

(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. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705 Z N A	4 B O 6 4
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 C O 8 3
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 C O 8 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 C O 8 5
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
(86) (22) 出願日	平成16年3月12日 (2004. 3. 12)		バスジーン セラピューティクス, イン
(85) 翻訳文提出日	平成17年11月9日 (2005. 11. 9)		コーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/007755		アメリカ合衆国 1 9 0 7 9 ペンシルベ
(87) 国際公開番号	W02004/080425		ニア、シャロン ヒルズ、フック ロード
(87) 国際公開日	平成16年9月23日 (2004. 9. 23)		4
(31) 優先権主張番号	60/454, 300	(74) 代理人	100067817
(32) 優先日	平成15年3月12日 (2003. 3. 12)		弁理士 倉内 基弘
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/454, 432		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成15年3月12日 (2003. 3. 12)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		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 6 5 により特定されるアミノ酸配列の残基 1 ~ 5 2 2 と少なくとも 9 0 % 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 6 5 により特定されるアミノ酸配列の残基 1 ~ 4 1 2 と少なくとも 9 0 % 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 6 5 により特定されるアミノ酸配列の残基 1 ~ 3 1 2 と少なくとも 9 0 % 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 6 6 により特定されるアミノ酸配列の残基 1 ~ 2 2 5 を含有する請求項 1 2 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 1 2 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 1 2 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 1 2 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 1 2 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】

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十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 49】

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 40 の方法。

【請求項 50】

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 40 の方法。

【請求項 51】

細胞を、血管形成の阻害に十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、
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； 10
- (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 52】

上記細胞はEphB4又はエフリンB2を発現する請求項 51 の方法。

【請求項 53】

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 20
の患者の治療方法：

- (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。

【請求項 54】

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 53 の方 30
法。

【請求項 55】

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、慢性間接リユー
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、繊維血管腫、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(cororany collaterals)、虚血肢血管形
成、ルベオース、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 53 の方法。

【請求項 56】

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 40
追加的抗血管形成試薬の投与ステップを含む、請求項 53 の方法。

【請求項 57】

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；

(i i) 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

(i i i) 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

(i v) 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

(i i) 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；

(i i i) 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

(i v) 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：

40

(a) EphB4蛋白質及び / 又はm R N A の発現；

(b) エフリンB2蛋白質及び / 又はm R N A 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 6 1 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。

【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。

【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。

【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。

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の種々の病状に關与する。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

10

20

30

40

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十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效果を有する、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1～522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。

10

20

【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十分な膜貫通領域部分を含有しないことを表すために使用される。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效果を有する、複合的活性を有する。可溶性エフリンB2ポリペプチドは、図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。

30

40

【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、単鎖抗体、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。

50

【0009】

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。

【0010】

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

【0011】

本発明は、例えば、腫瘍の成長速度を減少させるのに十分な量のポリペプチド薬を投与する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

【0012】

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、カボジ肉腫、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。本発明で使用す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投与されてもよい。

30

40

【0013】

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、血管形成の阻害に十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

50

する抗体。

【0014】

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、慢性間接リウマチ及び乾癬、眼性血管形成病、オスラーウェバー症候群、心筋性血管形成、プラーク新生血管形成、毛細血管拡張症、血友病性関節、繊維血管腫、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 (cororany collaterals)、虚血肢血管形成、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投与されてもよい。

10

【0015】

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。

20

【0016】

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。

30

【0017】

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。

40

【0018】

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B2EC蛋白質のアミノ酸配列を示す(非開裂エフリンB2リーダーペプチドを含む前駆体の推定配列を示す)。

図4はB4ECv3-FC蛋白質のアミノ酸配列を示す(非開裂EphB4リーダーペプチドを含む前駆体の推定配列を示す)。

図5は、B2EC-FC蛋白質のアミノ酸配列を示す(非開裂エフリンB2リーダーペプチドを含む前駆体の推定配列を示す)。

図6は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。

10

図7はB4EC-FC阻害アッセイ(溶液中阻害)を示す。

図8は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はB4ECv3に応答するHUAEC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B2EC-FCに応答するHHEC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B2EC-FC量、ng/ml)。

図11はB2ECに応答するHHAEC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B2EC量、ng/ml)。

【0019】

20

図12は、HUAEC細管形成に対するB4ECv3の効果を示す。

図13は、HUAEC細管形成に対するB2EC-FC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)、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、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)、pIG-Fc(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EphB4EC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 = 6xHis標識。

【0020】

図17は、EphB4EC蛋白質の精製及びリガンド結合性を示す。図17Aは(クマシー染色され)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HUAEC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：HUAEC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）チャンパー（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200μlのEBM溶液中のHUAEC細胞の懸濁液（ 2×10^5 細胞/ml）を、上室チャンパーに接種し、B4v3蛋白質を刺激剤（VEGF又はbFGF）と同時に共にチャンパーの下室へ添加し、100nM～1μM試験化合物の存在又は非存在下で10～20ng/mlのVEGFに反応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。

HUAEC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AngioSys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96HUAECw/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、ヘマトキシリン（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 B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B4lgG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B4lgG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

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 \pm 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、50 nM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融合での刺激に应答する、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 ECDの効果を示す。Aは、2個のHNSCC(-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HNSCC-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。

10

図24は、B4v3は、ネズミ角膜hydran(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(180 ng)を、繊維芽細胞増殖因子(bFGF)(100 ng)の存在又は非存在下でhydran及びスクラルフェート(45 ug)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。bFGF-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Bsf(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。

20

【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 $\times 10^6$ 細胞で、40 mg/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($p < 0.05$)。

30

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 \pm SEM(標準偏差)として示す。 $* p < 0.05$ 。

【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。

40

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ブロット法を示す。上段はEphB4、下段は α -アクチン(標準蛋白質)。Bは、ウェスタンブロット法により決定されるPC3細胞中のEphB4のリン酸化を示す。左は

50

10 % P B S、右は血清飢餓状態。

【 0 0 2 6 】

図 2 8 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、代表的な前立腺癌凍結断片（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： α -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。

10

図 2 9 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、ウェスタンブロット法でEphB4及び、標準蛋白質として α -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）のウェスタンブロット法を示す。LNCaP-FGFはFGF-8の安定なトランスフェクションクローンであり、一方CWR22R-RXRはRXRレセプターを安定して発現する。BPH-1は、良性肥大性前立腺上皮から確立された。

【 0 0 2 7 】

図 3 0 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（1 nM）で36時間処理又は処理なしでのPC3細胞のウェスタンブロット法を示す。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 α -アクチンで再プロブした。Bは、IGFR-1を特異的に中和する抗体MAB391で（2 μ g/ml；一晚）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ブロット法を示す。膜を、EphB4、IGFR-1及び α -アクチン抗体で逐次的にプロブした。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。

20

【 0 0 2 8 】

図 3 1 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。

30

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50 nM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；GFP siRNA）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ブし、ストリップし、 α -アクチンモノクローナル抗体で再プロブした細胞溶解産物のウェスタンブロット法を示す。

Bは、完全長EphB4を一時的に発現する293中での発現に対するEphB4 AS-10の効果を示す。細胞をAS-10又はセンスODNへ6時間曝露し、上記（A）のウェスタンブロット法により分析した。

40

Cは、方法段落記載のようにsiRNAで処理されたPC3細胞の48 h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。

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 \pm s.e.m.を示す。

Eは、上記（A）中でトランスフェクトされた50 nMのsiRNAの存在下でのPC3細胞の移動のスクレイプアッセイを示す。スクレイプが単層で作成された直後（0 h）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 \times 視野の顕微鏡写真を示す。

20時間後のスクレイプでは大量の細胞にEphB4 siRNA472ではなくコントロールsiRNA Aで充填されていた。

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

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PC3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フィブロネクチンに反応するマトリゲル（商標）被覆されたインサートの下側への細胞移動を固定化し、ギムザ染色した。コントロール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PC3細胞を、上記トランスフェクション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。プロピジウムアイオダيد蛍光強度に対する細胞数のプロットを示す。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）。

10

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PC3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）及びウェスタンブロット法（B）で確認されることを示す。

20

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200x。

30

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200x。

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。

40

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（ポイデンチャンバー、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及びエオシン（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

50

キューベーションであり、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ペシー（LN）から構成される患者サンプルの蛋白質抽出物のウェスタンブロット法を示す。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ブロッティングされた。膜は、EphB4モノクローナル抗体及び α -アクチン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 α -アクチンを示す。 α -アクチンシグナルをそれぞれのサンプルの担持及び転移のコントロールとして使用した。

10

【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、 α -アクチンモノクローナル抗体で再プローブされた全細胞溶解産物のウェスタンブロット法を示す。

20

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ブロット法は、10%FCSを補充された培地中で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 α -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、1 μ M 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 α -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ブ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 α -アクチンが図1C中に示されるように検出された。 α -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。

30

【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インキューベーション前に、図示されたようにEGF（10ng/ml）、3 μ M U73122、又は5 μ M SH-5、5 μ M SP600125、25nM LY294002、 α - μ M PD098095又は5 μ M 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ブロット法で分析した。 α -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。

40

【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 siRNAでトランスフェクトした。トランスフェクション40時間後、細胞を採取し、溶解してウェスタンブロット法用に処理した。膜をEphB4モノ

50

クローナル抗体でプローブし、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ブした。スクランブルされた緑蛍光蛋白質 (GFP) 配列に対する陰性試薬コントロールはRNAiであり、コントロールはリポフェクタミン2000 (商標) のみでトランスフェクションされる。

Bは、方法段落記載のようにsiRNAで48時間処理したSCC細胞系のMTT細胞生存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SCC15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。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。Lipo = リポフェクタミン (商標) 200 mockトランスフェクション。

10

【0035】

図43は、SCC細胞に対する特別なEphB4 AS-ODN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ODNで処理した。細胞溶解産物をAS-ODN処理24時間後採取してウェスタンブロット法を適用した。

Bでは、SCC25細胞を48ウェルプレートへ均一密度で接種し、1、5、及び10 μ MのEphB4 AS-ODNで2及び4日処理した。細胞生存能力を第5日にMTT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AS-ODNも又、SCC15細胞生存能力の効果的抑制剤であった。

20

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

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単層中に3mm幅裂け目を作成したSCC15細胞の融合培養物を示す。EphB4 AS-ODN (AS-10) の阻害及びAS-ODN (AS-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ODNは陰性コントロールODNとして含まれた。標識化未処理培養物はODNへ曝されなかった。試験開始時点で、全培養物は同一幅のスクレープ (裂け目) を示し、1 μ M 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。

30

Eは、方法段落記載の2室アッセイ中の、20mg/ml EGFでのSCC15細胞の移動を示す。未処理 (NT)、AS-6及びAS-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10ng/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 AS-ODNはin vivo腫瘍増殖を抑制することを示す。20mg/kg/日で、EphB4 AS-10処理又はODNスクランブルされたBalb/Cヌードマウス中へのSCC15皮下腫瘍異種移植の増殖曲線は、 5×10^6 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 (PBS) 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ODN処理したグループと比較したスチューデントt-testによる。)

40

【0037】

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

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。ISH中の暗青色は、エフリンB2の陽性反応を表す。EphB4に対するシグナルは、カポジ肉腫バイオプシーでは検出されなかった。反対に、EphB4に対するISHシグナルは、扁平上皮細胞癌腫瘍細胞中で強い。エフリンB2も又EphB4-AP融合蛋白質を使用してKS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

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FITC標識化抗ヒトFc抗体で検出されたEphB4/Fc処理した断片(中央)中に示される範囲を表す。コントロールとして、隣接する断片をヒトFcフラグメントで処理した(右)。その断片へ結合するEphB4/Fcから生じる特別なシグナルは、腫瘍細胞の範囲のみに観察される。Cは、エフリンB2及びHHV-8潜伏蛋白質LANA(潜伏感染関連核抗原)1の共発現を示す。冷凍KSPaiオブシー材料のエフリンB2(赤)、LANA1(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、KSPaiオブシー中でのLANA1及びエフリンB2の共発現を直接的に示す。共発現は黄色で示される。プロビジウムアイオダイド染色(赤)された核を有する細胞中のPECAM-1(緑)に対する抗体を有するパイオブシーの二重標識法-共焦点画像は、腫瘍の血管の特性を示す【0038】

10

図46はHHV-8は静脈性内皮細胞中での動脈性マーカー発現を誘起することを示す。Aは、動脈/静脈マーカー及びウイルス性蛋白質用のHUEC及びHUEC/BC-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)、CD148(j、v)、及びHHV-8蛋白質LANA1(b、f、m)又はORF59(r)の免疫蛍光検出用に処理した。同一視野の併合画像中の黄色は、エフリンB2及びLANA又はエフリンB2及びCD148の共発現を示す。生存細胞の位置は、第三カラム(c、g、k、o、s、w)中のDAPI(青)での核染色法により明らかになった。顕微鏡写真は、代表的視野である。Bは、HUEC及び2個のHHV-8感染させた培養物(HUEC/BC-1及びHUEC/BC-3)の、エフリンB2及びEphB4に対するRT-PCRを示す。エフリンB2生成物(200bp)はHUEC/BC-1中で観察され、HUEC/BC-3及びEphB4生成物(400bp)はHUEC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RT-PCRを示す。

20

【0039】

図47は、HHV-8はカボジ肉腫細胞中の動脈性マーカー発現を誘起することを示す。Aは、種々の細胞溶解産物に対するエフリンB2のウェスタンブロット法を示す。SLK-vGPCRはHHV-8 vGPCRを発現するSLKの安定なクローンであり、SLK-pCEFLはエンブティ発現ベクターでトランスフェクトされた安定なクローンのコントロールである。LANA又はLANA 440でトランスフェクトされたSLK細胞は、それぞれSLK-LANA及びSLK-440である。蛋白質ロード及び移動量を-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 vGPCR-CEFLでのKS-SLK細胞の一時的トランスフェクションは、FITC(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pCEFLは変化がなかった。KS-SLK細胞(0.8×10^5 /ウェル)を $0.8 \mu\text{gDNA}$ でリポフェクタミン2000(商標)を使用してトランスフェクトした。24時間後、方法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FITC複合第二抗体で染色した。Cでは、HUECのvGPCR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。24ウェルプレート中の 8×10^3 HUECを、Superfect(商標)を使用して、翻訳開始部位に関する-2941~-11、又は記載のような2個の5'-欠失の配列を含有する $0.8 \mu\text{g}$ /ウェルのエフリンB2プロモーター構築物で、 80 ng /ウェルpCEFL又はp vGPCR-CEFLと共にトランスフェクションした。ルシフェラーゼはトランスフェクション48時間後に測定され、誘導割合はグラフの右側に示される。pGL3Basicはプロモーターの無いルシフェラーゼコントロールベクターである。ルシフェラーゼは、GPCRが共トランスフェクトされた-ガラクトシダーゼの発現を誘起したために、蛋白質へ中和された。グラフは、複製物6個の平均 \pm SEMである。3個の複製物の同様な試験の1例を示す。

30

40

【0040】

図48は、VEGF及びVEGF-CがエフリンB2発現をレギュレートすることを示す

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ブ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。

【0041】

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HUVEC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。ウェスタンブロット法を、インハウスで生成されたエフリンB2に対するモノクローナル抗体で行った。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 1×10^5 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、HUVEC細胞をフィブロネクチンで被覆された8ウェルチャンバースライド上に接種した。HUVEC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。

10

20

【0042】

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。指数関数的成長期の細胞を、マトリゲル（商標）上にプレートする前に表示濃度のEphB4細胞外領域（ECD）で一晩処理した。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（ 1×10^5 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 ECD又はPBSを含有するマトリゲル（商標）プラグを、マウスの中央腹部内に皮下移植した。7日後、プラグを除去し、断片化し、H&Eで染色してマトリックス内への細胞移動を画像化した。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 ECDはほとんど完全にマトリゲル（商標）中への細胞の移動を阻害した。

30

40

【0043】

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

図52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

50

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 μ M) 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。下にクローン番号を示す。

図58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、SCC15/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 (mm³) である。 10

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。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60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、SCB4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 (mm³)、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 (mm³) を表す。

【0045】

20

図61はヒトEphB4のゲノムヌクレオチド配列を示す。

図62はヒトEphB4のcDNAヌクレオチド配列を示す。

図63はヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す。

図64はヒトエフリンB2のcDNAヌクレオチド配列を示す。

図65はヒトEphB4のアミノ酸配列を示す。

図66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

30

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。

【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でのその発現のために命名されたEphに関係する。それらはそれらの細胞外領域配列の関連性及びそれらのエフリン-A蛋白質又はエフリン-B蛋白質へ選択的に結合する能力を基礎として2個のサブグループへ分離される。エフリン-A蛋白質と選択的に相互作用するレセプターは、EphAレセプターであり、エフリン-B蛋白質と選択的に相互作用するものはEphBレセプターである。

10

【0050】

Ephレセプターは、リガンド結合球状領域、その次に一對のフィブロネクチンタイプIIIリピートが続くシステインリッチ領域から構成される細胞外領域を有する（例えば、図16参照）。細胞質領域は、2種の蛋白質チロシンキナーゼ領域、即ち無菌性-S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。

20

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

30

【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。

40

【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

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的に生産されるポリペプチドのスクリーニングにより得ることができる。更に、フラグメントは、従来のMerrifield固体相（合成法）f-Moc又はt-Boc化学等の公知の技術を使用して化学的に合成できる。フラグメントは（組み換え的に又は化学合成により）生産され、EphB4又はエフリンB2の機能を阻害するように働くことのできるそれらのペプチジルフラグメントを特定するために、例えば血管形成又は腫瘍増殖を阻害するフラグメントの能力の試験により試験されるてもよい。

【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いてもよい。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もある。それは、組み合わせ由来の変異体が天然可溶性ポリペプチドに関する選択的能力を有するように生成できる。これら変異体蛋白質は、組み換え型DNA構築物から発現された場合、遺伝子治療法プロトコル中に使用できる。同様に、突然変異誘発は、対応する野生型可溶性ポリペプチドとは劇的に異なる細胞内半減期を有する変異体を生み出すことが出来る。例えば、変異した蛋白質は、蛋白質分解性変質又は本発明の蛋白質（例えば、可溶性ポリペプチド）の分解さ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ヘライゲートされる。遺伝子の縮重セットの目的は、1の混合物中に能力のある可溶性ポリペプチド配列の目的とするセットをエンコードする全ての配列を提供することである。縮重オリゴヌクレオチドの合成法は当分野で公知である (例えば、Narang、SA (1983) tetrahedron 39:3; Itakuraら、(1981) 組み換え型DNA、Proc.第3回クリーブランドシンポジウム、Macromolecules、A G Walton編、アムステルダム:Elsevier pp273-289; Itakuraら、(1984) Annu.Rev.Biochem.53:323; Itakuraら、(1984) Science198: 1056; Ikeら、(1983) 「核酸」Res. 11:477参照)。これら技術は、他の蛋白質の直接的発展に使用されてきた (例えば、Scottら、(1990) Science、249:386-390; Robertsら、(1992) PNAS USA89:2429-2433; Devlinら、(1990) Science、249:404-406; Cwirlaら、(1990) PNAS USA87:6378-6382; 並びに米国特許番号第5223409号、5198346号、及び5096815号参照)。

【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) Biochemistry33: 1565-1572; Wangら、(1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balintら、(1993) Gene 137: 109-118; Grodbergら、(1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashimaら、(1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowmanら、(1991) Biochemistry30:10832-10838; 及びCunninghamら、(1989) Science244:1081-1085); リンカースキャニング突然変異誘発 (Gustinら、(1993) Virology193:653-660; Brownら、(1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnightら、(1982) Science232:316); 飽和突然変異誘発 (Meyersら、(1986) Science232:613); PCR突然変異誘発 (Leungら、(1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19); 又は化学突然変異誘発等のランダム突然変異誘発 (Millerら、(1992) 「細菌遺伝子学短期コース」CSHL出版、コールドスプリングハーバー、NY; 及びGreenerら、(1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34) 合成できる。リンカースキャニング突然変異誘発は、好ましくは組み合わせ的設定で、本発明の可溶性ポリペプチドの短縮された (生物活性な) 形を特定するために魅力的な方法である。

【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

ミ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】

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クリーニングを採用して、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 β -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-メチレンブソイドペプチド(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 20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)。

【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ニズ的性質、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。

【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ー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-、及びニックル-又はコバルト-複合樹脂等の、アフィニティー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、インフルエンザウィルス赤血球凝集素(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又はトロンピ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

10

20

30

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的に生産してもよい（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、遺伝子治療等の治療用として細胞又は患者へ直接に投与できる。

【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/又は非相同のヌクレオチド配列と融合されてもよく、DNAライブラリ中のものでもよい。

20

【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×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×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×SSCで50の低い緊縮から約0.2×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一定に保持されてもよい。例えば、本発明は6×SSC室温での低い緊縮条件下でハイブリダイズされ、次に2×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配列多型性はほ乳類細胞間に存在することが予測されている。当業者は、特別な蛋白質をエンコードする核酸の1以上のヌクレオチド(約3~5%までのヌクレオチド)中のこれらの変異は、天然対立遺伝子的変異により所定の種の被験体間に存在することを理解できる。これらヌクレオチド変異及び得られるアミノ酸多型性のいずれかが及び全ては本発明の範囲内である。

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。

【 0 0 7 2 】

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

10

【 0 0 7 3 】

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む発現ベクター中に提供される。調節配列は当分野で認識され、可溶性ポリペプチドの直接的発現のために選択される。従って、用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現調節要素を含む。例示的調節配列は、Goeddel「遺伝子発現技術：酵素学的方法」Academic Press、サンディエゴ、CA (1 9 9 0) に記載されている。例えば、動作可能なように結合された場合に 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 T7 RNA 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。

20

30

【 0 0 7 4 】

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む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。

40

【 0 0 7 5 】

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む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、培地及び他の副成分を含む。細胞培養物用の適切な培地は当分野で公知である。可溶性ポリペプチドは、蛋

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ンされた遺伝子又はそれらの一部をライゲートすることにより生産できる。組み換え型可溶性ポリペプチドの作成用の発現ビヒクルとして、プラスミド及び他のベクターが挙げられる。例えば、適切なベクターとして下記種類のプラスミドが挙げられる：E. coli等の原核細胞中の発現用の、pBR322由来プラスミド、pEMBL由来プラスミド、pEX由来プラスミド、pBta

10

【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。pcDNAI/amp、pcDNAI/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo及びpHyg由来ベクターは、真核細胞のトランスフェクションに適切なほ乳類発現ベクターの例である。これらのベクターのいくつかはpBR322等の細菌性プラスミドからの配列で改質されて、原核及び真核細胞の両方での複製及び耐薬品性選択を促進してもよい。又、ウシバピロームウイルス（BPV-1）、又はエプスタイン-バーウイルス（pHEBo、pREP由来及びp205由来）等のウイルス誘導体は、真核細胞中の蛋白質の一時的発現に使用出来る。他のウイルス性（レトロウイルスを含む）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SLC5A8ポリペプチドを発現することも好ましい。これらバキュロウイルス発現システムの例として、pVL由来ベクター（pVL1392、pVL1393及びpVL941等）、pAcUW由来ベクター（pAcUW1等）、並びにpBlueBac

20

30

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

40

【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

50

く（例えば、 $F(ab')_2$ 、 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 10
ュバント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タ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、骨髓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 of 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 40
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髓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 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、E L I S A、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 A B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）、ウェスタンブロット法、免疫沈殿アッセイ及び免疫組織化学法が挙げられる。

10

【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。

20

30

【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融合蛋白質の不活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性部分）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。

40

【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

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、マイクロタイタプレートのウェル）、カラム多孔質ガラス（ＣＰＧ）又はウェルの溶液中に浸漬されるピンが挙げられる。細胞又は精製蛋白質の固体担持体への結合は、直接的でも１以上のリンカー分子を介してでもよい。

【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。

10

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

20

30

【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、又は後に随時行っても良い。本発明の方法は、試験される化合物、選択された親和性マトリックス、及び溶離バッファ配合等の因子に依存して、種々の順序の変更が可能である。例えば、洗浄ステップ後、それに結合した化合物を有する融合蛋白質は、親和性マトリックスから適切な

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ビン切断部位等の開裂可能なリンカーを含有する場合、親和性リガンドからの開裂はそれへ結合した化合物との融合物の一部を溶離できる。結合された化合物は、次に融合蛋白質又はその開裂生成物から抽出等の適切な方法により溶離できる。

【0092】

V I . 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、トラコーマ、及び化膿性肉芽腫；免疫及び非免疫性炎症等の炎症性障害；慢性間接リウマチ及び乾癬；眼性血管形成病、例えば糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、黄斑改質、角膜移植拒絶、新血管の緑内障、後水晶体繊維増殖症、ルベオシス；オスラーウェバー症候群；心筋性血管形成；プラーク新生血管形成；毛細血管拡張症；血友病性関節；繊維血管腫；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 collaterals）、虚血肢血管形成、角膜障害、ルベオシス、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。

【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。

30

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。

【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種の治療に効果的ではあるが、多くの抗新生物性化合物は望ましくない副次的効果を誘起する。2以上の異なる治療が組み合わせられた場合に、それらの治療は相乗的に作用してそれぞれの治療の投薬量を減少させることを可能とすることが示され、その結果より高い投薬量ではそれぞれの化合物が発生させる有害な副作用効果を減少させる。又例えば、治療困難な悪性疾患でも2以上の異なる治療の併合治療法が効果を示す場合がある。

40

【0097】

50

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、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。

【 0 0 9 8 】

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、ピカルタミド、プレオマイシン、プセレリン、ブスルファン、カンプトテシン (camptothecin)、カペシタピン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、クロドロネート、コルヒチン、シクロホスファミド、シプロテロン、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドキシソルビシン、エピルビシン、エストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エキセメスタン、フィルグラスチム、フルダラビン、フルドロコルチゾン、フルオロウラシル、フルオロキシメステロン、フルタミド、ゲムシタピン、ゲニステイン、ゴセレリン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、イマチニブ、インターフェロン、イリノテカン、イロノテカン (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、メルカプトブリン、メスナ、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトーテン、ミトキサントロン、ニルタミド、ノコダゾール、オクトレオチド、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、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、トボテカン、トラスツツマブ、トレチノイン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン及びビノレルビン。

【 0 0 9 9 】

これらの化学療法の抗腫瘍化合物は、それらの作用機構により、例えば下記グループに分類できる：ピリミジンアナログ (5-フルオロウラシル、フロクスウリジン、カペシタピン、ゲムシタピン及びシタラビン) 及びプリンアナログ、葉酸アンタゴニスト並びに関連する抑制剤 (メルカプトブリン、チオグアニン、ペントスタチン及び2-クロロデオキシアダデノシン (クラドリピン)) 等の代謝拮抗物質 / 抗癌試薬；ピンカアルカロイド (ビンブラスチン、ピンクリスチン及びビノレルビン) 等の天然生成物、タキサン (パクリタキセル、ドセタキセル)、ピンクリスチン、ビンブラスチン、ノコダゾール、エポチロン及びナベルピン等の微少管破壊剤、エピジ (epidi) ポドフィロトキシン系 (エトポシド、テニポシド)、DNA 損傷剤 (アクチノマイシン、アムサクリン、アンスラサイクリン系、プレオマイシン、ブスルファン、カンプトセシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、サイトキサン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、ヘキサメチルメラミンオキサリプラチン、イフォスファミド、メルファラン、merchlorehtamine、マイトマイシン、ミトキサントロン、ニトロソウレア、プリカマイシン、プロカルバジン、タキソール、タキソテール、テニポシド、トリエチレンチオホスホルアミド及びエトポシド (VP 16)) 等の抗増殖性 / 細胞分裂抑制剤；ダクチノマイシン (アクチノマイシン D)、ダウノルビシン、ドキシソルビシン (アドリアマイシン)、イダルビシン、アンスラサイクリン系、ミトキサントロン、プレオマイシン、プリカマイシン (ミトラマイシン) 及びマイトマイシン等の抗生物質；酵素 (L-アスパラギンを全身的に新陳代謝させ、それら自身アスパラギンの合成能力を有さない細胞を除去する L-アスパラギナーゼ)；抗血小板試薬；窒素マスタード (メクロレタミン、シクロホスファミド及びアナログ、メルファラン、クロラムブシル)、エチレンイミン類及びメチルメラミン類 (ヘキサメチルメラミン及びチオテパ)、アルキルスルホネート-ブスルファン、ニトロソウレア類 (カルムスチン (BCNU) 及びアナログ、ス

トレプトゾシン)、トラゼン-ダカルバジニン(D T I C)等の抗増殖性/細胞分裂抑制アルキル化試薬;葉酸アナログ(メトトレキサート)等の抗増殖性/細胞分裂抑制代謝拮抗物質;白金配位錯体(シスプラチン、カルボプラチン)、プロカルバジン、ヒドロキシウレア、ミトーテン、アミノグルテチミド;ホルモン類、ホルモンアナログ(エストロゲン、タモキシフェン、ゴセレリン、ピカルタミド、ニルタミド)及びアロマターゼ阻害薬(レトロゾール、アナストロゾール);抗凝血剤(ヘパリン、合成ヘパリン塩及び他のトロンビン阻害薬);フィブリン溶解性試薬(組織プラスミノゲン活性化剤、ストレプトキナーゼ及びウロキナーゼ等)、アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ;抗遊走性試薬;抗分泌性試薬(brevealdin);免疫抑制剤(シクロスポリン、タクロリムス(F K - 5 0 6)、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(T N P - 4 7 0、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(V E G F)抑制剤、繊維芽細胞増殖因子(F G F)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(トラスツマブ);細胞周期停止剤及び分化誘起剤(トレチノイン);m T O R抑制剤、トポイソメラーゼ抑制剤(ドキソルピシン(アドリアマイシン)、アムサクリン、カンプトセシン、ダウノルピシン、ダクチノマイシン、エニボシド(eniposide)、エピルピシン、エトボシド、イダルピシン及びミトキサントロン、トポテカン、イリノテカン)、コルチコステロイド類(コーチゾン、デキサメタゾン、ハイドロコーチゾン、メチルベドニソロン、プレドニゾン及びプレニソロン);増殖因子シグナル変換キナーゼ抑制剤;ミトコンドリア性機能障害誘起剤及びカスパーゼ活性化剤;及びクロマチンかく乱剤。

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) b F G F (基本的繊維芽細胞増殖因子)等の「血管形成分子」の放出抑制剤;(2)抗 b F G F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-ペニシリンアミン及びチオリンゴ酸金塩等の関節炎薬、ビタミンD₃アナログ、 γ -インターフェロン等の血管形成刺激への内皮細胞応答抑制剤。更に血管形成抑制剤として、Bloodら、Bioch. Biophys. Acta、1032:89-118(1990)、Mosesら、Science、248:1408-1410(1990)、Ingberら、Lab. Invest. 59:44-51(1988)、及び米国特許番号第5092885号、5112946号、5192744号、5202352号、及び6573256号に記載されているものが挙げられる。更に、血管形成を阻害するために使用できる広い範囲の化合物があり、下記に例示される: V E G F-仲介された血管形成経路をブロックするペプチド又は試薬、エンドスタチン蛋白質又は誘導体、アンギオスタチンのリシン結合フラグメント、メラニン又はメラニン-促進化合物、プラスミノゲンフラグメント(例えばプラスミノゲンのクリングル1~3)、トロポイン(tropoin)サブユニット、ピトロネクチン_{v₃}のアンタゴニスト、サポシンB由来ペプチド、抗生物質又はアナログ(例えば、テトラサイクリン又はネオマイシン)、ジエノゲスト含有組成物、ペプチドへ連結されたM e t A P - 2阻害コアを含有する化合物、化合物E M - 1 3 8、カルコン及びそのアナログ、並びにN A A L A D a s e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、他の治療の実施中及び/又はその後に行われてもよい。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

【 0 1 0 2 】

V II . 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。

【 0 1 0 3 】

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

10

【 0 1 0 4 】

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。

20

【 0 1 0 5 】

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。

【 0 1 0 6 】

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

30

40

【 0 1 0 7 】

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

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、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル、並びにそれらの混合物等の他の溶剤、可溶化剤及び乳化剤が挙げられる。一方、不活性希釈剤、経口組成物も又湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、甘味剤、矯味剤、着色剤、香料及び保存薬等の添加剤を含有してもよい。

【0108】

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

10

【0109】

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

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する適切な水性及び非水性キャリアの例として、水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)及びそれらの適切な混合物、オリーブオイル等の植物性オイル、並びに、エチルオレアート等の注射用有機的エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチン等のコーティング材料の使用、分散体の場合必要な粒子径の維持及び界面活性剤の使用を行うことにより維持できる。

40

【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マイ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。

10

【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、直腸内又は腔内で溶解して活性化化合物を放出する。

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

20

30

【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(IgGFc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。

40

【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った。蛋白質の推定アミノ酸配列を図1~図5に示す。高純度の単離された蛋白質及びそれらの認識を、対応する抗エフリンB2及び抗EphB4モノクローナル又はポリクローナル抗体により確認した。組み換え型蛋白質は、予測される高親和性結合、結合競合及びそれらの対応する結合パートナーとの特異性性質を示し、それらは生物化学的アッセイにより確認

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。B 4 E C v 3 並びに B 2 E C 及び B 2 E C - F C 蛋白質は、ヒト内皮細胞の走化性をブロックし（ヘその緒及び肝臓性 A E C 又は V E C で試験した）、細胞外マトリックス（マトリゲル、商標）の変質の減少及び増殖因子刺激に対する応答における移動を減少させた（図 9 ～ 1 1）。B 4 E C v 3 及び B 2 E C - F C 蛋白質はそれらの内皮細胞管形成阻害により示される抗血管形成効果の能力を有する（図 1 2 ～ 1 3）。

10

【 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（インビトロジェン社製）、pIG（Novagen社製）又は p R K 5 をベースとした。pEF6 / V5-His-TOP0は、ヒト延長因子 1 a エンハンサー / プロモーター及びプラストサイジン耐性マーカーを含有する。pIGベクターは、C M V プロモーター調節下でヒトIgG1のF c 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、p R K 5 は一般的目的C M V プロモーター含有ほ乳類発現ベクターである。プラスミド構築物pEF6-B 4 E C - N T を生成するために、ヒトEphB4のc D N A フラグメントを、オリゴプライマー 5' - G G A 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 - 3' 及び 5' - T G G A T C C 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 C C A - 3' を使用してP C R 法で増幅し、pEF6 / V5-His-TOP0ベクターへT O P O - クローン化した。pEF6-h B 4 E C v 3 は、pEF6-B 4 E C N T に由来し、プラスミドD N A をE c o R V 及びB s t B I 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-B 4 E C - N T 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-h B 4 E C v 3 によりエンコードされた類似のB 4 E C v 3 蛋白質は、そのC-末端にV 5 エピトープ標識及び6 x H i s 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-h B 2 E C を、オリゴプライマー 5' - T G G A T C C A C C A T G G C T G T G A G A A G G G A C - 3' 及び 5' - A T T A A T G G T G A T G G T G A T G A T G A C T A C C C A C T T C G G A A C C G A G G A T G T T G T T C - 3' を使用した、エフリンB2 c D N A のP C R 増幅をし、pEF6 / V5-His-TOP0ベクター中へのT O P O - クロニングにより製造した。プラスミド構築物pIG-h B 2 E C - F C を、オリゴプライマー 5' - 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 - 3' 及び 5' - T A G G A T C C A 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 - 3' を使用した、エフリンB2 c D N A のP C R 増幅をし、それに続くT O P O - クロニングにより製造し、次に得られたP C R フラグメントをB a m H I 及びH i n d I I I により切断したpIGh IgG1 Fc融合発現ベクター内でサブクロニングして塩基配列決定した。同様に、pIG-h B 2 E C 及びpIG-h B 4 E C v 3 をオリゴプライマー 5' - A T A A G C T T C C G C C A T G G A G C T C C G G G T G C T G - 3' 及び 5' - T T G G A T C 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 C - 3' を使用して、EphB4 E C D c D N A のP C R 増幅部位を製造し、次にB a m H I 及びH i n d I I I 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。

20

30

40

【 0 1 2 2 】

2) ほ乳類細胞培養及びトランスフェクション；

H E K 2 9 3 T（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 M E M 中に保持した。細胞を5% C O₂ / 95% 空気湿生雰囲気下37℃で保持した。トランスフ

50

エクシオンをリポフェクタミン 2000 試薬（商標、インビトロジェン社製）を使用して製造者のプロトコルに従って行った。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 血清使用量低減培地（商標、インビトロジェン社製）中で 5 分間希釈し、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。10 cm 培養皿それぞれには、10 µg 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 10000 g で 20 分間遠心分離して清澄化し、0.2 µm フィルターを通してろ過して精製用に使用した。

【0123】

3) 安定な細胞系の構築；

EphB4 ECv3 及び EphB4 ECnt 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 10 µg/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ン展開を選択した。安定細胞確立後、それらを 4 µg/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ブロット法及び B2EC-AP 試薬結合競合アッセイで確認した。

【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、10 mM イミダゾール、0.3 M NaCl を補充し、20000 g 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。80 ml の得られた上澄みを、1 ml 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 10 ml/h で添加した。カラムを 10 ml の 50 mM Tris-HCl、0.3 M NaCl 及び 10 mM イミダゾール、pH 8 で洗浄後、残っている蛋白質を 3 ml の 0.25 M イミダゾールで溶離した。溶離した蛋白質を 20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl、pH 8 に対して一晚透析した。B4ECv3 の純度及び特性を、PAGE / クマシー G-250 法及び抗 EphB4 抗体を使用したウェスタンブ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。

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；

10 µl の Ni-NTA-アガロースをマイクロ遠心機用試験管中で、結合バッファ BB（20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl、0.1% ウシ血清アルブミン pH 8）中で希釈した 50 µl 表示量の B4ECv3 を使用してインキュベートした。振とう台上でのインキュベーション 30 分後、Ni-NTA ビーズを 1.4 ml の BB で 2 回洗浄し、次に 50 µl の B2-AP を使用して最終濃度 50 nM とした。結合を 30 分間振とう台上で行い、次に試験管を遠心分離し、1.4 ml の BB で 1 回洗浄した。沈降した AP 量を PNP 処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）

50 µl の BB 中に希釈された異なる量の B4ECv3 を、50 µl の 5 nM B2E

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B2EC - APを膜結合した完全長EphB4を発現するHEK293細胞5000と共に20分間沈降させた。結合反応を1.2mlのBBで希釈して停止し、次に10分間遠心分離した。上澄みを廃棄し、採取された細胞に関するアルカリホスファターゼ活性をパラ-ニトロフェニルホスフェート（PNPP）基質を添加して測定した。

【0127】

（細胞ベースの阻害）

B4ECv3を20mM Tris-HCl、0.15M NaCl、0.1% BSA、pH8中に連続的に希釈し、膜結合した完全長エフリンB2を発現するHEK293細胞5000と混合した。インキュベーション1時間後、50μlの5nM B4EC - AP試薬（EphB4外部ドメインと胎盤性アルカリホスファターゼとの蛋白質融合）をそれぞれの試験管中へ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APの比色分析的反応をPNPP基質で展開した。

【0128】

C. B4EC - 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）10μlのプロテインA - アガロースをエッペンドルフ型試験管中で、結合バッファBB（20mM Tris-HCl、0.15M NaCl、0.1% BSA、pH8）中に希釈した50μlの表示量のB4EC - FCと共にインキュベートした。振とう台上でインキュベーション30分間後、プロテインAアガロースビーズを1.4mlのBBで2回洗浄し、次に50μlのB2ECAP試薬を適用して最終濃度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）B4EC - FCを連続的に20mM Tris-HCl、0.15M NaCl、50μg/ml BSA、pH8中に希釈した。2μl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5nM B2EC - AP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20mM Tris-HCl、0.15M NaCl、50μg/ml BSA、pH8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. B4EC - FC阻害アッセイ；

（溶液中阻害）B4ECv3について記載した上記参照。結果を図7に示す。

（細胞ベースの阻害）B4ECv3について記載した上記参照。

E. 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）B4EC - FCについて記載した上記参照。結果を図8に示す。

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

【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）（ 1.5×10^3 ）を100μlのEBM-2（Clonetic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（100μl）をそれぞれのウェルへEBM-2培地中に2×目的濃度（5～7濃度レベル）で添加する。第0日に、1のプレートを20%メタノール中0.5%クリスタルバイオレットで10分間染色し、水で洗浄し、

空気乾燥する。残っているプレートを72時間37℃でインキュベートする。72時間後、プレートを20%メタノール中0.5%クリスタルバイオレットで染色し、水で洗浄し、空気乾燥する。染色は、エタノール：0.1M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（ピヒクル処理した細胞）割合としてプロットする。IC₅₀（50%阻害を発生する薬剤濃度）をプロットしたデータから算出する。

【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、HUVECをEGM-2（Clonetic社製、番号CC3162）中に濃度2×10⁵細胞/mlで調製する。試験化合物を2×目的濃度（5濃度レベル）で同一の培地中に調製する。細胞（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（IC₅₀）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DMEM培地のみ（ベースライン）又は化学走性誘因物質含有培地（bFGF、VEGF又はスリス3T3細胞条件付け培地）を配置する。上部チャンバーに試験化合物を含む又は含まないDMEM+1%BSA中で調製される45μlのHUVEC細胞懸濁液（1×10⁶細胞/ml）を配する。37℃で5時間インキュベーション後、膜をPBS中で洗浄し、Diff-Quick溶液中に固定化して染色する。フィルターをガラススライド上に、移動した細胞を下向きに配置し、上部の細胞をKimwipe（商標）を使用して除去する。試験は4～6複製物及びそれぞれのウェルからの5視野を計測して行う。陰性無刺激コントロール値を刺激されたコントロール及びドラッグ処理した値から除き、データを平均移動細胞±S.D.としてプロットする。IC₅₀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な十分なEphB4の異所性部位のサブドメインを特定するために、EphB4EC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、EphB及びEphAレセプターファミリーの他の構成員と同様に、N-末端リガンド結合球状領域、次にシステイン-リッチ領域及び2個のフィブロネクチン型IIIリピート（FNIII）を含有する。EphB4の完全異所性部位を含有する組み換え型B4-GCF2蛋白質に加え、球状領域及びCys-リッチ領域（B4-GC）を含有するEphB4ECの3個の欠失変異体を構築した；即ち、球状、Cys-リッチ及び第一のFNIII領域（GCF1）並びに削除された球状領域（CF2）を有するECD変異体。球状領域のみを含有する短縮されたEphB4EC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6xHis標識化組み換え型蛋白質を一時的にトランスフェクトされた培養乳類細胞中で予備的に発現し、条件付けした増殖培地からNi²⁺キレート樹脂上のクロマトグラフィーを使用して親和性精製して均質化した(図17)。明らかにそれらのグリコシル化を原因として、この蛋白質は34.7kDa(GC)、41.5(CF2)、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。

10

【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、CF2ではなくGC、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Ni²⁺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CF2ではなくGCF2、GCF1又はGC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。

20

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。

30

【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、投薬量依存性挙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挙動で非常に阻害された(図19)。又in vitroで可溶性EphB4のnMはHUV/ECSへ細胞毒性であったか否かを評価した。

40

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

50

った(図21)。反対に、bFGF及びVEGFを補充されたプラグは、プラグ全体に十分な血管形成及び脈管を生じた。 μg 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】

μg /投薬量での治療は、コントロールと比較してマトリゲルプラグ中への湿潤を非常に阻害した(図21)。可溶性EphB4-処理した細胞からの溶解産物及びリン酸(phosphor)-チロシンに対する抗体を使用してウェスタンブ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投与の阻害的效果を試験した。角膜マイクロポケット中へ移植されたHydron(商標)ペレットは、通常の血管面積中の血管形成を増殖因子の存在下で誘起できる。マウス角膜中の血管形成応答は中程度であり、血管芽の発生は遅れ、新しい毛細血管はまばらでゆっくりとしか成長しなかった。コントロールグループと比べて、移植7日目に、bFGFによりマウス角膜中で誘起された新生血管形成は、可溶性EphB4-処理したグループ中で顕著に阻害された(図24)。

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 mm^3 に達した。しかし、可溶性EphB4を注射した動物では増殖速度が非常に($p < 0.0$)減少し、最終腫瘍体積はたった mm^3 であった(図25)。類似の結果が更に2個のこれら腫瘍保持マウスの集団でも得られた。可溶性EphB4の投与は、動物の体重又は一般的健康に対する非常な効果を示さないでin vivoで耐薬物性に優れることが明らかになった(昏睡、断続的な背中の曲げ、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;

40

組織分析は、通常腫瘍細胞の生存縁部 μm 幅で囲まれている、全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

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、繊維素沈着はコントロール腫瘍より、内側生存縁部中の血管中及び周囲並びに可溶性EphB4処理した中心壊死性コアで増加した。可溶性EphB4処理した腫瘍の生存縁部の外側では、脈管管腔は空腔を保持し、赤血細胞を含有するが、繊維素沈着は多くの脈管周囲で顕著であった。可溶性EphB4は、試験された正常組織（肺、肝臓及び腎臓）中の内皮に対してはこれらの効果が無いことが発見された。

【 0 1 4 5 】

H . 材料及び方法 ;

1) 発現構築物 ;

可溶性用発現ベクターを生産するために、6 x H i s 標識化EphB4- E C D 変異体、クローン化された完全長ヒトEphB4 c D N A を下記オリゴプライマーを使用してP C R 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EphB4N - 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 (B 4 - G C) 、 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 (B 4 - G C F 1) 又はT 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 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 (B 4 - G C F 2) 。得られたP C R フラグメントを、E F - 1 プロモーター調節下でほ乳類発現ベクターpEF6 / V5-His-TOP0 (インビトロジェン社製) 中でT A - 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 ~ 5 2 2 (G C F 2) 、 1 ~ 4 1 2 (G C F 1) 及び 1 ~ 3 1 2 (G C) 。pEF6クローニング用のB 4 - C F 2 欠失 (アミノ酸 1 3 - 1 8 3) P C R フラグメントを生成するために、EphB4 c D N A 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P C R 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 T C C A A T 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 C T G C T C C C G C C A G C C C T C G C T 。

【 0 1 4 6 】

分泌されたヒトエフリンB2-アルカリホスファターゼ (B 2 - A P) 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 c D N A のP C R 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、H i n d I I I 及びB a m H I で消化して、H i n d I I I - B g 1 I I 消化されたp A P T a g 2 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。

【 0 1 4 7 】

2) 抗体及び他の試薬 ;

抗EphB4モノクローナル抗体m A B 7 9 及びm A B 2 3 をマウス中で、成熟ヒトEphB4のG C F 2 蛋白質含有アミノ酸 1 ~ 5 2 2 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4 G 1 0 はU B I 社 (レイクブラシッド、N Y) から得た。プロテインG - H R P 複合体はBio-Rad社から購入した。

【 0 1 4 8 】

3) EphB4由来の組み換え型蛋白質の発現及び精製 ;

EphB4- E C 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H E K 2 9 3 T 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2 0 0 0 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。1 2 ~ 1 6 時間トランスフェクション後、増殖培地 (D M E M + 1 0 % 胎児ウシ血清) を吸引し、細胞を血清フリーD M E M で1 回洗浄し、血清フリーD M E M で置換した。分泌さ

10

20

30

40

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、クマシーブルー又は銀染色法を使用したSDS-PAGE電気泳動、ウェスタンブロット法及びUV分光法により試験した。精製された蛋白質を、20mM Tris-HCl、0.15M NaCl、pH8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、10μl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、0.5mlの結合バッファBB(20mM Tris-HCl、0.15M NaCl、0.1%ウシ血清アルブミン、pH8)中に希釈した10～500ngサンプルのB4-ECD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1.4mlのBBで2回洗浄し、次にB2-AP融合蛋白質を濃度50nM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、1.4ml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420nm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、20mM HEPES(pH7.4)、100mM塩化ナトリウム、50mMフッ化ナトリウム、2mMのEDTA、2mMのEGTA、1mM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、1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド(新規に添加)及び100Uトラジロール(商標)を含有する1ml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、50μl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、25000g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50μl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25000gで30秒の遠心分離で採取した。上澄みを廃棄し、ビーズを1ml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%CO₂/95%空気湿生雰囲気下37℃で保持した。通常、細胞を接触するまで60mmディッシュ中で増殖し、10分間1μg/mlのRPMI中でマウスエフリンB2-Fc融合で処理してEphB4レセプター活性化するか、コントロールとして単純(plain)培地で処理した。EphB4レセプター活性化に対する可溶性EphB4ECD蛋白質の異なる誘導体の効果を試験するために、3セットの細胞を使用した。第一のセットで、細胞を種々の蛋白質(5蛋白質; GC、GCF1、GCF2、GCF2-F、CF2)で5μg/ml20分間処理した。第二セットの細胞では、適用前に、蛋白質を1:5(EphB4蛋白質:B2-Fc)モル比でエフリンB2-Fcと予備混合し、20分間インキュベートし、細胞上に10分間適用した。第三セットの細胞では、細胞を最初に蛋白質と20分間5μg/mlで処理し、培地を1μg/mlのエフリンB2-Fcを含有する新しい培地で置換し、更に10分間インキュベートした。

【0152】

刺激後、細胞を直ちに、20mM Tris-HCl、pH7.4、150mM NaCl、1%(v/v)TritonX100(商標)、1mMのEDTA、1mMのPMSF、1mMバナジン酸ナトリウムを含有する蛋白質抽出バッファで採取した。蛋白質抽出物を、14000rpm、20分間4℃遠心分離で清澄化した。清澄化蛋白質サンプルを抗EphB4モノクロー

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。I P 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 1 X S D S - P A G E サンプルローディングバッファ中で可溶化し、10 % S D S - P A G E で分離した。EphB4レセプター活性化試験のために、電気ブロッティングした膜を 1 : 1000 希釈の抗 p T y r 特異的抗体 4 G 10、次に 1 : 5000 希釈のプロテイン G - H R P 複合体でプローブした。

【0153】

6) 細胞培養 ;

正常 H U V E C は C a m b r e x (商標、Bio Whittaker社) として得て、0.1 mg / ml 内皮性成長補充物 (ウシ脳からの疎抽出物)、ペニシリン (50 U / ml)、ストレプトマイシン (50 U / ml)、2 mmol / l グルタミン及び 0.1 mg / ml ヘパリンナトリウムを補充した E B M 2 培地中で維持した。細胞のアリコートを手続き (継代) 1 及び 3 間は冷凍保存した。全実験中、H U V E C は手続き 4 以下で使し、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) (60 μ l の 10 mg / ml ; Collaborative Lab社製、カタログ番号 35423) を氷冷 96-ウェルプレートのそれぞれのウェル中に設置した。プレートを室温で 15 分間放置し、次に 37 で 30 分間インキュベートしてマトリゲル (商標) をポリマー化した。その間に、ヒトへその緒の静脈内皮細胞を、E G M - 2 (Clonetic社製、カタログ番号 C C 3 1 6 2) 中、濃度 2×10^5 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 (500 μ l) 及び $2 \times$ 蛋白質 (500 μ l) を混合し、200 μ l 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 (I C₅₀) 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、6.5 mm 直径、8 μ m 孔径、10 μ m 厚ポリカーボネート膜 (BD Biosciences社製)) を使用して評価した。200 μ l の E B M 中の H U V E C 細胞の懸濁液 (2×10^5 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、100 nM ~ 1 μ M 試験化合物の存在又は非存在下で 10 ~ 20 ng / 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イプし、フィルターを固定して Diff Quick (商標) で染色した。200 \times 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 \pm S.D. としてプロットした。I C₅₀ 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 (1.5×10^3 細胞) を 100 μ l の E B M - 2 (Clonetic社製、カタログ番号 C C 3 1 6 2) を含む 96-ウェルプレート中にプレートした。24 時間後 (第 0 日)、試験用組み換え型蛋白質 (100 μ l) をそれぞれのウェルへ E B M - 2 培地中に $2 \times$ 目的濃度 (5 ~ 7 濃度レベル) で添加した。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。IC₅₀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。

10

20

【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の詳細に従い行った。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ベレット（ポリヒドロキシエチルメタクリレート[ポリHEMA]、Interferon Sciences社製、ニューブランズウィック、NJ、米国）を作成した。手術用顕微鏡を使用して、間質性直線状角膜切開を外科用ブレード（商標、Bard-Parker社製、no.15）を使用して麻酔した動物の外側直筋の挿入物と平行に行った。基質内のマイクロポケットを、改良フongレーフェ刀（2'30mm）を使用して切開した。1個のベレットを移植し、一時的（temporal）角膜輪部（bFGFベレット用に0±7±1±0mm及びVEGFベレット用に0±5mm内）に対して進め、それぞれの増殖因子用のベ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ベレットに向かって延びる血管の応答を測定した。ここで示される新生血管形成の隣接した外周部のデータ及び臨床性写真はベレット移植後6日目に得られ、その日は最大血管形成応答日であることが明らかになった。

30

【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。HUVEC細胞を密度5×10³/ウェル細胞で培養インサートの上層中に接種し、24時間EphB4ECD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じ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

40

50

積)。

【0160】

13) マウス中のSCC15腫瘍の成長；

対数的に増殖するSCC15(頭部及び頸部扁平上皮細胞癌細胞系)を 5×10^6 細胞密度で、EphB4ECDの存在又は非存在下で、ヒトbFGF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(1:1v/v)と共に皮下注射し、2週間腫瘍を検査した。EphB4ECD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TUNEL-陽性アポトーシス又は壊死、CD34免疫染色法、及びBrdU増殖速度試験を、脱パラフィン化後、再水和し、内因性ペルオキシダーゼ活性のためにクエンチし、プロテアーゼKでの透過化処理で10分後行った。血管密度の量的評価も又行った。局部的腫瘍内デリバリー又はEphB4ECDのIVデリバリーも又、週2回行った。

10

【0161】

30胸腺欠損ヌードマウス、BALB/c(nu/nu)へ、0.1mlマトリゲルと混合した0.1mlPBS中の 1×10^6 B16黒色腫細胞をそれぞれ注射し、又は200 μ lのDMEM血清フリー培地中に再懸濁した 1.5×10^6 SCC15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 μ g/mgで腫瘍周囲に静脈内又は皮下注射し、2 μ g/mgの注射を週間毎に行い(10 μ g/g、50 μ g/kg/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PBS50 μ lを毎日投与された。

20

【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(5×10^6)をヌードマウスの背中皮膚に皮下接種した。腫瘍が約100mm³の大きさまで増殖した時に(通常12日かかった)、sEphB4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 μ mに断片化し、ヘマトキシリンエオシンで染色した。脈管密度をコンピュータベースの画像分析機を使用して半定量化した(それぞれのグループのマウス3頭からの断片当たり5視野)。

30

【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；

最初にウェスタンブロット法により種々の前立腺癌細胞系中でEphB4蛋白質の発現について試験した。前立腺癌細胞系は顕著な変異体を120kD EphB4中に豊富に示すことが見いだされた。レベルはPC3中で比較的高く、PC3M(PC3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(MLC)はEphB4の発現を僅か又は全く示さない(図27A)。次にPC3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)。

40

【0165】

B. 臨床性前立腺癌サンプル中のEphB4の発現；

EphB4が臨床性前立腺癌サンプル中で発現したか否かを決定するために、前立腺癌外科的標本からの腫瘍組織及び隣接した正常組織を試験した。前立腺標本中の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

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EphB4mRNA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EphB4mRNA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(Zhongら、2003、Cancer Biol Ther.2:179-184)、EphB4発現は、「正常」前立腺(MLC)、前立腺癌(PC3)及び転移性前立腺癌(PC3M)を検討した時には逆の発現パターンを有することを今回発見し(図27A)、RXRはEphB4の発現をレギュレートするのではないかと考えた。この関係を確認するために、EphB4の発現を構成的にRXRを発現するCWR22R及びCWR22R-RXR間で比較した。RXR過発現細胞系でのEphB4発現の適度な減少が発見された一方、FGF8はEphB4発現に効果がなかった。初期結果に適合するように、EphB4は「正常」良性前立腺肥大性細胞系BPH-1中に発見されなかった(図29B)。

【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；

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

【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 siRNA472は、EphB4蛋白質発現を効果的にノックダウンした(図31A)。siRNA472及びアンチセンスAS-10ODNの両方は、投薬量依存性挙動でPC3細胞の生存能力を減少した(図31C、D)。関係のないsiRNA又はセンスオリゴヌクレオチドは生存能力に効果がなかった。

【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PC3細胞の単層中に導入された場合、次の20時間のコースで、細胞はクリアな領域中へ進行的に移動した。しかし、細胞がsiRNA472でトランスフェクトされ、創傷が導入された場合、この移動は非常に阻害された(図31E)。PC3細胞の10 μ MのEphB4 AS-10による12時間の予備処理は、同じ効果を生じた(図31F)。更に、siRNA472を有するPC3細胞中EphB4発現のノックダウンは、コントロールsiRNAと比べてこれらの細胞のマトリゲル(商標)侵入能力を激しく減少させたことがダブル-チャンパー侵襲アッセイにより評価された(図31G)。

【0171】

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

EphB4のノックダウンは細胞生存能力減少を生じたために(図31C)、これが細胞周期に対する効果に起因するのかを検討した。コントロールsiRNAトランスフェクトした細胞との比較において、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、PC3細胞がコントロールsiRNAではなくsiRNA472でトランスフェクトされた場合に確認された(図32B)。100nMで、siRNA472トランスフェクトされた細胞中ではコントロールsiRNAトランスフェクトされたPC3細胞中よりも15倍多くアポトーシスを生じた。

10

20

【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)はインビトロジェン社(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)はカルピオケム社(サンディエゴ、CA)から購入した。

30

【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。

40

【0174】

3) 細胞系及び培養物

前立腺癌細胞系、PC3、PC3M、DU145、ALVA31、LAPC-4、LNCaP、CWR22R及び大人ヒト正常前立腺上皮細胞系MLC-SV40及びBPH-1を得て、上記記載のように培養した(7)。安定な細胞系CWR22R-RXR、LNCaP-FGF8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(ECD)をpGEX-4T-1中でクローン化し、GST-融合ECD(GST-ECD)を生成した。BL21 E. coli中でGST融合蛋白質として発現したEphB4 ECDを、アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、GST領域をトロン

50

ピンにより開裂した。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ブロット法により再確認した。

【0176】

5) ワンステップ RT-PCR 及び量的 RT-PCR ;

合計 RNA 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 RT-PCR 用にファーストストランド cDNA を 5 µg の合計 RNA 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 RT-PCR を StratageneMX3000P 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って行った。EphB4 及び β -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 (β -アクチン、5'-GGAGCCCTGACCTGACTAACCTA-3' ; EphB4、5'-AAGGAGGACCCTTCACCGTCTT-3') 及びリバープライマー (β -アクチン 5'-TTGAGAGGTTAGTTTCGTGGAT-3' ; EphB4、5'-TCGAGTCAGGTTTCAACAGTCAC-3') それぞれを使用して 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 DNA 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 RT 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。

【0177】

6) 免疫組織化学法 ;

OCCT-包埋した組織を 5 µm 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 PBS 中で洗浄し、内因性ペルオキシダーゼを 0.3 % H₂O₂ の PBS 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 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。3 回の PBS での洗浄後、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、バーリングガム、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ってヤギ 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。

【0178】

7) ウェスタンブロット法 ;

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、Basgavukke、TN) を使用して調製した。合計蛋白質を DC 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 µg 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 PVDF 膜へ電子転移させ、非特異的結合を 5 % 脱脂乳を含有する TBST 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 ウェスタンブ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、 β -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。

【0179】

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 % FBS 補充した RPMI 1

640、24時間)又は正常条件(10%FBS)中で培養し、次に1µg/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100µl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ブ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、インビトロジェン社製)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10cm²ディッシュ当たり、60µlのリポフェクタミン2000(商標)を使用して24µg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、ウェスタンブ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、2µg/ml中和IGF-1Rモノクローナル抗体、MAB391(Haileyら、2002、Mol Cancer Ther.1:1349-1353)、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ブ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】

11) 細胞生存能力アッセイ;

30

PC3細胞を48-ウェルプレート上に密度約1×10⁴細胞/ウェルで合計体積200µl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(1~10µM)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2×10⁴PC3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2µl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、接触するまで培養した。10µM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触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、 0.5×10^5 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、C A) 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 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ フィブロネクチンを含む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 1 0 0 % メタノール中で 1 5 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。

【 0 1 8 5 】

10

1 4) 細胞周期分析 ;

6 - ウェルプレート中の P C 3 細胞の 8 0 % 接触性培養物を siRNA 4 7 2 (1 0 0 n M) 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 2 4 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 で、 $50 \text{ g}/\text{ml}$ 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 Triton X100 (商 標) 及び $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ D n a s e - フリー R n a s e A を含む 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。

20

【 0 1 8 6 】

1 5) 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 8 0 % 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 ~ 1 0 0 n M) siRNA 4 7 2 又は 1 0 0 n M 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、 1×10^4 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む $20 \mu\text{l}$ 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ジン被覆された 9 6 - 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、サニーベイル、C A) で測定した。

30

【 0 1 8 7 】

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 (> 9 0 %) 、次が腹膜である (6 ~ 1 0 %) (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 8 0 % 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) 。

40

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 1 2 ~ 1 8 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

【 0 1 8 8 】

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 R N A 及び蛋白質レベルで決定した。R T - P C R 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 3 3 A) 。これらの細胞系中の蛋白質発現をウェスタンブロット法により決定した。EphB4の特異的バンドは 1 2 0 k D に見られた。更に、エフリンB2を、ウェスタンブロット法で試験された全細胞系中に 3 7 k D バンドとして検出した (図 3 3 B) 。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 2 9 3 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 N C I H 2 8 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 3 4) 。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 3 5) 。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 H 2 8 及び H 2 0 5 2 中に存在し、H 2 3 7 3 中では弱く検出可能であった。

【 0 1 8 9 】

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 3 5 、最下列) 。これらの結果は、中皮腫細胞系中での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 3 6 に示す。

【 0 1 9 0 】

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 H 2 8 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- 1 0 (図 3 7 A) であった。EphB4 siRNA 4 7 2 のトランスフェクションは、同じ効果を生じた (図 3 7 B) 。

M M 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 : 3 6) 。創傷がサブ接触性 H 2 8 細胞中へ導入された場合に、次の 2 8 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- 1 0 で 2 4 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 3 8 A) 。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 3 8 B) 。

【 0 1 9 1 】

D . 材料及び方法 ;

1) 細胞系及び試薬 ;

N C I H 2 8 、 N C I H 2 0 5 2 、 N C I H 2 3 7 3 、 M S T O 2 1 1 H 中皮腫細胞系及び 2 9 3 ヒト胎児腎臓細胞をATCC社 (マナサス、V A) から得た。細胞を 1 0 % 熱不活性化胎児ウシ血清 (F B S ; Life Technologies社製、ゲイザーズバーグ、M D) 及び抗生物質を補充した R P M I 1 6 4 0 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ホスホロ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ブロット法に使用した。エフリンB2及びEphB4 (C - 1 6) 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）はサントクルス社から得た。

【0192】

2) RT-PCR;

合計RNAをランダム六量体（インビトロジェン社製）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'-GGAGCCAAAGGGTCAATCAT-3'；G3PDHリバースプライマー、5'-GGCATTTGCTGCAAGAGAAAGAG-3'；Clonetics（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）を使用してクローン化した。プライマー及びPCR生成物は、5'-tccgtgtggaagtactgtg-3'（フォワード）、5'-tctgtgtttggcaccagttag-3'（リバース）ではエフリン-B2用に、296-bp生成物を生成し、5'-cttttgggaagagaccctgtg-3'（フォワード）、5'-agacgggtgaagggtctcccttg-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0.1NHCl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、pH8.0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

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 I M M U - M O U N T (商標、Shandon社製、アストムーア、U K) でマウントした。

【 0 1 9 5 】

5) ウェスタンブロット法 ;

疎細胞溶解産物を細胞溶解バッファ (1 0 m M トリス、p H 7 . 5 、 1 m M の E D T A 、 1 5 0 m M N a C l 、 1 % TritonX100 (商標) 、 1 m M の D T T 、 1 0 % 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 1 0 0 0 0 × g で 1 0 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 (2 0 μ g 蛋白質) を 4 - 2 0 % 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リド (P V D T) 膜 (Bio-Rad 社製) へ電気ブ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 : 5 0 0 0 希釈) で 4 、 1 6 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 : 1 0 0 0 0 0 希釈) を 1 時間 2 5 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、I L) を使用して展開した。

【 0 1 9 6 】

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、1 0 % ヤギ血清で - 7 0 で 1 0 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 : 1 0 0) で 4 ー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。

【 0 1 9 7 】

7) 免疫蛍光研究 ;

細胞を Labtech I I (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 p H 7 . 4 (P B S) 溶液中で 3 0 分間固定化した。スライドを P B S で 2 回洗浄し、ブロッキングバッファ (0 . 2 % TritonX100 (商標) 、 1 % B S A の P B S 溶液) で 2 0 分間ブ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 : 1 0 0 希釈 P B S 溶液) で 4 で 1 6 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-アルドリッチ社製、セントルイス、M O) 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 (D A P I) で対比染色し、十分に P B S で洗浄し、Vecta sheild 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 A X 7 0 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、M I) デジタル画像化システムを使用して得た。

【 0 1 9 8 】

8) 細胞生存能力アッセイ ;

細胞を密度 5×10^3 / ウェル (4 8 - 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、細胞を種々の濃度 (1 ~ 1 0 μ M) 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ブロマイド (M T T) を使用して最終濃度 0 . 5 m g / m l 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 (9 0 % イソプロパノール、0 . 5 % S D S 及び 4 0 m M H C l) 中に溶解した。光学密度は E L I S A リーダーで 4 9 0 n m で、イソプロパノール (Molecular Devices 社製、C A) をブランクとして使用して測定した。

【 0 1 9 9 】

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6cmプレート上に24時間接種し、次に5%FBS含有培地へスイッチした。EphB4アンチセンス10(10 μ M)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(HNSCC)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80000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十分な頻度で発生し、この病気の決定的な形質変換事由であると考えられる劇的な表現型変化を生じる。これらの変化として、p53腫瘍抑制剤の突然変異、表皮増殖因子レセプター(EGFR)の過発現及びサイクリン依存性キナーゼインヒビターp16の不活性化が挙げられる。他の変化として、Rb突然変異、ras活性化、サイクリンD増幅、及びmyc過発現等は、HNSCC中ではより頻度が低い。高いEphB4の発現は血液性悪性疾患、乳癌、子宮内膜癌及び腸癌中で報告されているが、EphB4蛋白質レベルに対しては限られたデータしかなく、HNSCC等のこの蛋白質の腫瘍生物学に対する生物学的有意性データは完全に欠落している。

【0202】

A. HNSCC腫瘍はEphB4を発現する；

免疫組織化学法(in situハイブリダイゼーション)及びウェスタンブロット法によりヒト腫瘍組織中でEphB4の発現を研究した。12個の採取された有望な腫瘍組織を、IRB認定に従って、EphB及びEphAファミリーの他の構成員と反応しない特異的EphB4モノクローナル抗体と評価した。EphB4発現を染色強度を変化させて全ケースで観察する。図39A(左上)は代表的ケースを示し、H&E腫瘍構造で明らかのように、EphB4は腫瘍領域中のみで発現したことを示す(図39A左下)。ストロマ中のEphB4の着色がないことに注目すべきである。第二に、リンパ節中の転移性腫瘍部位は陽性染色法を示し、一方リンパ節の残りの部分は陰性のままである(図39A、右上)。

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

【0204】

B. HNSCCの主要な転移性部位での高いEphB4の発現；

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

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が最小で観察された。

【0205】

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

腫瘍細胞に限定されるEphB4の発現を示した後、次にHNSCC中のEphB4発現のin vitroモデルがあるかどうかの決定を試みた。6個のHNSCC細胞系をEphB4蛋白質発現についてウェスタンブロット法により検討した(図40A)。これらの大部分は強いEphB4発現を示し、その結果次の研究の基礎を確立した。EGFRは強くHNSCCと関係するために、EphB4発現はEGFRの活性化と関係するかを検討した。EGFR陽性細胞系であるSCC-15でのパイロット実験は、最適時間は24時間であり濃度1mMの特異的EGFRキナーゼ阻害剤AG1478(図40B)がEphB4の発現を阻害することを確認した。全細胞系を試験して、全体で活発なEGFR発現があるが、SCC-4では検出可能であるが強いことを示された(図40C、上段)。EGFR阻害剤AG1478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(SCC-15及びSCC-25)で観察された一方、他では効果は観察されなかった(SCC-9、-12、-13及び-71)。従って、SCC-15及び-25は、EGFR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、SCC-9、-12、-13及び-71は、EGFR活性とは関係のないHNSCC中のEphB4のレギュレーションのモデルであり、その場合、p53、PTEN、IL-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EGFR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。

10

20

【0206】

明らかに、構成的EGFRシグナルの阻害はSCC15細胞中のEphB4レベルを抑制した。次にEGF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/mlEGFでの24時間処理の前に24時間血清飢餓状態にされたSCC15細胞中で誘起された(列1及び2)。図41Aに示されるEGFR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EGF仲介されたEphB4の誘導へのそれらのインプットを検討した。特異的キナーゼ抑制剤U73122、SH-5及びSP600125での、PLC γ 、AKT及びJNK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、EGF刺激されたEphB4の誘導をブロックした(図41B、列3~8)。反対に、ERK1/2のPD098095での阻害及びP13-KのLY294002又はウォルトマニンでの阻害は、EphB4レベルのEGF誘導に対する検出可能な効果を示さなかった。しかし、ERK1/2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、SB203580でのp38MAPK活性の阻害は基底を増加したが、EGFはEphB4レベルを誘起しなかった。類似の結果がSCC25細胞系でも見られた(データは記載しない)。

30

【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、siRNA又はAS-ODN法を使用して発現除去効果を検討して、HNSCCにおけるEphB4発現作用を研究した。EphB4配列への数個のsiRNA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。siRNA50及び472でトランスフェクトされたSCC-15、-25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 siRNA1562及び2302又はエフリンB2siRNA254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SCC-4中では(参照図40A)、細胞生存能力の減少は生じなかった。siRNA50及び472処理で見られた細胞生存能力減少はサブG0での細胞の蓄積のせいであり、アポトーシスを示す。この効果は、時間及び投薬量両方に依存する(図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siRNA2302は、mockリポフェクタミン2

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	s i R N A 配列
Eph B4 50:	5' -GAGACCCUGCUGAACACAAUU-3' 3' -UUCUCUGGGACGACUUGUGUU-5'
Eph B4 472:	5' -GGUGAAUGUCAAGACGCUGUU-3' 3' -UCCACUUACAGUUCUGCGAC-5'
Eph B4 1562:	5' -CAUCACAGCCAGACCCAACUU-3' 3' -UUGUAGUGUCGGUCUGGGUUG-5'
Eph B4 2302	5' -CUCUCCGAUCCCACCUACUU-3' 3' -UUGAGAAGGCUAGGGUGGAUG-5'

10

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

10

20

30

40

50

【0210】

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

【0211】

E. EphB4は細胞移動をレギュレートする；

次にEphB4がHNSCCの移動に作用するかを決定しようとした。

移動への寄与は、成長及び転移と関係する。移動は、創傷治癒/スクレープアッセイを使用して評価した。接触性SCC15及びSCC25培養物を、無菌性プラスチックパスツールピペットを使用した単回スクレープにより創傷し、境界を明確に定める3mm帯を残した。試験化合物の存在下での細胞の清澄化領域中への移動を、24、48及び72時間後に評価して定量化した。図43Dに示されるように、細胞移動はEphB4発現をブロックするAS-10へ応答して顕著に減少した一方、不活性化化合物のAS-1及びスクランブ

ルされたODNは効果が無いかほとんどなかった。AS-10による移動の阻害も又ボイデンドラブルチャンバー（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。

10

【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；インビトロジェン社製、カールスバッド、CA）及び抗生物質を補充したRPMI 1640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ブロッキングペプチドは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。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。

20

【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。

30

【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 一晚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% H₂O₂のPBS溶液中10分間室温でのインキュベーションによりブロックした。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、パーリングラム、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ンで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。

40

50

【0216】

5) ウェスタンブロット法；

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、19bp下流の5'-AAジヌクレオチドを含有する21bp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

同性を示さないことを特定した。センス及びアンチセンスsiRNA29マー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8bp（5'-CCCTGTC

10

【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T7RNA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フリーデオ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マー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。

20

【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

10

20

【0219】

7) 細胞生存能力アッセイ;

細胞を、0日目に密度 5×10^3 / 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 ($1 \sim 10 \mu\text{g} / \text{ml}$) 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ブロマイド (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 2×10^4 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 $2 \mu\text{l}$ のリポフェクタミン2000 (商標) を使用して siRNA ($10 \sim 100 \text{ nM}$) 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RPMI 1640) 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。

30

【0220】

8) 細胞周期分析;

SCC 15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 siRNA 472 (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、50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 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 $\mu\text{g} / \text{ml}$ DNase-フリーRNase Aを含有する1mlの低張性溶液中でインキュベートした。細胞をUSC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、細胞をプロセッシング36時間前に5 μM ODNへ曝した。

40

50

【 0 2 2 1 】

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 μ 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ブ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。

【 0 2 2 2 】

1 0) 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 μ 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。1 0 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。

【 0 2 2 3 】

1 1) I n v i v o 研究 ;

S C C 1 5 (5 \times 1 0 ⁶ 細胞) を 5 週齢オス Balb / C N u ⁺ / n u ⁺ 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 μ 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。

【 0 2 2 4 】

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

カボジ肉腫 (K S) は多病巣性血管増殖性病として、最も通常は皮膚及び粘膜に現れ、次に内臓器官への拡大する (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レセプター、V E G F R - 1 (F l t - 1)、V E G F R - 2 (F l k - 1 / K D R)、V E G F R - 3 (F l t - 4)、T i e - 1 及び T i e - 2 (3、R M & P S G 未公開データ) が挙げられる。K S 細胞は L Y V E 及びポドプラニン等のリンパ性内皮細胞関係蛋白質と共発現する (4)。

【 0 2 2 5 】

ヘルペスウイルス 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イルス中の 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 腫瘍がウイルス性ゲノムを含有することが示された。血清疫学研究は、K S で H I V 感染した患者は最高の H H V - 8 有病率を有すること、及び第二に H I V 感染しているが K S に罹患していない患者は、同様に H H V - 8 血清陽性である場合、それ以降の数年にわたり K S 発生のリスクが増加することを示した (6)。H H V - 8 の K S への作用の直接的証拠は、H H V - 8 感染後の骨髓内皮細胞の形質転換 (改質) である (7)。多くの H H V - 8 エンコードする遺伝子は、細胞性形質転換 (改質) をもたらす (8 参照)。しかし、最大の証拠は、この役割における G プロテイン結合レセプター (v G P C R) について蓄積された (9)。

K S 腫瘍細胞は動脈性又は静脈性内皮由来かを検討した。更に、H H V - 8 は K S モデ

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

【 0 2 2 6 】

A . K S 腫瘍は、EphB4ではなくエフリンB2を発現する；

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

【 0 2 2 7 】

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

次にK S の病因性要因と思われるH H V - 8 は、それ自身で内皮細胞中でのエフリンB2の発現を誘起しEphB4発現を抑制できるかを検討した。H U V E C 及びH H V - 8 と有効感染させたB C - 1 リンパ腫細胞の共培養は、内皮細胞の効果的感染を生じた(16)。十分な洗浄後に残っている内皮細胞の付着単層を、エフリンB2及びEphB4についてR T - P C R 及び免疫蛍光により試験した。H U V E C は、EphB4静脈性マーカーをR N A レベルで強く発現したが、エフリンB2は発現しなかった(図46B)。反対に、H H V - 8 感染させた培養物(H U V E C / B C - 1 及びH U V E C / B C - 3) はエフリンB2を発現する一方、EphB4転写物はほとんど見られなかった。

【 0 2 2 8 】

H U V E C 及びH U V E C / H H V - 8 の培養物の、動脈 / 静脈マーカー及びウィルス性蛋白質についての免疫蛍光分析を、R N A 中に見られるものを反映する蛋白質発現中に変化があるかを決定するために行った。更に、蛋白質の細胞性局在化も決定できた。R T - P C R データに適合するように、H U V E C はエフリンB2陰性及びEphB4陽性であった(図46A (a & m)) 。予測されるように、それらは核抗原(L A N A 1) と関連するH H V - 8 潜伏を全く発現しなかった(図46A (b , n)) 。H H V - 8 で有効に感染させたB C - 1 細胞の共培養は、ウィルス性蛋白質L A N A 1 及びO R F 5 9 の存在で示されるようにH U V E C の感染を生じた(図46A (f , r)) 。H H V - 8 感染させたH U V E C は、今やエフリンB2を発現するがEphB4を発現しない(図46Aそれぞれ(e , q , u)) 。エフリンB2及びL A N A 1 共クラスターの発現は、併合画像中に黄色シグナルで示される(図46A (h)) 。エフリンB2陽性でEphB4陰性のH H V - 8 感染させたH U V E C は、同様に動脈性マーカーC D 1 4 8 を発現する(19)(図46A (j , v))

。エフリンB2及びC D 1 4 8 共クラスターの発現は、併合画像中に黄色シグナルで示される(図4 6 A (1))。未感染の、EphB4発現H U V E CはC D 1 4 8 に陰性であった(記載せず)。

【0 2 2 9】

C . H H V - 8 v G P C RはエフリンB2発現を誘起する；

個々のウィルス性蛋白質は全体のウィルスで観察されるエフリンB2の発現を誘起できるかを試験するために、K S - S L K細胞をH H V - 8 L A N A、又はL A N A 4 4 0又はv G P C Rで確実にトランスフェクトした。安定なクローンのウェスタンブロット法で、v G P C RでトランスフェクトされたK S - S L K中では、S L K - L A N A又はS L K - L A N A 4 4 0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4 7 A)。ベクター単独(p C E F L)でトランスフェクトされたS L Kを、コントロールとして使用した。S L K - v G P C R及びS L K - p C E F L細胞も又、一時的にトランスフェクトされたK S - S L K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4 7 Bは、S L K - p C E F Lと比較してS L K - v G P C R細胞中でより高いエフリンB2発現を示す。S L K - p C E F Lと比較してS L K - v G P C R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S L K - v G P C R細胞はS L K - p C E F 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、H H V - 8のv G P C Rは、K S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。H H V - 8はH U V E C中のエフリンB2の発現を誘起することは上記に示されているので、次にこれは、転写的効果により仲介されるかどうかを試験した。エフリンB2 5'-フランキングDNA-ルシフェラーゼレポータープラスミドは、下記「材料及び方法」欄に示されるように構成され、H U V E C中に一時的にトランスフェクトされた。エフリンB2 5'-フランキングDNA配列-2 4 9 1 / -1 1は、H U V E C細胞中で最小活性を有する(図4 7 C)。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H U V E C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。H H V - 8 v G P C R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p C E F 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-2 4 9 1 / -1 1、-1 2 4 2 / -1 1、又は-5 7 7 / -1 1で観察され、それは、最大活性は-1 2 4 2 / -1 1ルシフェラーゼ構築物で観察されるにもかかわらず、-5 7 7及び-1 1間の要素がv G P C Rへの応答を媒介するのに充分であることを表す。

【0 2 3 0】

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

次に公知のK S増殖因子はエフリンB2発現のv G P C R-仲介された誘導中に含まれるかを検討した。S L K - v G P C R細胞をオンコスタチン-M、I L - 6、I L - 8、V E G F又はV E G F - Cの中和抗体で36時間処理した。図4 8 Aは、V E G Fの中和は、S L K - v G P C R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、V E G F - C及びI L - 8の中和で観察された。オンコスタチン-M又はI L - 6の中和で測定可能な効果は観察されなかった。V E G F及びV E G F - 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、H U V E CをV E G F、V E G F - C又はE G Fで処理した。H U V E Cは、2種の異なる濃度の個々の増殖因子(10 ng、100 ng / ml)を有する5% F B Sを含有するE B M - 2培地中で48時間増殖した。V E G F - A又はV E G F - Cのみが投薬量依存性挙動でエフリンB2発現を誘起した(図4 8 B)。反対に、E G FはエフリンB2の発現に効果がなかった。

【0 2 3 1】

E . エフリンB2 siRNAはK S中のエフリンB2発現を抑制する；

3個のエフリンB2 siRNAを「方法」段落記載のように合成した。K S - S L K細胞をsiRNAでトランスフェクトして48時間後、エフリンB2発現をウェスタンブロット法により決定した。エフリンB2 siRNA 1 3 7又は2 5 4は、siRNA EphB4 5 0又はsiRNA G F P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 6 3 s

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HUEC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、HUEC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HUECの成長を劇的に減少した。反対に、HUEC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HUEC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HUEC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(HUEC)をClonetic社(サンディエゴ、CA)から入手し、EGM-2及びEGM-2MV培地中でそれぞれ維持した。T1ヒト繊維芽細胞系は、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pKS vGPCR-CFEL及びpCFEL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所的麻酔下で得た。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) ジ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。确实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

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。

【 0 2 3 6 】

【 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		
ephrin B2	5'-TCC GTG TGG AGT ACT GCT G-3'	296
	5'-TCT GGT TTG GCA CAG TTG AG-3'	
EphB4	5'-CTT TGG AAG AGA CCC TGC TG-3'	297
	5'-AGA CGG TGA AGG TCT CCT TG-3'	
RT-PCR Primers		
ephrin B2	5'-AGA CAA GAG CCA TGA AGA TC-3'	200
	5'-GGA TCC CAC TTC GGA CCC GAG-3'	
EphB4	5'-TCA GGT CAC TGC ATT GAA CGG G-3'	400
	5'-AAC TCG CTC TCA TCC AGT T-3'	
β -actin	5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3'	546
	5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'	

【 0 2 3 7 】

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) HUVEC 及び BC-1 の共培養；

HUVEC 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、ナパービル、IL）上で EGM-2 と 50 ~ 70 % 接触まで増殖した。BC-1 又は BC-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、BC-1 又は BC-3 細胞を TPA (20 ng/ml) で予備処理し、48 時間ウイルス誘起し、次に HUVEC 培養物へ 10 : 1 の割合で添加し、共培養を 2 日間行った。HUVEC を十分に PBS で洗浄して付着した BC-1 又は BC-3 細胞を除去した。

【 0 2 3 8 】

6) cDNA 及び RT-PCR の調製；

チタニウムワンステップ RT-PCR キット（商標、Clontech 社、パロアルト、CA）を 1×10^5 細胞から RT-PCR 用に使用した。EphB4 増幅用のプライマー対、エフリン B2 及び β -アクチンを表 4 に示す。それぞれの PCR 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。PCR 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 1×10^4 / 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ブロマイド (M T T) 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 11 (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 p H 7 . 4 (P B S) 溶液中で 30 分間固定化した。スライドを 2 回 P B S で洗浄し、ブロッキングバッファ (0 . 2 % TritonX100、1 % B S A の P B S 溶液) で 20 分間プレインキュベートし、次に EphB4、エフリン B2、C D 1 4 8、L A N A 1 又は O R F 5 9 (1 : 100 希釈の P B S 溶液) に対する抗体で、ブロッキングバッファ中、4 で 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 - アルドリッチ社製、セントルイス、M O) 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 (D A P I) で対比染色し、十分に P B S で洗浄して Vecta sheild antifade mounting 溶液 (商標、ベクターラボラトリーズ社製、バーリングガム、C A) でマウントした。画像をオリンパス社製 A X 70 20 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、M I) 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 - F c 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 % F B S でブロックした凍結断片を、5 μ g / ml の EphB4 / F c (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 μ g / ml ウサギ抗ヒト IgG - F I T C の P B S 溶液 (Jackson ImmunoResearch ラボラトリーズ社製、ウェストグロブ、P A) で室温で 1 時間インキュベートした。核を D A P I で対比染色し、断片を上記のようにマウントした。ヒト F c (Jackson ImmunoResearch 社製) を陰性コントロールとして使用した。

30

【0242】

9) ウェスタンブロット法;

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 で 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 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 (商標、Pierce 社製、ロックフォード、I L) を使用して展開した。膜を Restore ウェスタンブ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 α - アクチンで再プローブした。

40

【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、M A) 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 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。指数関数的成長をする H U V E C 又は K S - S L K を、2 又は 8 μ g / ml の EphB4 - E C D 又はコントロールとしての P B S 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。

50

【 0 2 4 4 】

1 1) 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B2cDNA (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性を示さなかった。センス及びアンチセンスsiRNA29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'-CCCCGTGTCCTC-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T78bp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T7RNA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。

【 0 2 4 5 】

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。

【 0 2 4 6 】

【 表 5 】

Table 5: siRNAs of ephrin B2 and EphB4.

ephrin B2 264	5'-GCAGACAGAUACACUAUUUAUU-3' 3'-UUCGUCUGUCUACGUGAUAAU-5'
ephrin B2 63:	5'-CUGCGAUUUCCAAUUCGAUUU-3' 3'-UUGACGCUAAAGGUUUAGCUA-5'
ephrin B2 137:	5'-GGACUGGUACUAUACCCACUU-3' 3'-UCCUGACCAUGAUUAGGGUG-5'
Eph B4 50:	5'-GAGACCCUGCUGAACACAAUU-3' 3'-UUCUCUGGGACGACUUGUGUU-5'
GFP	5'-CGCUGACCCUGAAGUUCAUUU-3' 3'-UUGCGACUGGGACUUCAGUA-5'

【 0 2 4 7 】

1 2) 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

キット（商標）補充剤 b F G F、h E G F 及び R³-I G F-I を補充された E B M-2、又は 5 % F C S 及び 1 0 n g / m l r h V E G F（商標、R & D システムズ社製）を補充された E B M-2 のいずれかで交換した。3 7 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 2 0 0 0（商標、インビトロジェン社製、1 μ g / m l）を使用して 1 0 n M の特異的 siRNA 含有 O p t i-M E M-1 血清フリー培地（商標、インビトロジェン社製）中でトランスフェクトした。2 時間 O p t i-M E M-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。4 8 時間後、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、直ちに 1 0 × 倍率で画像を撮った。

【0248】

1 3) 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'-フランキング DNA の翻訳開始部位に関して -2 4 9 1 ~ -1 1 を、B A C P A C クローン R P 1 1-2 9 7 1 6（商標、Bac Pac Resources 小児病院、オークランド、C A）から、アドバンテージ G C ゲノム P C R キット（商標、Clontech 社、パロアルト、C A）を使用して、ターゲット面積中の C G-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 M l u I 部位を含有する様に設計した。増幅した生成物を M l u I で消化し、ゲル精製し、p G L 3 B a s i c（商標、Promega 社製、マジソン、W I）中の複数のクローニング部位中の M l u I 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 p E F N B 2 .₂^{491/-11} luc を表示した。このクローンの K p n I 又は S a c I いずれかとの消化、その次の再環化は、それぞれ p E F N B 2 ._{1242/-11} luc 及び p E F N B 2 ._{577/-11} 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、C A）を使用して精製した。

【0249】

1 4) 一時的トランスフェクション；

E G M-2 培地中に維持された H U V E C 細胞（0 . 8 × 1 0⁴ 細胞 / ウェル、2 4 ウェルプレート中）は、0 . 5 μ g / 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、5 0 n g / ウェルの p C E F L 又は p K S v G P C R-C E F 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 4 8 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。p C E F L-v G P C R が p C M V-S p o r t-g a l（商標、インビトロジェン社製）から -ガラク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。

1 5) EphB4 細胞外領域（E C D）蛋白質の構築及び精製；

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

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

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

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

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

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

10

20

30

40

50

【 0 2 5 1 】

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

EphB4を発現する細胞系を合成ホスホロチオアート改質オリゴヌクレオチドで処理し、24時間後に採取した。細胞溶解産物を調製し、ウェスタンブロット法分析により、EphB4の相対的量を未処理のコントロール細胞と比較してプローブした。

細胞増殖の阻害に関する研究は、発現EphB4発現を特徴とするHNSCC細胞系中で行った。細胞生存能力の損失は、EphB4発現のロ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。EphB4RNAiプローブに対する結果を下記表7にまとめた。

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EphB4RNAiプローブによるEphB4遺伝子発現の阻害を示す。

【 0 2 5 2 】

【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

【 0 2 5 3 】

【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	(2643-2662)	++	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 GCT 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 GGC 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 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 TCT 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

【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 CCG 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 GGC 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)		

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	aaattggaaactgctgatctg 466		
2	447	aattggaaactgctgatctga 467	+++	70
3	453	aaactgctgatctgaagtggg 473	++++	70
4	454	aactgctgatctgaagtgggt 474	+++	80
5	854	aatgtcaagacgctgcgtctg 874	+++	65
6	467	aagtgggtgacattccctcag 487	+	35
7	848	aaggtgaatgtcaagacgctg 868	++	50

10

【 0 2 5 7 】

【表 7 - 2】

8	698	aaggagaccttcacogtcttc	718	+++	75
9	959	aaaaagtgcgcccagctgact	979	+	40
10	1247	aatagccactctaaccatt	1267	++	50
11	1259	aacaccattggatcagccgtc	1279	++	50
12	1652	aatgtcaccactgaccgagag	1672	+	35
13	1784	aaataccatgagaagggcgcc	1804	+++	65
14	1832	aagacgtcagaaaaccgggca	1852	+	30
15	1938	aacatcacagccagaccaac	19	++	50
16	2069	aagcagagcaatgggagagaa	2089	++++	75
17	2078	aatgggagagaagcagaatat	2098	+++	65
18	2088	aagcagaatatccggacaaac	2108	+++	70
19	2094	aatattcggacaaacacggac	2114	++	40
20	2105	aaacacggacagtatctcatc	2125	++	50
21	2106	aacacggacagtatctcatcg	2126	+	35
22	2197	aaaagagatcgatgtctccta	2217	+++	65
23	2174	aatgaggctgtgaggggaattt	2194	++	50
24	2166	aagaccctaagaggctgtga	2186	++	50
25	2198	aaagagatcgatgtctcctac	2218	+++	55
26	2199	aagagatcgatgtctcctacg	2219	+++	70
27	2229	aagaggtgattggtgcaggtg	2249	+	33
28	2222	aagattgaagaggtgattggt	2242	+	30
29	2429	aacagcatgccogtcatgatt	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	aacatcctagtcaacagcaac	2629	++	50
36	2621	aacagcaacctcgtctgcaaa	2641	+	35
37	2678	aactcttcgataccaccta	2698	++	50
38	2640	aagtgtctgactttggccttt	2660	+++	70
39	2627	aacctcgtctgcaaagtgtct	2647	++	50
40	2639	aaagtgtctgactttggcctt	2659	+	25
41	2852	aatcaggacgtgatcaatgcc	2872	+++	75
42	2716	aaagattcccatccgatggac	2736	++	50
43	2717	aagattcccatccgatggact	2737	++	60
44	2762	aagttcacttccgccagtgat	2782	+++	70
45	3142	aagatacgaagaaagtttcgc	3162	++	50
46	3136	aatgggaagatacgaagaaag	3156	+++	66
47	2867	aatgccattgaacaggactac	2887		
48	3029	aaaatcgtggcccgaggagaat	3049	+	33
49	3254	aaaatcttggccagtgatccag	3274	++	50

10

20

30

40

【表 7 - 2】

8	698	aaggagaccttcacogtcttc	718	+++	75
9	959	aaaaagtgcgccagctgact	979	+	40
10	1247	aatagccactctaaccatt	1267	++	50
11	1259	aacaccattggatcagccgtc	1279	++	50
12	1652	aatgtcaccactgaccgagag	1672	+	35
13	1784	aaataccatgagaagggcgcc	1804	+++	65
14	1832	aagacgtcagaaaacogggca	1852	+	30
15	1938	aacatcacagccagacccaac	19	++	50
16	2069	aagcagagcaatgggagagaa	2089	++++	75
17	2078	aatgggagagaagcagaatat	2098	+++	65
18	2088	aagcagaatattcggacaaac	2108	+++	70
19	2094	aatattcggacaaacacggac	2114	++	40
20	2105	aaacacggacagtatctcatc	2125	++	50
21	2106	aacacggacagtatctcatcg	2126	+	35
22	2197	aaaagagatcgatgtctcta	2217	+++	65
23	2174	aatgaggctgtgaggaattt	2194	++	50
24	2166	aagaccctaagtggctgtga	2186	++	50
25	2198	aaagagatcgatgtctctac	2218	+++	55
26	2199	aagagatcgatgtctctacg	2219	+++	70
27	2229	aagaggtgattggtgcaggtg	2249	+	33
28	2222	aagattgaagaggtgattggt	2242	+	30
29	2429	aacagcatgccogtcatgatt	2449	++	40
30	2291	aagaaggagagctgtgtggca	2311	+++	50
31	2294	aaggagagctgtgtggcaatc	2314	+++	60
32	2311	aatcaagacctgaaggtgg	2331	+++	70
33	2497	aaacgacggacagttcacagt	2517	+	35
34	2498	aacgacggacagttcacagtc	2518	+	40
35	2609	aacatcctagtcaacagcaac	2629	++	50
36	2621	aacagcaacctcgtctgcaa	2641	+	35
37	2678	aactcttccgatccacctac	2698	++	50
38	2640	aagtgtctgactttggccttt	2660	+++	70
39	2627	aacctcgtctgcaaagtgtct	2647	++	50
40	2639	aaagtgtctgactttggcctt	2659	+	25
41	2852	aatcaggacgtgatcaatgcc	2872	+++	75
42	2716	aaagattcccatccgatggac	2736	++	50
43	2717	aagattcccatccgatggact	2737	++	60
44	2762	aagttcacttccgccagtgat	2782	+++	70
45	3142	aagatacgaagaagtttcgc	3162	++	50
46	3136	aatgggaagatacgaagaag	3156	+++	66
47	2867	aatgccattgaacaggactac	2887		
48	3029	aaaatcgtggcccgaggagaat	3049	+	33
49	3254	aaaatcttggccagtgccag	3274	++	50

10

20

30

40

【表 7 - 3】

50	3255	aaatcttggccagtgtccagc	3275	+++	75
51	3150	aagaaagttttcgcagccgctg	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RNA i プローブ					
Eph B4 50		gagaccucgucgaacacaaau			
Eph B4 472		ggugaaugucaagacgcuguu			
Eph B4 1562		caucacagccagaccaacu			
siRNA 2303		cucuuccgaucccaccuacuu			
Eph B4 2302		cucuuccgaucccaccuacuu			

10

【0260】

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

K S S L K ; 内因性高レベルのエフリンB2を発現する細胞系。細胞生存能力を、一定の投薬量のそれぞれのオリゴヌクレオチド (5 U M) を使用して試験した。遺伝子発現ダウンレギュレーションを、完全長エフリンB2を安定して発現するように設計された細胞系 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 50 n M で試験されたRNA i プローブへの応答である生存能力を試験するために使用した。蛋白質発現レベルを完全長エフリンB2を安定して発現する293細胞を使用して、一定の (fixed) 50 n M のRNA i 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B2 RNA i プローブについての結果は、下記表 9 にまとめた。

20

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B2RNA i プローブを示す。

【0261】

【表 8 - 1】

Table 8. Ephrin B2 antisense ODNs.

30

	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	++

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

【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

【 0 2 6 4 】

【表 9 - 1】

Table 9. Ephrin B2 RNAi probes.

20

RNAi 配列及び他のヒト遺伝子との相同性	生存率減少割合 (%)	エフリン B2 発現の阻害	RNAi 番号
89 aactgogatttccaaatcgat 109	80	++++	1
141 aactccaaatttctacctgga 161	70	++++	2
148 aatttctacctggacaaggac 168	75	+++	3
147 aaatttctacctggacaagga 167	60	+++	4
163 aaggactggtactatacccac 183	40	++	5
217 aagtggactctaaaactggtg 237	80	++++	6
229 aaactgttggccagtatgaat 249	50	+++	7
228 aaaactgttggccagtatgaa 248	80	++++	8
274 aagaccaagcagacagatgca 294	80	++++	11
273 aaagaccaagcagacagatgc 293	60	+++	12
363 aagtttcaagaattcagccct 383	66	+++	13
370 aagaattcagccctaacctct 390	50	+++	14
373 aattcagccctaacctctggg 393	50	+++	15
324 aactgtgccaaccagaccaa 344	90	++++	16
440 aaatgggtctttggagggcct 460	80	++++	17
501 aagatcctcatgaaagtggga 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

30

40

50

【 0 2 6 5 】

【 表 9 - 2 】

566	aagacgtccagaactagaagc	586	70	+++	28
593	aaatggaagaagttcgacaac	613	75	++++	29
577	aactagaagctggtacaaatg	597	66	+++	30
594	aatggaagaagttcgacaaca	614	35	++	31
583	aagctggtacaaatggaagaa	603	50	+++	32
611	aacaagtccctttgtaaaacc	631	70	++++	33
599	aagaagttcgacaacaagtcc	619	70	++++	34
602	aagttcgacaacaagtccctt	622	80	++++	35
626	aaaaccaaattccaggttctag	646	50	+++	36
627	aaaccaaattccaggttctagc	647	25	+	37
628	aaccaaattccaggttctagca	648	30	++	38
632	aaatccaggttctagcacaga	652	60	+++	39
633	aatccaggttctagcacagac	653	40	++	40
678	aacaacatcctcggttccgaa	698	30	++	41
681	aacatcctcggttccgaagtg	701	20	+	42
697	aagtggccttatttgcaggga	717	30	++	43
明細書中に記載された追加的エフリン B2 RNA i プローブ					
GCAGACAGAUGCACUAUUUAUU					ephrin B2 264
CUGCGAUUUCCAAUUCGAUUU					ephrin B2 63
GGACUGGUACUAUACCCACUU					ephrin B2 137

10

20

【 0 2 6 6 】

実施例 10 (EphB4抗体は腫瘍増殖を阻害する。)

30

図 5 7 は、G 2 5 0 及びプルダウンアッセイによる EphB4 モノクローナル抗体の比較結果を示す。

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

B a I b C ノードマウスへ 2.5×10^6 の生存腫瘍細胞 S C C 1 5 を皮下注射した。S C C 1 5 は、頭部及び頸部扁平上皮細胞癌系である。腫瘍は、nu/nu マウス中に、マトリゲル及び増殖因子並びに A b ' と予備混合した $2.5 \sim 5 \times 10^6$ 細胞を皮下注射して開始され、腫瘍異種移植が開始された。マウスを注射 1 4 日後に解剖した。S C C 1 5 は頭部及び頸部扁平上皮細胞癌系であり、B 1 6 は黒色腫細胞系であり、M C F - 7 は乳癌系である。これらの処理に対する腫瘍の応答を、P B S 注射を受けたコントロール処理マウスと比較した。動物の腫瘍増殖を毎日観察し、皮下腫瘍をカリパスを使用して毎 2 日に測定した。抗体番号 1 及び 2 3 は、コントロールと比較して、特に追加的増殖因子添加なしのコントロールでは S C C 1 5 腫瘍サイズの顕著な退縮を示した。

40

図 5 9 は、EphB4 抗体は、S C C 1 5 頭部癌及び頸部癌腫瘍種の、アポトーシス、壊死及び血管形成減少を引き起こすことを示す。

【 0 2 6 7 】

血管形成を C D - 3 1 免疫組織化学法により評価した。処理及び未処理のマウスからの腫瘍組織断片を C D 3 1 用に染色した。アポトーシスを免疫組織化学 TUNNEL 法により評価し、BrdU アッセイにより増殖した。外科的除去に続き、腫瘍を標準手順に従い直ちに 2 m m 連続断片へスライスし、パラフィン中に包埋した。パラフィン包埋した組織を 5 μ m へ

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 (retrieval) 液中でマイクロ波を照射した。スライドを P B S で洗浄し、TUNNEL法反応混合物 (末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ及びフルオレセイン標識化ヌクレオチド溶液) 及びBrdUを完全に光を遮断した湿性チャンパー中に加えた。次にTUNNEL及びBrdU反応混合物を除去し、スライドを洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼと結合している抗フルオレセイン抗体を添加した。インキュベーション及び洗浄後、3, 3' ジアミノベンジジンを添加した。マッソン社製トリクローム (商標) 及びヘマトキシリン及びエオシンも又スライドを染色して形態を画像化するために使用した。マッソン社製トリクローム (商標) は、壊死及び線維症の画像化を可能とした。腫瘍は腫瘍 / 皮膚、筋肉境界から血液サポートを得た。腫瘍が成長するに従い、内側領域は栄養が欠乏した。これは壊死 (細胞死) を、好ましくは腫瘍中央で導く。細胞死後、(腫瘍) 組織は、繊維芽細胞組織で置換される。スライドを、得られたデジタル画像を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。A b 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。A b 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。A b 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。A b 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。A b 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。A b 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P B S で処理した腫瘍は、高い腫瘍密度及び活発な血管形成応答を示した。EphB4抗体で処理した腫瘍は、生存腫瘍細胞の領域中の腫瘍細胞密度の減少及び腫瘍血管形成の顕著な阻害、並びに腫瘍壊死及びアポトーシスを示した。

10

20

30

40

50

【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P B S での隔日治療は、第4日、腫瘍が確立された後に開始して14日間連続した。I P 又はS C 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。

【図 7】 B 4 E C - F C 阻害アッセイ（溶液中阻害）を示す。

【図 8】 B 2 E C - F C 結合アッセイ（プロテイン A - アガローススペースアッセイ）を示す。

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

【図 10】 B 2 E C - F C に応答する H H E C の走化性を示す。

【図 11】 B 2 E C に応答する H H A E C の走化性を示す。

【図 12】 H U A E C 細管形成に対する B 4 E c v 3 の効果を示す。

【図 13】 H U A E C 細管形成に対する B 2 E C - F C の効果を示す。

【図 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 EphB4 E C 蛋白質の領域構造を示す。

【図 17 A】 EphB4 E C 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 S D S - P A A G ゲル電気泳動を示す。

【図 17 B】 EphB4 E C 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、M T S 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 B 4 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 B 2-Fc 融合での刺激に応答しての、P C 3 細胞中の EphB4 レセプターのチロシンリン酸化を示す。

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

【図 24】 B 4 v 3 は、ネズミ角膜 hydon 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】 s B 4 v 3 との S C C 1 5、B 1 6 及び M C F - 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、B 1 6 黒色腫、S C C 1 5（頭部癌及び頸部癌）、及び M C F - 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 R X R 発現を示す。

【図 30】 E G F R 及び I G F R - 1 による前立腺癌細胞中の EphB4 のダウンレギュレーションを示す。

【図 31】 発現及び前立腺細胞機能に対して特別な EphB4 A S - O D N（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 siRNA 4 7 2 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 R T - P C R（A）及びウェスタンブロット法（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】 H 2 8 細胞の増殖に対する EphB4 アンチセンス O D N プローブの効果及び H 2 8 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（A S）プローブの効果及び H 2 8 の移

10

20

30

40

50

動に対するEphB4 siRNAの効果を示す。

【図39】EphB4はHNSCC主要組織及び転移で発現したことを示す。

【図40】EphB4はHNSCC細胞系中で発現し、EGFによりレギュレートされることを示す。

【図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】SCC細胞に対する特別なEphB4 AS-ODNのin vitro効果を示す。

【図44】EphB4 AS-ODN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KSバイオプシー組織中で発現したことを示す。

10

【図46】HHV-8は静脈性内皮細胞中での動脈性マーカー発現を誘起することを示す。

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

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

【図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KS細胞中の生存能力及びHUVEC増殖を抑制することを示す。

【図50】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。

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

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SCC15/MG異種移植腫瘍の増殖を阻害することを示す。

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

【図60】EphB4抗体の全身的投与は腫瘍退縮に導くことを示す。

【図61】ヒトEphB4のゲノムヌクレオチド配列を示す。

【図62】ヒトEphB4のcDNAヌクレオチド配列を示す。

【図63】ヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す。

【図64】ヒトエフリンB2のcDNAヌ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

```

MELRVLLCWASLAALAEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEEELSG
LDEEQHSVRTYEVCVQAPGQAHWLRGTGWVPRRGAVHVIATLRFMT
LECLSLPRAGRSCKETFTTFYFYESDADTATATLTPAMMENFYIKVDTV
AAEHLTRKRPAGEATGKVNVTLRGLPLSKAGFYLAQDQGCACMALL
SLHLFYKCAQLTVNLTREFPETVRELVPVAGSCVVDVAPAGPESP
SLYCREDGQWAEQPTVTCSCAPGFEEAAGNTKCRACQGTFFKPLSGE
GSCQPCPANSHTIGSAVQCRCVGYFRATDPRGAPCTTPPSAPRS
VVSRLNGSSLHLEWSAPLESSEGGREDLTALRCRCRPGGSCAPCGGD
LTFDGPRLDVEPWWVVRGLRPFDTTYTEVTALNGVSSLATGPVFPE
PVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAPSGAWLDYEVK
YHEKGAEPPSSVRLKTSERNAELRGLKRGASYLVQVRRARSEAGYGP
FGQEHHSQTQLDESEGWRQGSKRALLQIEGKPIPNPILGLDSTRTG
HHHHHH

```

【 図 2 】

Figure 2. Amino acid sequence of the B4ECv3NT protein

```

MELRVLLCWASLAALAEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEEELSG
LDEEQHSVRTYEVCVQAPGQAHWLRGTGWVPRRGAVHVIATLRFMT
LECLSLPRAGRSCKETFTTFYFYESDADTATATLTPAMMENFYIKVDTV
AAEHLTRKRPAGEATGKVNVTLRGLPLSKAGFYLAQDQGCACMALL
SLHLFYKCAQLTVNLTREFPETVRELVPVAGSCVVDVAPAGPESP
SLYCREDGQWAEQPTVTCSCAPGFEEAAGNTKCRACQGTFFKPLSGE
GSCQPCPANSHTIGSAVQCRCVGYFRATDPRGAPCTTPPSAPRS
VVSRLNGSSLHLEWSAPLESSEGGREDLTALRCRCRPGGSCAPCGGD
LTFDGPRLDVEPWWVVRGLRPFDTTYTEVTALNGVSSLATGPVFPE
PVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAPSGAWLDYEVK
YHEKGAEPPSSVRLKTSERNAELRGLKRGASYLVQVRRARSEAGYGP
FGQEHHSQTQLDESEGWRQGSKRALLQISSTVAAARV

```

【 図 5 】

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

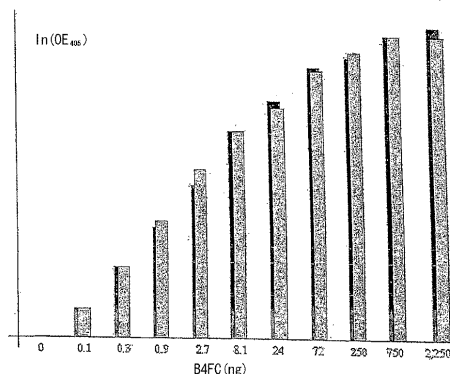
```

MAVRSDSVWKYCWGLMVLCTAISKSIVLEPIYWNSSNSKFLPGQ
GLVLYPQIGDKLDIICPKVDSKTGQYFYKVMVDKQADRCTIK
KENTPILNCAKPDQDIKFTIKFOEFSNLMGLEFQKNKDYIIST
NGSLEGLDNQEGGVCCOTRAMKILMKVQDASSAGSTRNKDPTRRPE
LEAGTNGRSSTTSFFVKPNPGSSTDGNSAGHSNNILGSEVDPPEK
SCDKTHTCPCPAPELLGGPVSFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKLSLSLSPGK

```

【 図 6 】

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



【 図 3 】

Figure 3. Amino acid sequence of the B2EC protein

```

MAVRSDSVWKYCWGLMVLCTAISKSIVLEPIYWNSSNSKFLPGQ
GLVLYPQIGDKLDIICPKVDSKTGQYFYKVMVDKQADRCTIK
KENTPILNCAKPDQDIKFTIKFOEFSNLMGLEFQKNKDYIIST
NGSLEGLDNQEGGVCCOTRAMKILMKVQDASSAGSTRNKDPTRRPE
LEAGTNGRSSTTSFFVKPNPGSSTDGNSAGHSNNILGSEVDPPEK
SCDKTHTCPCPAPELLGGPVSFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKLSLSLSPGK

```

【 図 4 】

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

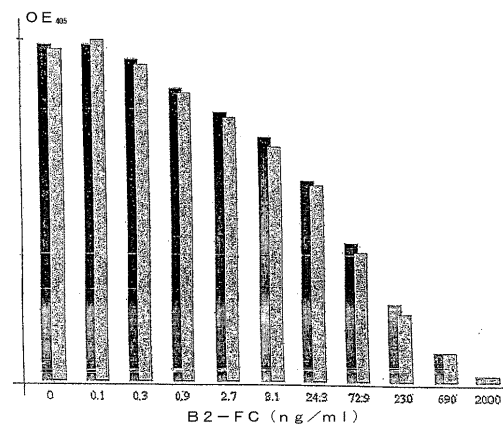
```

MELRVLLCWASLAALAEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEEEL
SGLDEEQHSVRTYEVCVQAPGQAHWLRGTGWVPRRGAVHVIATL
RFTMLECLSLPRAGRSCKETFTTFYFYESDADTATATLTPAMMENPY
IKVDTVAEHLTRKRPAGEATGKVNVTLRGLPLSKAGFYLAQDQ
QGCACMALLSLHLFYKCAQLTVNLTREFPETVRELVPVAGSCVVD
DAVPAPGSPSPSLYCREDGQWAEQPTVTCSCAPGFEEAAGNTKCR
CAQGTFFKPLSGEGSCQPCPANSHTIGSAVQCRCVGYFRATDPR
RGAPCTTPPSAPRSVVSRLNGSSLHLEWSAPLESSEGGREDLTALR
CRECRPGGSCAPCGGDLTFDGPRLDVEPWWVVRGLRPFDTTYT
VTALNGVSSLATGPVFPEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSS
SLAWAVPRAPSGAWLDYEVKYHEKGAEPPSSVRLKTSERNAELR
GLKRGASYLVQVRRARSEAGYGPFGQEHHSQTQLDESEGWRQDPE
PKSCDKTHTCPCPAPELLGGPVSFLFPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKATKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSDGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKLS
LSLSPGK

```

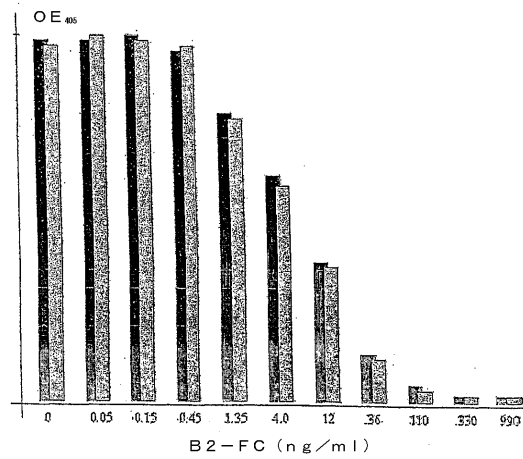
【 図 7 】

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



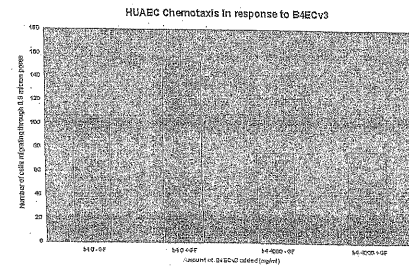
【 図 8 】

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



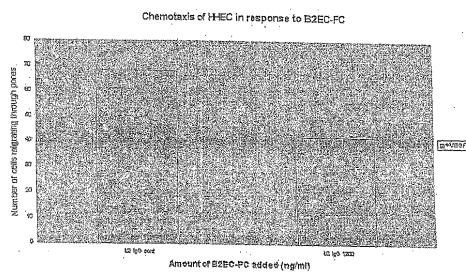
【 図 9 】

Fig. 9



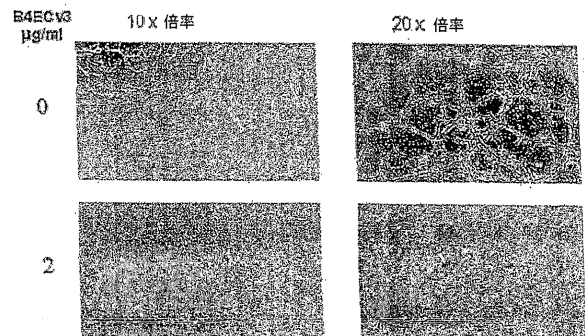
【 図 10 】

Fig. 10



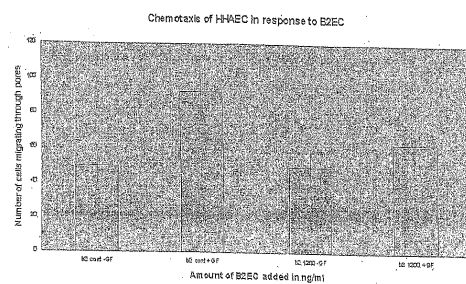
【 図 12 】

Effect of B4ECv3 on HUAEC Tubule Formation



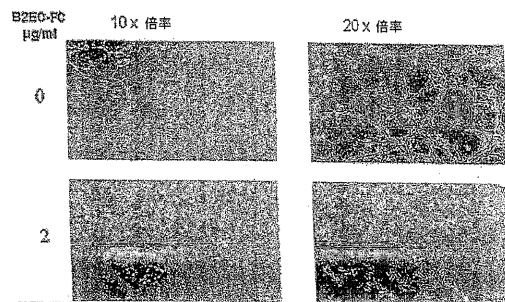
【 図 11 】

Fig. 11



【 図 13 】

Effect of B2EC-FC on HUAEC Tubule Formation



【 図 1 4 】

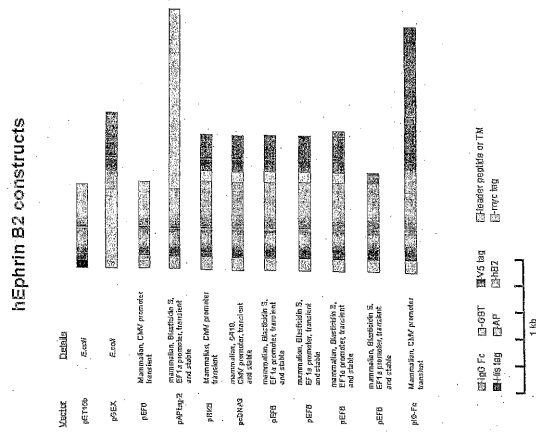


Figure 14

【 図 1 5 】

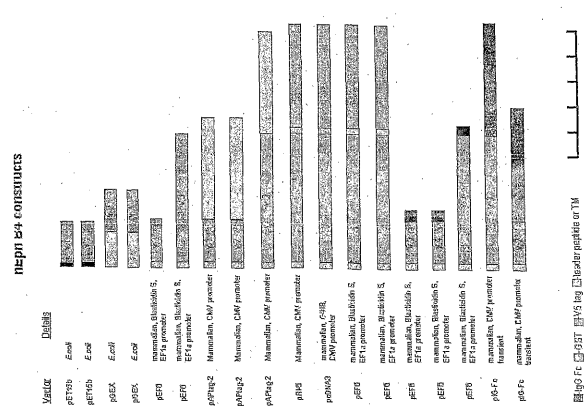


Figure 15

【 図 1 6 】

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

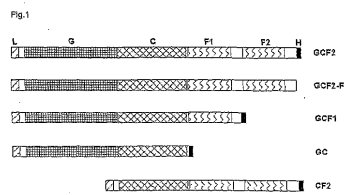


Figure 17A. Purification and ligand binding properties of the EphB4EC proteins

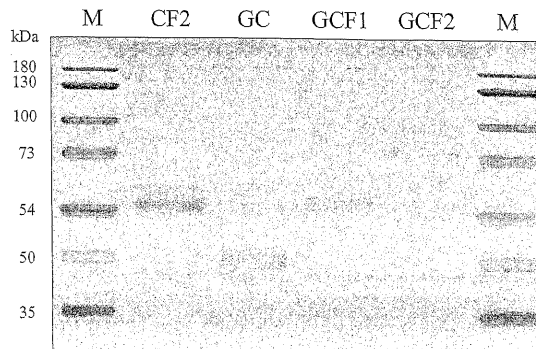
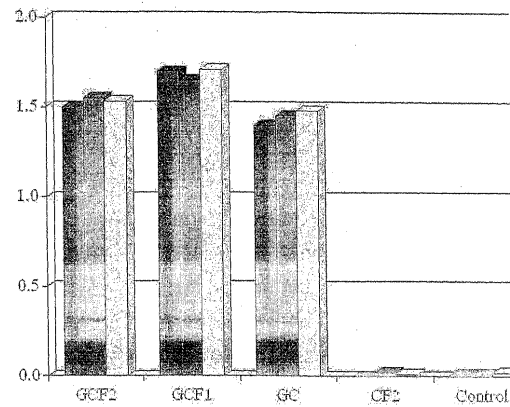
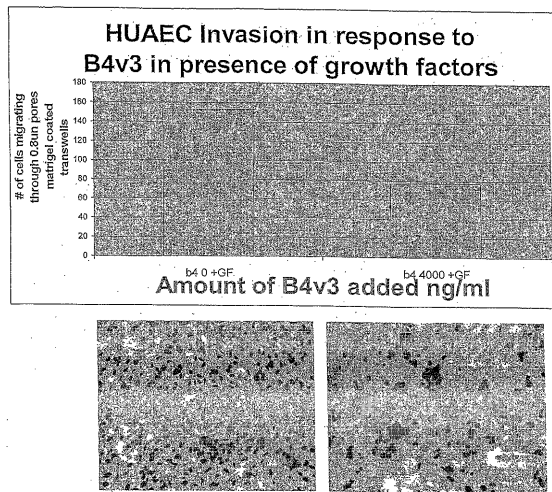


Figure 17B. Binding of Ephrin B2-AP fusion to EphB4-derived recombinant proteins immobilized on NTA-agarose beads.

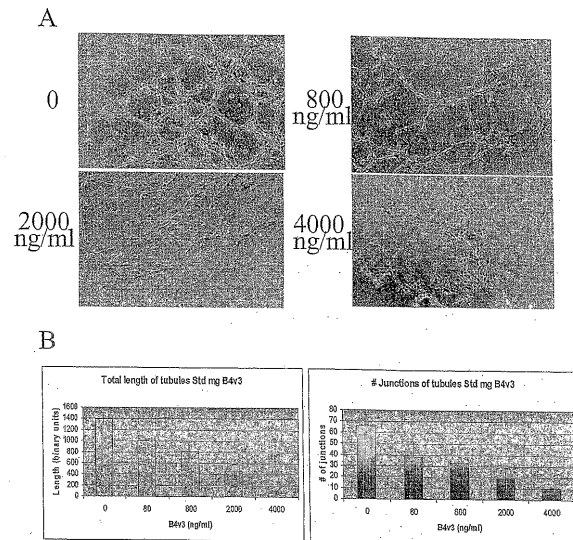


【 図 1 8 】

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, 8 μ m pore size, 10 μ m thick polycarbonate membranes. The upper surfaces of the transwell were pre-coated with matrigel. The cell suspensions of HUAECs in 0.25% BSA (2×10^5 cells/ml) in 200 μ l 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 100 nM–1 μ M test compound was investigated. After incubation for 4–24 h 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 200 \times mag were counted and the results expressed as mean # per field

【 図 1 9 】

Fig. 19
B4v3 inhibits tubule formation on Matrigel.

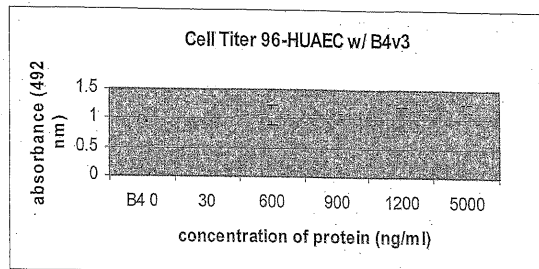
B4v3 inhibits tubule formation on Matrigel.

HUAEC cultures were cultured with B4v3, at 800, 2000, and 4000 ng/ml following seeding on STD matrigel in growth factor stimulated conditions, to analyze tubule formation. Cells were photographed 6h and 24h after seeding, 20 \times 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 2 0 】

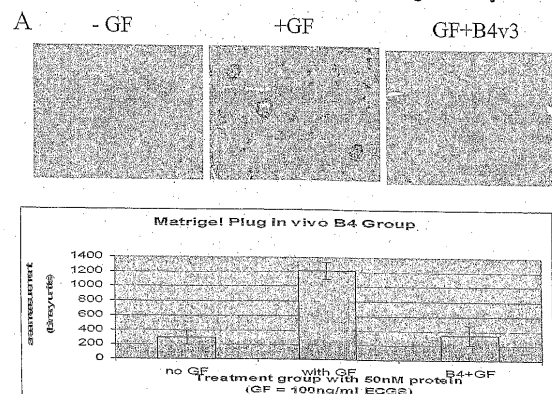
Fig. 20



Cell viability assays:

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

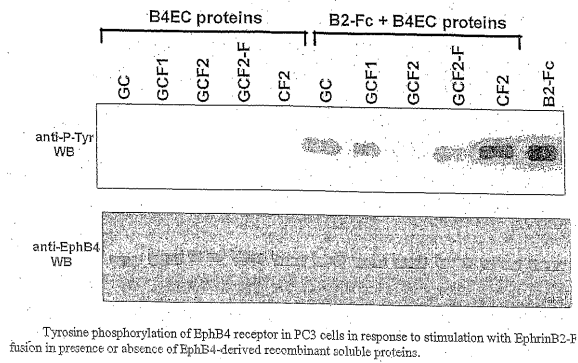
B4v3 inhibits invasion and tubule formation by endothelial cells in the Murine Matrigel assay



B4v3 inhibits invasion and tubule formation by endothelial cells in the murine Matrigel assay. B4v3 (50nM) was added to Matrigel solution containing ECGE (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 20 \times magnification or with Masson's Trichrome (B) to detect tubule formation. 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 2 2 】

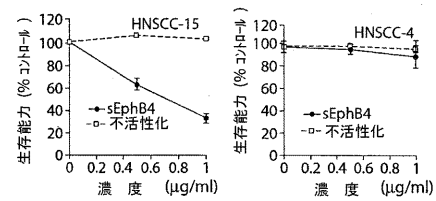
Fig. 22



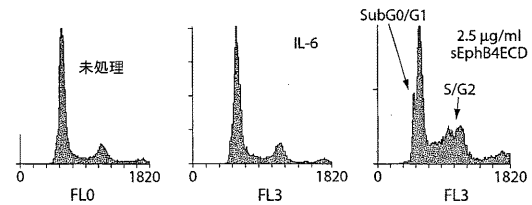
Tyrosine phosphorylation of EphB4 receptor in PC3 cells in response to stimulation with EphrinB2-F fusion in presence or absence of EphB4-derived recombinant soluble proteins.

【 図 2 3 】

A



B



soluble EphB4 effects on viability and cell cycle. B) 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 μg/ml sEphB4ECD. Viability was determined on day 3 by MTT assay. Shown is the mean and SEM of triplicate samples. C) 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 2 4 】

Fig. 24

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



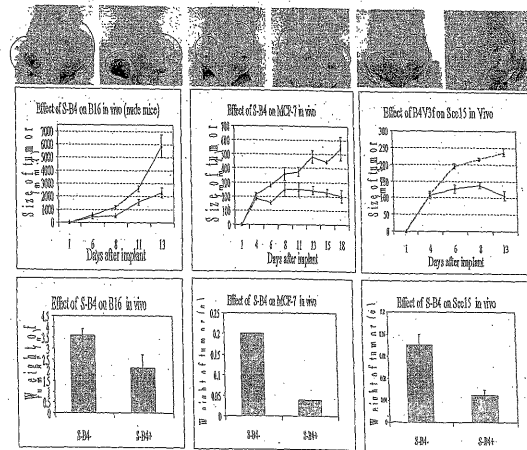
+GF B4
 +GF -GF

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

B4v3 (180ng) was added to hydon 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 B5f, top right and bottom left respectively, did not produce an angiogenic response above background, lower right, on day 3 after implantation.

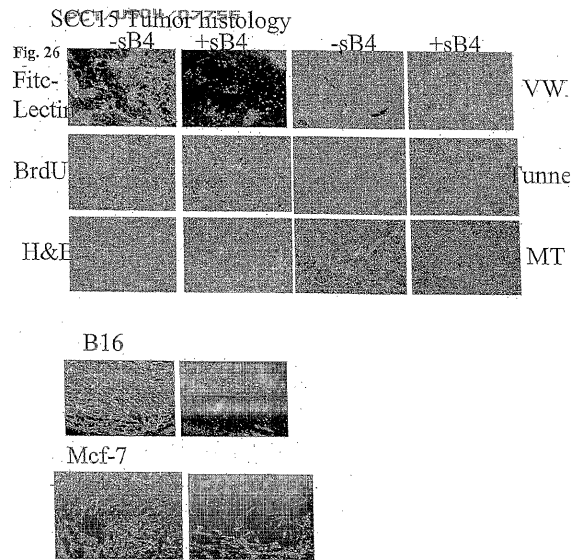
【 図 2 5 】

Fig. 25



SCC15, 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 1×10^6 cells in a matrigel preparation. The representative picture shows reduced 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. $p < 0.05$.

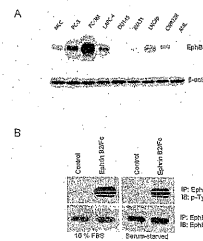
【 図 2 6 】



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.

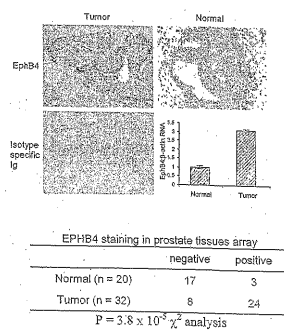
【 図 2 7 】

Figure 27



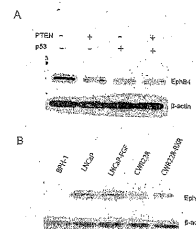
【 図 2 8 】

Figure 28



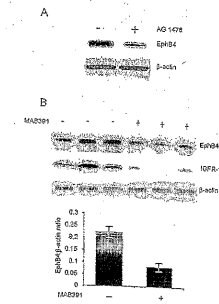
【 図 2 9 】

Figure 29



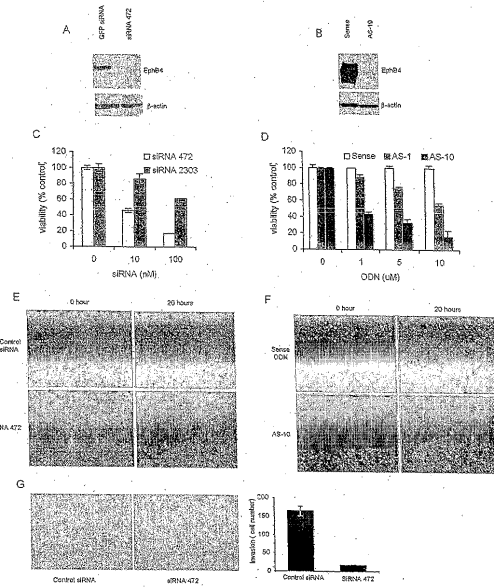
【 図 3 0 】

Figure 30



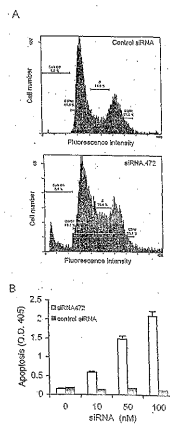
【 図 3 1 】

Figure 31



【 図 3 2 】

Figure 32



【 図 3 3 】

Figures and Legends

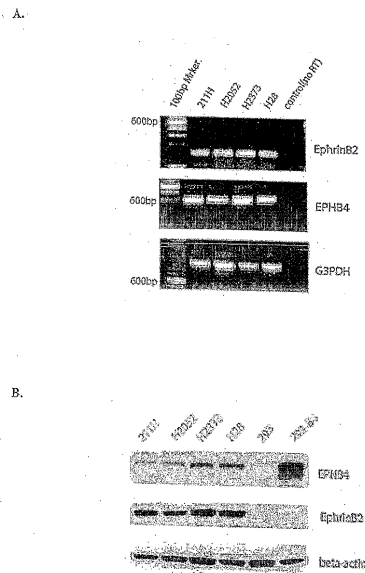


Fig. 33

【 図 3 4 】

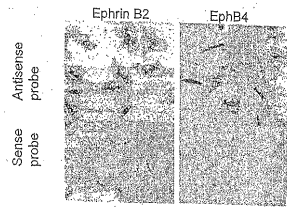


Fig. 34 Expression of ephrin B2 and EphB4 by in situ hybridization in mesothelioma cells. NCI H28 mesothelioma cell lines cultured in chamber slides hybridized with antisense probe to ephrin B2 or EphB4 (top row). Control for each hybridization was sense (bottom row). Positive reaction is dark blue cytoplasmic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

【 図 3 6 】

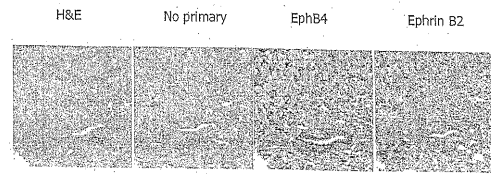


Fig. 36 Expression of ephrin B2 and EphB4 in mesothelioma tumor. Immunohistochemistry of malignant mesothelioma biopsy. H&E stained section reveals tumor architecture; bottom left panel is background control with no primary antibody. EphB4 and ephrin B2 specific staining is brown color. Original magnification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

【 図 3 5 】

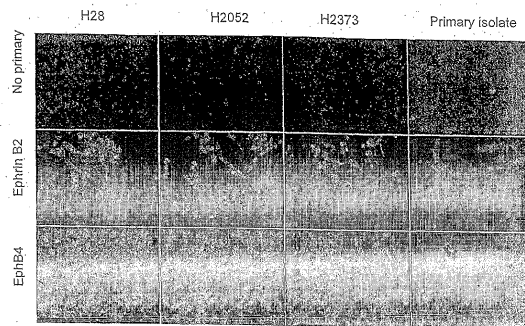


Fig. 35 Cellular expression of EphB4 and ephrin B2 in mesothelioma cultures. Immunofluorescence staining of prior cell isolate derived from pleural effusion of a patient with malignant mesothelioma and cell lines NCI H28, H2052 and H2373 for ephrin B2 and EphB4. Green color is positive signal for FITC labeled secondary antibody. Specificity of immunofluorescence staining was demonstrated by lack of signal with no primary antibody (first row). Cell nuclei were counterstained with DAPI (blue color) to reveal location of all cells. Shown are merged images DAPI and FITC fluorescence. Original magnification 200X.

【 図 3 7 】

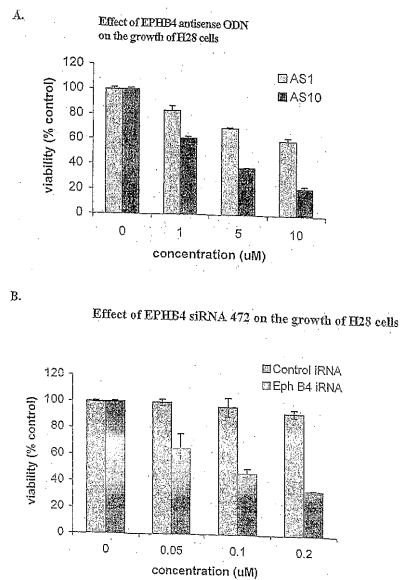


Fig. 37

【 図 3 8 】

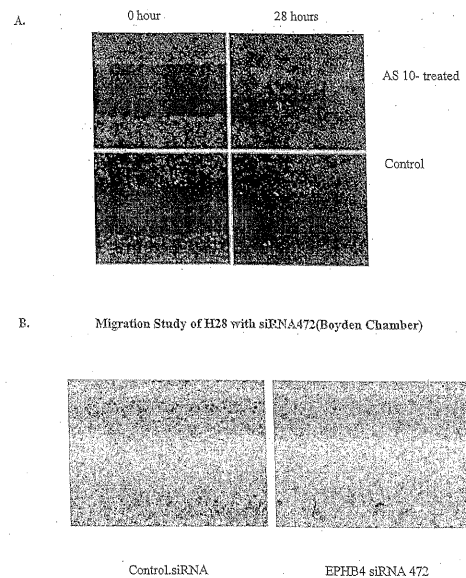


Fig. 38

【 図 3 9 】

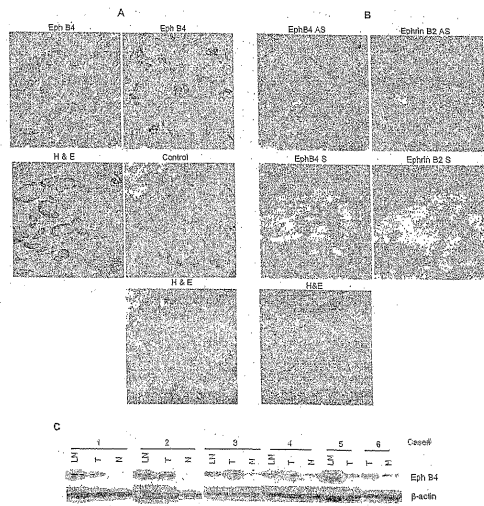


Fig. 39

【 図 4 0 】

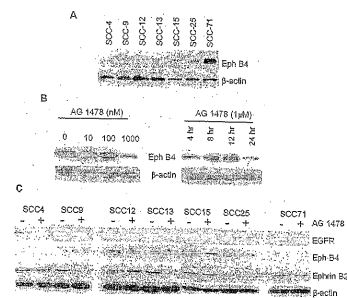


Fig. 40

【 図 4 1 】

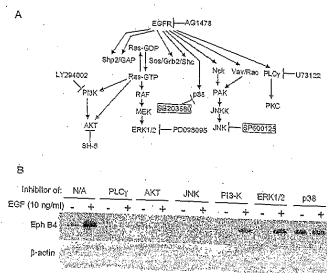


Fig. 41

【 図 4 2 】

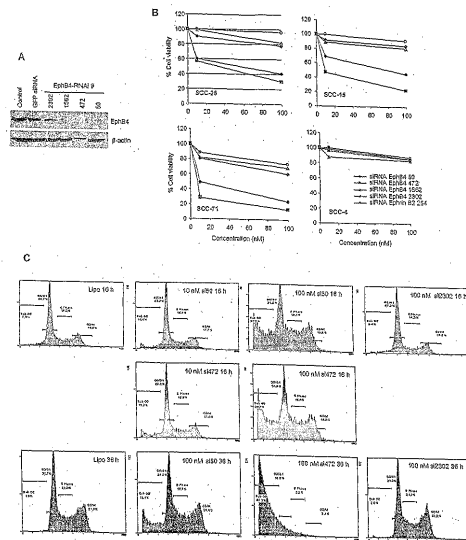


Fig. 42

【 図 4 3 】

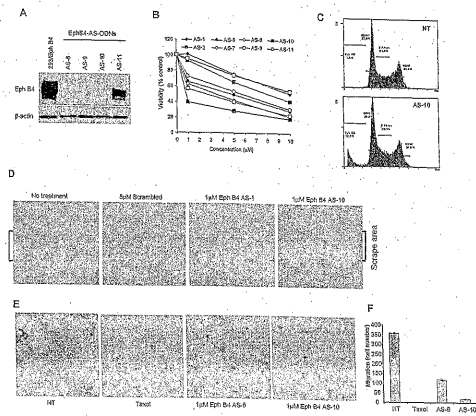


Fig. 43

【 図 4 4 】

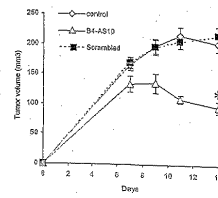
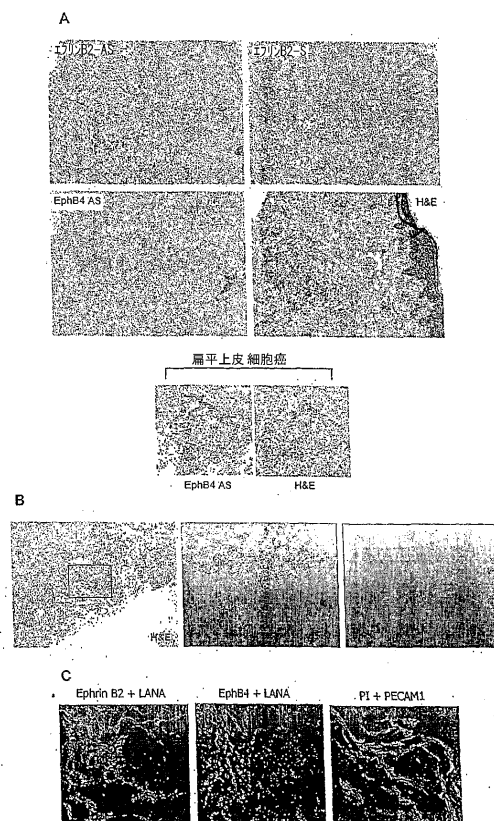
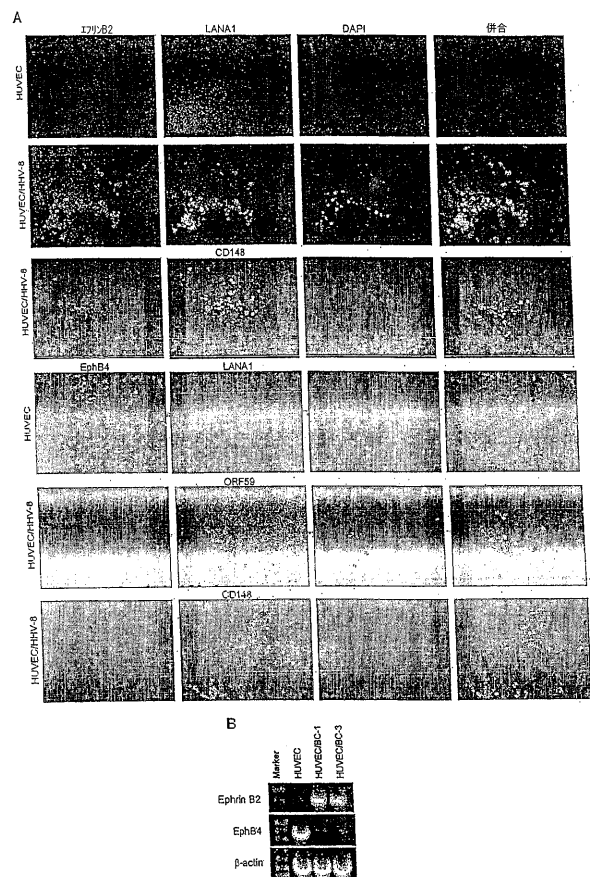


Fig. 44

【 図 4 5 】

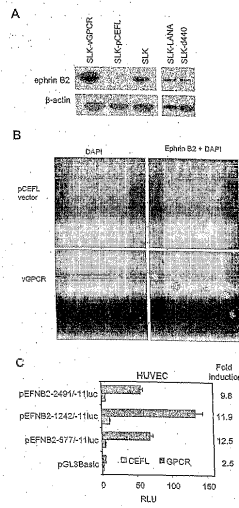


【 図 4 6 】



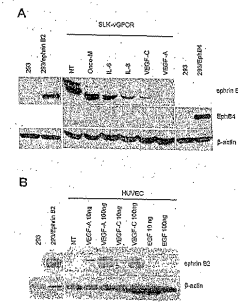
【 図 47 】

Fig. 47



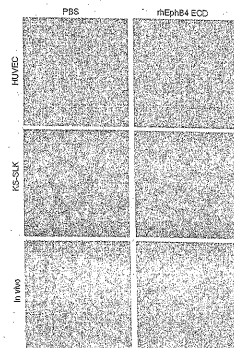
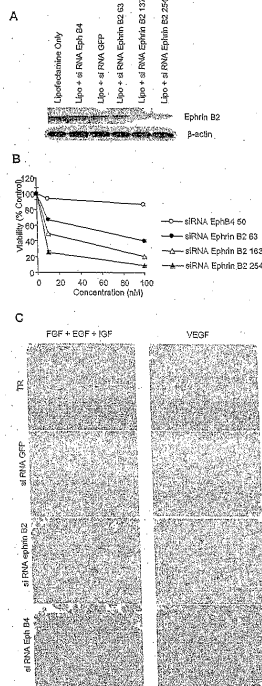
【 図 48 】

Fig. 48



【 図 50 】

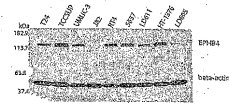
Fig. 50



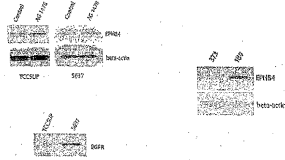
【 図 5 1 】

Fig. 51

Expression of EPHB4 in bladder cancer cell lines



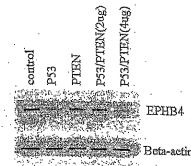
Regulation of EPHB4 expression by EGFR signaling pathway



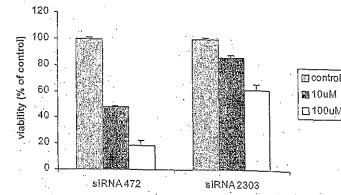
【 図 5 2 】

Fig. 52

Transfection of p53 inhibit the expression of EPHB4 in 5637 cell



Growth inhibition of bladder cancer cell line(5637) upon treatment with EPHB4 siRNA 472



【 図 5 4 】

Apoptosis Study of 5637 cells transfected with EPHB4 siRNA 472

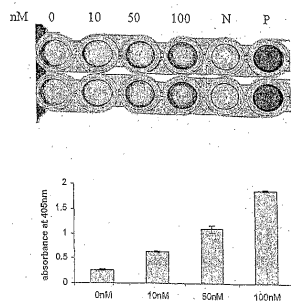


Fig. 54

【 図 5 5 】

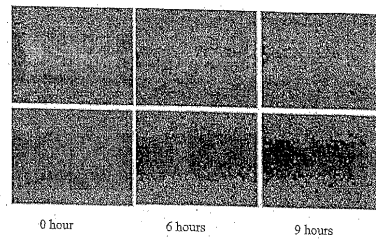


Fig. 55

【 図 5 6 】

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

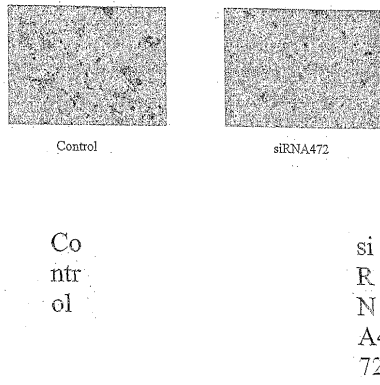
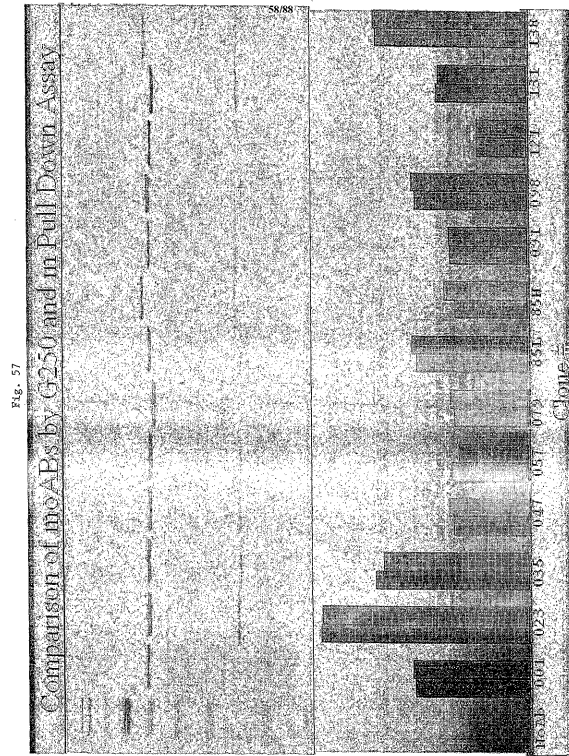


Fig. 56

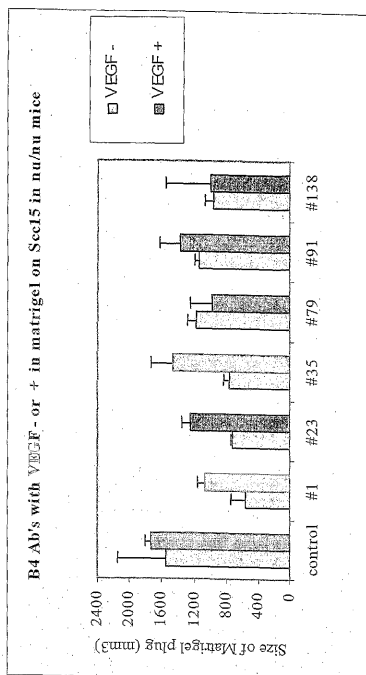
【 図 5 7 】



【 図 5 8 】

SCC15/MG xenograft Tumor regression

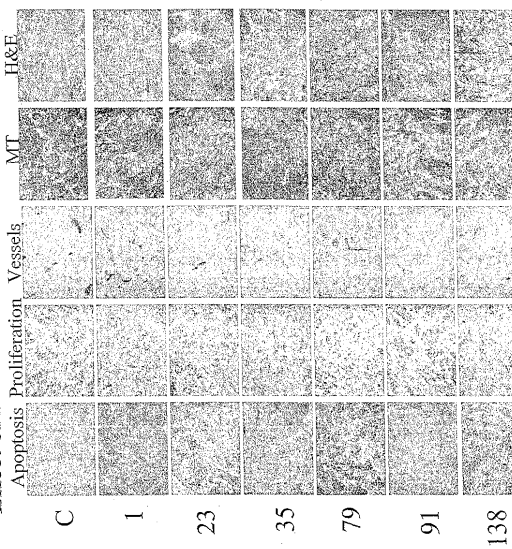
Fig. 58



【 図 5 9 】

Effect of B4 antibodies on SCC15 Tumor histology

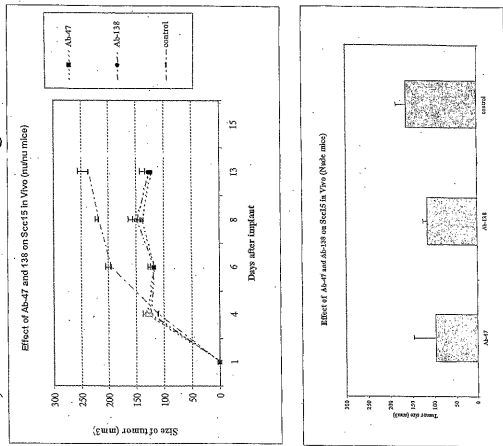
Fig. 59



【 図 6 0 】

Fig. 60

SCC15/IP,SC B4 Ab treated xenograft Tumor regression



【 図 6 1 】

Fig. 61(a)

FIGURE 61 Bph34 gene

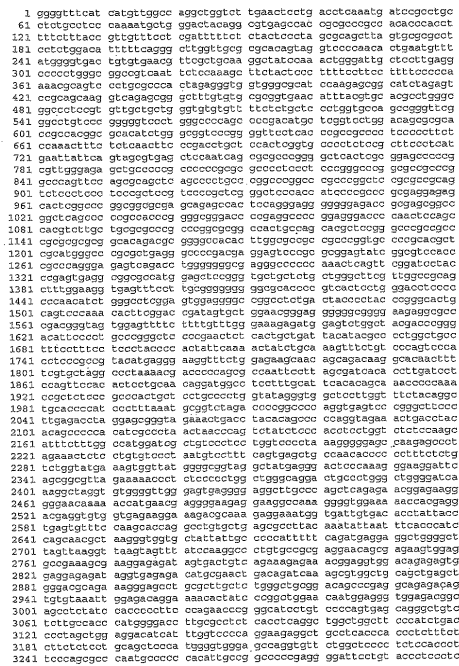


Fig. 61(b)

3301 ctcaactctc caactgcagg gggtgtgtgag tttttcttaa tccccccctc tctccagtg
3361 cctgcccctc ccccgatga tccagacaa gcaaggtgtg ttaacccttc caatcaaac
3421 cgcgccccag aatctctccc cctctgcctt cccaaatacc aatccagatg tggagctcgc
3481 gggagggagg taactgggat gggtgcagg gctatgcoca gccaagagag gtcctcttc
3541 gggagggagg taactgggat gggtgcagg gctatgcoca gccaagagag gtcctcttc
3601 gggagggagg taactgggat gggtgcagg gctatgcoca gccaagagag gtcctcttc
3661 atgtgggggt agagagtggt atctctggac tggggggggg aaagctggag gctgagacaa
3721 ggggttcccc tccccctcag gctgctgctg ctgggggggg tccagagag gggagagctc
3781 tcttttttaa cttttctcag ctggcgcccc tctctccctg acattttgat cctctctct
3841 cctcagagaa ggcctagatc tggagagctc agaatctcgg ccgttgacaa gggcaggctg
3901 ggggtggggt ggcctcttgc tggagagctc agaatctcgg ccgttgacaa gggcaggctg
3961 tgcctccctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc actctgtctc
4021 gttcccccag atctgtctct cttgacaccc cctccccccc caagcagctg actctgtctc
4081 tctgtctctc tggagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4141 gaaatctctc cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4201 gaaatctctc cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4261 tgcctccccc gttgagagctc gttgagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4321 cctcagagaa cctgagagctc cctctctcga gctcagagat aagagctcgc
4381 gaaatctctc cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4441 agagctctgc cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4501 tggagagctc cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4561 cgtctcagct gttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4621 ctggagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4681 cctgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4741 aggtgagctc cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4801 aggtgagctc cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4861 tggagagctc cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4921 cctgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
4981 cctgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
5041 aggtgagctc cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
5101 tctgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
5161 cctgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
5221 tttatttttt tttatttttt atatttttaa aggggggtgt tctagatcac caaggtgggt
5281 cttcaactct tttatttttt aggggggtgt tctagatcac caaggtgggt
5341 aggtgagctc cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
5401 cgtgtctctc tttatttttt aggggggtgt tctagatcac caaggtgggt
5461 tggagagctc cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
5521 cttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
5581 aggtgagctc cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
5641 cgtgtctctc tttatttttt aggggggtgt tctagatcac caaggtgggt
5701 gttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
5761 aggtgagctc cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
5821 tttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
5881 gttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
5941 cgtgtctctc tttatttttt aggggggtgt tctagatcac caaggtgggt
6001 tttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
6061 gttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
6121 gttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
6181 cttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
6241 tttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
6301 cgtgtctctc tttatttttt aggggggtgt tctagatcac caaggtgggt
6361 tttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
6421 cttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
6481 cttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
6541 tttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
6601 gttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc
6661 cttgagagct cttgagagctc tggagagctc aactctctga gctcagagat aagagctcgc

Fig. 61(c)

6721 aaatattttt tttttttttt aagacagat cttgtctgtt cgcacagatg ggggtgagct
6781 ggggtgagct cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
6841 ggggtgagct cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
6901 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
6961 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7021 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7081 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7141 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7201 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7261 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7321 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7381 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7441 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7501 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7561 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7621 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7681 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7741 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7801 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7861 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7921 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
7981 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8041 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8101 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8161 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8221 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8281 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8341 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8401 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8461 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8521 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8581 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8641 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8701 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8761 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8821 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8881 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
8941 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
9001 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
9061 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
9121 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
9181 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
9241 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
9301 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
9361 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
9421 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
9481 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
9541 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
9601 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct
9661 tttgtgtgtt cttgtgtgtt cgcacagatg ggggtgagct ggggtgagct ggggtgagct

Fig. 61(d)

16141 ggggttttgg accagctctg gcaacatggt gaaacttcat cctctataaa aactataaat
 16142 ggggttttgg accagctctg gcaacatggt gaaacttcat cctctataaa aactataaat
 16261 atccaaaggt caggatgata gagaacatcc ttggttaaac ggtgaacccc catctctact
 16322 aaaaatacga aaatatacga agcagctctg gggagctctg gtagctccag ctactctggg
 16381 gggctgggga gggagatgag gtagaacacg gggagctctg ctgagctgag ccagatgtagc
 16441 gggctgggga gggagatgag gtagaacacg gggagctctg ctgagctgag ccagatgtagc
 16501 aaaaaaagag caaaaataac tttaaatgaa aaanaataga ctggagacag tggctctgct
 16561 ctgtaatacc ggcacttttg gggagctgag ttggttagaac aactggggtt aagatcttga
 16621 gacagctctg gtagaacacg tgaatacccc gttctctact caaataagaa aatcagctga
 16681 gttgttttgg gggagctctg aatccagct ccttagagag ctgagctgag aagatctctg
 16741 gaaacaaagt gattctcgag ttgaggttga ggtctgaagt agtctgtttt gccaacttgc
 16801 attccagctt gagaagaatga gaactttctt taataaagag gaatgatatt agtaatacag
 16861 caaatgtgct gaaatggtaa gttctcccaa agggctcaac agttgaaag cagatgtagt
 16921 atggagatgg gggagctctg aaggagctca gaagagcaac aggaactctg gttccctggt
 16981 gaggcccaac ccaatcactc tccggagcag gggccgagag gttccagag cgtgcgtctc
 17041 ctgagagctg cagaanaacg gggagctctg cgggggtgta agggcgagag cagctactctg
 17101 gtagcagctc gggagctctc tgaagctctg tggagggctc tggagctgag aatcagacag
 17161 cagacacaa ttgattgtga ggtctgggaa ggggtttgag ctggaggttg gaaagctccc
 17221 caaagtctct gggagacccc caggtctcca agtcccatcc atcttttttt tttttttttt
 17281 ttttttgg gggatcttgc ttgtccctcc aggtctgaat ggaatgggac catctccgct
 17341 cctccagccc ttccctctcc gttctcagc catctctctc cctccagctc cagatgtagt
 17401 gggatctcag ggtctctgca cctgctctg cagatttttt gatttttttg tagagctggg
 17461 gttctccagg ctgttgccag ctgtctctga atctctgaac ttgtgattcg cccggctctg
 17521 cctccagagc ttgttgagat acaggtctga gaaactgac cgggtcaaac tcatctcttc
 17581 atgctctctc ttctgtgat cagagctga gctctcaga gggagagagc taagatctcg
 17641 aaacaaabaa caaacatgga gtttttgga gttctggagct ctcaactctg tgaactgag
 17701 ctggagcaga gttctctgag caaagctcac tgcagacagc ggaacagctg ctcaactctg
 17761 aacccagaga cttggggagc ctgagagcag aggaatacct gaggctcaga tgcagacagc
 17821 agctcagca cctgttgaga accggtctc taataaatac atagagatga cgtctggcgg
 17881 gtagtgaca cctgttaacc cagctactcg gggagctgag gaggagaaat cgttgaacac
 17941 tggagagctt aggttcagc tggctgagc ttgtccagct cactccagc tgggagacag
 18001 agagagctc ttgtctcaaa aaaaagagc tccagcagct ctgattttt agcaacacac
 18061 tgaacctgca gttccctctc cactctcga caaaatggga atatccagct gttctctgca
 18121 gggatctcag gattggagct aacaggttat tttaataatg ctaggcagct gottttttt
 18181 ttttttctc atttttttt ttgagacaga gttctactct gttccagagc ctggagctgag
 18241 gggagagctt cttagctcac cgaagctctg atctctctg ctgaactctg tgaactctctg
 18301 atccacagc cctggctctc cgaatctgag gaaatctgag cgtcagacac cagctccgag
 18361 ctcaactttt ctttttttt agagacagc cttttttttt caacagagct gggatggagct
 18421 ggcacatcca tagctctctg gactctcaac cctccagctc caacacacac tctcaactta
 18481 gttctccagc tagctgggag taagctcagc ttgactctg ctcaactaaa tttttttttt
 18541 ttgttttttg agtctctga cctagctctg ctcaactctg ctcaactctg tgaactctctg
 18601 caactctctc ctttttttg cccaagctt ttgagctaga gggatctgag ggcacacaca
 18661 gatttgagac agttgctctc taactctgtt aattttctgt aatagcttta cgtcaataca
 18721 gttctctgag cacaactctt aggtctctga ggtctctga cgtatgactt gatactctc
 18781 acagatttga aggtctctga caaacatga ttctggagc ctcaactctg tgaactctctg
 18841 gactctatag cactctcaga tcaacacaca ccaagattct ttgtctgct tagctctctg
 18901 caagcaataa ccaactctct gttctctga ttctctgag gttctctgag cactctctc
 18961 cagagcaaat gttttctgag ttatgattag ttgattatga tccagctggg tttttttttg
 19021 gttgttttgg ttgttttttg ttgttgaaa aggtctctga cttctctgag aggtctctg
 19081 gtaggtgttc aattcagag cactcagagc tcaactccac aggtctctga gactctctc
 19141 cttcagctcc ccaagcagct gggatctgag gtagcagaca ccaatggcag ctaatttttt
 19201 ttgtatttt ttgaaagag aggtttctc catgtctctc aggtctctc cgaactctg
 19261 agctcagag aggtctctga ccaactctga cttctctgag ttgctctcag aggtctctg
 19321 tggagctcgc ctgttttttg ttgttttttg gaaacacaga ttgtgtcttg tcaacagcgc
 19381 tggagatga ttgttgatga atagctgag gaaagctcaa actctctggg tcaagcagct
 19441 cttcaactcc aggtctctga gttatctgga ccaagctctc tcaacacagct gttgtgtaa
 19501 tttatttttt ttgttttgg agagagctg ttgtattgt tccagctgtg gttctgaaa

PCT/US2004/007755

16981 tgaaaaaaag caaaggggtt cttctatgca gatgtgctta gaggagaaag agaatcgttt
 17041 aattatttct gcaactttac cagattttac tgaatttttt ttttttttta actttattta
 17101 gttttttttt tttcttttga aggtctctga ccaagtgaga ttggagtttg gtaggtgtg
 17161 gttcttttgc tccagcaaac gttcactccc tgggttcaag tgaattctct gtaactgact
 17221 cttgtagtag ttgaatttgc atgtgagcca ccaacatacc cagctgattg ttgtattttt
 17281 atgtagagca gtttcttcca agtctctgaa ggtctctgct gaactctgag gttcaagctga
 17341 tccacatccc ttggtctctc aaggtctgag gattatagag atagatctga agtctgagc
 17401 taggactctt tttaaaaaa tcaaaaattt tttctatgca gaaaataaac atgtactgga
 17461 acagagttat agogattctg tagctctat taataccagc ttgattttta cgtttctga
 17521 gttgttttga agatttctt cactgctgct ttatctcaac caggtacacg ttgaacagc
 17581 ggtctgttga ttggttttga acttttttga ttgatttttt agtagagca gttctgtgct
 17641 ctttgcccca gtttagagc cagctctgca ttcaagctc actgagctc ccaactctc
 17701 ttggtcaggt gattctctct cctcagctcc cttgagctg ggaactacag gttgcaacg
 17761 ccaacatgca ctaattttta aattttttta gggagctggg gttctgctat gttgcaacg
 17821 ctgctctgct tagactctga ccaactctct caactctctt aaactctctc agtctgga
 17881 ttaagagctt gggccacccc gctctgctat ttattatttt ttgagctctt ctaactctg
 17941 agaatctct cactgagaca ctgacacac gaaggttag ttccctctgc cctctgag
 18001 ctctgattc ttgattttga aaactctct ttatggatca ttgagctctg cttctctgct
 18061 ttctgttagc aagagctctg ttgtgtagag gttttttttg ttgttttttg ttgtttttt
 18121 gaaatgaggt cttgtctgct cccagctgag agtgcagtg caaactctg gttactgca
 18181 aactctctc cttgggttga agagattct ctgctcagc cctctgagta gttggagta
 18241 caggagagct cccagctccc cagatatttt ttgtatttt agtagagca gtttttccc
 18301 aattttgaga aggtattctc gaactctga cttgctgag ttgctctccc ctgagctctc
 18361 caactgctc ggtatcagc ctagcagac tatgcccga taattttgtt attttattg
 18421 gagcagagc ttgctcagct ttgctcagc gaactgaaac cctggctccc aagctaccca
 18481 cccctctgct cctcccaagc ttgctgagat aaagctgagc gaaactgagc ctgctgagc
 18541 agagagagc ggtctaaag gtttagtgc acaactctgt aatccagca actgttgag
 18601 ctgaggttg ttgactcact gggccagga tttagagata aactccgga cactgtgaa
 18661 acccgtctc taacaaaat acaaaaatg gtagagagc atggtgata ttgtctgct
 18721 agctactct gggagctgag gggagagag cacttaagc ttgagagag aggtctgtg
 18781 gggctatct ttgactcact catctcagc ttggtctccc catctctta aagagtagc
 18841 agttggagag accagcagc gttaaaatgt ttgacagagc agagatggtt gatgctcat
 18901 tggagctgt gaggagagct cctggggagc ctttagagag agagtagttt aagagagct
 18961 cagctgggga cagtggtta cactgtgct cccagctgag aggtggagc gggaggtgag
 19021 atcaacttgg ctgagagttt ctagcagcag ctgcccacac ttgtaaacac ctgtctgac
 19081 taataatata aaaaacagc agactgagtg gttccacact gtaactccag ctactcagga
 19141 gactaagaca gggagatctg ttgactcagc gggagcagag ttgagctgag ccaagatgct
 19201 gaaacttca tccagctgag gtagagagc gaagatctat ctcaaaaa taatataa
 19261 aaaaagctc ttgtctggt cgtaggagc aagagagaga cttggagag cgtcagaga
 19321 gaagctctg ccaagctccc aggtctggg ttgagagaa ggttttggat ttggagatg
 19381 ttgttgagc atccagaca gaattctg atgattgag agtctgctg ttgagagaa
 19441 agggagcga aggaactct gaggatata cctgcaact ctggagagc ttgagagag
 19501 caaaactgca gctggagta gggagcagc aggtctgag gatgattca aattcagct
 19561 ttgttgagc ttgtctgag ttgtctgag ctgagagtg ttctccagct gggagagac
 19621 ccaagatctt gggatttgtt cagctgtgct gaattctgag agtctgctg ttgagagac
 19681 ttttaagag ttgaggtgca gttctcagc ttgttttttg cactctgag aggtctgag
 19741 ggtgactct actctctct ctttaataca taacagatga cttcaagag gtagctacag
 19801 ttgtgtgtg gatacagcc atgtatctc cactctgag cgggttgctc aggtgactca
 19861 ttgctgagc ttgagagcga gaattctgag aggtggagc aggtctgag gggagagc
 19921 gggagagag cttgagaca cgtgagac caataatca caaaaacac actgttttt
 19981 aatagagct gttgagctgt gttcaactct agtccagct aatagagag cttgagagca
 20041 aggatcatt gttcagagca gtttaagct ggttgagac atgactgctc cactgactc
 20101 caactctggg gaaagagca gttctctgag gttctctgag atctctgag aaggtgagc
 20161 gttgatttt tctggagat aagagctgtt accagttaa gttgagagaa aggttgaat
 20221 aatttttca cttcaatcc atgactgag gattggaga gattgaatg ttcaactctg agagagac
 20281 atgtgagca atgtgtgtg atactgaga aagagctgtt aaaaatctg aaaaagaaa
 20341 gggagagagc ttactgagc gatttgagg gcttgcctca caggtgagtt gtagagtag

13561 cttgctgctca caaactctcc ccaactcagt atctcagat gttggagta caggatgag
 13621 ccaactctcc ttgcaaatat ttaattctct ttattgaga gtaataatc agtctgtag
 13681 aaatagctga tttgtttttt tatgtatct ttgttgac atctcaatg tactagatt
 13741 ttggtataaa actgaatac atttcaact ttgaactctt cactgactat agattctctg
 13801 gttgagctat gattttata tagaacaaca toaaacac ttgctggctt gggcagctc
 13861 aggtgatttt gagactagc ttctcaact ggtgaagcc catctctat aaaaatac
 13921 aaatlagcgc agactggtg taacaactg taatccagc taactcagag cgtgagcag
 13981 ggaatagcga gaacccgga gggagagat gtagtgagc gagatgtgc caatgactc
 14041 cagctgggga gacagagta gactggtct caaaaaaa acaaaaaat tactctgca
 14101 gtaagaaag atttgaac ttctctctt gctctgagc acttcagag agctctgctg
 14161 cccctggggg agagctgaa accaactct ttgtctcaga cttgctgctg ttgtgtctc
 14221 tccctccacc ttgctccctg actggggac ttgtctcag agtacaagt tcatgtctc
 14281 aagccgggga ttggagctcc taagacaga caatgtctc ttgctcaga gotttctct
 14341 cccagagagc cggagctgag cggagcagc ttgctctg ttgagcagc gtagctgtg
 14401 gttgtgtctt gttctgtgtg ctactgtgag ttgctgtgtg cttgctgag taagagctc
 14461 gaacacccc gttctcagc agctctcag ttatgtgac ctgctgtgt gttcaagag
 14521 aggtctctt ggtgtctccc agctctctt tacttgaat ctctccatc cctctgctc
 14581 ttcttttggt ttgtgtctc ataaagatt gtgactcag ttactctttg ttctctctc
 14641 atcggtaca ggaagcagc caatggaga gaagcagat atcgagaca acaagcagc
 14701 tctctctagc gaactggtg gttgctcaa ttgttaga atagaggtt gggccaggt
 14761 gttgtgtctc ctactataa tccagcag ttgtaggaga gaggtagga gatacttga
 14821 gttcagagct ttgagacag cctggccac atgttgaac toactctga taataatac
 14881 atcgagctc caggtatgt ggtggagag ttgaatcca gactcactg aggtgaggt
 14941 agagatata tttaacag gtagggagc atgtgaga gcaagatgt cgtcagctg
 15001 cttccgctc ggttagaca gtagatctc atctcagga acaaaaaaa aaaaaaaa
 15061 acaagcaga cagggtttg ggtctaaa ggtctaaa agctccag agctctgga
 15121 gttactctc aggtgagag cctgtgctg attctcag tactaagtg taactgagc
 15181 cttctctta ttgagacat aatgggttg ttggagatt ttgcaaaag atcgatgtc
 15241 cttcagctcaa gattgaagc gttgtgtg caggtgagc cgaagctgt cccagctac
 15301 ttggagagca ggggggttg gaaaggcac actggagag gaggctgac gactctgag
 15361 tctgttttg aaggtgatt ttgcaagag ttgcaagag gctcagag gctcaagag
 15421 aagagagat gttgtgaa caagctctg aaggtggtt caagcagct gtagcgtat
 15481 gattttctga gtagctctc catctagc cagttctgca accaactat catctgctc
 15541 gagggtgtg tcaacacag catgctgc atgtctga cagagattt gtagagagc
 15601 gctctgagc cctctgctg ggtgagagc cttccagct ttgtgggca cccagaggt
 15661 caactctac caggagca ctgtttta gaaagaca ctagagctt ggtcagctg
 15721 aactctcca cttctgctc cttgggtca gctctgtt ttgtcttt tttttttt
 15781 agagagagc ttgtctgtg cctcagctg gattgaggt gaggatctc ggtcattg
 15841 agttctcag tccagagc aagagctc cttgctgag tccagagct ttccagagc
 15901 atagagctg aactcagct ttgactat ttgtattt ttgtattt ggtctcagc
 15961 atgagagca ggtgtgata aactctga cctcagagc ttctccacc taagctctg
 16021 aaggtgttg tactcagct gtagagagc gtagagagc agctctgag ttaattatt
 16081 cttctgagc atgtctgag ttgagagc ttctctctc atgtctcag aagctgag
 16141 gttgtctc cttcttttt tttttatt ttgtattt gaattttt ttgttagat
 16201 gaggtttca ttgtgtgc caggcagag ttgaattg aagctctg cctcagcag
 16261 cttcagctc caggtctag catctctc cttgctgag cttgctgag ttggtatga
 16321 gactctgag cactgctgt agtctgagc aggtctgag ttgtcttag ttctctct
 16381 ttgtctagc atgtctgag actccagc taagtagat cgtctgct gactctcaca
 16441 agtctgga ttacagag tagagcag cctggccca actttttt tttttttt
 16501 cagagctct cactctgct ttgagagc ttgagagc ttgactata gactcagta
 16561 gctctgagc cactgctgt ttgagagc cttctgagc cttctgagc ttgtagaga
 16621 cactctga ccaactgct cagcaattt ttaatttt ttgtagagc aggtactga
 16681 taggttccc aggtctgt ctaactgag cttcagcag gctccctc taagctctc
 16741 aagctgagc gattgagag agtagcagc gttcctgag ttgactct ttttttga
 16801 aatattata gattgttt ttgagagc cttgagagc cttccagagc aataagaa
 16861 tcaacagc aactgagtt tctctctg gggagagag ggtcaatg gtagagagga
 16921 ctgaaaata gaaataat agacagct tttaaaaaa taacaatac attcaaatg

PCT/US2004/007755
Fig. 61(e)PCT/US2004/007755
Fig. 61(f)

20401 ttgggaagtg acagatgag tttagaagt ggaagggag ctggtagc ttgactaaca
 20461 ttggaatcc caggtgttg ttgagacag gggagagat cgttccagc agaggatga
 20521 agacagctt gggacaata ttgggaact atctctca actataaaa aattatcaa
 20581 gataatgag actgtgctt ttgtccagc actcagagc cttctgata ccaagagat
 20641 tagagtgca gtagatag ttgagacac ttgactctc actctggagc gaagagag
 20701 cttgtctca aaaaaaaa atgtgagtg gaggggagac gttggtgag cgtctcag
 20761 caagcccca cctactgc ttccagcta aagcagagc agttcagat catctagc
 20821 gggagctg ttgggggag cgtctgagc atgggagc ttggcagc gactatcag
 20881 cctgagagc agactgctg caactctga gttcagca cttcagctc caaagtct
 20941 gattttgag ttccagat cttcagag aactcttc atccacta cccagctc
 21001 cgttaagc ttggtgag atctggtg actctctg gctcagagc gaaagagag
 21061 ttggaagc gggagctga ggtttgag ttgagctg gaaagcagc ttgagagga
 21121 gttgtgagc ttgagctg ttgagctg ttgagctg ttgagctg ttgagctg
 21181 aagttgag actctgga actcagag accactcag ccaactctc ttgagctg
 21241 agcagagc aggtgagc actcagat cagctact gggagctg ttgagagga
 21301 ttgtagagc ccaagagtg gtagctgag ttgctatga atctctg ctactcag
 21361 ctgggagc actcagag cttgtctca aagacagc ccaactctc ttgagctg
 21421 atgtaact agacttgg gaggtagg cagagagc gctgagct aggttoga
 21481 gaaagctg gcaacagc gaaacactg ttgactata aatacaaaa ttgagtag
 21541 gttgtgagc agctgagc ttgagagc ttgagagc gaggtagg aactctga
 21601 accagagc caggttga cttgagcag atgcccag ttgactca cctgggaa
 21661 cagattga gattagag cttggagc atgtcagc gaaagagc aggtagctg
 21721 gggagggg gggagctg ttgagctg agttctgag gattctga gttgctc
 21781 ttctctctt ttgtgagc actcagat cactcagc ggtctgag gggagctt
 21841 gttctcaga gttcactc cgtcagtg cgttgagtt aggttagt gattggag
 21901 gttgactt ttgggagc gctcagtg gactagga atcagagc aggttccc
 21961 ttgtctaac aggtttct aggttctt ctaactgag attgggtg aggttctg
 22021 ttccagagc ttactcag ggtgtctg agctgagc gttgcaaaa aggttagt
 22081 atctttgat caagagtg agtacagc ccaagctg cttgctcag ttgtctaac
 22141 agactctg gggccagc ttggagac ataatgag aggttagt gaaagctg
 22201 gcaacatg ttgaacccc ttctaaaa actcaaaa attagcagc cactgagc
 22261 ggtgctgctt aatccagct actcagag cttgagag ataatgct gaacccag
 22321 aagagcttg cagttagct agtacagc atgtctcc actcagagc actcagag
 22381 actctgctt aataaaaa taagaggtt ggttagaga tatttgctc gaaagagat
 22441 gttgagag aggtcagc ctagagctg catctgga ttacagca agagctgtg
 22501 ggtctgag cttcagagc attcaact ggttagag attctgag ttgtattt
 22561 ttgggggtg ttgctctca ttactcag ttactcagc cactttctg gctgttag
 22621 atctttgt ttctctgag agactaac agactctc actctctt caggttag
 22681 atgactga aggtgctc cgttgcagc cagagagc ggaatgagc cccagctg
 22741 agtctgag ggtctgag cagagagc ggaatgagc caaactgt cctggagag
 22801 tagagctt ggaagagc attcagag cctcagagc caaactgt cctggagag
 22861 atgggggt aggttagc aagatggc cttctctg cttctctg cactctctg
 22921 ccaagagtg ttgtctat ggtctgag gggagagc cttgctctg cttgagag
 22981 ggttcaac ttctccag gactggag ttgtagat actctctc actctctg
 23041 ccttaggag tcaacacta ttctgaga gggagctc caactcag actctctg
 23101 ttggagagc ttgtctgag cttgtctg ttgtagag gaagagatc ttgagctg
 23161 ttgtctgag cttgagagc gggagagc gattctgag ggttagagc ttgagctg
 23221 ttgtgagc cttgagagc gggagagc gattctgag ggttagagc ttgagctg
 23281 ttgtgagc cttgagagc cactgctg cactgctg cttgagag cttgagag
 23341 aggtcagc agagagctc aagagctc gggagctc aagagagc ttgtgagc
 23401 aggtcagc agagagctc aagagctc gggagctc aagagagc ttgtgagc
 23461 ttctctag ctactttg gttctgag cttcagag cctcagag cttgagag
 23521 ttctctag cttctctg ttctctag ttctctag ttctctag ttctctag
 23581 agatctct cagttctt ttctctag ttctctag ttctctag ttctctag
 23641 ttctctag cttctctg ttctctag ttctctag ttctctag ttctctag
 23701 atctctct cctcagct gataacaga aatagagag atagaact ggaagcagc
 23761 cactgctg cactgctg atgacagc ttggagagc ttggagagc atgactct

【 図 6 2 】

Fig. 61(h)

23821 aggttagag tlogagacca ttgtggacaa cttgttgaaa ctttatgtct actaaaaata
 23841 caaaatateg ctgggcatgg tgggtggcgg ctgtatatac agctatagag gaggtgtgag
 23941 caggagatc gtttgaaccc gggaggttgg gtttggatgg agcagagatc gacacatgtg
 24001 actccagcct ggtatgacga gtgaatttcc attcacaana aaaaaaanaa aaaaaaanaa
 24061 aaatgtgaag gccaggtgtgt ggtcaccggc ttgaattctc gcactttggg aggtccaggt
 24121 ggaacgatgt ctggagacca ggaattttag agcagactgg ccaaaataga aaacccctat
 24181 ctctacaaa caaaaacaa aaatattgtg ggcagatgtg gttgtgtct gttgtccag
 24241 ctactcagga ggttagagcc agaggtgtct aggcagatct gcccctggcc cagcggccct
 24301 gggacatccc ctccataatt ctccacagcc ttctctgac cagcggggcc ttctctctct
 24361 ttttttccct tatctcagcc tccagccatc agcagactcc ttctctctct caaccagctc
 24421 ttctctccc attctggcct ttcttttctc aaactcaatt ttctctctct gaaactgtct
 24481 cagctctctc cccagctctc attttggggg cttttctctc ttctttctct ttctctgaga
 24541 cccagcccaa agcctctgcc ttctgctctc agcctacccc cttttctggg ttgacacaga
 24601 ggaatggctg agcctcttta aaaaaaacgc ccggagactg ttgaactctg ttctctctct
 24661 cccgtgtggt ttcttgatgt gtttcaatctc ctggagtgag gaactctctc ggaacacaga
 24721 gaggagagcg gccacaggga actataggct tccacagctc ctctctctct ttctgacaga
 24781 cctgtctcga atccagatcca ctctggggg aaacacagaag aaaaactctg ccaatgtcca
 24841 gcaatagagc tccacagcca agccggggac ccgggtgggg accagagagc ccgcccgcga
 24901 gtaactgccc gaaagaaatc cccaccccag ggaacacatc tcccaatttt ccggagagga
 24961 gtggggatcc cagagccccc ccagccctgtg gcccccgtgg attgaacttt gagccctgtg
 25021 ggtgaggagt ttgcaatttg gagaagcagc attttggggg ttctgacata tagagagggg
 25081 aaatcacccc ccagccactct cggggaaatc cagacaaagg gtgagggcgc ctttctctca
 25141 ggtgtgggtg ttgacagagg aaaaagaggt gccacacatc tcccccgtc cccagatgac
 25201 cccctcaact ttgttgggtg gttcccgagc acaaaagaga gttgtactcc cttgacagt
 25261 ccaagatggg ggggtgtgac caggggacga gaaaggtgtg caggccacag tgaacaaatc
 25321 attgggggtt gtagtcccaa ctgtgtgtg tccacacaaa actcaatcac tttttctctc
 25381 ttgaalggcc cctcccccag ctgtgtcttt catatctcgt gttttctgag ttgtttttg
 25441 gttcaatttt ttctctctct tctctttttg tctttttttg ttgtttttct acgcctctg
 25501 tcaatacttt gttgtggagg gaactctgtt caactagccc tcttttggcc aagtgtgaac
 25561 aggggccaat caatagctt gttctcaga gttctcagc gttcaccacc attcccgagc
 25621 cccgtctggg accccacagc ttgtctatc gaaaggtgtg ggggtgagtg agtgaagag
 25681 gggtagtggt gttgtggaac cagaagacgg acccgctgtg ttgaggggtg tottaataa
 25741 tatttaaaaa agtaactttt ttgataaaaa aaagaaaagt ggaactgtcc cagctccagg
 25801 ggtgtggagg gtagagctt agtttctaa ggaagatggg gttgtgtagg gagggtttg
 25861 ttgtgtgccc agaggtgtca gaggctgaga gttgtgagg ttgt-agggg ttgactttg
 25921 ttatcagccc cagggtatgt ttgagtggtt ggggtggggg ccagagcgga ttgaactatc
 25981 gcaagtgtct ctaagctctc

Fig. 62(a)

FIGURE 62. EphB4, mRNA.

1 ctccggccgg cggcgccagc agagccaact caggagaggg gggagacccc gagggccggg
 61 ctccagccccc gcccccgggg ggggagcccc gagggccggg agggagcccc actccagcca
 121 cgtctctgtg agcgccggc cggcgccggc actccagcca cgtcccgagc ccgcccggcg
 181 cggcgccggc acagagcgg gggccaactt gggccggcg ccgggtgccc ccgacggctg
 241 catggggccc cgtgagggc cccgacagag agcccggcg ggaatctcgg cgtccacccc
 301 cccagggaga gtccagactg gggggggggg gggcccccca actcagttcg gatccactcc
 361 ggtggaggg gccctctgga gttccggatg ctgctctctt gggcttctgt agccagagct
 421 ttgagagaga cctgtgtgaa caaaaaattg gaaactgtgt actggaagt ggtgaacttc
 481 cctcaggtag accggtagtg ggaagaaact aggggctgtg atgagagaca gccacggctg
 541 ccagactagg aagttgtgta cgtgagagct gcccccggcg aggcacacug actctgacaa
 601 ggttgagtc cagagcgga cccgctctca gttgaagaca cgttgaactt caactatgct
 661 ggtgtgctgt cctgtctctg ggtctgggac tctggaagg agactctac cgtctctac
 721 tatagagag atcgagaaac gggcccggcg cccagccgag cctgagtgga gaaacccatc
 781 atcagagtg acagctggcg agcgagagat ctccacggga agagccctgg agcgagagcg
 841 accggagag ttgaattcca gacgtgtggt ctggagagcg tgaagagcg tgggtctac
 901 ctggctcttc agagacaggg tgcctgcatg gccctctgct cctgctacat cttctacaaa
 961 aagtggccgc agtgaactgt gaaactgaat gattctccgg agactctgcc tggagagctg
 1021 gtttgccggc tggccgagtg ctggtgtgtg gctggtgtg ccgcccctgg cccagagccc
 1081 agcctctact cgggtgggga tggcgagtg cccgaagag ccgtccaggg cttgagctgt
 1141 gttccgggtg ttggagcagg ttgggggaac acaaaagtcg gagactgtgc cccagagccc
 1201 ttaagacccc tgtcaggaga aggtgtctgt agcctatgag cagacatag ccaactctaa
 1261 acaattggat cagcgtctg caggtgtgtg gctggagact tccggagagc cagacacccc
 1321 cggggagagc cttgacacac cctctctgtg gctccagaga cagggttttc cccagcgaac
 1381 ggtctctccc tgaactgga atgagtgccc cccctggagt cttgttgccc agagagactc
 1441 acctagccc tccgtgtcgg ggaagtgcga cccagagagc cttgtgtccc cttgggggga
 1501 gaactgaatt ttgaacccc ccccccgggc ctgggtgagc cctgagtggt ggttgaagag
 1561 ctacgctcgt acttcaacta taacttttag gtaactgag tgaacgggtt acactcttca
 1621 gaaaggggg cgtccccatt tgaactgttc aatgtaacca ctgacggagc agtctctctc
 1681 gaaagtgttc aactccgggt gacgtgtccc tccacacgga cttgagagct ggtctgggtg
 1741 gttcccccgg accccaggtg ggtgtgtgtg gactagaggt tcaaaacca tgaagaggg
 1801 gcagaggttc ccagagcgtg ggggtctcgg aagaactcag aaaaacggcg agagctgcgg
 1861 ggtgtgaagc gggagagcag ctactcgggt caggtacggg ccgctctgga ggcgcgtcac
 1921 gggcctctgg gccagagaca cccacagcag acccaactgg atgagagaga ggggtggggg
 1981 gaaagagtg cctctatgta cccagacgga gtcgtgtgtg ttgtctctgt cctgtgtgtg
 2041 attgtgtgtg cagttctctg cctcagagag cagagaagat ggaagagagc agaatattcg
 2101 gaaacacagc gaaagtatct cactggacat ggtactaagg tctacatoga cccctctact
 2161 tatgagagac ctacagggcg tgtgagagaa ttggaagag agtccgtgtt cctctacgtc
 2221 aagattgag agttgatgtg ttgacttagg ttgggtggga ggggttggga ggggttggg
 2281 gccagagaga ctatgtggca atcaagacc tgaagagtggt ctacagggag
 2341 cggagagcga gtagagttct gaaagagccc tccactatgg gccagtctga ccaacccaat
 2401 atactccgg gccagagggc ggtccacac agcatctcgg tcaagatctg agcagagtc
 2461 atgagagaga ggtgtgtgga cttctctgt cgtgtaaac aggaagagtt caactatc
 2521 cagctctgga gaaagtctgg gggatctgac tggagagtc ggtacattcg agagatgagc
 2581 taagtctacc gaaagactgg tctgtgaac atctgatgc accagaactc cttctcgaaa
 2641 ggtctgact ttgggtcttc cagatctctg gaggagagc cttccctccc caactacac
 2701 agtctcagag cccagagagc ttacatcca tgaactgagc cccagagact tgcctctggg
 2761 aagttcaatt ccgcagatga tgcctgagat taaggagtg ttgtgtggga gttgagatg
 2821 ttgtgggaga ggcctgactg ggaactgagc aatcagagtg ttacatgag catgaaagc
 2881 gaaacaggg ttgcctggcg cccagagctgt ccaacactgt caccgtctag caccgtgagc
 2941 tgttgagag accccagcca tggcccccag ccgttcccac aggtgtctag gcccttgagc
 3001 aagatgaccc gaaacccggc cagctcaaaa atcgtggggc gggagagatgg cggggctcca
 3061 caactctccc tgaacagcg gaaactccaa taactagtt ttgagctgtt ggtgagatgg
 3121 cttcgagcca tcaaaatgg aaagacagga gaaagtgctt cctgtgccc cctgtggcg
 3181 ttgagagtg ccagagact cttgtgtgag gaaactgtcc gaatggaggt caactctggc

Fig. 63(a)

FIGURE 63. EphrinB2 Gene

3241 ggaacccaga agaaactctt ggcactgttc cagacatgga agtcccagc caagccggga
 3301 accccgggtg ggaacaggag accggccggc agtctctg ctggaggac tcccccaccc
 3361 agggacacag cctcccatct ttccgggaga gagtgggag tcaagagagc cccacgccc
 3421 gtcgcccgct ggttgtcaat ttgagccctt ggggtgagga gttgcaatt ttgagagaca
 3481 ggaatcggg gttctgcaat aatgagggg gaaatcaccc cccacacccc cttcgggaa
 3541 tccagccaaa ggttgagagg gtttccctc cagactagg ttgacacaga ggaagagga
 3601 gtcgcaaaaa tcccccagc tcccccagtg ccccccacc cttgaggggt ggttccccc
 3661 agacaaaaga gagtgtgact cctctgacag ctccagagtg ggggggctgt tccagagggc
 3721 agaaaggggt gtcggggccc agtgaacaaa tcaatgggtt ttgagctccc aactgtctg
 3781 tgcacacccc aaactcaatt atttttttct ctgttaagt cccctccccc agtctgtccc
 3841 ttcataatga aggttttga gttttttt ttgcttaaat tttttccccc gttcccttt
 3901 tttttctgg ttttttttt ctacgcctct tttcttaact ttgtgttga ggaagactgt
 3961 ttaactagtg cctcttttgc caagttgaa accagggccc acacacatgt ctgttccag
 4021 aacagtgct ttttctctcc caactccccc acccggccgg ggaacccaaa gttgtgtct
 4081 atgagaggtt gttgggtgag gtatgaaa ggagcgtagt ttgtgttga acccagaaa
 4141 ggaagccggt gtttgagggg gtttgttaaa taaattaaa aagtaactt ttgtataaa
 4201 caaaagaaa ttggagtgtt cccagctcca ggggt

【 図 6 3 】

Fig. 62(b)

【 図 6 3 】

PCT/US2004/007755
Fig. 63(c)

6782	ttttgttctg	ttttcttaca	ctgactgtag	ctatctgttg	gggggttag	tacattgcca
7123	ttttgttttc	ttttttctgc	ttttcttgga	attattatgag	ctactaatct	tgactgctca
6894	tacatctaat	acattttttc	atgattctgc	atattggctg	ctactaatcg	tgctgttact
7001	ttctctctct	ttctcttaact	acgtgcggag	tcgtctataa	acgatctaat	tcattgttgc
6942	ttctctctct	ttctctctct	acgtgcggag	tcgtctataa	acgatctaat	tcattgttgc
7021	attctaacct	ctgacgtctg	ctctctctgc	ctctaatcag	aaagtattgt	ttctgttaca
7081	ggagacagac	ctgctaaac	gttcacggag	cttgcgtgct	ctctcagctt	ttcaaacgac
7141	gactgctggc	tatttatgac	aggcaacaaa	caaaagaaa	acgtcattgt	ctctgccttc
7263	gactgctggc	gactgctggc	ggagctggag	ggagctggag	ggagctggag	acgcctgttc
7264	gactgctggc	taactctctg	ctctctctgc	ctctgttggc	ctctgttggc	acgcctgttc
7321	cgagactatg	agagataagc	aggaggaatg	gtgaacaaac	gtgaaagac	taggctgaac
7381	ctctataaac	ctctcttcag	acactatgac	cgccggcgga	ctactattct	tattctcagc
7441	agacatctgc	cgagctgtgc	cgactatata	ctattatttc	ttttctatgc	taataatcag
7501	gactgctggc	gactgctggc	ggagctggag	ggagctggag	ggagctggag	acgcctgttc
7561	aaacaaacat	ggagagaaa	ggagagaaa	acaaagtatt	ttctgcctta	tgactatctt
7621	aaacaaacat	ggagagaaa	ggagagaaa	ctggagctgt	aatagtgctt	ttctttttct
7681	ctctaaagac	cgactgaagc	aggctctaaa	ggagctgaac	ggagctgaac	atttagcgag
7741	ctctaaagac	cgactgaagc	aggctctaaa	ggagctgaac	ggagctgaac	atttagcgag
7801	tattatctct	ttttatgtct	aktatatac	ttttttttta	ttaataatct	attttttaca
7861	tttaactctt	gttgatctac	attttaata	cagttttgtt	attgcctctc	ctaacactgc
7921	tacacagctc	ccactctctc	ctggcctgct	accattgttc	ttttgttaca	ctaacactgc
7981	ttttgttctg	ttttgttctg	ttttgttctg	ctgattttgt	cgaggtggc	tggtgtttct
8041	ttgtcttctg	gagaaagcca	tattgtctta	ctgattttgt	cgaggtggc	tggtgtttct
8101	actgggggtg	gttgscctgc	tattgtctg	ctactattac	tttgtttctc	ataacaaatt
8161	actgggggtg	ctactaacct	ctctgcctgc	caaaatcttc	acgcctctca	atgcagcaac
8221	ttttgttctg	ttttgttctg	ttttgttctg	ctgattttgt	cgaggtggc	tggtgtttct
8281	ttttgttctg	ttttgttctg	ttttgttctg	ctgattttgt	cgaggtggc	tggtgtttct
8341	ttctctagac	ggagggggca	ctggcaactc	tgctctcagc	cgactgagaa	ttctaacatg
8401	ggagagagaa	tgctgaagact	gtcatctctc	acttatcttc	cagcaactata	ttctgaagac
8461	ggagagagaa	tgctgaagact	gtcatctctc	acttatcttc	cagcaactata	ttctgaagac
8521	aaagatgact	attattata	gtggctgttc	agaaagctg	ctgattttct	ttctgtatgc
8581	ttctctctct	tatgcactgc	ataacaggtg	gtttttctta	gtttttctta	ataatcaac
8641	cgccctctct	ttctatgac	tactagaaa	caacattata	caggttagct	cattgtatgc
8701	ctgagcagct	cgctctctgc	actgtctgag	aaacattctg	aaacattctg	ttctatctac
8761	ctgagcagct	cgctctctgc	actgtctgag	aaacattctg	aaacattctg	ttctatctac
8821	cgattttgtg	gctgatctgc	gtttactctg	tttttaactg	ctctctctg	atactagaaa
8881	ctgatagac	ctgatagac	ggagctgcct	aggagctcct	gctctcttca	atttagggca
8941	cgagctctgc	ctggagctgt	tgagaaacaa	ggaggtttgc	ggcccccac	cgagctctgc
9001	ctgatagac	ctgatagac	ggagctgcct	aggagctcct	gctctcttca	atttagggca
9061	ctggctgaac	tgctgctcca	ggggcctgct	ggagaaactc	gcctctcaac	acactctgtg
9121	ggaaacacac	tcaacattata	actgtttgtg	tgctgtctga	agaaatctgc	actgttgcgc
9181	ttgttgggag	actgcggagg	actatcaaac	tgctgtggga	gattttgtgc	ataatgcaac
9241	ctgactctgc	gatttaaacg	ctctctctgc	tatagaaagc	cgccgggggg	ttatctgaaa
9301	tttatagctta	ctgtctgtgc	ctctctctgc	gacacagagc	aggaggtatg	cattttctgc
9361	tgagggggag	ggagaaacag	ctatagaggga	ggaggtgtgc	tttgtattata	ctgttggaact
9421	cattgtttta	ggagaaacag	ctatagaggga	ggaggtgtgc	tttgtattata	ctgttggaact
9481	cattgtttta	ggagaaacag	ctatagaggga	ggaggtgtgc	tttgtattata	ctgttggaact
9541	ttctctgcct	cgccctgctg	ctctctctgc	atactctaca	ggaaactgca	gcgcactgac
9601	ttctctgcct	cgccctgctg	ctctctctgc	atactctaca	ggaaactgca	gcgcactgac
9661	ttctctgcct	cgccctgctg	ctctctctgc	atactctaca	ggaaactgca	gcgcactgac
9721	attctaacgg	ctactaagc	tgattgttgc	attgtgtctc	aaacacagct	tacagctata
9781	attctaacgg	ctactaagc	tgattgttgc	attgtgtctc	aaacacagct	tacagctata
9841	ttctctggtg	actgtttaga	gagactgagc	tagtctgttc	caattgtgoc	actatctaaa
9901	tgagggacag	acacatagc	tgacttactaa	aggagttaac	taattgttgc	caacattata
9961	tgagggacag	acacatagc	tgacttactaa	aggagttaac	taattgttgc	caacattata
10021	gtttatatac	aaagtctgct	gaattgtctg	tttgtgtgct	cgctgtgtgc	ta

Fig. 63(c)

13561	caagcagcaga	ctccgcagcag	tatocaaacaa	aagtgtagcag	cttggggcga	ggaagcaggg
13621	gcgctgcagc	ctttgtatgt	agcagtcagc	ttgtgcacaa	aaacattcgt	tttagatcgt
13681	agtgtagcag	cttttttttt	aagtgtagct	tgatgcagcg	gcacaaacgt	acccctacgt
13741	gagtcagcag	cttttttttt	gagtcagcag	ttgtgcacaa	gagtcagcag	cttcgcagcg
13801	cttttttttt	cttttttttt	gagtcagcag	gagtcagcag	gagtcagcag	cttcgcagcg
13861	accaccaccg	atagatgtgt	tgctgcacaa	tttataacac	ttttatagct	ccaaatgtgc
13921	tgcagcagc	ttgacgcctc	tttttttttc	ttgtacaa	caggtgtcag	ttgtgcagcg
13981	tatagtcagt	gggaagagct	gagtcagcag	ggaacgtcgt	aacacgcaga	ttgtgcacaa
14041	ttgttgattt	aaagcgcgtg	agacagatgt	gttcgcctcg	cttcagattt	taagcgtaac
14101	cttttttttt	ctaacgcagta	gtatctgtcga	acctaaccgt	gtatbaaacg	gacacctcgt
14161	actttttttt	cagtcagcag	ctgatatctg	aatataacgt	gtgagaagac	ttctgtcgtg
14221	gcagtcagc	cagctttatc	ctgatatctg	aatataacgt	gtgagaagac	ttctgtcgtg
14281	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	ggaacgtcgt	tttttttttt	attttttaac
14341	tatttttttt	taactgtcgt	gttttttgaa	gggcctcgtc	tttttttttt	attttttaac
14401	aaaactttta	tgtttggggg	actttgcagaa	tactatttta	agctgttgca	gcacatcagc
14461	aatatgcaga	agcatcagaa	gactaacagt	ctctgcctgt	tatgcagcag	gcctcctaac
14521	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	tttaagctgt	actgtcgtcg	taagtcagcg
14581	acttttcaga	agagcgcgtg	ctttttttgt	tttaagctgt	actgtcgtcg	taagtcagcg
14641	ggagccgcga	agtcacagtc	ggggtagcag	gcacagcgtt	ttgttcattc	cagcagcagcg
14701	tgcatctcgt	ctgcagagcg	gactgcagaa	acacagcagc	tacgcagcag	cagcagcagcg
14761	ctcttcagc	cttcagagcag	cagtcagcag	agttgtgcag	cttcagcagc	cttcagcagc
14821	cttcagcagc	cttcagcagc	cttcagcagc	cttcagcagc	cttcagcagc	cttcagcagc
14881	atgctggaaa	tttgcagatc	actttgcagaa	gacacgtcgt	ttgggagaaa	acctgtgcag
14941	ttcatcagct	tttgttgatt	acacgtcgtc	ctgcagcgtc	ttgttaaacg	ggaggttcag
15001	acttttcaga	tttgttcaga	ctgcacgtcg	tgcagtaaaa	ttgttatatt	ctctcttttt
15061	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt
15121	ttataatcag	ccacactcgt	actagtcaga	tttttttttt	ctctgtctgt	ggaggttcag
15181	tcnaagatt	actgcgtcag	ctgataaaaa	tttttaagcg	ttatttttaa	acttcaattc
15241	gaaagtcagc	acacagattt	cttttcacaa	cattaaaaaa	ataatgttgt	attcttcata
15301	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt
15361	acttcagcgt	agcccaaaat	gtgtcaccgt	actaaagaaa	tttgtgcaca	tttgtttatg
15421	gttgtctcgt	tgtagtcagc	aaataacaaa	gaaacacagt	ccattattta	ttgatgttgt
15481	ttatcttcaa	tgaaatagct	actctgtctc	actgatcatc	atacctaac	ttgttaattt
15541	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt
15601	ttctgcctcg	ctttgcagct	ctctgcagtc	gttagagcag	ttttatgtgt	gtgcctctcc
15661	cccccaccca	attttatctg	ctccacgtcg	cagcagcagc	cagtcacgga	ctaaccttgt
15721	ctctctcgtc	ggagtcacag	ctctgcagtc	cttaagtcgt	gataactcgt	ataattacac
15781	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt
15841	gagtcagcag	gatgtctttt	aaatagcag	cttcacacaa	ctttctcagc	cgagtcagcg
15901	gttgtctcgt	cgattttggg	ttttacgtcg	ctagtatttt	gtctgggtgt	agaaacttgt
15961	agctctcgtt	ttgatctctt	tttgtctcgt	ctctttattc	ttgtctcgtc	aaactctcgt
16021	gttgtctcgt	ctttgcagct	ctttgcagct	ctttgcagct	ctttgcagct	ctttgcagct
16081	ctttgcagct	ctttgcagct	ctttgcagct	ctttgcagct	ctttgcagct	ctttgcagct
16141	tttgttcagc	attttcagag	actaacgcag	ctatcagctg	ccccccagca	attttgggtt
16201	ttctctcgtc	ttttatacac	ttttgttcga	acagtcagaa	aaactgtcag	aaagtcagcg
16261	agttgttcag	taagggcgtg	gttgagtcag	cagtcagaaa	gagtcagcag	aaagtcagcg
16321	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt
16381	taaaactcgt	ctacgtctcg	ctctccacga	ttctctcaga	actcagggca	aaagtcagaa
16441	attatcagtc	ccagtcagct	ctctctcaga	ttctccagca	ccctgtgaga	cccgatcagt
16501	caatacagcg	gcagagaaaa	gcgcagcag	gacatccaga	cggtgcagtc	ttctgtctgt
16561	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt
16621	aatatcagcg	tttttttaac	aaagtcgtc	tttgtagttg	gttttaaac	tttgtctgtc
16681	tttttttttt	atttgtgtgt	ctagatcatt	aaataaaag	aatatttgtt	tgatatacga
16741	cttaattttt	ttttttttgt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt	cttttttttt
16801	cttttttttt	cttttttttt	cttttttt			

Fig. 63(g)

16981 accgctccca gctcccaaaa gctcggagat tatagagctg agccacacag cctcgcaaca
 17041 taaggactac ttttttaagt ttttcaaat agctctgga agtgcgaag tccaaattat
 17101 tagagatcct gtttagatca ctaaaatttt atgtctaat gtagatgata gaagagcca
 17161 aagtatcatc gtagagctat tagatccag atcttgcaaa aacttgaaaa aggtttggtt
 17231 aagttcaata gttatccaaa gattgaaaaa agtatccaat atcagatttt tcccaatagt
 17281 tcatgttaag tttagagccg ctaattcagt gtttccagat ttttcaaac tatattgttg
 17341 ctatatttga ttcacagaa gggatcatt tgtcttgttt aggtatgatt cactgggaaa
 17401 agccacagga gttgcctatt tccactcag agtccctact attagagtag ctcccaatcg
 17461 tccacagga ggcctccac tagagatag ccaagcaaca agccatggcc tgggaagcag
 17521 tcttgaaact ggagatgctc tctagtgaaa ggaagagcag gcttccctcc cccaggaaga
 17581 tagtagagag cctgtctgca ctgtctcgag gattcgaaat agtctgtcc agttctctc
 17641 cctgtgtggg acatgataca cctctgtggg atctctgttt ttatttggg ttaaaatcag
 17701 cagatttatc taagtacac ctctctcaca cactccctgt tctggcgaaa gttbaacag
 17761 aacagctccc cccatctggg catggctgtg atcttgagc gttccctctc gctgtttttg
 17821 gttacacgat gaactcttrc tgnacacaa gaaagaaatc tgtctgtcc atctaatg
 17881 gaagtcagtt tagtaattt aaacttagc agttatctat atcatactc ttttttaac
 17941 ttccaagtc agcatagag aggtatgtg ttgatataa caaaatttt aggcataga
 18001 tagacgtgtg gtagctgttg attttgatc gttctcaga atccaagaa acagatatac
 18061 aataaaaaac cactcacttc aaaaataga atctgttata ctgtctgat tatcaactat
 18121 ggaactcaat ttttttcaat taataaaga tactattag aaactcacc natittctt
 18181 tatatacat tctgtctatt gaaatttctg ctggagcca tatgtaaat taagtataa
 18241 acacaaatgc catgtagctg gctgtctttc tctccactt ttgttcttg gctctctgg
 18301 gaagctgtgc aactctgag cgtctctca gattcgagc tggaaagag cctctctct
 18361 tccagcaaca ctgatgttg ctgtgtgttg agtcaactc tctctgtctc tccatgtgac
 18421 gctcacaagc gctgtgtctg atttctctta atctctatg tatcctata aenctgtat
 18481 ttgggggaaa aaattgtgtt tcccaagctt gtagtataa ttgaagaa ttgagctgac
 18541 actgaagctt gttcagaaaa agggctgtt tctctcagc ctatctggtc accagtggtc
 18601 ttctacctgt ttgtgttgtt aggtctcagc gctcctgca aatgaagaac atggagatga
 18661 ttgggtgtgt gcaagctgtg agccaaaagc aagctgtcga aagcagctgt gttgtatta
 18721 tttagaggtt ttagatcttg aactctgagc atctctgagc tagagagga ttgagagaa
 18781 ttgcacata ttgaagcttc ttccagagag gaagctcag aaactgtcc tgcagagctc
 18841 ctgtctctcc agaatgcca gttgctgtg gaggctatc tgaagaaacc agtctctct
 18901 ctgtcagtc agtctgttg atctgtctg atctgtctca gaattctaat cagctgtgt
 18961 atctgaaat agtctgtt attttgactt cactgtgat aaagtctga tctcttgtt
 19021 tcatctcatc tttttgtcca atcaactac tattattga gaactcttc tgtctcagc
 19081 ccttggtgtt taattatgt atctgacaa ttggggactc gctcctctc agggatctag
 19141 actcaaatc cctatgact agtctgtccc acctctctgt cactcaaac gttctgcca
 19201 actcaattga ctgtgtgtt tactcaca gtaactgtt ttgtctgcat ggtctctag
 19261 gaagtgtgag agtctccggg aggtcagctc aaktatgag actacagta gtgaataac
 19321 ggcagagga gttagagat aggtctgtc ctcaactgca cctctccac ttgaagcca
 19381 taattctctc actcaagtc agctgtgtgt atgtgtgtt atcacagta ttgaagaa
 19441 aagctgtgta accactcaaa gatttggggt ctctctatc gatttataa aagaaatc
 19501 catgttcta atgtctcta gaaacataa gtttgagga gctggagata aaattctgga
 19561 ctatgttttc gccaagctgt gtttgagag gtttgaaatc gtttttgaaa tccagagaa
 19621 taagtgagat gccaagatc taatttctta atgtatga aatagatca ttgaagtg
 19681 aggtctccca cccactctcc gttttgataa gctcccccag gactcagct atctctgga
 19741 atagattttt acaaaagttg gacatgata gtttgagaa acatttatac caaggagc
 19801 ctgggtgtgt ttgaatgga ataaagagc ttaataagt attattata ctgactgtct
 19861 ctgaataatc gttgagagat gctcagagc ccaagacctc gttccctatg gttccatg
 19921 tctctcact acacatcca gacacatga gactctgtc ttgaagctga agctctgga
 19981 gttcagagga gttgactgca tggcctggga gaaacactc tgtgaatttt tagtaagaa
 20041 gaaaaaaaaa aatctctctt gaaagacagc gattctgga gaaatgaaa ttgaagaa
 20101 gctcagagat gctcagagat gctcagagat gctcagagat gctcagagat gctcagagat
 20161 gctcagagat gctcagagat gctcagagat gctcagagat gctcagagat gctcagagat
 20221 gaaataggtt acatctgtt ttttttga ttttctaa agttagatc gattctgga
 20281 gggctgtgaa tttagagaa ctctccctaa tagagatcaa cacttataa gttctgtct
 20341 tgcagctaac aaaaagaga gatttaagat taagaagtt tggagctat gagaacact

Fig. 63(h)

23821 gattagetta ccaagatta gtaacacaa caaacagaaa aaaaagagc aatgtgtgag
 23881 agtatatct tagtaaggag taattatatt aaataaaag catcttgaaa ttgaacagtt
 23941 agatggggtg gcaagatga ccaagatgtt ggaataatt ttgaaaatga aatagctaac
 24001 gctgaatatt aatgaagaa tttagatttt ttgaagtgta aactagatc tatatagga
 24061 agactttat ttittattt tattttatt calitttng agggatctc tcttttgt
 24121 cagctggag ttgagtggtg tttagctggc tactgcgaac ctccactcc ttggtttcag
 24181 tgtttctct gctcagctc cccagatagc ttggatgaaa gttgtggctc aatttttga
 24241 ttttttagca agaggggtt tccacagctg gctcagagat atctgagct ctgactgtc
 24301 tgaattctct cccactgagc cccactgagc ttgacttca ggtctgagc agactgtg
 24361 gcttagtaa agacttttaa atgaagatt ttctcagtag agtactggt aggtatgca
 24421 tttaacgaa actgaagatc atcagagta ttatttga agtttaagt ccttaggtg
 24481 ggtggagaa agagctgtc gttcgagaa gggggggccc actagagatc agatctgca
 24541 ggggtgaa taattgtgtt taattttagc tatgtatca ctgctccagc atgctctc
 24601 acacagagc tctctctct taattttagc tatgtatca ctgctccagc atgctctc
 24661 ctactgtg cttgggggca agtgaattt tagtaaatc taagatttga acattttagt
 24721 tgaatataa ttgagatag gaaataatt gtttaaac atctcttga ttaattgtg
 24781 ggaatttata taattgttt ttataata atgaagatt ttgatttga aggttttga
 24841 ttataataa taataataa ctcaacata acgacataa ttattttct tttttgaaa
 24901 ctctctaac cactcaataa gtttcttg agttactga ctactctg cctcagctc
 24961 ctctctagc ttacagetta ctacagaaa gataagga gctgggata atagatag
 25021 tctataataa gactggggg tctcagttt gaaactaga gggatatt gactgtg
 25081 ttgggggact gctcaaggg cttgtggag agttaggc taagaattt gccaagagat
 25141 cactgttagc ctctcagag agttgaaga atccagatc ggttagaga gggagaggg
 25201 tttagatagc ttgggaatc atagagaa atctctca cctcagagc ccaagatag
 25261 gttctacaa gttctcact aagaagatc agaaatcag aaaaacatc tttaaatgt
 25321 tttagaatt aattattgtc ttgatctg ttgatagaa ttccagaa ccaaaacat
 25381 gactgattt taagaatc cactctgca ttacagaaa atgcacaaa ccaaacacac
 25441 acaacacac acaacacac acaacacac agctctgta ctgttttt ttgaagaa
 25501 agttgttga gttgattt ttatatag taactttata aatagtgata gttgagata
 25561 cgaagagat taataattac agtatcatc tttaacttc aaactgtt tctacttga
 25621 gacagcaat aattatgca tttaggtta gttttataa atctcactg gtttcaac
 25681 caactgtg gttctagtgt gtaagctg tccagagc cagttgtata ataatagt
 25741 cattgtgtc ttgtttttt ccttagagc gaaaagaga cctgagtt ttgagagct
 25801 ctgactttt cccagctgt gtagtctga ggggagta ctctcattg gtagtctc
 25861 acacagagc ctctttaga gaattaac agaacactag agtctactc gtagtctc
 25921 ctctcagc taatgaga agtcaatt atctttga gttttttt atttctcaat
 25981 aaacgttt tagtatgta atgtctgt ctaagtagc cgttctctc cagtttcaag
 26041 cctctctag gctgggata caaatgcat atagatcac ttgttagtt gtttcaat
 26101 ggaactgct ctgtgaaat tttttaaa catttattt gattgtgtt gttactgt
 26161 taataataa gctcctcag ttgttgtt cagctgtg tatgtattt taattgaa
 26221 tttatttata acaacataa gacttacta agtccctta aggtattgt gccaactga
 26281 tagctatct catctctct tctactag gttattgt tttttttt gttgcaaat
 26341 tatattaga ttgtcagca ataatatg tttaactaa atttttcaat ttctagat
 26401 gttattgga gtttaaatg tatttcaat ttatagat ttctagata ctgtgtg
 26461 atcagatct aagaataga ccaactagc ttatgagga cttgtatagt gtttttatt
 26521 ttgttttga atgtatttt toaagtagc tattcagta atagctgtc gttgtatt
 26581 gctatgag atctctaat cttaagtaa tgaagagtt ggaattatc gttcagag
 26641 ctgagagc cctttttt atgtatga gattttat gtttttata atgtttat
 26701 caattcaat acactctgt tattttata ttgttttaa agttttttt atgtctag
 26761 aataactgt ttgaattgt cttatttga agggaggtg ttgtctaga tttctaat
 26821 ctccagttga ctttgggaa gctcttgtt ttgttagagc ttatccaga gataactgt
 26881 ttgaattt ttgtgtgtc ttgtgtgtc ttgtgtgtc ttgtgtgtc ttgtgtgtc
 26941 ctccagagtt ttgtgtgtc gactcttg ccaagctgt cttaagagc ttgtgtgtc
 27001 ttgtttatc atctctgat aaactctg aaaaacac caaagagc ttgtgtgtc
 27061 ctcaacaaat ctgtgtgtc agagatggt gaaataga ccaagctgtc ttgtgtgtc
 27121 tccagtgaa agtctctgt ttgtgtgtc ttgtgtgtc ttgtgtgtc ttgtgtgtc
 27181 ctccactt agtctctgt ggtttttg ttatttgt gcaactcat agttagaa

20401 agcaggaat tgaactctg ttgtttgaaa ctttaagat gttctaaaa gttcagaaa
 20461 taagagagga gaaaagga atgcagga gattatcaat ttattgttta tgaatttag
 20521 ttgtactta ctgcagagca ctgtctgga gtttttaac ctgcagaca cctcaagatt
 20581 actgtgttg ttgttgaggg gctgggggag ataaagaa tagctgctc ccaaatctc
 20641 tgaatctgc ttgtatgta gaactgaat ttgttttgt cctcaagaa gacgaattg
 20701 tccagagga acactgtgc attcacagc ttgcagagc atccagagc ggtccactc
 20761 gttactgga ttgttcaaa gttcagaa atctctaac atgtacaca ttgtttttt
 20821 aaatatata ttgtataaa aattgtttt gattctgtc tccagagaa tttttttga
 20881 tgaatagat tcatatct ttgtcaag agctcagta aaaaaaag gcaactctt
 20941 ctctttgtg gttgtcag taacacttr ccaagagaa gttacagc atatactt
 21001 tcttccaca taagaggtg ggtttttta tagtatca tagtatatt tctgtatgt
 21061 ttgtgtgtg tctataaca cactatgca cttttcaga aattaatcc atctatga
 21121 ataaactca aactattccc ttgtgtgtg ttgaattgt ggggtgctc atactctgt
 21181 ctactctct tagtaata tgcactgga gttactgt ttgtgtgtg tctctgtta
 21241 aagaaggtt ttgttgga gattcagag gactgttt gttttagc tttaattt
 21301 taatgagct gagggtgtg ctgttaca agcagctgt attctaat gttgtttg
 21361 tttagact tttagaaga ttgtcatag gaattctgt tttagtttt ttagaagaa
 21421 tccacttaa gaagatcat tgaagact ggttccagc aaaaagaaa gggagaggt
 21481 aggttttag ctataagat taagggata ttgtatagt agttttgt ctaagattt
 21541 gttctgga ataatgga gaaatcat ctcaagta ttgtatag gaaataaaa gatttatg
 21601 gaggagagc ttgtgtct ttgaagaga ggaacttca ttgtgagat gatacaac
 21661 caaactat ttcttgtt ttattttta gattttga gactgtgt ttgtctgt
 21721 taataaaaa cactgttt gactgtgac ttactata ttgaagaa ttgaact
 21781 ttgtgaga actgtctgt taatacat caacagaa gggaaacta caggacaca
 21841 agtatagc ggtatcct ttactcaca ttgaagct ttctctgtg cactgcaat
 21901 aacttaag ttgaactgt taataata caaataaaa gttatgct ctccagct
 21961 aggaaggt agtgaagt taacaaag agtatgaa tatcaagc gagggtgtg
 22021 taagaagat tgcagagta gctgtact accgttga ttgaagaa gatttatg
 22081 ctgtctctc tttttttt aagttatc tcaaaatc atactcaca tatgtatg
 22141 agtagaga ctgttgaaa ataaagtt gactgtgaa atgtgtgt ttgtttatg
 22201 ggaattgt ggtactgt taactgtg taactgtg taactgtg taactgtg
 22261 ctgtttttt ttatctttt atattttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 22321 gttttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 22381 gttttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 22441 gttttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 22501 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 22561 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 22621 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 22681 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 22741 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 22801 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 22861 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 22921 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 22981 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 23041 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 23101 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 23161 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 23221 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 23281 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 23341 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 23401 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 23461 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 23521 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 23581 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 23641 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 23701 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 23761 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt

Fig. 63(i)

27241 cactctgtg ctatgttgt agtctctt tccagagc ttgtttgta aagttgtc
 27301 ttgtgagctc accctgtgt gttcagga tctcttga ggtcctcc actcctcc
 27361 ccttggaac gctctcta aggaactgt acaagctgt acaagctgt actcctgt
 27421 ggtccactc gttcagct ttctatgt tttatttt ttatttttt tcaaaagc
 27481 ttgtctaat gttcagct ttctatgt tttatttt ttatttttt tcaaaagc
 27541 ctacgaaa tcaaaaaa agtcaaat cttccaaa taatgaaa caattctt
 27601 aagaatga agcagaaa ctccagagc ttgtgtgt ttgtatga tatgtttt
 27661 ctctctgt ttgtttta ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 27721 ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
 27781 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 27841 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 27901 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 27961 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28021 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28081 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28141 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28201 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28261 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28321 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28381 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28441 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28501 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28561 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28621 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28681 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28741 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28801 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28861 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28921 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 28981 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29041 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29101 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29161 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29221 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29281 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29341 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29401 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29461 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29521 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29581 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29641 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29701 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29761 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29821 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29881 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 29941 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 30001 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 30061 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 30121 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 30181 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 30241 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 30301 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 30361 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 30421 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 30481 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 30541 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt
 30601 ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt ttatttgt

Fig. 63(k)

34051	ttcttatttt	tcgaactaac	ttatcttttt	tggttttttt	aacatcgac	ttgatagac
34141	ttgcttattt	gaacaacatg	ataacgtgtg	ttgttgtgtg	tgcttgtgtg	tattttaaaa
34201	gcgaacgtg	tgctcttcac	gtgtgtatgt	gatgatgat	tttttttatt	tcagtgtgtg
34261	tcgaacgtg	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
34321	tcgaacgtg	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
34381	gtagtctgtc	catagattat	gcacagcagt	tgctctttaa	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
34441	ataacgttgt	actgtgtgtc	agctgagatg	tatgt-aagc	caacgttgtgt	attctgcgtc
34501	ctcttcagct	ttctatcgac	tgagtgatgt	tcagtctgtg	ctgttgagct	ttctatcgac
34561	tcgaacgtg	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
34621	ataacgttgt	tcattatttc	aat-aacttg	ataactcttc	atagtattat	tatttcctgt
34681	tcgtctgttc	ttcttcacag	aactgtgcga	ctactatttc	tgagattatt	tttgtcgttc
34741	tcgtctgttc	atctctgtgt	agcagagcac	ccatcatgtc	tcgaacacac	aaagtgttgt
34801	tcgaacgtg	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
34861	gtctgagctc	agctctgtgt	gcacagagcg	gcgaacatc	gatgaagaca	tggtaaagtgt
34921	gagatcgtc	tcctctcttc	ggggatgtgt	tatctctttt	tcactctctc	gatcaacacg
34981	tcctcagctc	ctcttcagct	tcactctctg	tcctcttttt	ttctactctc	gatcaacacg
35041	tcgtctgttc	ctctctgtgt	tcagtctgtg	tcctcttttt	tcactctctc	gatcaacacg
35101	actgcagctg	ctctgtgtgt	tcagtctgtg	tcctcttttt	tcactctctc	gatcaacacg
35161	gagatcgtc	gtctgcagct	aatctctaca	ctctcagaac	taggctctgt	ggggacattat
35221	gtatgagctc	ctatactatt	aatctctaca	ctctcagaac	tcggacacac	tcctttttaa
35281	tcgaacgtg	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
35341	actgcagctg	tccttttaatt	tcgaacacac	attttttttt	tcgtctctgt	ggaacaaatt
35401	actgcagctg	tccttttaatt	tcgaacacac	attttttttt	tcgtctctgt	ggaacaaatt
35461	tgatgtatca	tttagacago	aatctctaca	tcgtctgtgt	atagtatctc	gcgtgatgaa
35521	ataacgttgt	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
35581	ataacgttgt	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
35641	tgaaagtatg	tttttttttc	cacagtattc	tcactctctc	ttattttttt	aatatgcgtc
35701	ataacgttgt	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
35761	ttctattctt	agagttgtgt	gcagagagag	aggtattatt	ggatgtgtgt	acttttttgt
35821	tcgaacgtg	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
35881	gtctgagctc	gtatgtaggg	gcgaagaaag	gatttttctc	ctatgttgag	ctataattac
35941	ataacgttgt	aatatgtgtc	agttcttttt	gaattctgaa	actattctga	agtttactac
36001	ctcttcagct	agttgatcac	agtttcttca	ctgttgctaa	aacgttttgt	gcacttttga
36061	tcgaacgtg	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
36121	ctcttcagct	gcacacagc	attctggtag	tatttttgtt	attatgtagt	aattttttgt
36181	tattctctgc	tactcttggt	actctcagag	tgactcttaa	agggaaagaa	gaaatagtgt
36241	gatatagatg	gaaaataatc	ctgtatctgt	acgtgtctgc	ccatttttgt	tcctccgtgt
36301	tcgaacgtg	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
36361	actgcagctg	tttttttttc	ttactcttca	agatttgatg	gtttctctc	ttcccaacac
36421	cttttttttt	ataacacgaa	ataaacagtg	ttctactctt	aaaggtgcga	agacgttttc
36481	ttctattctt	ataacacgct	ctctcagag	ttctactctt	tttgttgtgt	ataattatga
36541	tcgaacgtg	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
36601	gcgaacacac	ggagatctgc	ataacacaga	tgatcatctc	gaaaagcagc	tgactcatca
36661	ataacgttgt	ataacacaga	ataatgtgtg	actctctgtg	ctctcagctt	gcacaaagag
36721	actgcagctg	ccgtttcttc	ctctcagcac	gcagttctca	ataattattc	ccagatcagc
36781	ctcttcagct	ctcttttttc	ctctcagcac	gcagttctca	ataattattc	ccagatcagc
36841	tcgaacgtg	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
36901	ttttttctgt	caactgtctc	ccagttctct	ttgtctatc	ttacagttat	tggtgaactc
36961	tttgacacag	ataaacagct	tactactctt	tgctgaatc	ctcagaaatc	tgctactctg
37021	actgtgtgtg	caatttgtgc	tgagtttgat	tttatgtgtc	tgagaaatgc	ataaacagag
37081	tcgaacgtg	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
37141	ctcttcagct	ctttctatat	gcacatcatc	ctactatttt	taggaaatgc	ataatggaaa
37201	actatctaca	ataattgatc	gatgatgat	ctctctcgca	atgtctcgca	ataatggatc
37261	gcctacagaa	actaatgatc	tgctgcctct	ggagagagag	gattacttca	aatgttgtac
37321	tcgaacgtg	tcgtctgcgt	ctctcagagt	gtctatcgac	tgctgtgtgt	tcgtgtgtgt
37381						

40931	caattatcca	tccctcttga	agcaacaaga	aggaagaagt	tattctctaa	ctttacaga
40981	caaatgtgtg	caactctctg	tgcnaactcg	ataaatagat	aatataatga	tgcgcaggag
41001	caatctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	tgcgcctctg
41101	caatctcttg	ttaatgaagt	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	tgcgcctctg
41161	agcggccctc	caactctctc	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	tgcgcctctg
41221	ctctctctga	agcggccctc	tgaagctctg	gctacgaact	ctctctctctc	agagcgaggg
41281	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	agagcgaggg
41341	tccctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	gaggtctaga	gatgacaga	gcacagaggg
41401	tgctctctca	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
41461	tgcggagctc	agaggaatcc	ctctctcttg	actctctcct	ctctctcttg	tctagctctg
41521	agcagctga	tctctctctg	aagctctctg	tctctctg	taataagctg	ggctatcttc
41591	ctactctttt	agaggtctga	aagagctctg	tctctctg	ggagcgagt	actatctctc
41641	gacctttctt	ctctctctctg	ctctctcttg	tacagacacg	ggcacaacgg	cgccagctctc
41701	gagcaatctc	actctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	ggagctcttg	cgatgatctg
41801	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
41821	cgaggaacag	tctctctctg	actctctctg	ctctctcttg	agcagactct	ctctctcttg
41891	gcgcgcggcg	taacacacag	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	taagactctg
41941	gcgcgcggcg	ctctctctctg	actctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	actctctctg
42001	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
42061	actctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	actctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg
42121	ctctctcttg	ctctctcttg	gagatctctg	taagacagcg	ctctctcttg	ggagacactg
42181	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
42241	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
42301	tctctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
42361	gagcagcagg	gagacagctg	ctctctcttg	ggagcagctg	tgcacatctg	ggagcagctg
42421	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
42481	tacagactct	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
42541	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
42601	actctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
42661	gagcagcagg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
42721	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
42781	ggggtctggg	aagagctctg	ctctctcttg	actctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg
42841	ctctctcttg	aaagaaagaa	aaagaaatct	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
42901	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
42961	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43021	agcagctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43081	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43141	gagagctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43201	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43261	tgaagacaga	agcctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43321	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43381	gagctctctg	actctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43441	actctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43501	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43561	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43621	actctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43681	gctctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43741	ctctctcttg	agagacatct	ctctctcttg	actctctctg	actctctctg	ctctctcttg
43801	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43861	actctctctg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg
43921	tgcctctctg	agagagagtg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg	ctctctcttg

【 図 6 4 】

FIGURE 64. EphrinB2, mRNA

```

1 gggagggagct gggagtggtt tggcactgag tgtgagagagg gacttcgtgt ggaagtactgt
61 ctgggggtgtt ttggtggttt tatcgagaag tggcatttcc aaatcgatag ttttagagacc
121 tatctatcgg aattctctga actcacaact tctcaactgga caagactctg tactataccc
181 acagatagga gcaaatctgg atattatctg ccccaagctg gactcctaaa ttgtctggca
241 gtatgaatat tataaagttt atalggctga taagagacaa gagaacagat gactacttaa
301 gaaggaatat acocctctcc tcaactctgc caacaacagc caagatatca aatttcaocat
361 caagtctcaa ghattctcgc ccaactctgc gggctctaga ttccagaaga acaagactta
421 ttactatata tctactcaaa atgggtctct gggaggctcg gatacccgag agggaggggt
481 gtgcacagca agagactctg agtctctcat gaaagtctga caagatgaaa gtctctctgtg
541 atcaacagag atataagctc caacaagagc tccagaacta gaagctggta caaatggaag
601 aagttctgca acagactctc ttgtctaaac aaatcaggtt cttagacagc acggcaacag
661 cggcggacat cggggaaca acatctctcg ttccgaagtg gacttatctg agggatctg
721 ttcaagatgc atcatcttca tggctatcat cactacgtgt gtggctctct tgcctgaagta
781 ccgagagaga cacaggaagc actcggcgga gcacaagacc acgtgtctgc tgcgcacact
841 gggcaaccca agggcgagc gcaacacaaa cggctcagag ccaggtgaca ctatcatccc
901 gctaaagact cggagagagc tttcttgccc tcaatcagag aaggtcagcg aggaactaag
961 gcaacccgtg tacatgtccc aggaagtgcc ccgcgagag ccggcgacaa ttactacaaa
1021 ggtctcagag ggaacccgtg ggtacctctg ctttcccgag ggaacactaa tgcctcagtg
1081 cttcctctga gggctcgaga gcccgcgctg cggagacttg actgaagac agccacgggg
1141 gagagggaca cttctctctg gaagggctcg tggcgctgga cagttacat agtctctgag
1201 cattcgccct tggtagaaca acacgtctcc tggagctctg aagctgtgct agagagcgcc
1261 cattcggaact gctgtgagcc gtcccaagtc tctctctcga agcactgtgc tgcggtcaat
1321 cgggctctcg cggagagcaa gggagacagc tgggttgggg acgagagggc tgtgagatc
1381 ctggcaggtg cccacagatg ccccgctcgg aagggctcgg tctgtctgag ggtctcttc
1441 ccccgagctg ctacacggac ttgtccacag gactctggc tagttaaggt gtgcaaatg
1501 cttcagagct tagtctctac ttgtctcact gttctgttac ccagggtctc ggaagcaact
1561 aactgagacc tccactccac actctgacaa cctcagggac actatgtctc gaactccctc
1621 cctccacgag ctggcaacaa cagctctcgt ccatggctaa tccgttacta gaactgtgt
1681 ttgctacaaa ggtgccttt agcagatgc tagctctctc ggaagaaag ctaggagtc
1741 atagagagga gtgggctgtg ggaagaggtt ggtctgaact gcaactcact gctgtgcctc
1801 ctgaacacga agttctgaaa ggaagaaaga aaaaagcaac taggtagcac agcactcttg
1861 tttgtctgag atcgagaggg ccagtagagg acacgaagc agcactcttg gttctcagtg
1921 catggggggg cactctctgt tatcaaatg cagtggtcag gaagaaagc cactctctat
1981 tccgggggac aagacaggtt atgtctggga aaggaacagc ctgggggga aggaagaag
2041 aggcgctgtg atgatataat cgggagagc ttgttgggta ctgggaataa gatacaagc
2101 tccagaggtg aggaagctcg gttcgtcttg gatgatttt taagcaagat cagctgttat
2161 acttatcaaa ttattataaa cacagggaaa gactctagga gaatagcaga agtccaaatc
2221 gactctaaaa gtgaaagag ccaagagctca acaggtctga attccatcat catcgttgtt
2281 atlaagaaat ctttatatat aagagtagg tccagctccc cttcccccag gttccctct
2341 cccctccaga ttgagcctta cgaactcttg gttatctggg ttgctctcgg gtcccgaggc
2401 tggaggtctg gtaactgagc aggtctcagc gccctgctgt ctgtctcaag gtgaagaca
2461 cagcgagagc cttctagagt ctttagagca gaagtctgta attccatcat catcgttgtt
2521 gaagtagaga cgtatttata atagttatat agaacacagc ggtatataaa cgaagacttt
2581 tcaactaat atattttag gtgtgacaa gttgcaaca gaaatgctga aattcatttg
2641 tggcaattaa gtggtcccaa tgcctcagc ttaaaaaa saattggaca gctactctg
2701 ggaaaaaaaa catctatcca aaaaagacaa caatgagagc aaatgcaaaa ataccgaagt
2761 cttccgaagg catctcagc accctcagc taggaagtcg gacgccaaa gggcagaag
2821 ccagatgac tgcatatcat atttaacat gacaagatgt tccggctgtt attctcgtt
2881 tgggttttcc cttgccttat gggctgaagt gttctctaga atcccgagc tcaactctgg
2941 gctctcaggt gaagattcag ctggtgtctc ctctctctgc cctcccccgc accctctccc
3001 tctcggaaa caggaaggtt aacaggaata cctacttttt atgtctatgt caaatagac
3061 attcttataa tagtctctgt actatgttaa cactttgtgt tctgaattgg aagggaaaaa
3121 aactctagag acagcatitt aaggtctcca gactccaggt gaatcactgc aaaaatgagt
3181 gtcacagaa attatgctc tctattctct gaactcgaaa atgatgttg tccaaagtgc
3241 gttgtgtgat gttgtgagtg gtcgggtgta tcaatgtgta catatgtga taatatcat

```

Fig. 64(b)

```

3361 ctacaaataa tattatatat atcatatata tattttctgt gagggttgc atgtgtaaac
3361 gccacagttac atatgtaat ctttccatca ccccacact tctttctgt gacttatgc
3421 aagagtttct tgaagccat cagaagttac ttttaggatg gggagaggg gcagagagg
3481 gaaaaatggg aaatagtctg attttaatga aatcaaatgt atgatcac atgttggtac
3541 gttttgtgtc tatgtataac tgtgaaaaat cagatgaatt gataaagag tctcctgcaa
3601 ccaatgaaa agttgtctg ggtctgtgt ttggtctggt agtaaaag acatataac
3661 aactgtccct ttgttgtag ttgttttagc ttgggaagt tcaagttaat gcttctgtg
3721 tatgatctc cctgttccc cgaactttga atttgacca tcaagtcca atgttttca
3781 tgaataag tttagatttt atgtctatg gatttgggt gtacactg acttattcac
3841 ctttttata aaaaacaca tgaacacag aagaagagc ttttcttcc ccaagttgt
3901 tacaatagc aatgttgtt ttattaaag tcaagcaag atgttttga taaactctga
3961 atttgaat gtatttagt acagctgtt tcaagcagc gtcattcccc ttgcaactg
4021 aatgagaaa aatgttata aaggtgtgc aaattgtgc atattgtgc ggaactatg
4081 tcaatgaat atttattaa aattctgtg tcaaatgt agtaacaa gtaattgac
4141 tgagtataa atatttttt cttctctgt ttattttta tgcctgtca taggttttaa
4201 atctgttta gtttccact cagtttagc ccagaaaat aatcctgt atgcacatto
4261 cactctgt tcaactgaa ttgtcttta aaaaaaaa atatttttt cctatggaaa
4321 aaaaaaaa aaaa

```

【 図 6 5 】

FIGURE 65. Eph4 Precursor Protein

```

1 mairvllvwa alaaaleetl lntkltatdl kvrtfcpvqd qvealeglde eqhsvrtyev
61 cdvcpagga hrlctgmpv tgehvyacl rfmleclal ptagrsket tcyfyysda
121 dtataltapw menpykavd vaashlirkr pgaetgkva vclrlgpls kagfyldfd
181 ggaomallsl hlffykcagl tvnltfrpkr vprelvvpa gscvdaava gpgspalyer
241 sdgqvseqv tgcscagfte aagntkera caggtfkpls ggcgcgcpa nshantigsa
301 vcpvrvyfr arddgagp ttpwseprv varlgsalil lewaglaag gredltyalr
361 cccrcppgac apogdlitfd ppxrdlvepv vvrglrlpdt tytfektaln gyalatapy
421 pfepvntvd revppavsd rvtrespsal elawevrap agavldyevk yhekagaps
481 svrltkten raelrlktg asyivqvrr seagypfeg ehshqqlde segwzeqial
541 agtaavrv lvllvrvr lrlctgagr saeydkhkg yllghktvy idpftyedpn
601 avrefekai dsvykieev igagfgevc rgrlragkx escvaktlk gytterora
661 flaeasingv felpnkrlr gvttnempvm ilrlfemnga ldsrlindg qrtvlglym
721 lrglaagery laemyvhrd laarnilvns nlvckvedfg larfleenas dptyseislg
781 klpirtatp aiaafktaa adaweyglm vermafger ydwengvri nalgdyrlp
841 pppdptalh qlmldowkd marnrpfqv vsalidmtrn psalkivare ngasphild
901 guphyasfg svgevlrak mryseefaa agfgefelve qisaelldlr gylaghqkx
961 llaavghms qkgyupggt gppspcy

```

【 図 6 6 】

FIGURE 66. EphrinB2

```

1 mavrnrdnkv ycwglmrlc rtasikslv epiymnena kflpggplvl ypgidkldi
61 icpkvsktv ggyeyklyvm vdkdgdvct ikcantpnl cakpddktr lkfdeqspn
121 lwglefghnk dyziateng slegldnqeg gvcotramkl lmkvgqdas agstznkdp
181 rpeleagtn gretteptv kpnpgstdd neaghegmni lgevalfag laagciliiv
241 iilitivill kyrrnrkbs phhtcllea tlatkkrqm nngsepedil lprcadsvr
301 ophyaksvd yghpyivge mppqpaniy ykv

```


【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/07755
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER 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. FIELDS SEARCHED		
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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 March 2005 (03.03.2005)		Date of mailing of the international search report 18 MAY 2005
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 Sheela J. Huff Telephone No. 571272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/07755

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ 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.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ 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.:
4. ☒ 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

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

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 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 (f)(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. 1×1 results in 1 inventions. Each of Groups IV has 13 additional sequences (in addition to SEQ ID No. EPHB4. 13×1 results in 3 inventions. Each of Groups V has 3 additional sequences (in addition to SEQ ID No. EPHB4. 3×1 results in 3 inventions. Each of Groups VI has 5 additional sequences (in addition to SEQ ID No. EPHB4. 5×1 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)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 8/64 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 K 8/64	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
C 1 2 P 21/08 (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, MD, MG, MK, MN, MW, MX, 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 ゴズリア, 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, ゴーナル 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