRNAを生成した。dsRNAは、5'末端単鎖リーダー配列、19ntターゲット特異性dsRNA、及び3'末端UUから構成される。リーダー配列は、dsRNAを単鎖特異的リボヌクレアーゼで消化して除去された。DNAテンプレートは、同時にRNaseフリー-デオキシリボヌクレアーゼでの処理により除去された。

## 【0245】

得られたsiRNAは、ガラス纖維フィルター結合により精製され、反応中の過剰のヌクレオチド、短いオリゴマー、蛋白質及び塩を除去した。最終生成物二重鎖21マー-siRNAを表5に示す。同様に、EphB4及び緑蛍光蛋白質(GFP)siRNAも合成した。

表5は、エフリンB2及びEphB4のsiRNAを示す。

## 【0246】

## 【表5】

Table 5: siRNAs of ephrin B2 and EphB4.

30

ephrin B2 264	5'-GCAGACAGAUGCACAUUAAU-3' 3'-UUCGUCUGCUACGUGAUAAU-5'
ephrin B2 63:	5'-CUGCGAUUUCAAUUCGAAUUU-3' 3'-UUGACGCUAAAGGUUUAGCUA-5'
ephrin B2 137:	5'-GGACUGGUACUAUACCCACUU-3' 3'-UUCCUGACCAUGAUUAUGGGUG-5'
Eph B4 50:	5'-GAGACCCUGCUGAACACAAUU-3' 3'-UUCUCUGGGACGACUUGUGUU-5'
GFP	5'-CGCUGACCCUGAAGUUCAUUU-3' 3'-UUGCGACUGGGACUUCAGUA-5'

40

## 【0247】

12) エフリンB2又はEphB4 siRNAのトランスフェクション；

HUVEC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、EGM-2（商標、Cambrex社、ウォーカースビル、MD）中で一晩増殖した。16時間後、培地を5%ウシ胎仔血清(FCS)並びに製造者により提供された濃度のEGM-2 Bullet

50

キット(商標)補充剤bFGF、hEGF及びR<sup>3</sup>-IGF-Iを補充されたEBM-2、又は5%FCS及び10ng/mlrhVEGF(商標、R&Dシステムズ社製)を補充されたEBM-2のいずれかで交換した。37でインキュベーション2時間後、細胞をリポフェクタミン2000(商標、インビトロジエン社製、1μg/ml)を使用して10nMの特異的siRNA含有Opti-MEM-1血清フリー培地(商標、インビトロジエン社製)中でトランスフェクトした。2時間Opti-MEM-1でトランスフェクション後、上記のように補充した培地を適切なウェル中で交換した。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10×倍率で画像を撮った。

## 【0248】

13)エフリンB2レポータープラスミドの構築;

ヒトエフリンB2 5'-フランкиングDNAの翻訳開始部位に関して-2491~-11を、BACPACクローンRP11-29716(商標、BacPac Resources小児病院、オークランド、CA)から、アドバンテージGCGノムPCRキット(商標、Clontech社、パロアルト、CA)を使用して、ターゲット面積中のCG-リッチ配列の広い領域を覆うように増幅した。プライマーをクローニング用MluI部位を含有する様に設計した。増幅した生成物をMluIで消化し、ゲル精製し、pGL3Basic(商標、Promega社製、マジソン、WI)中の複数のクローニング部位中のMluI部位中へライゲートした。得られたクローンの方向は、制限消化分析により確認した。正確なクローンはpEFNB2<sub>-2491/-11</sub>lucを表示した。このクローンのKpnI又はSacIいずれかとの消化、その次の再環化は、それぞれpEFNB2<sub>-1242/-11</sub>luc及びpEFNB2<sub>-577/-11</sub>lucを生じた。一時的トランスフェクションに使用されるプラスミドDNAは、MegaPrepキット(商標、QIAGEN社製、バレンシア、CA)を使用して精製した。

## 【0249】

14)一時的トランスフェクション;

EGM-2培地中に維持されたHUVEC細胞(0.8×10<sup>4</sup>細胞/ウェル、24ウェルプレート中)は、0.5μg/ウェルエフリンB2プロモーター-ルシフェラーゼ構築物と、50ng/ウェルのpCEF-L又はpKSVGPCR-CEF-Lのいずれかと一緒に、製造者の取り扱い説明書に従いSuperfect試薬(商標、QIAGEN社製)を使用して一時的に共トランスフェクトされた。細胞をトランスフェクション48時間後に採取し、ルシフェラーゼ細胞溶解バッファ(Promega社製)で溶解した。ルシフェラーゼ活性を製造者の取り扱い説明書に従いルシフェラーゼアッセイシステム(Promega社製)を使用してアッセイした。pCEF-L-vGPCRがpCMV-Sport-gal(商標、インビトロジエン社製)から-Galакトシダーゼ発現を誘起したために、ルシフェラーゼを蛋白質に対して正規化した。

15)EphB4細胞外領域(ecd)蛋白質の構築及び精製;

上記例えは実施例1参照。

## 【0250】

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51は膀胱癌細胞系中の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は、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はEphB4 siRNA472での処理による膀胱癌細胞系(5637)の増殖阻害を示す。

図54はEphB4 siRNA472でトランスフェクトされた5637細胞のアポトーシス研究の結果を示す。

図55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。5637細胞は、EphB4 AS-10(10μM)で処理された。

図56は、EphB4 siRNAの細胞侵襲に対する効果を示す。5637細胞はsiRNA472又はコントロールsiRNAでトランスフェクトされた。

10

20

30

30

40

50

## 【0251】

## 実施例8 (EphB4アンチセンスプローブ及びRNAi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、24時間後に採取した。細胞溶解産物を調製し、ウェスタンプロット法分析により、EphB4の相対的量を未処理のコントロール細胞と比較してプローブした。

細胞増殖の阻害に関する研究は、発現EphB4発現を特徴とするHN SCC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、48-ウェルプレート中で培養され、10000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 RNAiプローブに対する結果を下記表7にまとめた。

10

表6はEphB4アンチセンスプローブによるEphB4遺伝子発現の阻害を示す。

表7はEphB4 RNAiプローブによるEphB4遺伝子発現の阻害を示す。

## 【0252】

## 【表6-1】

Table 6. Inhibition of EphB4 Gene Expression by EphB4 antisense probes

名前	配列 5'→3'	位置	EphB4発現の阻害	生存率減少割合(%)
Eph B4 169	TCA GTA CTG CGG GGC CGG TCC	(2944-2963)	++	36
Eph B4 168	TCC TGT CCC ACC CGG GGT TC	(2924-2943)	++	51
Eph B4 167	CCG GCT TGG CCT GGG ACT TC	(2904-2923)	+++	66
Eph B4 166	ATG TGC TGG ACA CTG GCC AA	(2884-2903)	++++	70
Eph B4 165	GAT TTT CTT CTG GTG TCC CG	(2864-2883)	++++	75
Eph B4 164	CCA GAG TGA CTC CGA TTC GG	(2844-2863)	++	40
Eph B4 163	AGC AGG TCC TCA GCA GAG AT	(2824-2843)	++++	66
Eph B4 162	CTG GCT GAC CAG CTC GAA GG	(2804-2823)		25

## 【0253】

20

30

【表 6 - 2】

Eph B4 161	AGC CAA AGC CAG CGG CTG CG	(2784-2803)	+	33
Eph B4 160	AAA CTT TCT TCG TAT CTT CC	(2763-2783)	+	25
Eph B4 159	CAT TTT GAT GGC CCG AAG CC	(2743-2762)	++	40
Eph B4 158	ACT CGC CCA CAG AGC CAA AA	(2723-2742)		30
Eph B4 157	GCT GAG TAG TGA GGC TGC CG	(2703-2722)	+	25
Eph B4 156	CTG GTC CAG GAG AGG GTG TG	(2683-2702)	++	30
Eph B4 155	AGG CCC CGC CAT TCT CCC GG	(2663-2682)		25
Eph B4 154	GCC ACG ATT TTG AGG CTG GC	(2643-2562)	++	40
Eph B4 153	GGG GTT CCG GAT CAT CTT GT	(2623-2642)	++	35
Eph B4 152	CCA GGG CGC TGA CCA CCT GG	(2603-2622)	+	30
Eph B4 151	GGG AAG CGG GGC CGG GCA TT	(2583-2602)	+	25
Eph B4 150	CCG GTC TTT CTG CCA ACA GT	(2563-2582)	++	25
Eph B4 149	CCA GCA TGA CCT GGT GGA GG	(2543-2562)	++	20
Eph B4 148	GAG GTG GGA CAG TCT GGG GG	(2523-2542)	+	30
Eph B4 147	CGG GGG CAG CCG GTA GTC CT	(2503-2522)	++	40
Eph B4 146	GTT CAA TGG CAT TGA TCA CG	(2483-2502)	++++	70
Eph B4 145	TCC TGA TTG CTC ATG TCC CA	(2463-2482)	++++	80
Eph B4 144	GTA CGG CCT CTC CCC AAA TG	(2443-2462)	+++	60
Eph B4 143	ACA TCA CCT CCC ACA TCA CA	(2423-2442)	++++	80
Eph B4 142	ATC CCG TAA CTC CAG GCA TC	(2403-2422)	++	40
Eph B4 141	ACT GGC GGA AGT GAA CTT CC	(2383-2402)	+++	50
Eph B4 140	GGA AGG CAA TGG CCT CCG GG	(2363-2382)	++	45
Eph B4 139	GCA GTC CAT CGG ATG GGA AT	(2343-2362)	++++	70
Eph B4 138	CTT TCC TCC CAG GGA GCT CG	(2323-2342)	++++	70
Eph B4 137	TGT AGG TGG GAT CGG AAG AG	(2303-2322)	++	40
Eph B4 136	TTC TCC TCC AGG AAT CGG GA	(2283-2302)	++	35
Eph B4 135	AAG GCC AAA GTC AGA CAC TT	(2263-2282)	++++	60
Eph B4 134	GCA GAC GAG GTT GCT GTT GA	(2243-2262)	++	50
Eph B4 133	CTA GGA TGT TGC GAG CAG CC	(2223-2242)	++	40
Eph B4 132	AGG TCT CGG TGG ACG TAG CT	(2203-2222)	++	40
Eph B4 131	CAT CTC GGC AAG GTA CCG CA	(2183-2202)	+++	50
Eph B4 130	TGC CCG AGG CGA TGC CCC GC	(2163-2182)	++	50
Eph B4 129	AGC ATG CCC ACG AGC TGG AT	(2143-2162)	++	50
Eph B4 128	GAC TGT GAA CTG TCC GTC GT	(2123-2142)	++	50
Eph B4 127	TTA GCC GCA GGA AGG AGT CC	(2103-2122)	+++	60
Eph B4 126	AGG GCG CCG TTC TCC ATG AA	(2083-2102)	++	50
Eph B4 125	CTC TGT GAG AAT CAT GAC GG	(2063-2082)	++++	80
Eph B4 124	GCA TGC TGT TGG TGA CCA CG	(2043-2062)	++++	70
Eph B4 123	CCC TCC AGG CGG ATG ATA TT	(2023-2042)	++	50
Eph B4 122	GGG GTG CTC GAA CTG GCC CA	(2003-2022)	++++	80
Eph B4 121	TGA TGG AGG CCT CGC TCA GA	(1983-2002)	++	50
Eph B4 120	AAC TCA CGC CGC TGC CGC TC	(1963-1982)	++	40
Eph B4 119	CGT GTA GCC ACC CTT CAG GG	(1943-1962)	++++	75
Eph B4 118	TCT TGA TTG CCA CAC AGC TC	(1923-1942)	++++	80
Eph B4 117	TCC TTC CCT GGG GCC TT	(1903-1922)	++++	70
Eph B4 116	GAG CCG CCC CCG GCA CAC CT	(1883-1902)	++	50
Eph B4 115	CGC CAA ACT CAC CTG CAC CA	(1863-1882)	++++	60
Eph B4 114	ATC ACC TCT TCA ATC TTG AC	(1843-1862)	++++	65
Eph B4 113	GTA GGA GAC ATC GAT CTC TT	(1823-1842)	++++	90
Eph B4 112	TTG CAA ATT CCC TCA CAG CC	(1803-1822)	++++	70
Eph B4 111	TCA TTA GGG TCT TCA TAA GT	(1783-1802)	++++	70
Eph B4 110	GAA GGG GTC GAT GTA GAC CT	(1763-1782)	++++	80
Eph B4 109	TAG TAC CAT GTC CGA TGA GA	(1743-1762)	++	50
Eph B4 108	TAC TGT CCG TGT TTG TCC GA	(1723-1742)	++	45
Eph B4 107	ATA TTC TGC TTC CCT CCC AT	(1703-1722)	++++	70
Eph B4 106	TGC TCT GCT TCC TGA GGC AG	(1683-1702)	++++	70
Eph B4 105	AGA ACT GCG ACC ACA ATG AC	(1663-1682)	++	40
Eph B4 104	CAC CAG GAC CAG GAC CAC AC	(1643-1662)	++++	70

10

20

30

40

【0254】

【表6-3】

Eph B4 103	CCA CGA CTG CCG TGC CCG CA	(1623-1642)	++	40
Eph B4 102	ATC AGG GCC AGC TGC TCC CG	(1603-1622)	+++	50
Eph B4 101	CCA GCC CTC GCT CTC ATC CA	(1583-1602)	++++	80
Eph B4 100	GTT GGG TCT GGC TGT GAT GT	(1563-1582)	++++	80
Eph B4 99	TCC TGG CCG AAG GGC CCG TA	(1543-1562)	++	35
Eph B4 98	GCC GGC CTC AGA GCG CGC CC	(1523-1542)	++	50
Eph B4 97	GTA CCT GCA CCA GGT AGC TG	(1503-1522)	++++	80
Eph B4 96	GCT CCC CGC TTC AGC CCC CG	(1483-1502)	++	50
Eph B4 95	CAG CTC TGC CCG GTT TTC TG	(1463-1482)	++	50
Eph B4 94	ACG TCT TCA GGA ACC GCA CG	(1443-1462)	++++	80
Eph B4 93	CTG CTG GGA CCC TCG GCG CC	(1423-1442)	++	40
Eph B4 92	CTT CTC ATG GTA TTT GAC CT	(1403-1422)	++++	80
Eph B4 91	CGT AGT CCA GCA CAG CCC CA	(1383-1402)	++++	85
Eph B4 90	CTG GGT GCC CGG GGA ACA GC	(1363-1382)	+++	50
Eph B4 89	CCA GGC CAG GCT CAA GCT GC	(1343-1462)	++++	70
Eph B4 88	TGG GTG AGG ACC GCG TCA CC	(1323-1342)	++	40
Eph B4 87	CGG ATG TCA GAC ACT GCA GG	(1303-1322)	++++	60
Eph B4 86	AGG TAC CTC TCG GTC AGT GG	(1283-1302)	++	50
Eph B4 85	TGA CAT TGA CAG GCT CAA AT	(1263-1282)	++++	80
Eph B4 84	GGG ACG GGC CCC GTG GCT AA	(1243-1262)	++	50
Eph B4 83	GGA GGA TAC CCC GTT CAA TG	(1223-1242)	+++	60
Eph B4 82	CAG TGA CCT CAA AGG TAT AG	(1203-1222)	++++	70
Eph B4 81	GTG AAG TCA GGA CGT AGC CC	(1183-1202)	+++	60
Eph B4 80	TCG AAC CAC CAC CCA GGG CT	(1163-1182)	+++	50
Eph B4 79	CCA CCA GGT CCC GGG GGC CG	(1143-1162)	++	40
Eph B4 78	GGG TCA AAA GTC AGG TCT CC	(1123-1142)	++++	70
Eph B4 77	CCC GCA GGG CGC ACA GGA GC	(1103-1122)	+++	60
Eph B4 76	CTC CGG GTC GGC ACT CCC GG	(1083-1102)	+++	60
Eph B4 75	CAG CGG AGG GCG TAG GTG AG	(1063-1082)	++	40
Eph B4 74	GTC CTC TCG GCC ACC AGA CT	(1043-1062)	++	50
Eph B4 73	CCA GGG GGG CAC TCC ATT CC	(1023-1042)	++	50
Eph B4 72	AGG TGC AGG GAG GAG CCG TT	(1003-1022)	++++	70
Eph B4 71	CAG GCG GGA AAC CAC GCT CC	(983-1002)	++	40
Eph B4 70	GCG GAG CCG AAG GAG GGG TG	(963-982)	+++	50
Eph B4 69	GTG CAG GGT GCA CCC CGG GG	(943-962)	+++	50
Eph B4 68	GTC TGT GCG TGC CCG GAA GT	(923-942)	++	40
Eph B4 67	ACC CGA CGC GGC ACT GGC AG	(903-922)	++	40
Eph B4 66	ACG GCT GAT CCA ATG GTG TT	(883-902)	++	50
Eph B4 65	AGA GTG GCT ATT GGC TGG GC	(863-882)	++++	60
Eph B4 64	ATG GCT GGC AGG ACC CTT CT	(843-862)	++++	80
Eph B4 63	CCT GAC AGG GGC TTG AAG GT	(823-842)	++++	80
Eph B4 62	GCC CTG GGC ACA GGC TCG GC	(803-822)	+++	70
Eph B4 61	ACT TGG TGT TCC CCT CAG CT	(783-802)	++++	80
Eph B4 60	GCC TCG AAC CCC GGA GCA CA	(763-782)	+++	50
Eph B4 59	GCT GCA GCC CGT GAC CGG CT	(743-762)	+++	50
Eph B4 58	GTT CGG CCC ACT GGC CAT CC	(723-742)	++	45
Eph B4 57	TCA CGG CAG TAG AGG CTG GG	(703-722)	+++	70
Eph B4 56	GCT GGG GCC AGG GGC GGG GA	(683-702)	++	50
Eph B4 55	CGG CAT CCA CCA CGC AGC TA	(663-682)	++	50
Eph B4 54	CCG GCC ACG GGC ACA ACC AG	(643-662)	++	50
Eph B4 53	CTC CCG AGG CAC AGT CTC CG	(623-642)	+++	50
Eph B4 52	GGA ATC GAG TCA GGT TCA CA	(603-622)	++++	90
Eph B4 51	GTC AGC TGG GCG CAC TTT TT	(583-602)	+++	70
Eph B4 50	GTA GAA GAG GTG CAG GGA TA	(563-582)	++++	80
Eph B4 49	GCA GGG CCA TGC AGG CAC CC	(543-562)	++++	80
Eph B4 48	TGG TCC TGG AAG GCC AGG TA	(523-542)	++++	90
Eph B4 47	GAA GCC AGC CTT GCT GAG CG	(503-522)	++++	80
Eph B4 46	GTC CCA GAC GCA GCG TCT TG	(483-502)	++	40

10

20

30

40

【表6-4】

Eph B4 45	ACA TTC ACC TTC CCG GTG GC	(463-482)	+++	50
Eph B4 44	CTC GGC CCC AGG GCG CTT CC	(443-462)	++	50
Eph B4 43	GGG TGA GAT GCT CCG CGG CC	(423-442)	+++	60
Eph B4 42	ACC GTG TCC ACC TTG ATG TA	(403-422)	++++	80
Eph B4 41	GGG GTT CTC CAT CCA GGC TG	(383-402)	++++	80
Eph B4 40	GCG TGA GGG CCG TGG CCG TG	(363-382)	++	50
Eph B4 39	TCC GCA TCG CTC TCA TAG TA	(343-362)	+++	60
Eph B4 38	GAA GAC GGT GAA GGT CTC CT	(323-342)	++++	80
Eph B4 37	TGC AGG AGC GCC CAG CCC GA	(303-322)	+++	50
Eph B4 36	GGC AGG GAC AGG CAC TCG AG	(283-302)	+++	45
Eph B4 35	CAT GGT GAA GCG CAG CGT GG	(263-282)	++	50
Eph B4 34	CGT ACA CGT GGA CGG CGC CC	(243-262)	++	40
Eph B4 33	CGC CGT GGG ACC CAA CCT GT	(223-242)	+++	60
Eph B4 32	GCG AAG CCA GTG GGC CTG GC	(203-222)	++++	70
Eph B4 31	CCG GGG CAC GCT GCA CGT CA	(183-202)	+++	60
Eph B4 30	CAC ACT TCG TAG GTG CGC AC	(163-182)	+++	70
Eph B4 29	GCT GTG CTG TTC CTC ATC CA	(143-162)	++++	80
Eph B4 28	GGC CGC TCA GTT CCT CCC AC	(123-142)	++	40
Eph B4 27	TGC CCG TCC ACC TGA GGG AA	(103-122)	++	50
Eph B4 26	TGT CAC CCA CTT CAG ATC AG	(83-102)	++++	70
Eph B4 25	CAG TTT CCA ATT TTG TGT TC	(63-82)	++++	70
Eph B4 24	AGC AGG GTC TCT TCC AAA GC	(43-62)	++++	80
Eph B4 23	TGC GGC CAA CGA AGC CCA GC	(23-42)	++	50
Eph B4 22	AGA GCA GCA CCC GGA GCT CC	(3-22)	+++	50
Eph B4 21	AGC AGC ACC CGG AGC TCC AT	(1-20)	+++	50

## 明細書中に記載された追加的アンチセンスプローブ

EphB4 AS-1	GTG CAG GGA TAG CAG GGC CAT	(552-572)		
EphB4 AS-2	AAG GAG GGG TGG TGC ACG GTG	(952-972)		
EphB4 AS-3	TTC CAG GTG CAG GGA GGA GCC	(1007-1027)		
EphB4 AS-4	GTG GTG ACA TTG ACA GGC TCA	(1263-1285)		
EphB4 AS-5	TCT GGC TGT GAT GTT CCT GGC	(1555-1575)		
EphB4 AS-6	GCC GCT CAG TTC CTC CCA	(123-140)		
EphB4 AS-7	TGA AGG TCT CCT TGC AGG	(316-333)		
EphB4 AS-8	CGC GGC CAC CGT GTC CAC CTT	(408-428)		
EphB4 AS-9	CTT CAG GGT CTT GAT TGC CAC	(1929-1949)		
EphB4 AS-10	ATG GAG GCC TCG CTC AGA AA	(1980-1999)		
Ephb4 AS-11	CAT GCC CAC GAG CTG GAT GAC	(2138-2158)		

【0256】

10

20

30

【表7-1】

Table 7. Inhibition of EphB4 Gene Expression by EphB4 RNAi probes

RNAi	EphB4 RNAi 配列表		EphB4 発現の阻害	生存率減少割合(%)
1	446	aaattggaaaactgctgatctg	466	
2	447	aattggaaaactgctgatctga	467	+++
3	453	aaactgctgatctgaagtggg	473	++++
4	454	aactgctgatctgaagtgggt	474	+++
5	854	aatgtcaagacgctgcgtctg	874	+++
6	467	aagtgggtgacattccctcag	487	+
7	848	aaggtgaatgtcaagacgctg	868	++

【0257】

【表7-2】

8	698	aaggagacccaccgtcttc	718	+++	75
9	959	aaaaagtgcgcaggctgact	979	+	40
10	1247	aatagccactctaaccatt	1267	++	50
11	1259	aacaccattggatcagccgtc	1279	++	50
12	1652	aatgtcaccactgaccgagag	1672	+	35
13	1784	aaataccatgagaaggccgc	1804	+++	65
14	1832	aagacgtcagaaaaccggca	1852	+	30
15	1938	aacatcacagccagacccaac	19	++	50
16	2069	aagcagagaatgggagagaa	2089	++++	75
17	2078	aatgggagagaaggcagaatat	2098	+++	65
18	2088	aagcagaatattcggacaaac	2108	+++	70
19	2094	aatattcggacaaacacggac	2114	++	40
20	2105	aaacacggacagttctcatc	2125	++	50
21	2106	aacacggacagttctcatcg	2126	+	35
22	2197	aaaagagatcgatgtctccta	2217	+++	65
23	2174	aatgaggctgtgagggattt	2194	++	50
24	2166	aagaccctaattgggtgtga	2186	++	50
25	2198	aaagagatcgatgtctctac	2218	+++	55
26	2199	aaagagatcgatgtctctacg	2219	+++	70
27	2229	aagagggtattggcaggtg	2249	+	33
28	2222	aagattgaagaggtgattgg	2242	+	30
29	2429	aacagcatgccgtcatgatt	2449	++	40
30	2291	aagaaggagagctgtgtggca	2311	+++	50
31	2294	aaggagagctgtgtggcaatc	2314	+++	60
32	2311	aatcaagaccctgaagggtgg	2331	+++	70
33	2497	aaacgacggacagttcacagt	2517	+	35
34	2498	aacgacggacagttcacagtc	2518	+	40
35	2609	aacatccatgtcaacagcaac	2629	++	50
36	2621	aacagcaacccatcgatcgaaa	2641	+	35
37	2678	aactttccgatcccacctac	2698	++	50
38	2640	aagtgtctgactttggcattt	2660	+++	70
39	2627	aacctcgctgc当地gtct	2647	++	50
40	2639	aaagtgtctgactttggcattt	2659	+	25
41	2852	aatcaggacgtgatcaatgcc	2872	+++	75
42	2716	aaagattcccatccgatggac	2736	++	50
43	2717	aagattcccatccgatggact	2737	++	60
44	2762	aagttcacttccgcoagtgtat	2782	+++	70
45	3142	aagatacgaagaaaatggc	3162	++	50
46	3136	aatggaaagatacgaagaaaag	3156	+++	66
47	2867	aatgccattgaacaggactac	2887		
48	3029	aaaatcgccccgggagaat	3049	+	33
49	3254	aaaatcttggccagtgtccag	3274	++	50

10

20

30

40

【表7-2】

8	698	aaggagacccatcaccgttcc	718	+++	75
9	959	aaaaagtgcgcggcagctgact	979	+	40
10	1247	aatagccactctaaccatt	1267	++	50
11	1259	aacaccattggatcagccgtc	1279	++	50
12	1652	aatgtcaccactgaccgagag	1672	+	35
13	1784	aaataccatgagaaggcgcc	1804	+++	65
14	1832	aagacgtcagaaaaccggca	1852	+	30
15	1938	aacatcacagccagaccaac	19	++	50
16	2069	aagcagagcaatggagagaa	2089	++++	75
17	2078	aatgggagagaagcagaatat	2098	+++	65
18	2088	aagcagaatattcgacaaac	2108	+++	70
19	2094	aatattcgacaaaacacggac	2114	++	40
20	2105	aaacacggacagtatctcatc	2125	++	50
21	2106	aacacggacagtatctcatcg	2126	+	35
22	2197	aaaagagatcgatgtctccta	2217	+++	65
23	2174	aatgaggctgtgagggattt	2194	++	50
24	2166	aagaccctaattgaggctgtga	2186	++	50
25	2198	aaagagatcgatgtctcctac	2218	+++	55
26	2199	aagagatcgatgtctcctacg	2219	+++	70
27	2229	aagaggtgattggcaggtg	2249	+	33
28	2222	aagattgaagaggtgatttgt	2242	+	30
29	2429	aacagcatcccgtcatgatt	2449	++	40
30	2291	aagaaggagagctgtgtggca	2311	+++	50
31	2294	aaggagagctgtgtggcaatc	2314	+++	60
32	2311	aatcaagacccctgaagggtgg	2331	+++	70
33	2497	aaacgacggacagttcacagt	2517	+	35
34	2498	aacgacggacagttcacagtc	2518	+	40
35	2609	aacatccatgtcaacagaac	2629	++	50
36	2621	aacagcaacccatcgatcgaaa	2641	+	35
37	2678	aactcttcccgatcccacctac	2698	++	50
38	2640	aagtgtctgactttggcctt	2660	+++	70
39	2627	aacctcgatcgaaaagtgtct	2647	++	50
40	2639	aaagtgtctgactttggcctt	2659	+	25
41	2852	aatcaggacgtgatcaatgcc	2872	+++	75
42	2716	aaagattcccatcccgatggac	2736	++	50
43	2717	aagattcccatcccgatggact	2737	++	60
44	2762	aagttcaactccgcgcgtat	2782	+++	70
45	3142	aagatacgaagaaaagtgc	3162	++	50
46	3136	aatggaaagatacgaagaaag	3156	+++	66
47	2867	aatgccattgaacaggactac	2887		
48	3029	aaaatcgccggccggagaat	3049	+	33
49	3254	aaaatcttggccaggatgtccag	3274	++	50

10

20

30

40

【0259】

## 【表7-3】

50	3255	aaatcttggccagtgtccagc	3275	+++	75
51	3150	aagaaaagtttgcagccgctg	3170	+++	80
52	3251	aagaaaatcttggccagtgtc	3271	++	50
53	3256	aatcttggccagtgtccagca	3276	++	50
明細書中に記載された追加的RNAiプローブ					
Eph B4 50		gagacccugcugaacacaauu			
Eph B4 472		ggugaaugucaagacgcuguu			
Eph B4 1562		caucacagccagaccccaacuu			
siRNA 2303		cucuuccgaucccaccuacuu			
Eph B4 2302		cucuuccgaucccaccuacuu			

## 【0260】

## 実施例9（エフリンB2アンチセンスプローブ及びRNAi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 U M）を使用して試験した。遺伝子発現ダウンリギュレーションを、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293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50nMで試験されたRNAi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293細胞を使用して、一定の(fixed)50nMのRNAiプローブで24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B2RNAiプローブについての結果は、下記表9にまとめた。

表8は、エフリンB2アンチセンスODNを示す。

表9は、エフリンB2RNAiプローブを示す。

## 【0261】

## 【表8-1】

Table 8. Ephrin B2 antisense ODNs.

10

20

30

40

	配列	コード領域	生存率減少割合 (%)	エフリンB2発現の阻害
Ephrin AS-51	TCA GAC CTT GTA GTA AAT GT	(983-1002)	35	++
Ephrin AS-50	TCG CCG GGC TCT GCG GGG GC	(963-982)	50	+++
Ephrin AS-49	ATC TCC TGG ACG ATG TAC AC	(943-962)	45	++
Ephrin AS-48	CGG GTG CCC GTA GTC CCC GC	(923-942)	35	++
Ephrin AS-47	TGA CCT TCT CGT AGT GAG GG	(903-922)	40	+++
Ephrin AS-46	CAG AAG ACG CTG TCC GCA GT	(883-902)	40	++
Ephrin AS-45	CCT TAG CGG GAT GAT AAT GT	(863-882)	35	++
Ephrin AS-44	CAC TGG GCT CTG AGC CGT TG	(843-862)	60	+++
Ephrin AS-43	TTG TTG CCG CTG CGC TTG GG	(823-842)	40	++
Ephrin AS-	TGT GGC CAG TGT GCT GAG CG	(803-822)	40	++

## 【0262】

【表8-2】

42				
Ephrin AS-41	ACA GCG TGG TCG TGT GCT GC	(783-802)	70	+++
Ephrin AS-40	GGC GAG TGC TTC CTG TGT CT	(763-782)	80	++++
Ephrin AS-39	CCT CCG GTA CTT CAG CAA GA	(743-762)	50	+++
Ephrin AS-38	GGA CCA CCA GCG TGA TGA TG	(723-742)	60	+++
Ephrin AS-37	ATG ACG ATG AAG ATG ATG CA	(703-722)	70	+++
Ephrin AS-36	TCC TGA AGC AAT CCC TGC AA	(683-702)	60	+++
Ephrin AS-35	ATA AGG CCA CTT CGG AAC CG	(663-682)	45	++
Ephrin AS-34	AGG ATG TTG TTC CCC GAA TG	(643-662)	50	+++
Ephrin AS-33	TCC GGC GCT GTT GCC GTC TG	(623-642)	75	+++
Ephrin AS-32	TGC TAG AAC CTG GAT TTG GT	(603-622)	60	+++
Ephrin AS-31	TTT ACA AAG GGA CTT GTT GT	(583-602)	66	+++
Ephrin AS-30	CGA ACT TCT TCC ATT TGT AC	(563-582)	50	++
Ephrin AS-29	CAG CTT CTA GTT CTG GAC GT	(543-562)	50	+++
Ephrin AS-28	CTT GTT GGA TCT TTA TTC CT	(523-542)	70	+++
Ephrin AS-27	GGT TGA TCC AGC AGA ACT TG	(503-522)	65	+++
Ephrin AS-26	CAT CTT GTC CAA CTT TCA TG	(483-502)	75	+++
Ephrin AS-25	AGG ATC TTC ATG GCT CTT GT	(463-482)	60	+++
Ephrin AS-24	CTG GCA CAC CCC TCC CTC CT	(443-462)	45	++
Ephrin AS-23	GGT TAT CCA GGC CCT CCA AA	(423-442)	50	+++
Ephrin AS-22	GAC CCA TTT GAT GTA GAT AT	(403-422)	50	+++
Ephrin AS-21	AAT GTA ATA ATC TTT GTT CT	(383-402)	60	+++
Ephrin AS-20	TCT GAA ATT CTA GAC CCC AG	(363-382)	60	+++
Ephrin AS-19	AGG TTA GGG CTG AAT TCT TG	(343-362)	75	+++
Ephrin AS-18	AAA CTT GAT GGT GAA TTT GA	(323-342)	60	+++
Ephrin AS-17	TAT CTT GGT CTG GTT TGG CA	(303-322)	50	++
Ephrin AS-16	CAG TTG AGG AGA GGG GTA TT	(283-302)	40	++
Ephrin AS-15	TTC CTT CTT AAT AGT GCA TC	(263-282)	66	+++
Ephrin AS-14	TGT CTG CTT GGT CTT TAT CA	(243-262)	70	++++
Ephrin AS-13	ACC ATA TAA ACT TTA TAA TA	(223-242)	50	+++
Ephrin AS-12	TTC ATA CTG GCC AAC AGT TT	(203-222)	50	+++
Ephrin AS-11	TAG AGT CCA CTT TGG GGC AA	(183-202)	70	++++
Ephrin AS-10	ATA ATA TCC AAT TTG TCT CC	(163-182)	70	++++
Ephrin AS-	TAT CTG TGG GTA TAG TAC CA	(143-162)	80	++++

10

20

30

40

【0263】

【表8-3】

9				
Ephrin AS-8	GTC CTT GTC CAG GTA GAA AT	(123-142)	60	+++
Ephrin AS-7	TTG GAG TTC GAG GAA TTC CA	(103-122)	80	++++
Ephrin AS-6	ATA GAT AGG CTC TAA AAC TA	(83-102)	70	+++
Ephrin AS-5	TCG ATT TGG AAA TCG CAG TT	(63-82)	50	+++
Ephrin AS-4	CTG CAT AAA ACC ATC AAA AC	(43-62)	80	++++
Ephrin AS-3	ACC CCA GCA GTA CTT CCA CA	(23-42)	85	++++
Ephrin AS-2	CGG AGT CCC TTC TCA CAG CC	(3-22)	70	+++
Ephrin AS-1	GAG TCC CTT CTC ACA GCC AT	(1-20)	80	++++

10

20

30

40

【0264】

【表9-1】

Table 9. Ephrin B2 RNAi probes.

RNAi配列及び他のヒト遺伝子との相同意	生存率減少割合 (%)	エフリンB2発現の阻害	RNAi番号
89 aactgcgatttccaaatcgat 109	80	++++	1
141 aactccaaatttctacctgga 161	70	++++	2
148 aatttctacctggacaaggac 168	75	+++	3
147 aaatttctacctggacaagga 167	60	+++	4
163 aaggactgttactataacccac 183	40	++	5
217 aagtggactctaaaactgttg 237	80	++++	6
229 aaactgttggccagtatgaat 249	50	+++	7
228 aaaactgttggccagtatgaa 248	80	++++	8
274 aagaccaaggcagacagatgca 294	80	++++	11
273 aaagaccaaggcagacagatgc 293	60	+++	12
363 aagttcaagaattcagccct 383	66	+++	13
370 aagaattcagccctaaccctct 390	50	+++	14
373 aattcagccctaaccctctggg 393	50	+++	15
324 aactgtgccaaaccagaccaa 344	90	++++	16
440 aaatgggtttggaggggct 460	80	++++	17
501 aagatcctcatgaaagttgga 521	50	+++	18
513 aaagtggacaagatgcaagt 533	50	+++	19
491 aagagccatgaagatcctcat 511	50	+++	20
514 aagttggacaagatgcaagtt 534	66	+++	21
523 aagatgcaagttctgctggat 543	66	+++	22
530 aagttctgctggatcaaccag 550	50	+++	23
545 aaccaggaataaagatccaac 565	35	++	24
555 aaagatccaacaagacgtcca 575	40	++	25
556 aagatccaacaagacgtccag 576	60	+++	26
563 aacaagacgtccagaactaga 583	60	+++	27

50

【0265】

【表9-2】

566	aagacgtccagaactagaagc	586	70	+++	28
593	aaatggaagaagttcgacaac	613	75	++++	29
577	aactagaagctgtacaaatg	597	66	+++	30
594	aatggaagaagttcgacaaca	614	35	++	31
583	aagctggatccaaatgaaagaa	603	50	+++	32
611	aacaagtcccttgtaaaacc	631	70	++++	33
599	aagaagttcgacaacaagtcc	619	70	++++	34
602	aagttcgacaacaagtccctt	622	80	++++	35
626	aaaacccaaatccaggttctag	646	50	+++	36
627	aaacccaaatccaggttctagc	647	25	+	37
628	aacccaaatccaggttctagca	648	30	++	38
632	aaatccaggttctagcacaga	652	60	+++	39
633	aatccaggttctagcacagac	653	40	++	40
678	aacaacatcccggttccgaa	698	30	++	41
681	aacatcccggttccgaaagt	701	20	+	42
697	aagtggccattttgcaggga	717	30	++	43

10

20

## 明細書中に記載された追加的エフリンB2 RNA i プローブ

GCAGACAGAUGCACUAUUUU			ephrin B2 264
CUGCGAUUUCCAAUCGAUUU			ephrin B2 63
GGACUGGUACUAUACCCACUU			ephrin B2 137

30

【0266】

実施例10 (EphB4抗体は腫瘍増殖を阻害する。)

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

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

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

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

【0267】

血管形成をCD-31免疫組織化学法により評価した。処理及び未処理のマウスからの腫瘍組織断片をCD31用に染色した。アポトーシスを免疫組織化学TUNNEL法により評価し、BrdUアッセイにより増殖した。外科的除去に続き、腫瘍を標準手順に従い直ちに2mm連続断片ヘスライスし、パラフィン中に包埋した。パラフィン包埋した組織を5μmへ

40

50

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 (retieval) 液中でマイクロ波を照射した。スライドを PBS で洗浄し、TUNNEL法反応混合物 (末端デオキシヌクレオチジルトランス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) 及びヘマトキシリソニアシンも又スライドを染色して形態を画像化するために使用した。マッソン社製トリクローム (商標) は、壊死及び線維症の画像化を可能とした。腫瘍は腫瘍 / 皮膚、筋肉境界から血液サポートを得た。腫瘍が成長するに従い、内側領域は栄養が欠乏した。これは壊死 (細胞死) を、好ましくは腫瘍中央で導く。細胞死後、(腫瘍)組織は、纖維芽細胞組織で置換される。スライドを、得られたデジタル画像を20倍拡大して画像化した。S C C腫瘍の、投与された抗体それぞれで異なる形態が得られた。Ab番号1は、アポトーシスではなく壊死及び線維症の増加部分を示した。Ab番号23は、アポトーシス、壊死及び線維症の増加及び脈管湿潤物の減少を示した。Ab番号35は、壊死及び線維症の増加、並びにアポトーシスのわずかな増加並びに脈管湿潤物の減少を示した。Ab番号79はアポトーシス、ネクローシス及び線維症の大きな増加を示した。Ab番号91は、アポトーシスに変化は無く、増殖の増加を示した。Ab番号138は、アポトーシス、壊死、線維症の増加並びに増殖及び脈管湿潤物の減少を示した。コントロールPBSで処理した腫瘍は、高い腫瘍密度及び活発な血管形成応答を示した。EphB4抗体で処理した腫瘍は、生存腫瘍細胞の領域中の腫瘍細胞密度の減少及び腫瘍血管形成の顕著な阻害、並びに腫瘍壊死及びアポトーシスを示した。

10

20

30

40

#### 【0268】

図60は、異種移植における抗体の全身的投与は、異種移植でのS C C 15腫瘍の腫瘍退縮を導くことを示す。

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

#### 【0269】

##### 資料の組み込み

ここで挙げた全ての刊行物及び特許は、それぞれの個々の刊行物又は特許が資料として使用されるものとして特別に、別々に表されたように、その全体をここで資料として使用する。

本発明が所定の例示で示されていても、上記例示は説明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。本発明の範囲は特許請求の範囲に従い定められ、それらの全ての均等物をも含むものである。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0270】

【図1】B4ECv3蛋白質のアミノ酸配列を示す。

【図2】B4ECv3NT蛋白質のアミノ酸配列を示す。

【図3】B2EC蛋白質のアミノ酸配列を示す。

【図4】B4ECv3-FC蛋白質のアミノ酸配列を示す。

【図5】B2EC-FC蛋白質のアミノ酸配列を示す。

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

50

【図7】B4EC-Fc阻害アッセイ（溶液中阻害）を示す。

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

【図9】B4Ec v 3に応答するHUAEc走化性を示す。

【図10】B2EC-Fcに応答するHHEcの走化性を示す。

【図11】B2ECに応答するHHAEcの走化性を示す。

【図12】HUAEc細管形成に対するB4Ec v 3の効果を示す。

【図13】HUAEc細管形成に対するB2EC-Fcの効果を示す。

【図14】ヒトエフリンB2構成の概略図である。

【図15】ヒトEphB4構成の概略図である。

【図16】組み換え型可溶性EphB4Ec蛋白質の領域構造を示す。

【図17A】EphB4Ec蛋白質の精製及び、精製されたEphB4由来の組み換え型可溶性蛋白質のSDS-PAGEゲル電気泳動を示す。

【図17B】EphB4Ec蛋白質のリガンド結合性を示す。

【図18】EphB4 v 3が走化性を抑制することを示す。

【図19】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。

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

【図21】ネズミマトリゲル（商標）アッセイにおいてB4 v 3は、内皮細胞による侵襲及び細管形成を抑制することを示す。

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

【図23】生存能力（生存率）及び細胞周期に対する可溶性EphB4 ECDの効果を示す。

【図24】B4 v 3は、ネズミ角膜hydronマイクロポケットアッセイ中の新血管応答を阻害することを示す。

【図25】sB4 v 3とのSCC15、B16及びMCF-7の共注射は、マトリゲル及び増殖因子の存在下で、これらの細胞のin vivo腫瘍増殖を抑制することを示す。

【図26】可溶性EphB4は3種の腫瘍種、B16黒色腫、SCC15（頭部癌及び頸部癌）、及びMCF-7（乳癌）でアポトーシス、壊死及び血管形成減少を生じることを示す。

【図27】前立腺細胞系でのEphB4の発現を示す。

【図28】前立腺癌組織中のEphB4の発現を示す。

【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。

【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31】発現及び前立腺細胞機能に対して特別なEphB4 AS-ODN（アンチセンスオリゴヌクレオチド）及びsiRNAの効果を示す。

【図32】細胞周期及びアポトーシスに関するEphB4 siRNA472の効果を示す。

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

【図34】中皮腫細胞中でのin situハイブリダイゼーションによるエフリンB2及びEphB4の発現を示す。

【図35】中皮腫培養物中のEphB4及びエフリンB2の細胞性発現を示す。

【図36】中皮腫腫瘍中のエフリンB2及びEphB4の発現を示す。

【図37】H28細胞の増殖に対するEphB4アンチセンスODNプローブの効果及びH28細胞の増殖に対するEphB4 siRNAの効果を示す。

【図38】細胞移動に対するEphB4アンチセンス（AS）プローブの効果及びH28の移

10

20

30

40

50

動に対するEphB4 siRNAの効果を示す。

【図39】EphB4はH N S C C主要組織及び転移で発現したことを示す。

【図40】EphB4はH N S C C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41】EGFによるEphB4のレギュレーション機構を示す。

【図42】特異的EphB4 siRNAは、EphB4発現、細胞生存能力を阻害し、細胞周期停止を引き起こすことを示す。

【図43】S C C細胞に対する特別なEphB4 A S - O D Nのin vitro効果を示す。

【図44】EphB4 A S - O D Nはin vivo腫瘍増殖を抑制することを示す。

【図45】EphB4ではなくエフリンB2がK Sバイオプシー組織中で発現したことを示す。 10

【図46】H H V - 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47】H H V - 8はカポジ肉腫細胞中の動脈性マーカー発現を誘起することを示す。

【図48】V E G F及びV E G F - CがエフリンB2発現をレギュレートすることを示す。

【図49】特異的siRNAでのエフリンB2ノックダウンは、VEGFの存在下であり、IGF、EGF又はbFGFの非存在下でのK S細胞中の生存能力及びH U V E C増殖を抑制することを示す。

【図50】可溶性EphB4は、K S及びECコード形成及びin vivo血管形成を抑制することを示す。

【図51】膀胱癌細胞系中の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。 20

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

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

【図54】EphB4 siRNA472でトランスフェクトされた5637細胞のアポトーシス研究の結果を示す。下のグラフの縦軸は405nmでの吸光度である。

【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。

【図56】EphB4 siRNAの細胞侵襲に対する効果を示す。

【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を示す。 30

【図58】EphB4抗体はS C C 15 / M G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S C C 15、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に導くことを示す。

【図61】ヒトEphB4のゲノムスクレオチド配列を示す。

【図62】ヒトEphB4のcDNAスクレオチド配列を示す。

【図63】ヒトエフリンB2のゲノムスクレオチド配列を示す。

【図64】ヒトエフリンB2のcDNAスクレオチド配列を示す。

【図65】ヒトEphB4のアミノ酸配列を示す。 40

【図66】ヒトエフリンB2のアミノ酸配列を示す。

## 【図1】

Figure 1. Amino acid sequence of the B4ECv3 protein

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWKVTFPQVDGQWEELSG  
LDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVVATLRTFM  
LECLSLPRAGRSCKETFTVFFYESDADTATLTPAWMENPYIKVDTV  
AAEHITLTKRKPGRGAEATGKVNKTLLRGPLSKAGFYLAFQDGACMALL  
SLHLFYYKKCAQLTVNLTRFPTETVPLVAGSCVVDAPVAPGESP  
SLYCREDGQWAEPVTGCSACPGFEAAEGNTKCRACAQGTFKFLSGE  
GSCQCPANSHNTIGSACVQCRVGYFRARTDPRGAPCTPPSAPRS  
VVSRLNGSSLHLEWSAPLSSGRGREDLTAYALRCRECRPGGSCAPCGGD  
LTFDPGPRDLVEPVWVVRGLRFDFTYTFETVTLNGVSSLATGPVPEE  
PVNVITDREVEPAPVSDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAVSGAWLDYEVK  
YHEKGAEGPSSVRFKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGP  
FGQEHHSQTQLDSEGWREQGSKRAILQIEGKPIPNPLGLDSTRG  
BHHHHHH

## 【図2】

Figure 2. Amino acid sequence of the B4ECv3NT protein

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWKVTFPQVDGQWEELSG  
LDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVVATLRTFM  
LECLSLPRAGRSCKETFTVFFYESDADTATLTPAWMENPYIKVDTV  
AAEHITLTKRKPGRGAEATGKVNKTLLRGPLSKAGFYLAFQDGACMALL  
SLHLFYYKKCAQLTVNLTRFPTETVPLVAGSCVVDAPVAPGESP  
SLYCREDGQWAEPVTGCSACPGFEAAEGNTKCRACAQGTFKFLSGE  
GSCQCPANSHNTIGSACVQCRVGYFRARTDPRGAPCTPPSAPRS  
VVSRLNGSSLHLEWSAPLSSGRGREDLTAYALRCRECRPGGSCAPCGGD  
LTFDPGPRDLVEPVWVVRGLRFDFTYTFETVTLNGVSSLATGPVPEE  
PVNVITDREVEPAPVSDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAVSGAWLDYEVK  
YHEKGAEGPSSVRFKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGP  
FGQEHHSQTQLDSEGWREQGSKRAILQISSTVAAARV

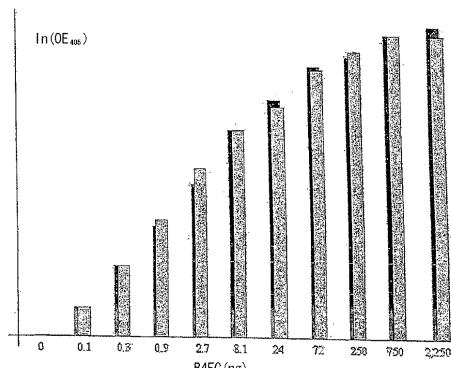
## 【図5】

Figure 5. Amino acid sequence of the B2EC-FC protein

MAVRDSDSYWKYCWGVLMVLCRTAISKSIVLEPIYWNSNSNSKFLPGQ  
GLVLYFQICDKLDDIICPKVDSKTVGQYEEYKVMVDKDQADRCTIK  
KENTPDLNCAKPDQDKFTIKFQEFSPNLWGLEFQKNDYIILISTS  
NGSLECLDNQEGGVQCQTRANKILMKVGDASSAGSTRNKDPTTRPE  
LEAGTNGRSSTTSFEPVKEPNPGSSTDGNSAGHSAGNNILGSEVDPDPK  
SCDKTHTCPPCPEAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVV  
DVSHEDPEVKFNWVYDVGEVHNNAKTREREEQYNSTYRVVSLTVLH  
QDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISAKGQPREEQVYTLPPSRD  
ELTKNQVSILTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDG  
SFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## 【図6】

Fig. 6. B4EC-FC binding assay (Protein A-agarose based)



## 【図3】

Figure 3. Amino acid sequence of the B2EC protein

MAVRDSDSYWKYCWGVLMVLCRTAISKSIVLEPIYWNSNSNSKFLPGQ  
GQGLVLYFQICDKLDDIICPKVDSKTVGQYEEYKVMVDKDQADRCTIK  
CTIKKENTPLNCAKPDQDKFTIKFQEFSPNLWGLEFQKNDYIILISTS  
YIISTNSGSLEGIDNQEGGVQCQTRANKILMKVGDASSAGSTRN  
KDPTTRPELEAGTNGRSSTSPFVKPNPGSSTDGNSAGHSAGNNI  
LGSEVGSHHHHHH

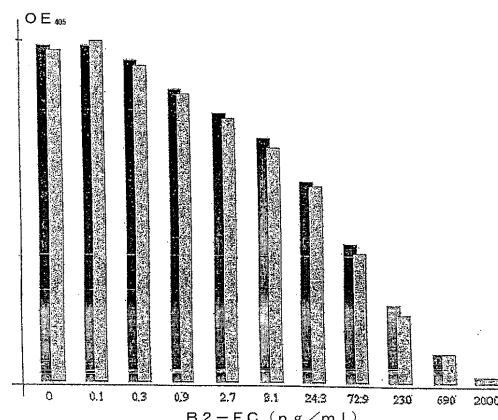
## 【図4】

Figure 4. Amino acid sequence of the B4ECv3-FC protein

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWKVTFPQVDGQWEELSG  
SGLDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVVATL  
RFTMLECLSLPRAGRSCKETFTVFFYESDADTATLTPAWMENPY  
IKVDTVAEERLTKRKPGRGAEATGKVNKTLLRGPLSKAGFYLAFQD  
QGACMALLSLHLYFKKCAQLTVNLTRFPTETVPLRVVVPAGSCV  
DAVEPAPGSPSPSLYLCREDGQWAEPVTGCSACPGFEAAEGNTKCR  
CAQGTFKPLSGEGSCQCPANSHNTIGSACVQCRVGYFRARTDP  
RGAPCTTPEPSAPPSVSRVSLNGSSLHLEWSAPLSSGRGREDLTAYLR  
CRECRPGGSCAPCGGDLTDFPGPRDLVEPVWVVRGLRFDFTYTF  
VTAINGVSSLATGPVFEPEPVNTTDREVPAPVSDIRVTRSSPSSL  
SLAWAVPRAVSGAWLDYEVKYEKGAEGPSSVRFKTSENRAELR  
GLKRGASYLVQVRARSEAGYGFQGQENRHSQTQLDESEGWRQEQDPE  
PKSCDKTHTCPPCPEAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTC  
VVVDSHEDPEVKFNWVYDVGEVHNNAKTREREEQYNSTYRVVSL  
TVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISAKGQPREPVYTL  
FPPSRDELTKNQVSILTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFP  
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL  
SLSPGK

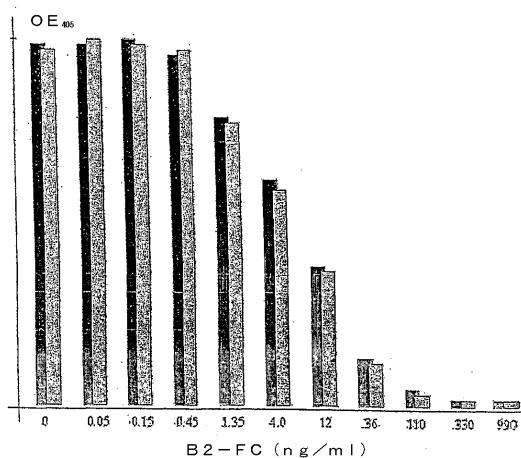
## 【図7】

Fig. 7. B4EC-FC inhibition assay (Inhibition in solution)



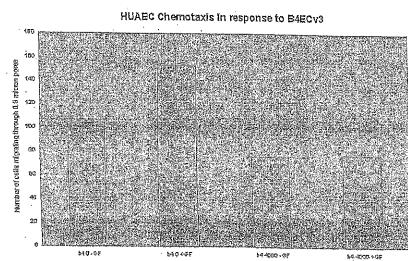
【図8】

Fig. 8. B2EC-FC binding assay (Protein-A-agarose based assay)



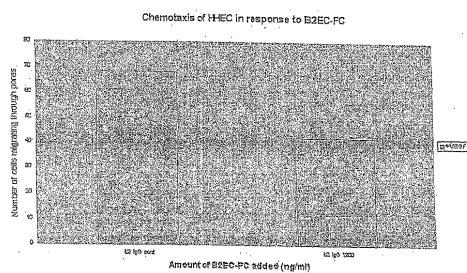
【図9】

Fig. 9



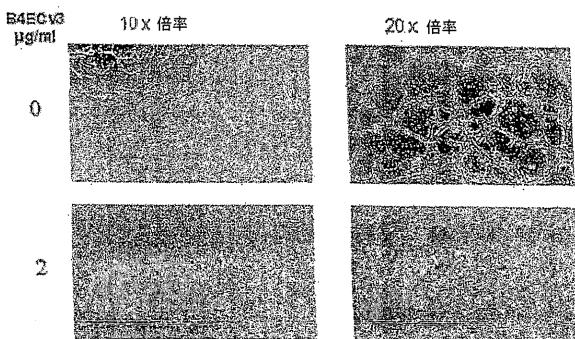
【図10】

Fig. 10



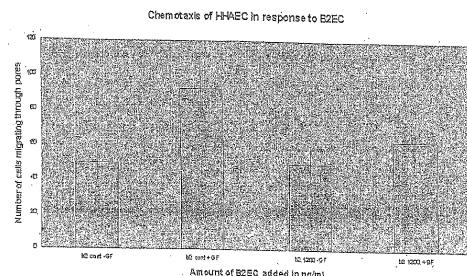
【図12】

Effect of B4ECv3 on HUAEc Tubule Formation



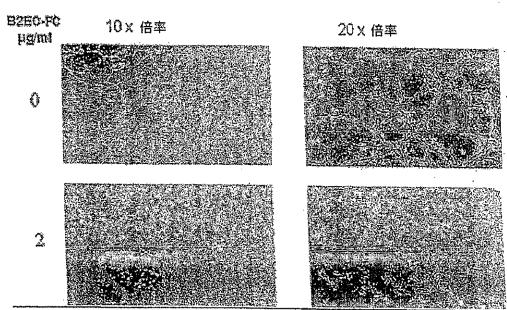
【図11】

Fig. 11



【図13】

Effect of B2EC-FC on HUAEc Tubule Formation



【図14】

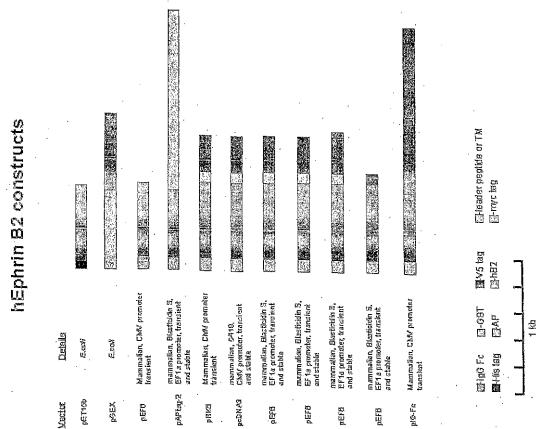


Figure 14

【図15】

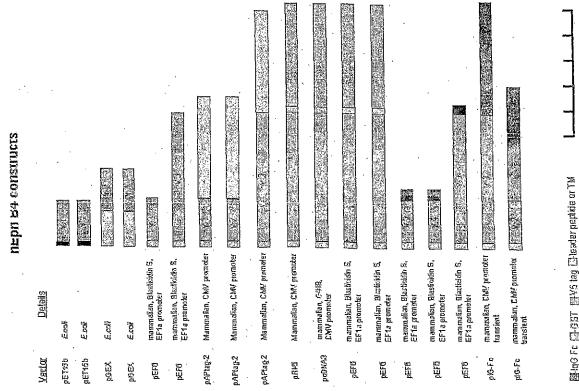


Figure 15

【図16】

Figure 16. Domain structure of the recombinant soluble EphB4EC proteins.

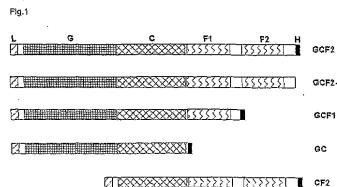


Figure 17A. Purification and ligand binding properties of the EphB4EC proteins

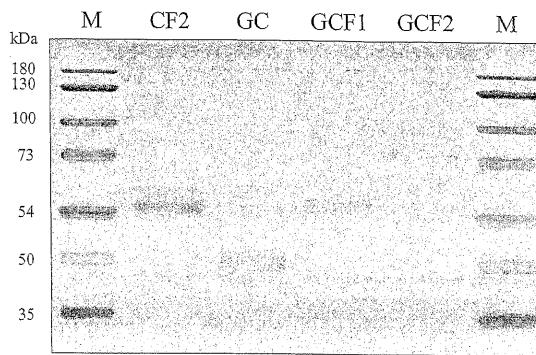
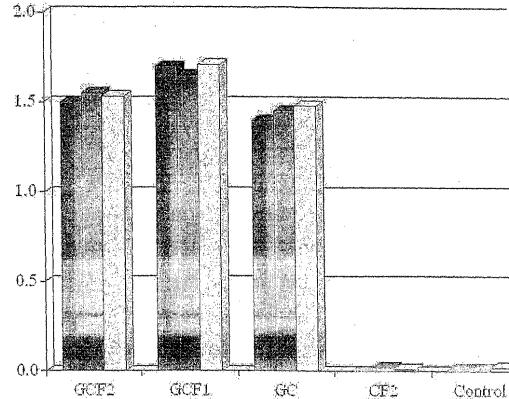
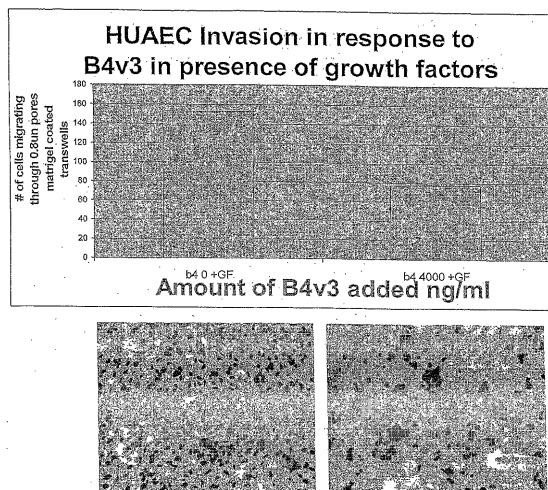


Figure 17B. Binding of Ephrin B2-AP fusion to EphB4-derived recombinant proteins immobilized on NTA-agarose beads.



## 【図18】

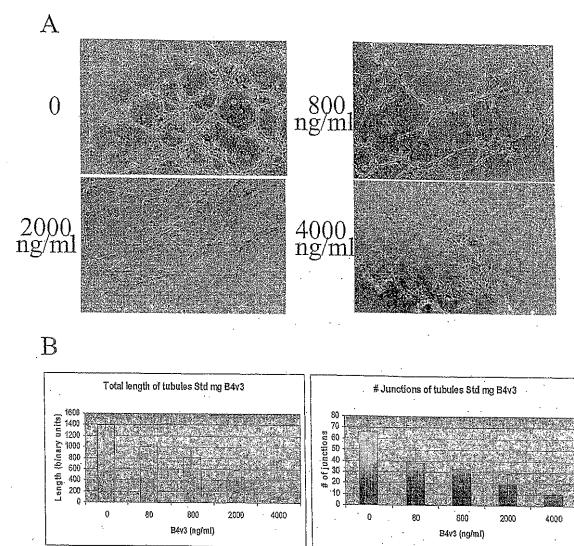
Fig. 18  
B4v3 inhibits chemotaxis, In Vitro Invasion Assay



**In Vitro Invasion Assay:** Chemotaxis of HUAECs, measuring migration and degradation of basement-membrane ability, was assessed using a modified Boyden chamber, transwell membrane filter inserts in 24 well plates, 6.5 mm diam, 8um pore size, 10um thick polycarbonate membranes. The upper surfaces of the transwell were pre-coated with matrigel. The cell suspensions of HUAECs in 0.25% BSA (2x 10<sup>5</sup> cells/ml) in 200ul of EBM were seeded in the upper chamber and the B4v3 protein was added simultaneously with stimulant (VEGF or bFGF) to the lower compartment of the chamber and their migration across a polycarbonate filter in response to 10-20 ng/ml of VEGF with or without 100nM-1μM test compound was investigated. After incubation for 4-24h at 37, The upper surface of the filter was scraped with swab and filters were fixed and stained with Diff Quick. Triplicate. Ten random fields at 200x mag were counted and the results expressed as mean # per field

## 【図19】

Fig. 19 B4v3 inhibits tubule formation on Matrigel.



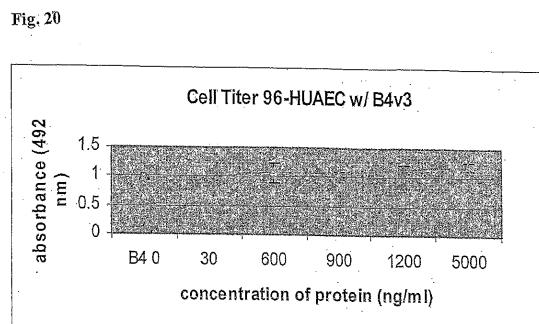
**B4v3 inhibits tubule formation on Matrigel.**

HUAEC cultures were cultured with B4v3, at 800, 2000, and 4000 ng/ml following seeding on STD matrigel to analyze tubule formation. Cells were photographed 6h and 24h after seeding, 20X magnification, and the total length of the tubule-like network formed in the well, and # of junctions was established.

**A**, displays the strong inhibition of tubule formation by B4v3 in a representative experiment.

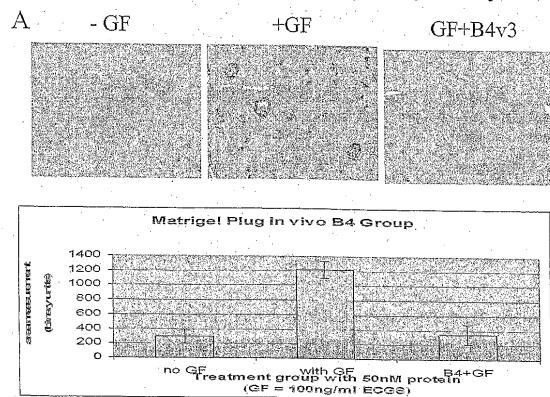
**B**, shows a quantitation, with AngioSys Software, of the reduction of tube-length obtained with B4v3 at increasing concentrations as well as a reduction in the number of junctions, in comparison to cells with no protein. Results are displayed as mean values  $\pm$  S.D. obtained from three independent experiments performed with duplicate wells.

## 【図20】



**Cell viability assays:**  
Cell viability was determined using the (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulophenyl)-2H-tetrazolium, imer salt (MTS) assay according to the instructions of the manufacturer (Promega, Madison, WI, USA).

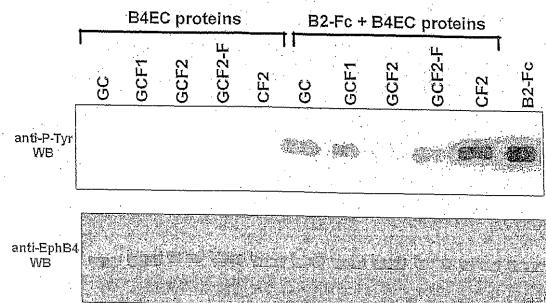
**B4v3 inhibits invasion and tubule formation by endothelial cells in the Murine Matrigel assay**



**B4v3 inhibits invasion and tubule formation by endothelial cells in the murine Matrigel assay.**  
B4v3 (50nM) was added to Matrigel solution containing EC22 (150ng/ml) and injected subcutaneously into BalbC nu/nu mice. After 6 days plugs were removed and processed in paraffin. Individual sections were either stained with hematoxylin (**A**) to detect total invading cells, photographed at 20X magnification, or with Masson's Trichrome (**B**). Top left of **A** displays section of a Matrigel plug with no GF, top right of **A** displays section with B4v3 containing GF, and lower left section contains GF, and lower right shows GF in the presence of B4v3. Significant invasion of endothelial cells is only seen in GF containing Matrigel. **Top right** displays an area with a high number of invaded cells induced by B4v3, which signifies the dimeric form of B4v3. The **left upper parts** of the pictures correspond to the cell layers formed around the Matrigel plug from which cells invade toward the center of the plug located in the direction of the **right lower corner**. Total cells in sections of the Matrigel plugs were quantitated with Scion Image software. Results obtained from two experiments with duplicate plugs are displayed as mean values  $\pm$  S.D.

【図22】

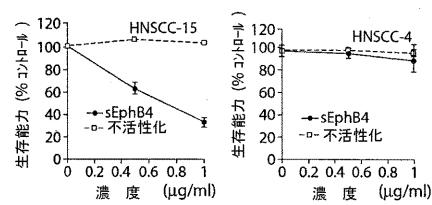
Fig. 22



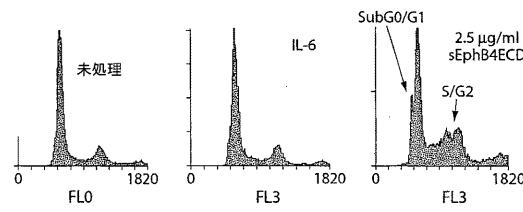
Tyrosine phosphorylation of EphB4 receptor in PC3 cells in response to stimulation with EphrinB2-F fusion in presence or absence of EphB4-derived recombinant soluble proteins.

【図23】

A



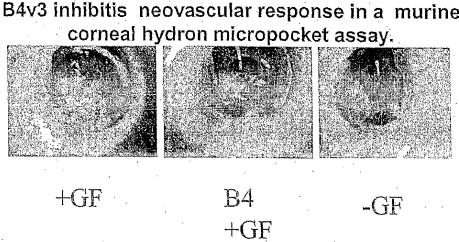
B



Soluble EphB4-CD effects on viability and cell cycle. A) 3-day cell viability assay of two HNSCC cell lines. Cells were seeded on 48-well plates at equal densities and treated with 0, 0.5 or 1  $\mu$ g/ml sEphB4-CD. Viability was determined on day 3 by MTT assay. Given is the mean and SEM of triplicate samples. B) FACS analysis of cell cycle in HNSCC-15 cells treated as in A. It was previously determined that IL-6 had no inhibitory effect on viability. Treatment of these cells resulted in an accumulation in subG0/G1 and S/G2 phases as indicated by the arrows.

【図24】

Fig. 24

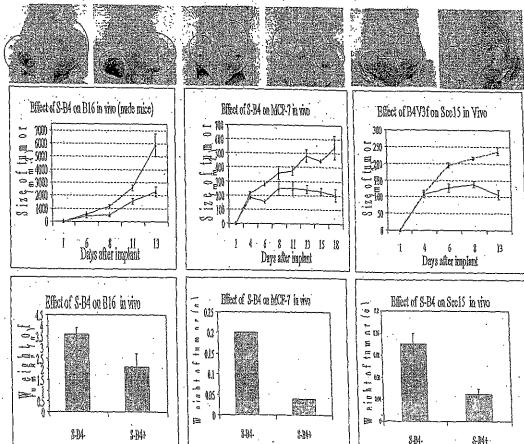


B4v3 inhibits neovascular response in a murine corneal hydron micropocket assay.

B4v3 (180ng) was added to hydron and sucralfate (45ug) with or without basic fibroblast growth factor (bFGF) (100ng) and pellets formed. The pellets were selected and inserted into a micropocket into corneas of BalbC nu/nu mice. After 3 days pellets were removed and processed in freezing compound. Only the bFGF-sucralfate pellet, top left, induced an intense neovascular response originating from the limbal vessels and reaching the pellet on day 3 after implantation. Pellets containing bFGF and sucralfate with B4v3 and B8f, top right and bottom left respectively, did not produce an angiogenic response above background, lower right, on day 3 after implantation.

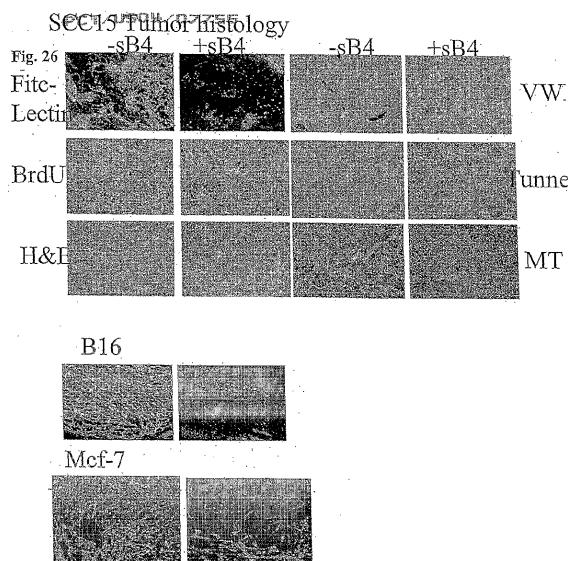
【図25】

Fig. 25



SC15, B16, and MCF-7 co-injected with sB4v3 in the presence of matrigel and growth factors, inhibits the *in vivo* tumor growth of these cells. (A) sB4v3, 40mg per kg body weight were subcutaneously co-injected with  $\times 10^6$  cells in a matrigel preparation. The representative picture shows retarded tumor growth in the presence of sB4 (left flank) compared with PBS control treatment (right flank). (B) Treatment with sB4 significantly inhibited human SCC, B16, and MCF-7 tumor growth compared with control-treated mice ( $p<0.05$ ). (C) Treatment with sB4 significantly inhibited tumor weight compared with control-treated mice ( $p<0.05$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p<0.05$

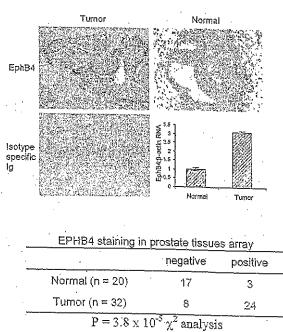
【 図 2 6 】



Soluble EphB4 causes apoptosis, necrosis and decreased angiogenesis in three tumor types, B16 melanoma, SCC15, head and neck carcinoma, and MCF-7 Breast carcinoma. Tumors were injected premixed with Matrigel plus growth factors and soluble EphB4 subcutaneously. After 10 to 14 days, the mice were injected intravenously with FITC-lectin (green) to assess blood vessel perfusion. Tumors treated with control- PBS displayed abundant tumor density and a robust angiogenic response. Tumors treated with sEphB4 displayed a decrease in tumor cell density and a marked inhibition of tumor angiogenesis in regions with viable tumor cells, as well as tumor necrosis and apoptosis.

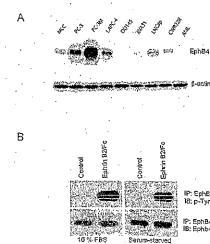
【図28】

Figure 28



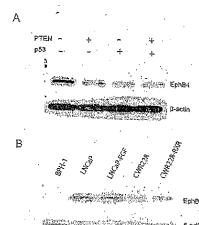
【 図 27 】

Figure 27



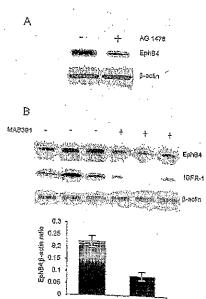
【 図 29 】

Figure 29



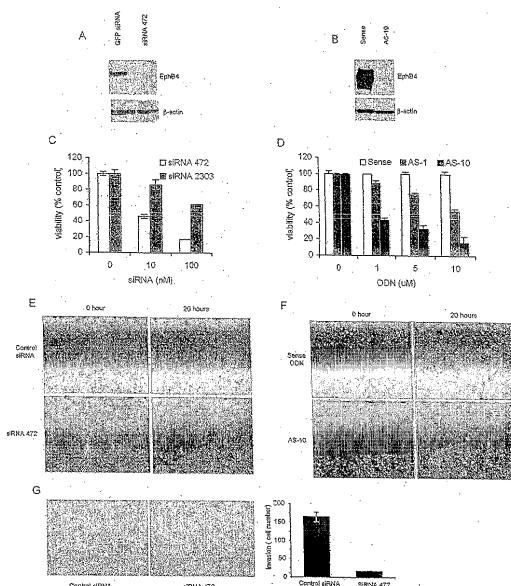
## 【図30】

Figure 30



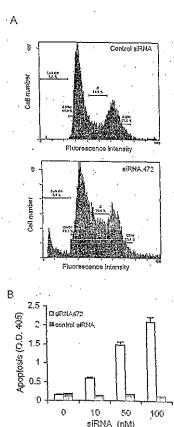
## 【図31】

Figure 31



## 【図32】

Figure 32



## 【図33】

Figures and Legends

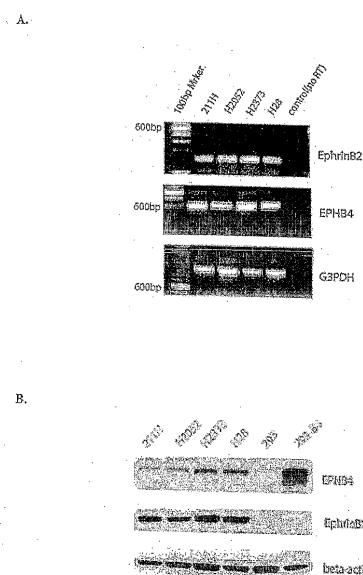


Fig. 33

【図34】

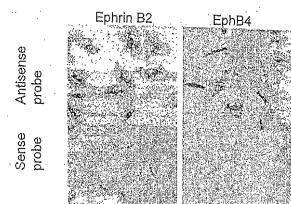


Fig. 34 Expression of ephrin B2 and EphB4 by *in situ* hybridization in mesothelioma cells. NCI H28 mesothelioma cell lines cultured in chamber slides hybridized with antisense probes to ephrin B2 or EphB4 (top row). Control for each hybridization was sense (bottom row). Positive reaction is dark blue cytoplasmic stain.

【図36】

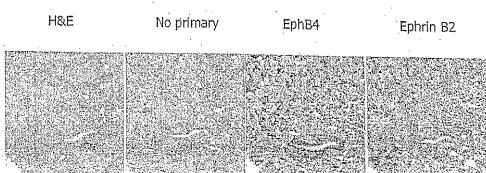


Fig. 36. Expression of ephrin B2 and EphB4 in mesothelioma tumor. Immunohistochemistry of malignant mesothelioma biopsy. H&E stained section to reveals tumor architecture; bottom left panel is background control with no primary antibody. EphB4 and ephrin B2 specific staining is brown color. Original magnification 200X.

【図35】

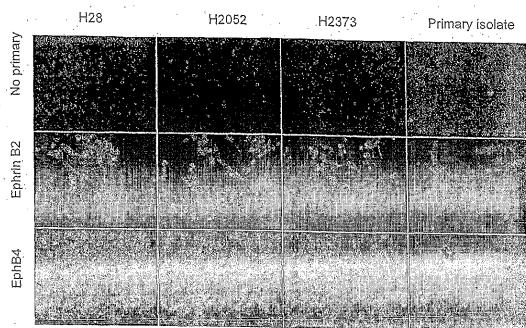


Fig. 35. Cellular expression of EphB4 and ephrin B2 in mesothelioma culture. Immunofluorescence staining of primary cell isolate derived from pleural effusion of a patient with malignant mesothelioma and cell lines NCI H28, NCI H22 and NCI H2052 for ephrin B2 and EphB4. Green color is positive signal for FITC labeled secondary anti-rabbit IgG. Cell nuclei were counterstained with DAPI (blue color) to reveal location of all cells. Shown are merged images of DAPI and FITC fluorescence. Original magnification 200X.

【図37】

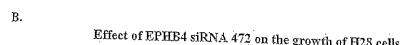
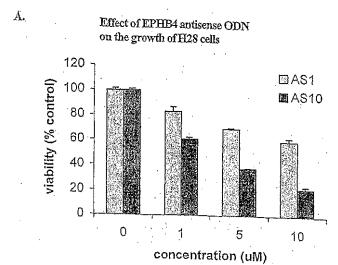


Fig. 37

【図38】

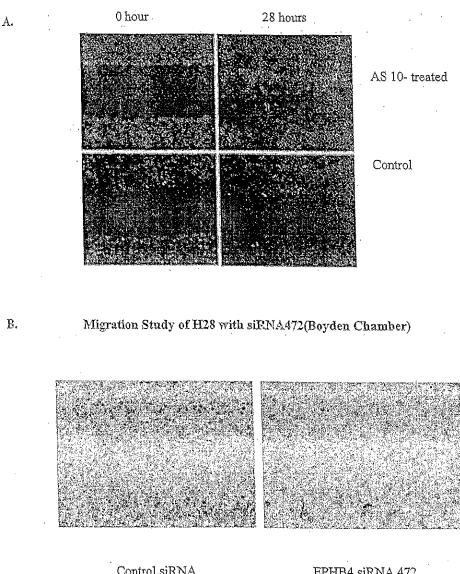


Fig. 38

【図39】

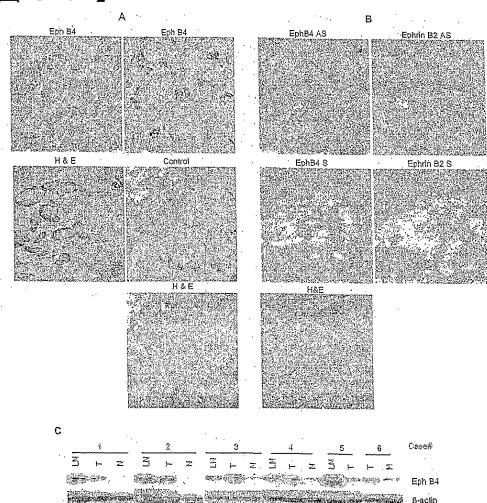


Fig.39

【図40】

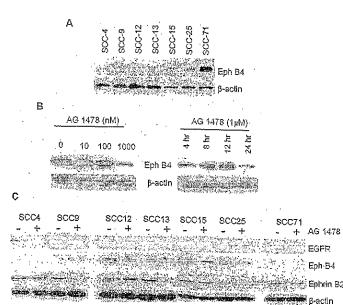


Fig.40

【図41】

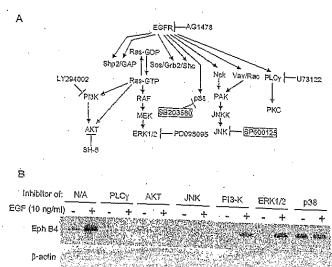


Fig.41

【図42】

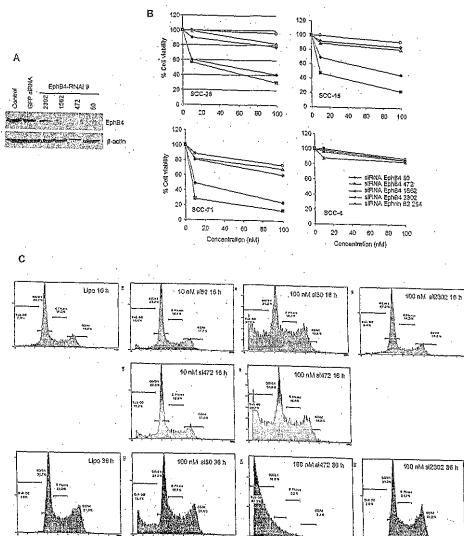


Fig.42

【図43】

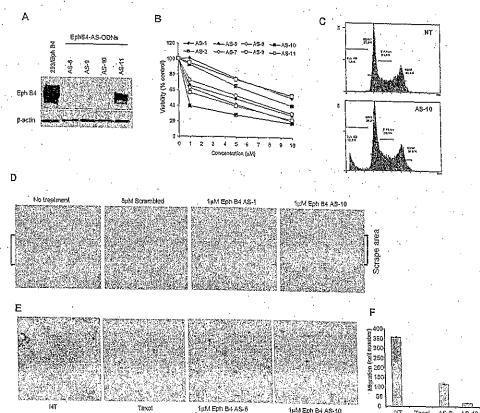


Fig. 43

【図44】

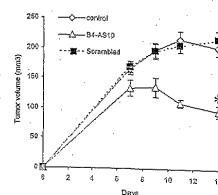
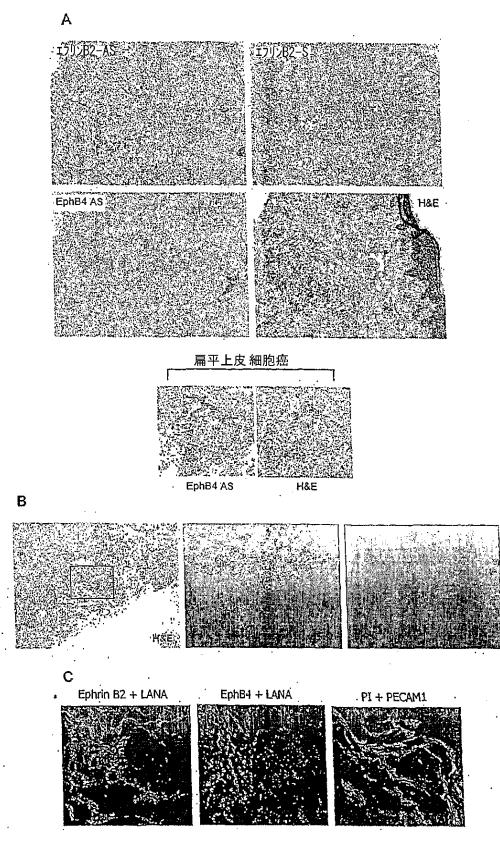
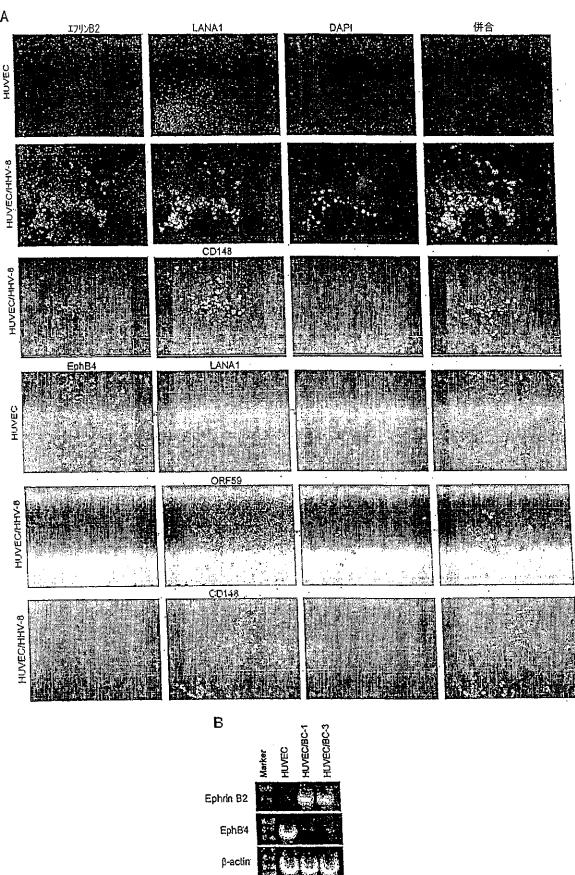


Fig. 44

【図45】

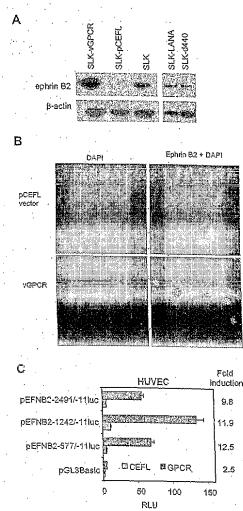


【図46】



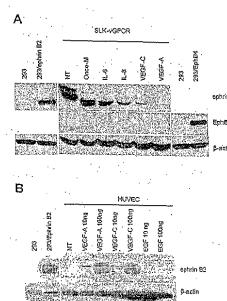
## 【図47】

Fig. 47



## 【図48】

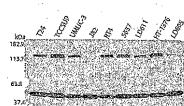
Fig. 48



【図51】

Fig. 51

Expression of EPHB4 in bladder cancer cell lines



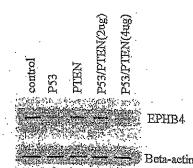
#### Regulation of EPHB4 expression by EGFR signaling pathway



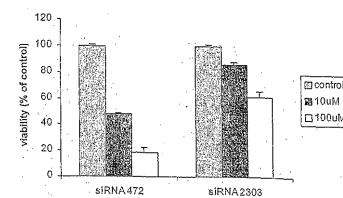
【図52】

53/88

Transfection of p53 inhibit the expression of EPHB4 in 5637 cell

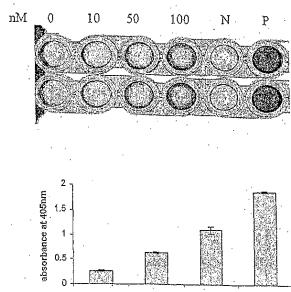


Growth inhibition of bladder cancer cell line(5637) upon treatment with EPHB4 siRNA 473



【図54】

#### Apoptosis Study of 5637 cells transfected with EPHB4 siRNA 472



【 図 5 5 】

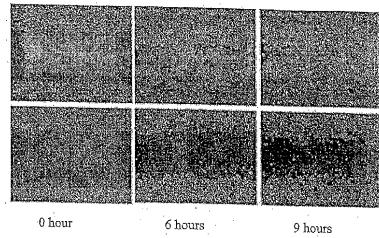
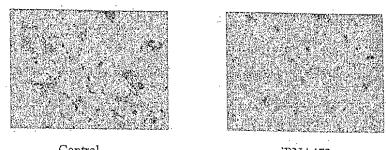


Fig. 55

Fig. 54

【図56】

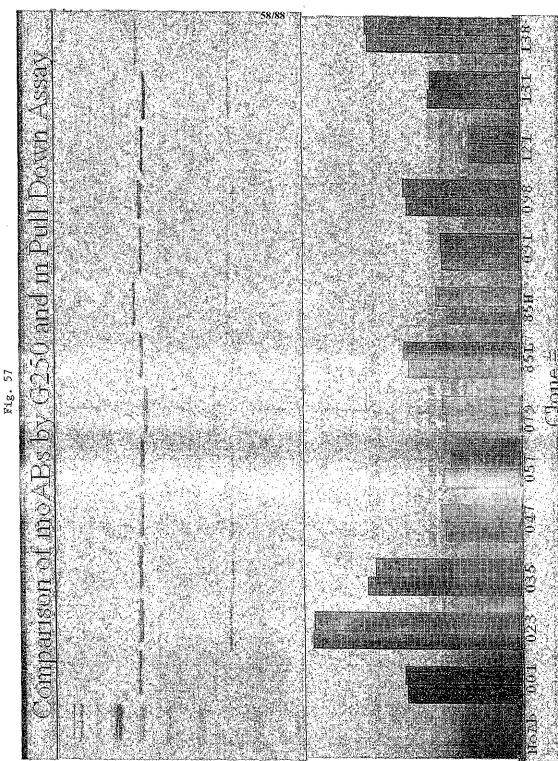
Invasion study of 5637 cell transfected with siRNA 472 or control siRNA



Co  
ntr  
ol  
Si  
R  
N  
A4  
72

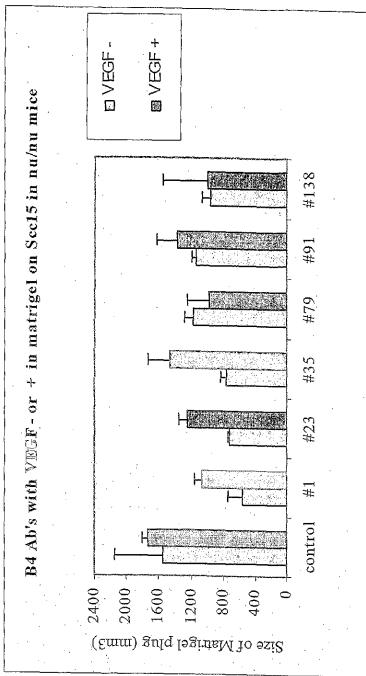
Fig. 56

【図57】

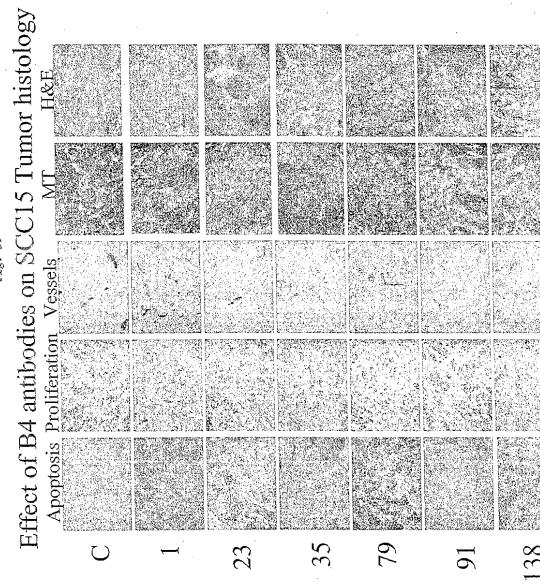


【図58】

## SCC15/IMG xenograft Tumor regression



【図59】



【 四 60 】

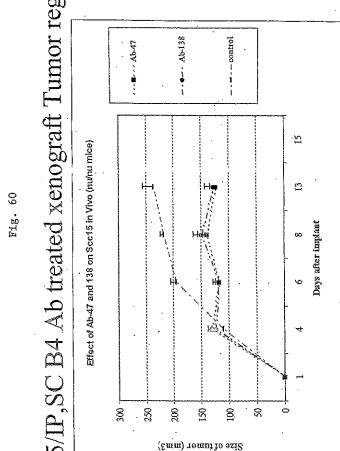


Fig. 60

SCC15/IP,SC B4 Ab treated xenograft Tumor regression

【図 6-1】

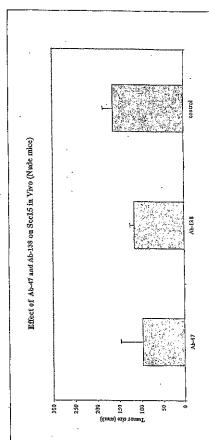


Fig. 61(b)

Fig. 61(a)

FIGURE 61 EphB4 gene

Fig. 61(c)

Fig. 61(d)

PCT/US2004/007755  
Fig. 61(c)

DCP/UVG/2024/005755

PCT/US2004/007755  
E15 2/17/04

【 図 6 2 】

Fig. 61(h)

【 図 6 3 】

Fig. 62(b).

3341 gggccacccaa gaaacaaatgtt ggccgcgtt cagccatgtt agttccggggaa caaggccggaa  
 3342 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt gttttttttt  
 3343 ggaggccacccgtt ctcccccattt tttttttttt  
 3344 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3345 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3346 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3347 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3348 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3349 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3350 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3351 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3352 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3353 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3354 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3355 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3356 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3357 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3358 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3359 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3360 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3361 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3362 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3363 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3364 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3365 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3366 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3367 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3368 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3369 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3370 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3371 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3372 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3373 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3374 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3375 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3376 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3377 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3378 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3379 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3380 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3381 ggatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 3401 aacatggggggaa gggccatgtt ccgtttttttt  
 4081 atggggggggatggggggggatggggggggatgggggggg  
 4141 ggccggccgtt gggggggggatggggggggatgggggggg  
 4202 taaaagaaaaa tggggggggatggggggggatgggggggg

Fig. 05(4)

Fig. 63(d)

Fig. 63(e)

Fig. 63(g)

Fig. 63(h)

Fig. 63(i)

Fig. 63(j)

30661 tggtgtggcc atcaatggcg tgggtggcc tggaaatggcc tggatgttcc ttctggccgt  
30671 tggtgtttat ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
30781 agggatgtac ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
30841 ctgggtttttt atattatccat tggatgttcc ttctggccgt  
30901 gatgtgtggccat cttccatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31001 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31021 atttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31141 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31201 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31261 aaaaaacaaat ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31321 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31381 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31441 atccatccatc ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31501 aggtttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31561 gtatggccca ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31611 gatccatccat ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31681 aatgggtgtcc ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31741 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31801 aaaaaatgggg ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31861 acggagatgt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31921 aatggatgtt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
31981 aatgtttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32041 ttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32101 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32161 ttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32221 acatggatgtc acggccgtttt actttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32281 gcggatgtc ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32341 ttatgtttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32401 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32461 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32521 agttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32581 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32641 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32701 gaatattttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32761 ttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32821 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32881 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
32941 ctggttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33001 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33061 ttatccatgt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33121 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33181 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33241 ttggggccggcc cggccggccggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33301 ctgtggaaaccc cggccgtttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33361 ttgttgcgtcc gatgttgcgtcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33421 ctgtttgtgtt gatgttgcgtcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33481 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33541 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33601 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33661 gatgtttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33721 ctgtggaaaccc cttccatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33781 ctttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33841 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33901 tttttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
33961 agttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt  
34022 agttttttttt ttttttttttttggatggcc agggatccat tggatgttcc ttctggccgt

Fig. 63(k)

Fig. 63(1)

【 図 6 4 】

Fig. 64(b)

FIGURE 64. *Enchanted*—main

【 図 6 5 】

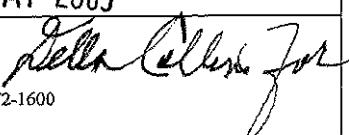
FIGURE 65. EphB4 Precursor Protein

【 6 6 】

FIGURE 66. EphrinB2

FIGURE 16. EphrinB2

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/07755									
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A31K 38/00; C07K 5/00 US CL : 514/12, 530/350 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/12, 530/350											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)											
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 5,624,899 (BENNETT et al) 29 April 1997, see columns 2-3 and 10-14.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-11, 20, 22</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 5,635,177 (BENNETT et al) 03 June 1997, see columns 2-3</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-11, 20, 22</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 5,624,899 (BENNETT et al) 29 April 1997, see columns 2-3 and 10-14.	1-11, 20, 22	X	US 5,635,177 (BENNETT et al) 03 June 1997, see columns 2-3	1-11, 20, 22
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	US 5,624,899 (BENNETT et al) 29 April 1997, see columns 2-3 and 10-14.	1-11, 20, 22									
X	US 5,635,177 (BENNETT et al) 03 June 1997, see columns 2-3	1-11, 20, 22									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.									
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
Date of the actual completion of the international search 03 March 2005 (03.03.2005)		Date of mailing of the international search report <b>18 MAY 2005</b>									
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer  Sheila J. Huff Telephone No. 571272-1600									

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US04/07755
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b> <p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</li> <li>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 23 and 36 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: Claim 23 is a duplicate and claim 36 refers to the polypeptide of claim 25 and claim 25 is directed to antibodies.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</li> </ol>		
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b> <p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</li> <li>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-11,20,22 and 34</li> </ol> <p>Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US04/07755

## BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-11, 20, 22, 34, drawn to polypeptide comprising an amino acid sequence of an extracellular domain of an EphB4 protein, a composition and kit containing said polypeptide and a method of inhibiting signaling using said polypeptide.

Group II, claim(s) 12-19, 21, 24, 35, drawn to polypeptide comprising an amino acid sequence of an extracellular domain of an EphB2 protein, a composition and kit containing said polypeptide and a method of inhibiting signaling using said polypeptide.

Group III, claim(s) 25-33, drawn to antagonistic antibody, composition containing said antibody.

Group IV, claim(s) 37-49, 56 58-59 drawn to method of reducing the growth rate of a tumor.

Group V, claim(s) 50-55 and 57, drawn to method of inhibiting angiogenesis.

Group VI, claim(s) 60-61, drawn to method of identifying a tumor.

In addition, with Group III, applicant will have antibody to EPHB4 examiner without paying additional fees.

In addition, if applicant pays for Group IV, they will get Group IV as it reads on a polypeptide comprising an amino acid sequence of an extracellular domain of EPHB4 protein. If applicant wants any more peptides or antibodies, they need to pay additional fees.

In addition, if applicant pays for Group V, they will get Group V as it reads on a polypeptide comprising an amino acid sequence of an extracellular domain of EPHB4 protein. If applicant wants any more peptides or antibodies, they need to pay additional fees.

In addition, if applicant pays for Group VI, they will get Group VI as it reads on expression of EPHB4 protein. If applicant wants any more proteins/nucleic acids, they need to pay additional fees.

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Each of the products of Groups I-VI different structurally and functionally and this lack the same or corresponding special technical feature. Each of the methods in Groups IV-VI require the use of different products. The product in Group IV-V are polypeptides/antibodies whereas the product in Group VI is any agent. Groups VI and V do not have the same technical feature because in Group IV the polypeptide/antibody is used to reduce the growth rate of the tumor whereas in Group I it is to inhibit angiogenesis.

According to PCT Rule 13.2 and to the guidelines in Section (I)(i)(B)(1) of Annex B of the PCT Administrative Instructions, all alternatives of a Markush Group must have a common structure, which is a significant structural element. Although SEQ ID No. EphB4 and EphB2 share a common structure of a single amino acid, the compounds are not regarded as being of similar nature because the shared common structure is not a significant structural element. A common structure of a single amino acid is not a significant structural element because the amino acid is found in every amino acid sequence.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US04/07755

The number of inventions has been determined as follows: Each of Groups III has 1 additional sequences (in addition to SEQ ID No. EPHB4. 1 X 1 results in 1 inventions. Each of Groups IV has 13 additional sequences (in addition to SEQ ID No. EPHB4. 13 X 1 results in 3 inventions. Each of Groups V has 3 additional sequences (in addition to SEQ ID No. EPHB4. # X 1 results in 3 inventions. Each of Groups VI has 5 additional sequences (in addition to SEQ ID No. EPHB4. 5 X 1 results in 5 inventions. Thus, 1 + 3 + 3 + 5 plus the original 6 groups results in 18 inventions.

If no additional fees are paid, Group I, claims 1-11, 20, 22 and 34 will be examined.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 0 7 K 19/00</b> (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 38/00</b> (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
<b>A 6 1 P 43/00</b> (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
<b>A 6 1 K 39/395</b> (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
<b>A 6 1 P 35/00</b> (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
<b>A 6 1 P 35/04</b> (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 9/00</b> (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
<b>A 6 1 K 45/00</b> (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
<b>A 6 1 K 8/64</b> (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 P 29/00</b> (2006.01)	A 6 1 K 8/64	
<b>A 6 1 P 19/02</b> (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
<b>A 6 1 P 37/02</b> (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
<b>A 6 1 P 17/02</b> (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
<b>C 1 2 P 21/08</b> (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,M,D,MG,MK,MN,MW,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 クラスノペロフ, バレリー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 1 0 1 , パサディナ, サウス ロス ロブレス アベニュー  
- 3 4 6 , アパートメント 6

(72)発明者 ゾズリア, セルゲイ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 1 2 , ロサンゼルス, エス. グランド アベニュー 2  
2 5 , アパートメント 2 3 0 8

(72)発明者 ケルテズ, ナタリー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 0 1 , 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 レディ, ラマチャンドラ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 3 3 , ロサンゼルス, シャルロット ストリート 2 1  
0 1 , アパートメント 2 1

(72)発明者 ギル, パルカシュ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 3 3 , ロサンゼルス, ゾーナル アベニュー 1 9 2 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA63 BA80 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04 GA13  
HA14  
4B064 AG27 CC24 DA01 DA13  
4C083 AD411 CC01  
4C084 AA02 AA07 AA19 BA01 BA08 BA22 CA53 CA59 DC50 NA14  
ZA362 ZB262 ZC022  
4C085 AA13 AA14 BB11 CC02 DD62 DD88 EE01  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 DA76 EA20  
EA24 EA50 FA74 GA31