

(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2004-520007

(P2004-520007A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 31/07	A 6 1 K 31/07	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/337	A 6 1 K 31/337	2 G O 5 4
A 6 1 K 31/704	A 6 1 K 31/704	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/21	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 9
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	4 B O 6 3
		(全 162 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-516058 (P2002-516058)	(71) 出願人	598093026
(86) (22) 出願日	平成13年8月1日 (2001.8.1)		オーソーマクニール・ファーマシューチカル・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月3日 (2003.2.3)		アメリカ合衆国ニュージャージー州08869-0602ラリタン・ユースルート
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/024469		ナンバー202
(87) 国際公開番号	W02002/010339	(71) 出願人	503046541
(87) 国際公開日	平成14年2月7日 (2002.2.7)		オレゴン・ヘルス・アンド・サイエンス・ユニバーシテイ
(31) 優先権主張番号	60/222, 162		アメリカ合衆国オレゴン州97006ピーバートン・ノースウエストワンハンドレッツ
(32) 優先日	平成12年8月2日 (2000.8.2)		ドエイティファイフスアベニュー505・オーエイチエスユウエストキャンパス
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100060782
			弁理士 小田島 平吉
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 KSHV感染の遺伝子発現プロフィール及びKSHV感染を処置する方法

(57) 【要約】

本発明は、KSHV生活環の潜伏及び溶菌期の間にかかる宿主内皮細胞転写パターンにおける変化を同定するために核酸マイクロアレイ技術を利用する。次に、増殖サイクル中にアップレギュレーションされるいくつかの遺伝子の生産もしくは活性を阻害し、そして2つのそのような標的は、後期ウイルス遺伝子の発現において役割を有することを示した。この組み合わせた方法を用いて、KSHV感染にとって重要であることが以前に知られていない細胞経路を同定し、そしてこのようにして見出した新規な抗ウイルス方法の有効性の証拠を提示する。さらに、本発明は、血管新生及びトランスフォーメーションを包含する様々な内皮細胞由来の活性に關与する多種多様な内皮細胞遺伝子及び経路を同定する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

c - K i t シグナリング経路を阻害する化合物の投与を含んでなる K S H V の複製を阻害する方法。

【請求項 2】

c - K i t シグナリング経路を阻害する化合物の投与を含んでなるカポジ肉腫の処置方法。

【請求項 3】

I 型シグマ受容体シグナリング経路を阻害する化合物の投与を含んでなる K S H V の複製を阻害する方法。

【請求項 4】

I 型シグマ受容体シグナリング経路を阻害する化合物の投与を含んでなるカポジ肉腫の処置方法。

【請求項 5】

表 2 に記載する遺伝子よりなる群から選択される少なくとも一つの遺伝子を含んでなる K S H V 複製の溶菌期に特異的な遺伝子発現プロファイル。

【請求項 6】

表 2 に記載する遺伝子よりなる群から選択される少なくとも一つの遺伝子を含んでなる K S H V 複製の潜伏期に特異的な遺伝子発現プロファイル。

【請求項 7】

表 2 に記載する遺伝子よりなる群から選択される一つもしくはそれ以上の遺伝子とハイブリダイズするプローブをコードする核酸を含んでなるマイクロアレイ。

【請求項 8】

a) K S H V に感染していると思われる細胞のサンプルを得ること；
b) 細胞から R N A を抽出すること；
c) 表 2 に記載する遺伝子よりなる群から選択される一つもしくはそれ以上の遺伝子に特異的なプローブをコードする核酸を含んでなるマイクロアレイと R N A とを接触させること；及び
d) 細胞のサンプルの遺伝子発現プロファイルを決定し、そしてそれを K S H V 感染細胞の遺伝子発現プロファイルと比較すること、
を含んでなる K S H V もしくは K S H V 複製の段階を診断する方法。

【請求項 9】

a) 表 2 に記載する遺伝子よりなる遺伝子の群から遺伝子産物を選択すること；
b) 試験化合物が遺伝子産物を阻害もしくは活性化するかどうかを決定するために遺伝子によりコードされる遺伝子産物と試験化合物とを合わせること；及び
c) 試験化合物が K S H V の複製を阻害もしくは活性化するかどうかを決定するために K S H V 感染細胞と試験化合物とを合わせること、
を含んでなる K S H V 複製のモジュレーターを同定する方法。

【請求項 10】

c - K i t を阻害する化合物の投与及び c - K i t の阻害以外の機構により K S H V 複製を調節する化合物の投与を含んでなる K S H V の複製を阻害する方法。

【請求項 11】

c - K i t の阻害以外の機構により K S H V 複製を調節する該化合物が、ダウノルピシン、ドキシノルピシン、インターフェロンアルファ、レチノイド及びタキソールよりなる群から選択される請求項 10 の方法。

【請求項 12】

c - K i t を阻害する化合物の投与及び c - K i t の阻害以外の機構によりカポジ肉腫を調節する化合物の投与を含んでなるカポジ肉腫の処置方法。

【請求項 13】

c - K i t の阻害以外の機構により K S H V 複製を調節する該化合物が、ダウノルピシン

10

20

30

40

50

、ドキソルビシン、インターフェロンアルファ、レチノイド及びタキソールよりなる群から選択される請求項 1 2 の方法。

【請求項 1 4】

I 型シグマ受容体を阻害する化合物の投与及び I 型シグマ受容体の阻害以外の機構により K S H V 複製を調節する化合物の投与を含んでなる K S H V の複製を阻害する方法。

【請求項 1 5】

I 型シグマ受容体の阻害以外の機構により K S H V 複製を調節する該化合物が、ダウノルビシン、ドキソルビシン、インターフェロンアルファ、レチノイド及びタキソールよりなる群から選択される請求項 1 4 の方法。

【請求項 1 6】

I 型シグマ受容体を阻害する化合物の投与及び I 型シグマ受容体の阻害以外の機構によりカポジ肉腫を調節する化合物の投与を含んでなるカポジ肉腫の処置方法。

【請求項 1 7】

I 型シグマ受容体の阻害以外の機構によりカポジ肉腫を調節する該化合物が、ダウノルビシン、ドキソルビシン、インターフェロンアルファ、レチノイド及びタキソールよりなる群から選択される請求項 1 6 の方法。

【請求項 1 8】

a) R N A サンプルの R N A 発現のレベルを決定すること、ここで、該 R N A サンプルは、

b) 増幅し、そして蛍光的に標識し、遺伝子発現プロファイルに相当する多数の核酸配列を含有するマイクロアレイにハイブリダイズさせ、そして該マイクロアレイを蛍光に関して走査する；

c) アルゴリズムを用いて該発現レベルを正規化すること；及び

d) 該 R N A サンプルを遺伝子発現プロファイルデータベースに対して評点すること、の工程を含んでなるビジネスを行う方法。

【請求項 1 9】

該 R N A サンプルを患者から得る請求項 1 8 の方法。

【請求項 2 0】

該 R N A サンプルを血液、羊水液、血漿、精液、骨髄及び組織生検よりなる群から選択される患者サンプルから単離する請求項 1 9 の方法。

【請求項 2 1】

該マイクロアレイが D N A マイクロアレイである請求項 1 8 の方法。

【請求項 2 2】

該データベースがウェブブラウザインターフェースを介して利用できる請求項 1 8 の方法。

【請求項 2 3】

該ウェブブラウザが遺伝子配列分析手段を提供する請求項 1 8 の方法。

【請求項 2 4】

ユーザーが該データベースへのアクセスの料金を支払う請求項 1 8 の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願との関係

本願は、2000年8月2日に出願された米国仮出願第60/222,162号の利益を請求する。

【0002】

発明の背景

カポジ肉腫 (K S) は、皮膚及び内臓器官上の血管増殖性病巣 (a n g i o p r o l i f e r a t i v e l e s i o n s) を特徴とする血管新生物である。病巣は、内皮起源の増殖する紡錘状の腫瘍細胞の存在により識別され、そして炎症性細胞及び赤血球の広範囲血管外遊出を有する異常な血管新生を示す。K S は免疫応答性個体において稀にしか起こ

10

20

30

40

50

らない症状であるが、後天性免疫不全症候群（エイズ）と関連する最も一般的な悪性疾患である。ヒトヘルペスウイルス 8（HHV8）もしくはカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）は、KS 発症と関連する感染性病原体である⁽¹⁴⁾。ウイルスは、病巣における紡錘細胞の大部分、並びに病変がある内皮細胞及び浸潤する白血球に感染する^(7, 8, 79, 80, 81)。紡錘細胞の大部分は潜伏型の KSHV ゲノムを保有し、わずかな割合の細胞は増殖サイクル（lytic cycle）に入り、そして感染性ウイルスを生産する^(72, 82, 80, 81)。KSHV の複雑な生物学における潜伏及び増殖ウイルス（lytic virus）遺伝子発現の正確な役割は、これから完全に解明されなければならない。さらに、細胞性遺伝子プロファイルに対するウイルス遺伝子発現の影響についてもしくはこれらのウイルス-細胞相互作用が腫瘍形成にどのように寄与するかほとんど知られていない。有効なインビトロ培養系の確立は、KSHV 及び KS と関連する多数の問題の解明を与えるはずである。最近、我々は、KSHV 感染に非常に許容的でありそしてゲノムを主に潜伏状態で無限に維持する不死化した皮膚微小血管内皮細胞を用いてそのような培養系を開発した。KSHV での DMVEC の感染は、紡錘細胞形成、接触阻止の喪失及び軟寒天における増殖を包含する表現型変化を引き起こし、インビボにおける KS 病巣形成を促進するものによく似たウイルス-細胞相互作用を示唆する。

10

【0003】

KSHV 感染により誘導される変化は、宿主細胞の改変された転写プログラムに反映される。DNA マイクロアレイ分析は、数千の宿主遺伝子の転写変化の同時モニタリングを可能にする⁽⁶⁰⁾。既知の DNA フラグメントをつけたガラススライドにハイブリダイズする RNA サンプルの自動定量により、様々な実験条件下での転写の違いの比較が可能になる。

20

【0004】

発明の要約

ヒト内皮細胞のカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス感染は、紡錘細胞形成及び悪性トランスフォーメーションを引き起こす。DNA マイクロアレイ分析により、ウイルス感染は、血管新生、炎症及び分化を支配するものを包含する多数の細胞経路の大きな変化をもたらすことが示された。増殖サイクルの誘導の際に、KSHV は宿主細胞応答をさらに調節した。我々は、増殖サイクル中に過剰発現される遺伝子が、可能性のある抗ウイルス標的であるかどうかを評価するために、それらの誘導もしくは機能を体系的に阻害した。I 型シグマ受容体のアンタゴニスト、ハロペリドール、及びキナーゼアンカリングプロテイン（kinase anchoring protein）（AKAP）とプロテインキナーゼ A（PKA）間の相互作用のペプチドインヒビター、Ht-31 は、増殖ウイルス遺伝子の発現を阻害したが、潜伏ウイルス遺伝子発現を阻害しなかった。KSHV 感染後に有意にアップレギュレーションされる遺伝子の一つは、幹細胞因子（stem cell factor、SCF）の受容体の機能を果たす受容体チロシンキナーゼ、c-Kit（CD117）タンパク質の遺伝子であった^(83, 84)。KSHV に感染した DMVEC は、外因性 SCF に対する増大した増殖性応答を示し、そして c-Kit シグナリングの阻害は、リガンド依存性増殖の減少を引き起こし、そして KSHV によって誘導されるトランスフォームした表現型を取り消す。さらに、c-kit シグナル伝達の阻害は、KSHV によって誘導される紡錘細胞形成を防ぎ、一方、アデノウイルスベクターによる c-kit の発現は、感染していない内皮細胞における紡錘細胞形成を誘導する。従って、KSHV は、c-Kit 発現及び機能の調節によって KS 発症に寄与する。本発明は、KSHV 感染並びにカポジ肉腫を処置及び診断するための方法及び組成物を提供する。本発明はまた、ウイルス複製の様々な段階での KSHV 感染細胞の遺伝子発現プロファイルも提供する。さらに、本発明は、内皮細胞トランスフォーメーションの処置及び診断のための方法及び組成物を提供する。本発明はまた、新生血管形成を刺激もしくは阻害することを包含する血管新生を調節するための、並びに内皮細胞を取り囲む細胞外マトリックスを調節するための方法及び組成物も提供する。本発明は、インターフェロンによりもたらされる遺伝子発現の調節のための方法及び組成物を提供する。さらに、本発明は、内皮細胞炎症の調節のための方

30

40

50

法及び組成物を提供する。また、本発明に含まれるものは、内皮細胞の脱分化のための方法及び組成物である。本発明はまた、該遺伝子発現プロファイル及びマイクロアレイを使用する方法、並びに遺伝子発現プロファイル及びマイクロアレイの該使用に関するビジネス方法にも関する。

【0005】

詳細な記述

DNAマイクロアレイによる宿主細胞-ウイルス相互作用の分析は、細胞経路とウイルス感染間の以前に知られていない関係の発見を可能にする。KSHVを保有する内皮細胞にこの技術を用いることにより、我々は、KSHVにより発現が調節される細胞性遺伝子を同定した。3つ全ての実験において一貫してアップレギュレーションされる細胞性転写産物の一つはc-kitであった。c-kitは、幹細胞因子(SCF)により活性化される受容体チロシンキナーゼである。KSHV感染後のc-Kit過剰発現は、パラ分泌及び自己分泌c-Kit/SCF相互作用の両方に影響を及ぼす。機能性結果を有する増大した発現は、c-Kit発現がKSの発症において役割を果たし得る可能性を高める。DMVECのKSHV感染はSCF受容体、c-Kitの発現を高め、そして増大した発現は、外因性SCFに応答する増大した増殖を促進する。さらに、DMVECはc-KitリガンドSCFを共発現し、そして自己分泌c-Kitチロシンキナーゼ活性の阻害は、KSHV感染によりDMVECにおいて誘導されるトランスフォームした表現型を抑制する。c-Kit発現及びc-Kit/SCF相互作用は、造血細胞及び限られた数の非造血細胞の正常な発生にとって重要であるが、c-Kitの発現はまた様々な悪性疾患とも関連している。c-Kit関連癌では、c-Kitの異なる役割が同定されている。例えば、GISTs及び生殖細胞新生物では、膜近傍及びチロシンキナーゼドメインにおける機能獲得型突然変異が記述されており、それぞれ、リガンド非依存性二量化もしくは二量化なしの構成的活性化を可能にする^(85, 86, 87, 88)。小細胞肺癌(SCLC)及び乳癌では、c-Kit及びSCFの共発現が起こり、そして自己分泌増殖ループを生じると考えられる^(89, 90, 91, 92, 93)。内皮細胞はKS紡錘細胞の前駆体であるので、皮膚内皮細胞のKSHV感染が、機能性結果を有するc-Kit発現を増大するという我々の発見は、c-Kit発現がKSの発症において役割を果たし得る可能性を高める。最近の報告により、KS組織におけるc-Kitの発現が初めて示され⁽⁹⁴⁾、そしてさらに詳細に調べた一つの場合には、膜近傍もしくはチロシンキナーゼドメインにおけるいかなる活性化突然変異も認められなかった。このインビボ結果は、c-KitがKSの発症において役割を果たすことを裏付ける。

10

20

30

【0006】

KS疾患中、KS病巣中の異型内皮細胞におけるKSHVの存在は、紡錘細胞発生及び腫瘍進行におけるKSHVの役割を示唆する。我々の研究において、DMVECのKSHV感染が機能性c-Kit受容体をアップレギュレーションするという結果は、c-Kit活性が細胞性トランスフォーメーションに必要とされるという教示と合わせて、KSの発症におけるc-Kit/SCFの役割を強く裏付ける。

【0007】

KSHVに関連する細胞性トランスフォーメーションにおけるc-Kitの原因的役割の同定は、KSの新規な治療的標的を示唆する。本報告において記述するc-Kitチロシンキナーゼインヒビター、STI571は、Bcr-Ablキナーゼ活性と関連する疾患、慢性骨髄性白血病の処置のI/II相臨床試験においてかなりの見込みを示している⁽⁹⁵⁾。最近、STI571はまた、c-Kit活性の阻害によりインビトロにおいてSCLC細胞系の増殖を抑制することも示された^(93, 96)。70%を超えるSCLCはc-Kit及びSCFを共発現し、c-Kit活性のインヒビターは、自己分泌c-Kitシグナリングが役割を果たすこの及び他の癌の処置の臨床用途を有し得ることを示唆する。要するに、c-Kitは、KS腫瘍形成における主要な標的とみなすべきである。従って、STI571、もしくはc-Kitシグナリングの他の薬理的インヒビターは、KSの処置のための可能性のある治療的因子として評価すべきである。

40

50

【0008】

本報告において記述する c - K i t チロシンキナーゼ活性の薬理的インヒビター、S T I 5 7 1 (G L E E V E C^R) は、最初に A b 1 チロシンキナーゼに対する特異性に関して選択された 2 - フェニルアミノピリミジン誘導体である^(9 7)。続いてこのインヒビターは、幅があるが限られた範囲の特異性を示し、B c r - A b 1 融合タンパク質、血小板由来増殖因子受容体及び c - k i t 受容体チロシンキナーゼに対して有効であることが示された^(9 7 , 9 8 , 9 9)。B c r - A b 1 融合遺伝子は、慢性骨髄性白血病 (C M L) にかかっている患者の 9 5 % において見出され、そして B c r - A b 1 の増大したチロシンキナーゼ活性は、該疾患における主要因子であると考えられる。S T I 5 7 1 は、B c r - A b 1 発現細胞の増殖及び腫瘍形成を抑制し^(9 8)、そして C M L の処置に対して認可されている^(9 5)。我々の結果は、S T I 5 7 1、並びに c - K i t シグナリングの他のインヒビターが、K S の処置及び K S H V の複製を阻害することに治療的潜在能力を有することを示す。

10

【0009】

我々はまた、ウイルス遺伝子発現に必要とされる細胞性遺伝子も同定した。誘導していない細胞において発現される全ての遺伝子並びに感染していない細胞において誘導されるものを差し引くことにより、P M A 刺激の 6 時間もしくは 4 8 時間後に K S H V によって特異的に且つ有意に誘導される少数群の遺伝子を同定した。この群の大部分は、前炎症性刺激により誘導され従っておそらく N F B により調節される遺伝子を含有した。増殖複製中の前炎症性遺伝子の誘導は、宿主の先天性免疫応答であることができ、もしくは N F B のウイルス活性化によりもたらされることができ、一致して、N F B 活性化の阻害は、B 細胞において K S H V によってもたらされるアポトーシスを誘導した。しかしながら、本研究において使用する小分子 N F B インヒビターでこれを確かめることはできなかった。2 3 個の遺伝子の機能もしくは誘導をインヒビターにより直接標的とした。これらのうち、2 つの標的は、後期遺伝子発現に必要とされることが見出された。従って、アップレギュレーションされる遺伝子のかなりの部分はウイルス遺伝子発現にとって必須であり、そしてより低いストリンジェンシーの検索は、ウイルス生活環に必要とされる追加の遺伝子を明らかにするであろう。例えば、潜伏期の中に誘導されるものに推定標的遺伝子のプールを拡張することにより、腫瘍細胞増殖もしくは潜伏プロウイルスの再活性化にとって必須の細胞性遺伝子産物を明らかにすることができる。従って、D N A チップは、

20

30

【0010】

我々は、O R F 6 5 遺伝子の発現にとって必須の細胞性成分として A K A P / P K A 相互作用及び I 型シグマ受容体を同定した。P K A は、細胞内 c A M P により活性化される遍在するシグナリング成分である。様々な A K A P との会合は、P K A の細胞内局在化をもたらし、そして細胞外刺激に応答する適時の活性化を保証する^(2 1 , 2 6)。P K A は、N M D A 及びグルタミン酸受容体のような細胞表面受容体、並びにミトコンドリアのような細胞内構造と関連することが見出されている^(2 1 , 2 6)。A K A P Y o t i a o は、P K A をプロテインホスファターゼ 1 及び N M D A 受容体につなぎ、そして P K A 活性化はそれによりイオンチャンネルの活性を調節することができる^(7 0)。さらに、

40

【0011】

I 型シグマ受容体は、ハロペリドールのような抗精神病薬の結合部位として特性化された^(3 3)。該受容体は E R に局在し、そして活性化の際に細胞表面にトランスロケーションすることができる^(4 2)。P K A のように、I 型シグマ受容体は、イオンチャンネル活性の制御に関与している。例えば、I 型シグマアゴニストは、ニューロンにおける N M D A 誘発性カルシウムシグナリングに影響を与える^(2 8 , 3 2)。I 型シグマ受容体は、E R からの I P 3 を介したカルシウム放出及び膜脱分極後の細胞外カルシウム流入の両方に影響を及ぼすことが示されている^(2 9)。興味深いことに、I P 3 受容体の P K A

50

リン酸化はその感受性を高め⁽⁷⁾、同定される薬剤標的の共通の作用部位を示唆する。KSHV感染中のカルシウムシグナリングの重要性についてはほとんど知られていないが、しかしながら、イオノマイシンは、ホルボールエステルによって誘導される再活性化プロセスを強力に増大することが報告されている⁽¹³⁾。総合すると、これは、カルシウムシグナリングが、KSHVの効率のよい再活性化もしくは複製に必要とされ得ることを示唆する。興味深いことに、ハロペリドールは、組織培養において、別のガンマ-ヘルペスウイルス、エプスタイン・バーウイルス(EBV)の複製を阻害することが示されている⁽⁴⁹⁾。ガンマ-ヘルペスウイルス再活性化及び複製におけるカルシウムシグナリングの必要条件をさらに調べる実験は、現在進行中である。

【0012】

我々の方法は、抗ウイルス研究の新規な戦略である。伝統的な仮説駆動型の方法と異なり、我々は、KSHVの増殖サイクル介入のための可能性のある標的を同定するためにデータ駆動型の方法を用いた。我々は、ウイルスに感染した宿主細胞の大域転写解析により得られるデータの大本体から、ある種のもって決定した規準を満たす遺伝子を選択した。これらの遺伝子によりコードされるタンパク質の大部分の上流調節因子もしくは機能のいずれかを阻害することにより、ウイルス複製にとって重要な宿主細胞経路を同定することができる。これらの経路は、新規な介入経路、もしくは既知の薬剤の新規な用途さえ提供する。従って、DNA-マイクロアレイは、ウイルス疾患の新規な処置の開発に適用することができる。

【0013】

本発明は、表2において同定する核酸分子及びそれによりコードされるポリペプチドに関し、それらは、KSHV感染によりその発現が調節される内皮細胞遺伝子である。KSHV調節内皮細胞遺伝子(KSHV modulated endothelial cell gene)の完全なアミノ酸配列は既知であってもなくてもよく、そして全長ゲノムDNAもしくはアミノ酸コーディング領域をコードする完全なヌクレオチド配列は既知であってもなくてもよい。American Type Culture Collectionのような寄託物から容易に入手可能である内皮細胞系の多種多様な哺乳動物細胞及び細胞タイプが、記述する遺伝子を含有すると予測される。1つもしくはそれ以上のKSHV調節内皮細胞遺伝子を生産することができるヒト起源の内皮細胞には、HUV-EC-C(CRL-1730)、HAAE-1(CRL-2472)、HAAE-2(CRL-2473)、HFAE-2(CRL-2474)、HIAE-78(CRL-2475)、HIAE-101(CRL-2478)、HUV-12(CRL-2480)及びDMVECが包含されるがこれらに限定されるものではない。

【0014】

他の細胞及び細胞系もまた、KSHV調節内皮細胞遺伝子cDNAを単離する用途のために適当であることができる。適当な細胞の選択は、細胞抽出物におけるもしくは全細胞アッセイにおけるKSHV調節内皮細胞遺伝子発現活性のスクリーニングにより行うことができる。これらのアッセイのいずれか一つにおいてKSHV調節内皮細胞遺伝子活性を有する細胞は、KSHV調節内皮細胞遺伝子DNAもしくはmRNAの単離のために適当であることができる。

【0015】

KSHV調節内皮細胞遺伝子DNAを分子的にクローン化するためには、当該技術分野において既知である様々な方法のいずれかを用いることができる。これらの方法には、適切な発現ベクター系における適切な細胞からのcDNAライブラリーの構築後のKSHV調節内皮細胞遺伝子の直接機能性発現が包含されるがこれに限定されるものではない。別の方法は、1つもしくはそれ以上のKSHV調節内皮細胞遺伝子によりコードされるアミノ酸配列から設計した標識オリゴヌクレオチドプローブでバクテリオファージもしくはプラスミドシャトルベクターにおいて構築したcDNAライブラリーをスクリーニングすることである。さらなる方法は、KSHV調節内皮細胞遺伝子によりコードされるタンパク質をコードする部分cDNAでバクテリオファージもしくはプラスミドシャトルベクターに

10

20

30

40

50

において構築した cDNA ライブラリーをスクリーニングすることからなる。この部分 cDNA は、1 つもしくはそれ以上の KSHV 調節内皮細胞遺伝子によりコードされる精製タンパク質のアミノ酸配列からの縮重オリゴヌクレオチドプライマーの設計によって DNA フラグメントの特異的 PCR 増幅により得られる。

【0016】

別の方法は、細胞から RNA を単離しそして RNA をインビトロもしくはインビボ翻訳系によってタンパク質に翻訳することである。ペプチド、タンパク質への RNA の翻訳は、例えば、抗-タンパク質抗体との免疫学的反応性によりもしくはタンパク質の生物学的活性により同定することができる目的のタンパク質の少なくとも一部の生産をもたらす。この方法では、適切な細胞から単離した RNA のプールを、所望のタンパク質の少なくとも一部をコードする RNA の存在に関して分析することができる。不要な RNA から適切な RNA を精製するために RNA プールのさらなる分別を行うことができる。この方法により生産されるペプチドもしくはタンパク質は、アミノ酸配列を提供するために分析することができ、それを今度は KSHV 調節内皮細胞遺伝子 cDNA の生産のためのプライマーを提供するために用いる、もしくは翻訳に使用した RNA を、KSHV 調節内皮細胞遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を提供しそして cDNA のこの生産のプロープを製造するために分析することができる。この方法は当該技術分野において既知であり、例えば、Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に見出すことができる。

10

20

【0017】

他のタイプのライブラリー、並びに他の細胞もしくは細胞タイプから構築したライブラリーが、KSHV 調節内皮細胞遺伝子をコードする DNA を単離するために有用であり得ることは当業者に容易に明らかである。他のタイプのライブラリーには、他の細胞から得られる cDNA ライブラリー、並びに YAC (酵母人工染色体) 及びコスミドライブラリーを含むゲノム DNA ライブラリーが包含されるがこれらに限定されるものではない。

【0018】

KSHV 調節内皮細胞遺伝子活性を有する細胞もしくは細胞系から適当な cDNA ライブラリーを製造できることは、当業者に容易に明らかである。KSHV 調節内皮細胞遺伝子 cDNA を単離するための cDNA ライブラリーの製造に使用する細胞もしくは細胞系の選択は、適切な生物学的活性の測定もしくはリガンド結合アッセイを用いて最初に細胞関連生物学的活性を測定することにより行うことができる。

30

【0019】

cDNA ライブラリーの製造は、当該技術分野において周知である標準的な技術により行うことができる。周知である cDNA ライブラリー構築技術は、例えば、Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989)に見出すことができる。

40

【0020】

KSHV 調節内皮細胞遺伝子をコードする DNA はまた、適当なゲノム DNA ライブラリーから単離できることもまた、当業者に容易に明らかである。ゲノム DNA ライブラリーの構築は、当該技術分野において周知である標準的な技術により行うことができる。周知であるゲノム DNA ライブラリー構築技術は、Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989)に見出すことができる。

50

【0021】

上記の方法によってKSHV調節内皮細胞遺伝子をクローン化するためには、遺伝子産物のアミノ酸配列が必要であり得る。これを成し遂げるために、タンパク質を精製し、そして部分アミノ酸配列を自動シーケネーターにより決定することができる。全アミノ酸配列を決定する必要はないが、部分KSHV調節内皮細胞遺伝子DNAフラグメントをPCR増幅するためのプライマーを製造するためにタンパク質からの6～8アミノ酸の2つの領域の線状配列を決定する。

【0022】

いったん適当なアミノ酸配列が同定されると、それらをコードすることができるDNA配列を合成する。遺伝暗号は縮重しているので、特定のアミノ酸をコードするために1つより多くのコドンを用いることができ、従って、アミノ酸配列を1組の同様のDNAオリゴヌクレオチドのいずれかによりコードすることができる。該組の一つのメンバーのみが、KSHV調節内皮細胞遺伝子配列と同一であるが、ミスマッチを有するDNAオリゴヌクレオチドの存在下でさえDNAにハイブリダイズすることができる。ミスマッチDNAオリゴヌクレオチドは、KSHV調節内皮細胞遺伝子DNAにそれでもなお十分にハイブリダイズすることができ、KSHV調節内皮細胞遺伝子をコードするDNAの同定及び単離を可能にする。これらの方法により単離されるDNAは、無脊椎動物及び脊椎動物起源から、様々な細胞タイプからのDNAライブラリーをスクリーニングするため及び相同遺伝子を単離するために用いることができる。

10

【0023】

遺伝暗号は縮重しているので、特定のアミノ酸をコードするために1つより多くのコドンを用いることができ、従って、アミノ酸配列を1組の同様のDNAオリゴヌクレオチドのいずれかによりコードすることができる。該組の一つのメンバーのみが、KSHV調節内皮細胞遺伝子配列と同一であるが、適切な条件下ではミスマッチを有するDNAオリゴヌクレオチドの存在下でさえKSHV調節内皮細胞遺伝子核酸にハイブリダイズすることができる。別の条件下では、ミスマッチDNAオリゴヌクレオチドは、KSHV調節内皮細胞遺伝子DNAもしくはRNAにそれでもなおハイブリダイズすることができ、KSHV調節内皮細胞遺伝子をコードするDNAの同定及び/もしくは単離を可能にする。

20

KSHV調節内皮細胞遺伝子の組換え発現

本明細書において記述する方法により得られるクローン化したKSHV調節内皮細胞遺伝子DNAは、適当なプロモーター及び他の適切な転写調節要素を含有する発現ベクターへの分子クローニングにより組換え的に発現することができ、そして組換えKSHV調節内皮細胞遺伝子タンパク質を生産するために原核もしくは真核宿主細胞に導入することができる。そのような操作のための技術は、Maniatis, T. et al.、上記に十分に記述されており、そして当該技術分野において周知である。

30

【0024】

発現ベクターは、適切な宿主における遺伝子のクローン化コピーの転写及びそれらのmRNAの翻訳に必要とされるDNA配列と本明細書において定義する。そのようなベクターは、エシェリキア・コリ(E. coli)を包含する細菌、藍藻、植物細胞、昆虫細胞、酵母細胞を包含する真菌細胞、及び動物細胞のような様々な宿主において真核生物遺伝子を発現するために用いることができる。

40

【0025】

特に考案されたベクターは、細菌-酵母もしくは細菌-動物細胞もしくは細菌-真菌細胞もしくは細菌-無脊椎動物細胞のような宿主間のDNAの往復を可能にする。適切に構築された発現ベクターは：宿主細胞における自律複製のための複製起点、選択可能なマーカー、限られた数の有用な制限酵素部位、高コピー数の潜在能力、及び有効なプロモーターを含有すべきである。プロモーターは、DNAに結合しそしてRNA合成を開始するようにRNAポリメラーゼを導くDNA配列と定義する強力なプロモーターは、高頻度でmRNAを開始させるものである。発現ベクターには、クローニングベクター、改変されたクローニングベクター、特に考案されたプラスミドもしくはウイルスが包含されるがこれら

50

に限定されるものではない。

【0026】

組換えKSHV調節内皮細胞遺伝子を哺乳動物細胞において発現するために様々な哺乳動物発現ベクターを用いることができる。組換えKSHV調節内皮細胞遺伝子発現のために適当であることができる市販されている哺乳動物発現ベクターには、pMAMneo (Clontech)、pcDNA3 (Invitrogen)、pMC1neo (Stratagene)、pXT1 (Stratagene)、pSG5 (Stratagene)、EBO-pSV2neo (ATCC 37593)、pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224)、pRSVgpt (ATCC 37199)、pRSVneo (ATCC 37198)、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUCTag (ATCC 37460) 及びIZD35 (ATCC 37565) が包含されるがこれらに限定されるものではない。

【0027】

組換えKSHV調節内皮細胞遺伝子を細菌細胞において発現するために様々な細菌発現ベクターを用いることができる。組換えKSHV調節内皮細胞遺伝子発現のために適当であることができる市販されている細菌発現ベクターには、pETベクター (Novagen) 及びpQEベクター (Qiagen) が包含されるがこれらに限定されるものではない。

【0028】

組換えタンパク質を酵母のような真菌細胞において発現するために様々な真菌細胞発現ベクターを用いることができる。組換えKSHV調節内皮細胞遺伝子発現のために適当であることができる市販されている真菌細胞発現ベクターには、pYES2 (Invitrogen) 及びPichia発現ベクター (Invitrogen) が包含されるがこれらに限定されるものではない。

【0029】

組換えKSHV調節内皮細胞遺伝子を昆虫細胞において発現するために様々な昆虫細胞発現ベクターを用いることができる。KSHV調節内皮細胞遺伝子の組換え発現のために適当であることができる市販されている昆虫細胞発現ベクターには、pBlueBacII (Invitrogen) が包含されるがこれに限定されるものではない。

【0030】

KSHV調節内皮細胞遺伝子をコードするDNAは、組換え宿主細胞における発現のために発現ベクターにクローン化することができる。組換え宿主細胞は、エシェリキア・コリのような細菌、酵母のような真菌細胞、ヒト、ウシ、ブタ、サル及びげっ歯類動物起源の細胞系が包含されるがこれらに限定されるものではない哺乳動物細胞、並びにショウジョウバエ及びカイコ由来の細胞系が包含されるがこれらに限定されるものではない昆虫細胞が包含されるがこれらに限定されるものではない原核生物もしくは真核生物であることができる。適当であることができそして市販されている哺乳動物種から得られる細胞系には、CV-1 (ATCC CCL 70)、COS-1 (ATCC CRL 1650)、COS-7 (ATCC CRL 1651)、CHO-K1 (ATCC CCL 61)、3T3 (ATCC CCL 92)、NIH/3T3 (ATCC CRL 1658)、HeLa (ATCC CCL 2)、C127I (ATCC CRL 1616)、BS-C-1 (ATCC CCL 26)、MRC-5 (ATCC CCL 171)、L細胞及びHEK-293 (ATCC CRL 1573) が包含されるがこれらに限定されるものではない。

【0031】

発現ベクターは、形質転換、トランスフェクション、プロトプラスト融合、リポフェクション及び電気穿孔が包含されるがこれらに限定されるものではない多数の技術のいずれか一つにより宿主細胞に導入することができる。発現ベクターを含有する細胞をクローン的に増殖させ、そしてそれらがKSHV調節内皮細胞遺伝子によりコードされるタンパク質を生産するかどうかを決定するために個々に分析する。KSHV調節内皮細胞遺伝子を発

現する宿主細胞クローンの同定は、抗体との免疫学的反応性、及び宿主細胞関連タンパク質生物学的活性の存在が包含されるがこれらに限定されるものではないいくつかの手段により行うことができる。

【0032】

KSHV調節内皮細胞遺伝子DNAの発現はまた、インビトロで製造される合成mRNAを用いて行うこともできる。合成mRNAもしくは適切な細胞から単離したmRNAをコムギ胚芽抽出物及び網状赤血球抽出物が包含されるがこれらに限定されるものではない様々な無細胞系において効率よく翻訳することができ、そしてカエル卵母細胞への微量注入が包含されるがこれに限定されるものではない細胞に基づく系において効率よく翻訳することもでき、一般に、カエル卵母細胞への微量注入が好ましい。

10

【0033】

KSHV調節内皮細胞遺伝子のアッセイ方法

以下の方法により機能性KSHV調節内皮細胞遺伝子活性のレベル及びKSHV調節内皮細胞遺伝子によりコードされる総タンパク質のレベルの両方をアッセイするために、宿主細胞トランスフェクタント及び微量注入した卵母細胞を用いることができる。組換え宿主細胞の場合、これは、KSHV調節内皮細胞遺伝子によりコードされるタンパク質の一つもしくはそれ以上のフラグメントもしくはサブユニットをコードするDNAを含有する一つまたはおそらく二つもしくはそれ以上のプラスミドの共トランスフェクションを伴う。卵母細胞の場合、これは、KSHV調節内皮細胞遺伝子によりコードされるタンパク質の合成RNAの共注入を伴う。発現を与える適切な期間の後、細胞性タンパク質を例えば³ 5 S - メチオニンで24時間代謝的に標識し、その後細胞ライセート及び細胞培養上清を採取し、そしてタンパク質に対して向けられるポリクローナル抗体での免疫沈降に供する。

20

【0034】

宿主細胞における適切なタンパク質のレベルは、免疫アフィニティー及びノもしくはリガンドアフィニティー技術により定量する。KSHV調節内皮細胞遺伝子を発現する細胞は、細胞膜への放射性[リガンド]結合の量を測定することにより発現されるタンパク質分子の数に関してアッセイすることができる。例えば³ 5 S - メチオニンで標識されたもしくは標識されていないタンパク質を単離するためにタンパク質特異的アフィニティービーズもしくはタンパク質特異的抗体を用いる。標識されたタンパク質は、SDS-PAGEにより分析する。標識されていないタンパク質は、タンパク質特異的抗体を用いてウェスタンブロットティング、ELISAもしくはRIAアッセイにより検出する。

30

【0035】

KSHV調節内皮細胞遺伝子活性を検出する別の方法は、cDNAをトランスフェクションした全細胞もしくはmRNAを注入した卵母細胞におけるKSHV調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質活性の直接測定を伴う。所望のタンパク質活性は、特異的リガンド結合もしくはKSHV調節内皮細胞遺伝子DNAを発現する宿主細胞の生物学的特性により測定する。

細胞に基づくアッセイ

本発明は、KSHV調節内皮細胞遺伝子発現もしくは遺伝子産物のいずれかの化合物調節を検出するための全細胞法を提供する。該方法は、工程：

40

- 1) KSHV調節内皮細胞遺伝子によりコードされる機能性タンパク質を含有する細胞、または内皮細胞もしくは細胞系と試験化合物とを接触させること、及び
 - 2) 試験化合物により改変されたKSHV調節内皮細胞遺伝子もしくは遺伝子産物機能に応答する細胞における変化を測定すること、
- を含んでなる。

【0036】

試験化合物との細胞接触に必要な時間の量は、例えば、KSHV調節内皮細胞遺伝子もしくはその遺伝子産物の活性の既知のモジュレーターで時間経過を試験しそして時間の関数として細胞変化を測定することにより、実験的に決定する。

50

【0037】

本発明の方法の測定手段は、試験化合物に同様にさらされていない同一の細胞に対して試験化合物にさらされている細胞を比較することによりさらに特定することができる。あるはまた、2種の細胞、機能性KSHV調節内皮細胞遺伝子を含むもの及び第一のものと同一であるが機能性KSHV調節内皮細胞遺伝子を欠く第二の細胞を両方とも同じ化合物と接触させ、そして2種の細胞間の違いに関して比較することができる。この技術はまた、これらのアッセイのバックグラウンドノイズを確定することにおいても有用である。これらのコントロール機構はまた、機能性KSHV調節内皮細胞遺伝子もしくはその遺伝子産物の調節に応答する細胞変化の容易な選択も可能にすることを当業者は理解する。

【0038】

「細胞」という用語は少なくとも1個の細胞をさすが、検出方法の感度に適切な複数の細胞を包含する。本発明のために適当な細胞は、細菌、酵母もしくは真核細胞であることができる。

10

【0039】

機能性KSHV調節内皮細胞遺伝子もしくは遺伝子産物の化合物調節を決定するためのアッセイ方法は、通常の実験室形態であることができ、もしくは高処理量に適合させることができる。「高処理量」という用語は、同時に複数サンプルの容易な分析、及びロボット操作能力を与えるアッセイ設計をさす。高処理量アッセイの別の所望される特徴は、試薬使用量を減らすようにもしくは所望の分析を行うために操作の数を最小限度に抑えるように最適化されるアッセイ設計である。アッセイ形態の例には、96ウェルもしくは384ウェルプレート、浮上液滴(levitating droplets)、及び液体処理実験に用いる「ラボ・オン・チップ(実験室チップ)(lab on a chip)」マイクロチャンネルチップが包含される。プラスチック型及び液体処理装置の小型化は進んでいるので、もしくは改善されたアッセイ装置が設計されるので、さらに多数のサンプルを本発明の設計を用いて実施できることを当業者は周知である。

20

【0040】

本発明の方法に適当な細胞変化は、KSHV調節内皮細胞遺伝子もしくは遺伝子産物の機能もしくは量における変化を直接測定すること、あるいはKSHV調節内皮細胞遺伝子機能の下流効果を測定すること、例えば二次メッセンジャー濃度またはKSHV調節内皮細胞遺伝子により転写的に影響を受ける遺伝子の転写における変化もしくはタンパク質レベルにおける変化を測定すること、あるいは細胞における表現型変化を測定することを含んでなる。好ましい測定手段には、KSHV調節内皮細胞遺伝子もしくはコードタンパク質の量における変化、KSHV調節内皮細胞遺伝子もしくはコードタンパク質の機能活性における変化、mRNAの量における変化、細胞内タンパク質における変化、細胞表面タンパク質もしくは分泌タンパク質における変化、またはCa²⁺、cAMPもしくはGTP濃度における変化が包含される。mRNAのレベルの変化は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によりもしくはディファレンシャル遺伝子発現により検出する。免疫アフィニティー、リガンドアフィニティーもしくは酵素測定は、宿主細胞におけるタンパク質のレベルの変化を定量する。例えば³⁵S-メチオニンで標識されたもしくは標識されていないタンパク質を単離するためにタンパク質特異的アフィニティービーズもしくは特異的抗体を用いる。標識されたタンパク質は、SDS-PAGEにより分析する。標識されていないタンパク質は、特異的抗体を用いて、ウェスタンブロッティング、蛍光セルソーティングによる細胞表面検出、細胞画像分析、ELISAもしくはRIAにより検出する。タンパク質が酵素である場合、タンパク質の誘導は、発光源もしくは比色定量基質の切断によりモニターする。

30

40

【0041】

細胞表面タンパク質の好ましい検出手段には、フローサイトメトリーもしくは統計的細胞イメージングが包含される。両技術において、目的のタンパク質は細胞表面に局在し、特異的蛍光プローブで標識し、そして細胞性蛍光の程度によって検出する。フローサイトメトリーでは、細胞を溶液において分析し、一方、細胞イメージング技術では、細胞の視野

50

を相対蛍光に関して比較する。

【0042】

アルカリホスファターゼもしくはプロテアーゼのような酵素である分泌タンパク質の好ましい検出手段は、蛍光もしくは比色定量酵素アッセイである。アルカリホスファターゼの蛍光/発光/発色基質は市販されており、そしてそのようなアッセイは、高処理量マルチウェルプレートスクリーニング形態に容易に適応可能である。プロテアーゼアッセイには、蛍光エネルギー移動に基づくアッセイを用いる。発蛍光団及びクエンチャー分子をプロテアーゼのペプチド基質の2つの末端に導入する。特異的基質の切断の際に、発蛍光団及びクエンチャーの分離は、検出可能な蛍光を与える。分泌タンパク質が、放射性の方法により測定できる場合、シンチレーション近接技術を用いることができる。目的のタンパク質の基質を、蛍光物質を含有する固体支持体への被覆もしくは導入のいずれかにより固定する。酵素反応により固相にごく接近する放射性分子は、蛍光物質が励起状態になりそして可視光を出すようにする。可視光の発光は、うまくいくリガンド/標的相互作用の検出の基礎を成し、そして適切なモニタリング装置により測定する。シンチレーション近接アッセイの例は、1986年2月4日に発行された米国特許第4,568,649号に開示されている。これらのタイプのアッセイの材料は、Dupont NEN^R (Boston, Massachusetts) から商標FlashPlateTM で市販されている。

10

【0043】

内因性遺伝子が表現型細胞構造変化をもたらす場合の好ましい検出手段は、細胞形態もしくは細胞内表現型変化の統計的画像分析である。例えば、限定としてではなく、細胞は、表面に対して平らなままであることに対して丸くなるように形態を変えることができ、もしくは増殖が表面非依存性になり従って腫瘍細胞生物学の技術分野において周知であるトランスフォームした細胞表現型に似ることができ、もしくは細胞は新規な発生物を生じることができる。細胞内的に起こることができる表現型変化には、細胞骨格変化、新しい遺伝子転写に应答する小胞体/ゴルジ複合体における変化、もしくは新しい小胞の生産が含まれる。

20

【0044】

内因性遺伝子が可溶性の細胞内タンパク質をコードする場合、内因性遺伝子における変化は、細胞ライセート内に含まれる特定のタンパク質の変化により測定することができる。可溶性タンパク質は、本明細書において記述する方法により測定することができる。

30

【0045】

本発明はまた、インビボにおいてKSHV調節内皮細胞遺伝子の発現並びにコードタンパク質の機能を調節する化合物をスクリーニングする方法にも関する。化合物は、タンパク質をコードするDNAもしくはRNAの発現、またはタンパク質の機能を増加もしくは減少することにより調節することができる。KSHV調節内皮細胞遺伝子の発現もしくはコードタンパク質の機能を調節する化合物は、様々なアッセイにより検出することができる。アッセイは、発現もしくは機能における変化があるかどうかを決定するための簡単な「イエス/ノー」アッセイであることができる。アッセイは、試験サンプルの発現もしくは機能を基準サンプルにおける発現もしくは機能のレベルと比較することにより定量的にすることができる。この方法において同定されるモジュレーターは、治療的因子として有用である。

40

タンパク質に基づくアッセイ

本発明は、KSHV調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質活性の試験化合物調節を検出するためのインビトロタンパク質アッセイ方法を提供する。該方法は工程：

- 1) 試験化合物及び機能性KSHV調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質を接触させること、及び
 - 2) 試験化合物によるタンパク質機能に対する変化を測定すること、
- を含んでなる。

【0046】

50

化合物との細胞接触に必要な時間の量は、例えば、既知のタンパク質モジュレーターで時間経過を試験しそして時間の関数として変化を測定することにより、実験的に決定する。

【0047】

タンパク質分解活性を調節する化合物を検出する方法は、p u n i t i v e調節化合物、機能性タンパク質及び適当な標識基質を合わせること及び時間の関数としてもしくは前もって特定した期間の後のいずれかで基質の量の変化によりプロテアーゼに対する化合物の影響をモニターすることを含んでなる。標識基質には；放射性標識される基質（C o o l i c a n e t a l . (1 9 8 6) . J . B i o l . C h e m . 2 6 1 : 4 1 7 0 - 6)、蛍光基質（L o n e r g a n e t a l . (1 9 9 5) . J . F o o d S c i . 6 0 : 7 2 - 3 , 7 8 ; T w i n i n g (1 9 8 4) . A n a l . B i o c h e m . 1 4 3 : 3 0 - 4) もしくは比色定量基質（B u r o k e r - K i l g o r e a n d W a n g (1 9 9 3) . A n a l . B i o c h e m . 2 0 8 : 3 8 7 - 9 2) が包含されるがこれらに限定されるものではない。本発明における使用のために有用な放射性同位体には、当該技術分野において周知であるもの、特に¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴C、³⁵S、³²P及び³³Pが包含される。放射性同位体は、チロシン残基のヨード化、セリンもしくはトレオニン残基のリン酸化、または放射性アミノ酸前駆体を利用するトリチウム、炭素もしくは硫黄の導入のような常法によりペプチドに導入する。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後のザイモグラフィ（W a d s t r o e m a n d S m y t h (1 9 7 3) . S c i . T o o l s 2 0 : 1 7 - 2 1)、並びに蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）に基づく方法（N g a n d A u l d (1 9 8 9) . A n a l . B i o c h e m . 1 8 3 : 5 0 - 6)もまた、タンパク質分解活性を調節する化合物を検出するために用いる方法である。アゴニストである化合物は、基質分解の速度を増し、そして時間の関数としていっそう少ない残存基質をもたらす。アンタゴニストである化合物は、基質分解の速度を減少し、そして時間の関数としていっそう多い残存基質をもたらす。

【0048】

本発明の方法のために有用な好ましいアッセイ形態は、プロテアーゼ切断部位をコードするペプチド配列により隔てられているクエンチャーもしくは受容体のいずれかと蛍光供与体とを含有するペプチド基質を用いるFRETに基づく方法である。蛍光供与体は、エネルギーを吸着しそしてエネルギーの一部を別の化合物に移動することができる発光源化合物である。本発明における使用のために適当な蛍光供与体の例には、クマリン、フルオレセイン、ロードール（r h o d o l）及びローダミンのようなキサンテン色素、レゾルフィン、シアニン色素ピマン（b i m a n e）、アクリジン、イソインドール、ダンシル色素、ルミノール及びイソルミノール誘導体のようなアミノフタルリックヒドラジド（a m i n o p h t h a l i c h y d r a z i d e）、アミノフタルイミド、アミノナフタルイミド、アミノベンゾフラン、アミノキノリン、ジカノヒドロキノン（d i c a n o h y d r o q u i n o n e）、並びにユウロピウム及びテルビウム複合体並びに関連化合物が包含されるがこれらに限定されるものではない。

【0049】

クエンチャーは、それが蛍光供与体に対して適切に近接して位置する場合に供与体からの発光を減らしそして一般に蛍光の形態でエネルギーを再放出しない化合物である。そのような成分の例には、インジゴ、ベンゾキノン、アントラキノン、アゾ化合物、ニトロ化合物、インドアニリン、並びにジ-及びトリフェニルメタンが包含される。供与体/クエンチャー対を用いるFRET法は、ペプチド基質に対する酵素活性の関数として蛍光供与体からの増加した発光を測定する。従って、KSHV調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質と拮抗する試験化合物は、2つのコントロールサンプル、FRETペプチドのみからの低い（基礎）蛍光及び酵素的に有効なタンパク質の活性により消化されるFRETペプチドからの高い蛍光の間の発光シグナルを生じる。

【0050】

受容体は、蛍光供与体からエネルギーを吸着しそしてエネルギーの一部を蛍光として再放出する蛍光分子である。受容体は、別個の機構がタンパク質分解効能を測定できるように

する特定のタイプのクエンチャーである。供与体 / 受容体対を利用する方法は、ペプチド基質に対する酵素活性の関数として受容体発光の減少を測定する。従って、KSHV調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質と拮抗する試験化合物は、2つのコントロールサンプル、FRETペプチドのみからの高い基礎蛍光及び酵素的に有効なタンパク質の活性により消化されるFRETペプチドからの低い蛍光の間の発光シグナルを生じる。本発明の方法のために有用な受容体の例には、クマリン、フルオレセイン、ロードール、ローダミン、レゾルフィン、シアニン、ジフルオロボラジアジンダセン及びフタルシアニンが包含されるがこれらに限定されるものではない。

KSHV調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質に結合する抗体の製造及び使用

KSHV調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質に対する単一特異性抗体は、該タンパク質 10
 に対して反応する抗体を含有する哺乳動物抗血清から精製するか、もしくは最初にKohler and Milstein, Nature 256:495-497(1975)により記述された技術を用いて該タンパク質と反応するモノクローナル抗体として製造する。免疫学的技術は当該技術分野において周知であり、そして例えば、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ISBN 0879693142により出版されたAntibodies: A laboratory manualに記述されている。単一特異性抗体は、本明細書において用いる場合、単一の抗体種もしくはあるタンパク質に対する均質な結合特性を有する複数の抗体種と定義する。均質な結合は、本明細書において用いる場合、 20
 上記のような、KSHV調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質と関連するもののような、特定の抗原もしくはエピトープに結合する抗体種の能力をさす。タンパク質特異的抗体は、免疫アジュバントと一緒にもしくはそれなしに適切な濃度のタンパク質で、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ウマなどのような動物(ウサギが好ましい)を免疫化することによりもたらされる。

【0051】

初回免疫の前に免疫前血清を集める。各動物に、許容しうる免疫アジュバントと会合した約0.001mg~約1000mgの間のタンパク質を与える。そのような許容しうるアジュバントには、フロイント完全、フロイント不完全、明礬沈殿物、コリネバクテリウム・パルバム(Corynebacterium parvum)を含有する油中水滴型エマルジョン及びtRNAが包含されるがこれらに限定されるものではない。初回免疫は、 30
 皮下(SC)、腹腔内(IP)もしくは両方のいずれかで複数部位で好ましくはフロイント完全アジュバント中のタンパク質からなる。抗体力価を決定するために各動物から一定間隔で、好ましくは毎週、瀉血する。動物には、初回免疫後にブースター注射を与えても与えなくてもよい。ブースター注射を与える動物には、一般に、同じ経路によりフロイント不完全アジュバント中の等量の抗原を与える。ブースター注射は、最大力価が得られるまで約3週間隔で与える。各ブースター免疫後約7日でもしくは単一の免疫後ほぼ毎週、動物から瀉血し、血清を集め、そしてアリコート約-20で保存する。

【0052】

KSHV調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質と反応するモノクローナル抗体(mAb) 40
 は、該タンパク質で同系マウス、好ましくはBalb/cを免疫化することにより製造する。上記に説明したように、等容量の許容しうるアジュバントに導入した約0.1mlのバッファもしくは食塩水中約0.001mg~約1.0mg、好ましくは約0.1mgのタンパク質抗原でIPもしくはSC経路によりマウスを免疫化する。フロイントアジュバントが好ましく、フロイント完全アジュバントを初回免疫に使用し、そしてフロイント不完全アジュバントをその後使用する。マウスに0日に初回免疫を与え、そして約2~約30週間休ませる。免疫化したマウスに静脈内(IV)経路によりリン酸緩衝食塩水のようなバッファ溶液中約0.001~約1.0mgのタンパク質抗原の1回もしくはそれ以上のブースター免疫を与える。免疫化したマウスから当該技術分野において既知である標準的な方法によって脾臓を取り除くことにより抗体陽性のマウスからリンパ球、好ましくは脾臓リンパ球を得る。安定なハイブリドーマの形成を与える条件下で、脾臓リンパ 50

球を適切な融合相手、好ましくは骨髓腫細胞と混合することによりハイブリドーマ細胞を製造する。融合相手には：マウス骨髓腫 P 3 / N S 1 / A g 4 - 1 ; M P C - 1 1 : S - 1 9 4 及び S p 2 / 0 を包含することができるがこれらに限定されるものではなく、S p 2 / 0 が一般に好ましい。抗体産生細胞及び骨髓腫細胞は、約 3 0 % ~ 約 5 0 % の濃度で、ポリエチレングリコール、約 1 0 0 0 m o l . w t . において融合させる。融合したハイブリドーマ細胞は、当該技術分野において既知である方法によりヒポキサンチン、チミジン及びアミノプテリンを補足したダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M) における増殖によって選択する。増殖陽性ウェルから約 1 4 、 1 8 及び 2 1 日に上清液を集め、そして K S H V 調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質を抗原として用いて固相免疫放射線アッセイ (S P I R A) のような免疫アッセイにより抗体生産に関してスクリーニングする。10
培養液もまた、m A b のアイソタイプを決定するためにオクタロニー沈降アッセイにおいて試験する。抗体陽性ウェルからのハイブリドーマ細胞は、M a c P h e r s o n , S o f t A g a r T e c h n i q u e s , T i s s u e C u l t u r e M e t h o d s a n d A p p l i c a t i o n s , K r u s e a n d P a t e r s o n , E d s . , A c a d e m i c P r e s s , 1 9 7 3 の軟寒天技術のような技術によりもしくは限界希釈の技術によりクローン化する。

【 0 0 5 3 】

モノクローナル抗体は、プリスタンでプライミングした B a l b / c マウスにプライミングの少なくとも約 4 日後に約 1×10^6 ~ 約 6×10^6 のハイブリドーマ細胞をマウス当たり約 0 . 5 m l 注入することによりインビボにおいて製造する。腹水液を細胞導入後約 8 - 1 2 日で集め、そして当該技術分野において既知である技術によりモノクローナル抗体を精製する。20

【 0 0 5 4 】

m A b のインビトロにおける製造は、当該技術分野において周知である組織培養培地においてハイブリドーマを増殖させることにより実施する。当該技術分野において周知である中空系培養技術、エアリフト反応器、ローラボトル、もしくはスピナーフラスコ培養技術を用いて大量の m A b を製造するために高密度インビトロ細胞培養を行うことができる。m A b は、当該技術分野において既知である技術により精製する。

【 0 0 5 5 】

腹水もしくはハイブリドーマ培養液の抗体力価は、沈降、受動凝集、酵素結合イムノソルベント抗体 (E L I S A) 技術及び放射線免疫アッセイ (R I A) 技術が包含されるがこれらに限定されるものではない様々な血清学的もしくは免疫学的アッセイにより決定する。体液もしくは組織及び細胞抽出物における K S H V 調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質の存在を検出するために同様のアッセイを用いる。30

【 0 0 5 6 】

単一特異性抗体を製造するための上記の方法は、ポリペプチドフラグメントもしくは全長の新生ポリペプチドもしくは個々のサブユニットに特異的な抗体を製造するために利用できることは当業者に容易に明らかである。特に、1 つのタンパク質サブユニットのみもしくは完全に機能性のタンパク質に特異的な単一特異性抗体を作製できることは当業者に容易に明らかである。K S H V 調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質の通常の機能を阻害する単一特異性抗体を作製できることもまた当業者に明らかである。40

【 0 0 5 7 】

抗体アフィニティーカラムは、抗体がゲルビーズ支持体と共有結合連結を形成するように抗体をゲル支持体に加えることにより作製する。好ましい共有結合連結は、抗体上に含まれるアミン、アルデヒドもしくはスルフィドリル残基によってなされる。抗体上にアルデヒドもしくは遊離スルフィドリル基を生成せしめる方法は当該技術分野において周知であり；アミン基は、例えば N - ヒドロキシスクシンイミドエステルと反応する。

K S H V 調節内皮細胞遺伝子もしくは遺伝子産物特異的試薬を含有するキット組成物

K S H V 調節内皮細胞遺伝子 D N A もしくは R N A 、 K S H V 調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質に対する抗体、または K S H V 調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質を含有す 50

るキットを製造することができる。そのようなキットは、KSHV調節内皮細胞遺伝子DNAにハイブリダイズするDNAを検出するためまたはサンプルにおけるKSHV調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質もしくはペプチドフラグメントの存在を検出するために用いる。そのような特性化は、法廷分析、診断用途及び疫学研究が包含されるがこれらに限定されるものではない様々な目的のために有用である。

【0058】

本発明のDNA分子、RNA分子、組換えタンパク質及び抗体は、KSHV調節内皮細胞遺伝子DNA、KSHV調節内皮細胞遺伝子RNAもしくはKSHV調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質をスクリーニングしそしてそのレベルを測定するために用いることができる。組換えタンパク質、DNA分子、RNA分子及び抗体は、KSHV感染細胞、カボジ肉腫組織もしくは腫瘍細胞の検出及びタイピングが包含されるがこれらに限定されるものではない様々な使用のために適当なキットの構築に役立つ。そのようなキットは、少なくとも一つの容器を厳重に閉じ込めて保持するために適当な区分されたキャリアーを含んでなる。キャリアーは、組換えKSHV調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質またはKSHV調節内皮細胞遺伝子もしくは遺伝子産物を検出するために適当な抗-タンパク質抗体のような試薬をさらに含んでなる。キャリアーはまた、標識された抗原もしくは酵素基質などのような検出の手段を含有することもできる。

10

遺伝子治療

KSHV調節内皮細胞遺伝子をコードするDNA配列に相補的なヌクレオチド配列をアンチセンス治療のために合成することができる。これらのアンチセンス分子は、DNA、ホスホロチオエートもしくはメチルホスホネートのようなDNAの安定な誘導体、RNA、2'-O-アルキルRNAのようなRNAの安定な誘導体、または他のKSHV調節内皮細胞遺伝子アンチセンスオリゴヌクレオチド模倣物であることができる。KSHV調節内皮細胞遺伝子アンチセンス分子は、微量注入、リボソーム被包により、もしくはアンチセンス配列を保有するベクターからの発現により細胞に導入することができる。KSHV調節内皮細胞遺伝子アンチセンス治療は、KSHV調節内皮細胞遺伝子もしくは遺伝子産物の活性を減らすことが有益である疾患の処置のために特に有用であることができる。

20

【0059】

KSHV調節内皮細胞遺伝子遺伝子治療は、標的生物体の細胞にKSHV調節内皮細胞遺伝子を導入するために用いることができる。KSHV調節内皮細胞遺伝子は、レシピエント宿主細胞の感染によりKSHV調節内皮細胞遺伝子DNAの導入をもたらすウイルスベクターに連結することができる。適当なウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルスなどが包含される。あるいはまた、KSHV調節内皮細胞遺伝子DNAは、リガンド-DNAコンジュゲートもしくはアデノウイルス-リガンド-DNAコンジュゲートを用いる受容体を介した選択的DNA導入、リポフェクション膜融合または直接微量導入を包含する非ウイルス技術により遺伝子治療のために細胞に導入することができる。これらの方法及びその変形は、エクスピボ並びにインピボKSHV調節内皮細胞遺伝子遺伝子治療のために適当である。KSHV調節内皮細胞遺伝子遺伝子治療は、KSHV調節内皮細胞遺伝子活性を高めることが有益である疾患の処置のために特に有用であることができる。KSHV調節内皮細胞遺伝子での使用のために適当な遺伝子治療の分子方法論のプロトコルは、Paul D. Robbins, Human Press, Totawa NJ, 1996によって編集された、Gene Therapy Protocolsに記述されている。

30

40

製薬学的組成物

KSHV調節内皮細胞遺伝子DNA、KSHV調節内皮細胞遺伝子RNA、またはKSHV調節内皮細胞遺伝子コードタンパク質、またはKSHV調節内皮細胞遺伝子及び/もしくは遺伝子産物活性のモジュレーターを含んでなる製薬学的に有用な組成物は、製薬学的に許容しうる担体の混合によるような既知の方法に従って調合することができる。そのような担体及び調合方法の例は、Remington's Pharmaceutical

50

Scienceに見出すことができる。有効な投与のために適当な製薬学的に許容しうる組成物を生成せしめるために、そのような組成物は、有効量のタンパク質、DNA、RNAもしくはモジュレーターを含有する。

【0060】

本発明の治療もしくは診断組成物は、KSHV調節内皮細胞遺伝子もしくは遺伝子産物関連活性の調節の適応がある疾患を処置もしくは診断するために十分な量で個体に投与する。有効量は、個体の症状、体重、性別及び年齢のような様々な因子に従って変わることができる。他の因子には、投与の形態が包含される。製薬学的組成物は、皮下、局所、経口及び筋肉内のような様々な経路により個体に与えることができる。

【0061】

「化学誘導体」という用語は、通常は基本分子の一部ではない追加の化学成分を含有する分子を表す。そのような成分は、基本分子の可溶性、半減期、吸収などを向上することができる。あるいはまた、該成分は、基本分子の望ましくない副作用を弱めるかもしくは基本分子の毒性を減らすことができる。そのような分子の例は、Remington's Pharmaceutical Scienceのような様々な指定研究書に記述されている。

【0062】

本明細書において開示する方法に従って同定される化合物は、あらゆる潜在的毒性を最小限度に抑えながら、KSHV調節内皮細胞遺伝子、遺伝子産物もしくはその活性の最適阻害を得るために日常的試験により特定される適切な投与量で単独で用いることができる。さらに、他の因子の共投与もしくは逐次投与が望ましい可能性がある。例えば、ダウソルピシン、ドキソルピシン、インターフェロナルファ、レチノイド及びタキソールのような、カポジ肉腫の処置のために有用な化合物を本明細書において記述するKSHV調節内皮細胞遺伝子もしくはそれらの遺伝子産物のモジュレーターと組み合わせて用いることができる。さらに、他の既知の抗腫瘍因子を本明細書において記述するKSHV調節内皮細胞遺伝子もしくはそれらの遺伝子産物のモジュレーターと組み合わせることができる。

【0063】

本発明はまた、本発明の新規な処置方法における使用のために適当な局所、経口、全身及び非経口製薬学的配合物を提供する目的も有する。KSHV調節内皮細胞遺伝子の調節における使用のための有効成分として本発明に従って同定される化合物もしくはモジュレーターを含有する組成物は、投与のための通常の賦形剤における多種多様な治療剤形で投与することができる。例えば、化合物もしくはモジュレーターは、錠剤、カプセル剤（各々、持続性及び徐放性製剤を包含する）、丸剤、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、チンキ剤、液剤、懸濁剤、シロップ剤及び乳剤のような経口剤形において、もしくは注入により投与することができる。同様に、全て製薬学的技術分野の当業者に周知である形態を用いて、静脈内（ボラス及び注入の両方）、腹腔内、皮下、密閉したもしくはしない局所、または筋肉内形態でそれらを投与することもできる。所望の化合物の有効であるが無毒の量をKSHV調節内皮細胞遺伝子もしくは遺伝子産物調節因子として用いることができる。

【0064】

生成物の日量は、1日につき、患者当たり0.01~1000mgの広い範囲にわたって変えることができる。経口投与のためには、組成物は、好ましくは、処置する患者に対する投与量の対症調整のために0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0及び50.0ミリグラムの有効成分を含有する割線錠もしくは非割線錠の形態で与える。薬剤の有効量は、通常、1日当たり約0.0001mg/kg~約100mg/kg体重の投与量レベルで与える。該範囲は、より特に1日当たり約0.001mg/kg~約10mg/kg体重である。化合物もしくはモジュレーターの投与量は、所望の効果を得るために組み合わせる場合、調整する。一方、これらの様々な因子の投与量は、独立して最適化しそしていずれかの因子を単独で用いる場合より病状が減少する相乗結果を得るように組み合わせることができる。

【0065】

10

20

30

40

50

本発明の化合物もしくはモジュレーターは、都合よく、単一の日量で投与することができ、または総日量を毎日2、3もしくは4回の分割した用量で投与することができる。さらに、本発明の化合物もしくはモジュレーターは、適当な鼻内賦形剤の局所使用によって鼻内形態で、もしくは該分野の当業者に周知である経皮皮膚パッチの形態を用いて、経皮経路により投与することができる。経皮送達系の形態で投与するためには、用量投与は、もちろん、投与処方計画の全体にわたって断続的よりむしろ連続的である。

【0066】

有効因子が別個の投与配合物である1種より多くの有効因子での組み合わせ処置には、有効因子を同時に投与することができ、もしくはそれらを各々別個にずらした時間で投与することができる。

10

【0067】

本発明の化合物もしくはモジュレーターを利用する投与処方計画は、患者のタイプ、種、年齢、体重、性別及び医学的症状；処置する症状の重さ；投与の経路；患者の腎及び肝機能；並びに用いるその特定の化合物を包含する様々な因子に従って選択する。通常の技量を有する医師もしくは獣医は、症状の進行を防ぐか、阻止するかもしくは抑えるために必要とされる薬剤の有効量を容易に決定しそして処方することができる。毒性なしに効能をもたらす範囲内の薬剤の濃度を得ることにおける最高精度は、標的部位への薬剤の有効性の反応速度論に基づく処方計画を必要とする。これは、薬剤の分配、平衡及び除去の考察を伴う。

【0068】

本発明の方法において、本明細書に詳細に記述する化合物もしくはモジュレーターは有効成分を成すことができ、そして典型的には意図する投与形態、すなわち、経口錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、シロップ剤などに関して適当に選択しそして通常の製薬学的実践と一致する適当な製薬学的希釈剤、賦形剤もしくは担体（本明細書において集合的に「担体」材料と称する）と混合して投与する。

20

【0069】

例えば、錠剤もしくはカプセル剤の形態の経口投与には、有効薬剤成分をエタノール、グリセロール、水などのような経口の無毒の製薬学的に許容しうる不活性担体と合わせることができる。さらに、所望もしくは必要に応じて、適当な結合剤、潤滑剤、崩壊剤及び着色剤もまた混合物に導入することができる。適当な結合剤には、限定なしに、澱粉、ゼラチン、グルコースもしくはベータ-ラクトースのような天然の糖、コーン甘味料、アラビアゴム、トラガカントゴムもしくはアルギン酸ナトリウムのような天然及び合成のゴム、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール、ワックスなどが包含される。これらの剤形に使用する潤滑剤には、限定なしに、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどが包含される。崩壊剤には、限定なしに、澱粉、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、キサントガムなどが包含される。

30

【0070】

液体形態には、有効薬剤成分を合成及び天然のゴム、例えば、トラガカントゴム、アラビアゴム、メチル-セルロースなどのような適当に風味をつけた沈殿防止剤もしくは分散助剤に合わせることができる。使用することができる他の分散助剤には、グリセリンなどが包含される。非経口投与には、滅菌した懸濁剤及び液剤が所望される。静脈剤投与が所望される場合、一般に適当な防腐剤を含有する等張製剤を用いる。

40

【0071】

有効薬剤成分を含有する局所製剤は、例えば、アルコール性溶液、局所クレンザー、クレンジングクリーム、スキングル、スキンローション、及びクリームもしくはゲル配合物のシャンプーを生成せしめるために、例えば、アルコール、アロエ・ベラゲル、アラントイン、グリセリン、ビタミンA及びE油、鉱油、PPG2プロピオン酸ミリスチルなどのような当該技術分野において周知である様々な担体材料と混合することができる。

【0072】

50

本発明の化合物もしくはモジュレーターはまた、小型単層小胞 (small unilamellar vesicles)、大型単層小胞 (large unilamellar vesicles) 及び多重層小胞のようなりポソーム送達系の形態で投与することもできる。リポソームは、コレステロール、ステアリルアミンもしくはホスファチジルコリンのような様々なリン脂質から生成せしめることができる。

【0073】

本発明の化合物はまた、化合物分子を連結する個々の担体としてモノクローナル抗体の使用により送達することもできる。本発明の化合物もしくはモジュレーターはまた、目標設定可能な薬剤担体として可溶性ポリマーと連結することもできる。そのようなポリマーには、ポリビニル-ピロリドン、ピランコポリマー、ポリヒドロキシプロピルメタクリル-アミドフェノール、ポリヒドロキシ-エチルアスパルトアミドフェノールもしくはパルミトイル残基で置換されたポリエチル-エンオキシドポリリシンを包含することができる。さらに、本発明の化合物もしくはモジュレーターは、薬剤の制御放出を行うことにおいて有用な生物分解性ポリマー類、例えば、ポリ乳酸、ポリεピロリドン (polyεpsilon)、カプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロ-ピラン、ポリシアノアクリレート及びヒドロゲルの架橋もしくは両親媒性ブロックコポリマーに連結することができる。

10

【0074】

経口投与には、化合物もしくはモジュレーターをカプセル剤、錠剤もしくはポーラス形態で投与することができ、あるいはまた、それらを動物飼料に混合することができる。カプセル剤、錠剤及びポーラスは、澱粉、タルク、ステアリン酸マグネシウムもしくはリン酸ジ-カルシウムのような適切な担体賦形剤と組み合わせた有効成分を含んでなる。これらの単位剤形は、均一な混合物が得られるように希釈剤、増量剤、崩壊剤及び/もしくは結合剤を包含する適当な細かく粉末にした不活性成分と有効成分とをよく混合することにより製造する。不活性成分は、化合物もしくはモジュレーターと反応せずそして処置する動物に対して無毒であるものである。適当な不活性成分には、澱粉、ラクトース、タルク、ステアリン酸マグネシウム、植物ゴム及び油などが包含される。これらの配合物は、処置する動物種の大きさ及びタイプ並びに感染のタイプ及び重さのような多数の因子により広範囲にわたって変えられる量の有効及び不活性成分を含有することができる。有効成分はまた、単に化合物を飼料と混合することによりもしくは飼料の表面に化合物を加えることにより添加物として飼料に投与することもできる。あるいはまた、有効成分を不活性担体と混合することができ、そして得られる組成物を次に飼料と混合するかもしくは動物に直接与えることができる。適当な不活性担体には、コーンミール、シトラスミール (citrus meal)、発酵残留物、ひき割りダイズ (soy grits)、乾燥穀類などが包含される。有効成分は、最終組成物が0.001~5重量%の有効成分を含有するように粉碎、攪拌、微粉碎もしくは混転によりこれらの不活性担体とよく混合する。

20

30

【0075】

あるいはまた、化合物もしくはモジュレーターは、不活性液体担体に溶解した有効成分からなる配合物の注入により非経口的に投与することができる。注入は、筋肉内、第一胃内、気管内もしくは皮下のいずれかであることができる。注入可能な配合物は、適切な不活性液体担体と混合した有効成分からなる。許容しうる液体担体には、落花生油、綿実油、ゴマ油などのような植物油並びにソルケタール (solketal)、グリセロール、ホルマールなどのような有機溶媒が包含される。代替りのものとして、水性の非経口配合物を用いることもできる。植物油が好ましい液体担体である。配合物は、最終配合物が0.005~10重量%の有効成分を含有するように有効成分を液体担体に溶解もしくは懸濁することにより製造する。

40

【0076】

化合物もしくはモジュレーターの局所施用は、水性の溶液もしくは懸濁液として本発明の化合物もしくはモジュレーターを含有する液体ドレンチ (liquid drench) もしくはシャンプーの使用により可能である。これらの配合物は、一般にベントナイトの

50

ような沈殿防止剤を含有し、そして通常は消泡剤も含有する。0.005～10重量%の有効成分を含有する配合物が許容できる。好ましい配合物は、0.01～5重量%の本発明の化合物もしくはモジュレーターを含有するものである。

【0077】

本発明はまた、RNAサンプルのRNA発現のレベルを決定すること、ここで、RNAサンプルを増幅し、そして蛍光的に標識する、蛍光的に標識したRNAを、特定の細胞もしくは組織タイプ（例えばニューロン細胞もしくは疾患組織）の遺伝子発現プロフィールに相当する多数の核酸配列を含有するマイクロアレイにハイブリダイズさせること、及び蛍光検出のためにマイクロアレイを走査すること；該蛍光を正規化すること；及び遺伝子発現プロフィールを作製するために特徴抽出（signature extraction）アルゴリズム（例えばMaxCorもしくはMean Logアルゴリズム）を使用することの工程を含んでなるビジネスを行う方法にも関する。好ましい態様として、RNAサンプルは患者から得られ、そして患者サンプルには、血液、羊水液、血漿、精液、骨髄及び組織生検が包含されるがこれらに限定されるものではない。

10

【0078】

本発明はまた、試験サンプル（例えば患者サンプル）を分析するために遺伝子発現プロフィールを用いるビジネス方法にも関する。特定の態様として、この方法は、本発明の遺伝子発現プロフィールマイクロアレイを用いて実施することができる。例えば、ユーザー（例えば、医師のような保健従事者）は、患者からサンプル（例えば、血液、組織生検）を得ることができる。サンプルは、例えば、病院施設を用いて組織内で調製することができる、もしくはサンプルを商業研究施設に送ることができる。簡潔に言えば、RNAを当該技術分野において周知である方法（Sambrook, et al. (1989)）を用いて患者サンプルから抽出する。次にRNAを例えばPCRにより増幅し、発蛍光団で標識し、そして特定の遺伝子発現プロフィールに相当する支持体にハイブリダイズさせる。支持体を蛍光に関して走査し、そして走査の結果を分析のために中央遺伝子発現プロフィールデータベースに送ることができる。別の態様として、サンプル自体を走査分析のために中央研究所施設に送る。走査結果は、コンピューター端末を介して、そしてインターネットもしくは他の手段によって分析のために中央研究所施設に送ることができる。好ましくは、ユーザーとコンピューターシステム間の接続は安全である。実際、ユーザーは、例えば、支持体の蛍光走査結果に関する情報並びに患者の疾患状態、臨床化学（例えば赤血球算定、電解質）及び患者の疾患状態に関する他の因子のような患者に関する追加の情報を入力することができる。中央コンピューターシステムは、次に、常駐コンピュータープログラムの使用によって、患者のサンプルの分析を提供し、そして患者の遺伝子プロフィールを示す遺伝子発現プロフィールを作製する。

20

30

【0079】

本発明の方法及び装置は、コンピューターシステムが複雑なマルチユーザー計算装置またはパーソナルコンピューターもしくはワークステーションのようなシングルユーザー装置であるかどうかにかかわらず、任意のコンピューターシステムに適用されることを当業者は理解する。コンピューターシステムは、好適には、プロセッサー、メインメモリー、メモリーコントローラー、補助記憶インターフェース及び端末インターフェースを含んでなり、これらの全ては相互に接続されている。キャッシュメモリーもしくは他の周辺装置の付加のような、様々な改変、付加もしくは削除を本発明の範囲内でコンピューターシステムに行うことができることに留意せよ。

40

【0080】

プロセッサーは、コンピューターシステムの計算及び制御機能を果たし、そして適当な中央演算装置（CPU）を含んでなる。プロセッサーは、マイクロプロセッサーのような単一の集積回路を含んでなることができ、またはプロセッサーの機能を果たすために協同して働く任意の適当な数の集積回路装置及び/回路板を含んでなることができる。

【0081】

好ましい態様として、補助記憶インターフェースは、コンピューターシステムが磁気ディ

50

スク（例えばハードディスクもしくはフロッピーディスク）または光学記憶装置（例えばCD-ROM）のような補助記憶装置から情報を記憶しそして引き出すことを可能にする。一つの適当な記憶装置は、直接アクセス記憶装置（DASD）である。DASDは、フロッピーディスクからプログラム及びデータを読み取ることができるフロッピーディスク装置であることができる。本発明は完全に機能性のコンピューターシステムに関連して記述され（そして引き続き記述され）るが、本発明の機構は様々な形態のプログラム製品として配布できること、及び本発明は実際に配布を実施する特定のタイプのシグナル保有メディアにかかわらず同等に適用されることを当業者は理解することに留意することが重要である。シグナル保有メディアの例には：フロッピーディスク及びCD-ROMSのような記録型メディア並びにワイアレスコミュニケーションリンクを含むデジタル及びアナログコミュニケーションリンクのような伝送型メディアが包含される。

10

【0082】

コンピューターシステムはまた、必要とされる情報をメインメモリーから動かすことを担う別個のプロセッサの使用によって、そして/もしくはメインプロセッサへの補助記憶インターフェースによって、メモリーコントローラーを含んでなることもできる。説明の目的のために、メモリーコントローラーを別個の存在として記述するが、実際には、メモリーコントローラーにより提供される機能の部分は、メインプロセッサ、メインメモリー及び/もしくは補助記憶インターフェースと関連する回路に実際に存在できることを当業者は理解する。

【0083】

さらに、コンピューターシステムは、システム管理者及びコンピュータープログラマーが、通常はプログラム可能なワークステーションによって、コンピューターシステムと通信できるようにする端末インターフェースを含んでなることができる。本発明は、複数のプロセッサ及び複数のシステムバスを有するコンピューターシステムに同等に適用されると理解されるべきである。同様に、好ましい態様のシステムバスは典型的なハードウェアに組み込みのマルチドロップバスであるが、コンピューター関連環境における双方向通信をサポートする任意の接続手段を用いることができる。

20

【0084】

コンピューターシステムのメインメモリーは、好適には、遺伝子発現プロフィールを作製するために用いるアルゴリズムに関連する一つもしくはそれ以上のコンピュータープログラム及びオペレーティングシステムを含有する。メモリーにおけるコンピュータープログラムは、その最も広い意味において用い、そして原始コード、中間コード、機械言語及びコンピュータープログラムの任意の他の表示を包含する全ての形態のコンピュータープログラムが包含される。「メモリー」という用語は、本明細書において用いる場合、システムの実際のメモリー空間における任意の記憶場所をさす。コンピュータープログラム及びオペレーティングシステムの部分は、メインプロセッサが実行するために命令キャッシュにロードすることができ、一方、他のファイルは磁気もしくは光学ディスク記憶装置上に記憶してもよいと理解されるべきである。さらに、メインメモリーは異種のメモリー場所を含んでなることができると理解されるべきである。

30

【0085】

本発明の別の好ましい態様は、組織もしくは細胞サンプルに対する薬剤及び毒性作用をスクリーニングする方法、並びに疾患を処置するための新規薬剤の開発方法を包含する様々なビジネス方法を含んでなる。本発明のさらなる態様は、正常及び疾患組織の遺伝子発現プロフィールを提供するビジネス方法を含んでなる。また本発明の範囲内であるのは、患者サンプルの診断及び予測子を提供するビジネス方法である。

40

【0086】

本願のビジネス方法は、本発明の方法論の商業的及び他の使用に関する。一つの態様として、ビジネス方法には、本発明により提供される遺伝子発現プロフィールを消費者、すなわち、患者、開業医、保健診療機関、並びに製薬販売業者及び製造業者に提供することに関連する本発明の方法論のマーケティング、販売もしくはライセンスが包含される。

50

【0087】

遺伝子発現プロフィールデータベースは、本発明の方法により作製される遺伝子発現プロフィールに関する注釈情報を含むように設計した内部データベースであることができる。そのような情報には、例えば、既定の核酸配列が見出されたマイクロアレイ、該配列と関連する関連cDNAに関する記述的情報、組織もしくは細胞源、外部源から得られる配列データ、及び調製方法を包含することができる。データベースは、2つの部分：配列を記憶するものと関連情報を記憶するものに分かれることができる。このデータベースは、中央コンピューター施設内のファイアウォールを有するプライベートデータベースとして維持することができる。しかしながら、本発明はそのように限定されず、そして遺伝子発現プロフィールデータベースを一般に公開することができる。

10

【0088】

データベースは、クライアントとネットワークサーバーとをつなぐネットワークシステムであることができる。ネットワークは、当該技術分野において既知であるような（例えばEthernet）、ローカルエリアネットワーク（LAN）もしくは広域ネットワーク（WAN）を包含する多数の通常のネットワークシステムのいずれか一つであることができる。サーバーは、ユーザー要求を処理するためにデータベース情報にアクセスしそしてクライアントの機械に情報を供給するためにインターフェースを提供するソフトウェアを含むことができる。サーバーは、ワールドワイドウェブをサポートしそしてクライアントの使用のためにウェブサイト及びウェブブラウザを維持することができる。クライアント/サーバー環境、データベースサーバー及びネットワークは、技術、営業用及び特許文献に十分に解説されている。

20

【0089】

ウェブブラウザを通して、クライアントはマイクロアレイデータベース及び遺伝子発現データベースからデータを取り出すための検索要求を構築することができる。例えば、ユーザーは、ボタンのようなユーザーインターフェース要素を「指してクリックし」、メニューを開き、そしてバーをスクロールすることができる。クライアントの要求は、ウェブアプリケーションに送ることができ、それはマイクロアレイデータベースもしくは遺伝子発現データベースから情報を集めるために用いることができるクエリーを生じるようにそれらをフォーマットする。さらに、ウェブサイトは、National Library of Medicineの一部、National Center for Biotechnology Information (NCBI)により維持されるGenBank及び関連データベースのような公開データベースへのハイパーテキストリンク、並びに遺伝子発現分析、遺伝病、科学文献などの関連情報を提供する任意のリンクを提供することができる。

30

【0090】

以下の実施例は、本発明を例示するが、しかしながら、本発明をこれらに限定しない。

【0091】

実施例 1KSHVに感染したDMVECの誘導

KSHVに感染したDMVECの樹立は、以前に詳細に記述されている⁽⁴³⁾。簡潔に言えば、ヒトパピロームウイルス16型のE6及びE7遺伝子のレトロウイルス発現により不死化した皮膚微小血管細胞(DMVEC)に、テトラデカノイルホルボールアセテート(TPA)で刺激したBCBL-1細胞の上清から得られたKSHVを感染させた。感染は、ORF26遺伝子のKS330 BamHIフラグメントの増幅のDNA PCR、ORF29遺伝子からのスプライシングされたmRNAのRT-PCRにより確かめた⁽¹¹³⁾。潜伏的に感染した細胞のパーセンテージは、LANA/ORF73⁽⁸²⁾の免疫蛍光染色により決定した。増殖誘導は、初期増殖タンパク質ORF59/PF-8⁽¹¹⁰⁾及び後期増殖糖タンパク質のタンパク質ORFK8.1A/B⁽¹¹¹⁾に対する抗体で評価した。DMVECは、>90%の細胞がORF73を発現する場合に実験に用いた。化学誘導なしに、2-5%の感染細胞はORF59を発現し、約10%のOR

40

50

F59陽性細胞はK8.1A/Bを発現した。ウイルスタンパク質に対する抗体は、Ball Chandran博士からの寛大な贈与であった。

DNAマイクロアレイ

DNAマイクロアレイは、マイクロアレイヤー(Molecular Dynamics)を用いてガラススライド(Molecular Dynamics)上にヒトcDNAのPCRフラグメントをスポットすることによりSalunga et al.(57)に記述されているように製造した。1つのDNAマイクロアレイを用いた: Mega-Aチップ: 4428クローン。各クローンを二重反復でスポットした。各マイクロアレイは、30種の植物遺伝子をバックグラウンドコントロールとして含有した(60)。記述されているように(57)ハイブリダイゼーションシグナルを走査し、そして正規化した。

10

プローブ調製及びハイブリダイゼーション

KSHVを感染させたトランスフォームした皮膚微小血管内皮細胞を以前に記述されているように(43)増殖させた。2種の異なる感染していない及び3種の異なる感染した細胞系を誘導しないかまたはPMAで6時間もしくは48時間誘導し、そしてトリプシン消化により採取した。RNeasyカラム(Qiagen)を用いて全RNAを調製し、その後、各サンプルをDNアーゼ(Promega)処理し、そしてRNeasyカラム上で再精製した。T7ポリメラーゼ線状増幅プロトコル(57)を用いてメッセンジャーRNAを一度増幅した。増幅後に、RNAをCy3-シチジンの存在下で逆転写により標識した。

【0092】

対応する感染した及び感染していないサンプルを記述されているように(57)ハイブリダイズさせた。変動係数(CV)決定を可能にするために各々の標識しそして増幅したRNAを少なくとも2つの別個のチップにハイブリダイズさせ、そして50%未満のCVを有する遺伝子の平均強度を次の発現比の計算に用いた。各マイクロアレイの結果は、記述されているように(57)第75百分位数に正規化した。

20

SCF及びc-KitのRT-PCR

RNeasy Total RNAキット(Qiagen, Chatsworth, CA)を製造業者の説明書に従って用いて、擬似感染及びKSHV感染したDMVECから全RNAを単離した。RNAを分光測光により定量し、そしてsuperscript逆転写酵素(RT; Life Technologies, Gaithersburg, MD)を200U/l・g RNAで用いてcDNAを合成した。c-Kit及びSCF mRNAの増幅に用いたプライマーは: c-Kit, 5'-CTCAACCATCTGTGAGTCCA-3'(配列番号: 1)及び5'-AAGCCGTGTTTGTGTTGGTGC A-3'(配列番号: 2)(83)、並びにSCF, 5'-CCATTGATGCCTTCAAGGAC-3'(配列番号: 3)及び5'-CTTCCAGTATAAGGCTCCAA-3'(配列番号: 4)(84)であり、これらはそれぞれc-Kit及びSCFの242bp及び274bpの産物を生じた。cDNA合成のコントロールとして細胞性遺伝子ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)を各サンプルから増幅した。一致するHPRT増幅産物が比較下のサンプルから得られた。各反応には、RTなしのサンプルを含んだ。PCR産物は、アガロースゲル電気泳動により分離し、そして臭化エチジウム染色により視覚化した。

30

40

免疫蛍光染色

c-Kitタンパク質の検出のために、1%ウシ血清アルブミン(BSA)及び0.02%アジ化ナトリウムを含有するPBS(染色バッファー)においてDMVEC単層をすすぎ、そして抗-c-Kitモノクローナル抗体、クローンNu-c-kit(Research Diagnostics, Flanders, NJ)もしくはクローン57A5(Ancell, Bayport, MN)、続いてヤギ抗-マウスFITC結合抗体(Biosource International, Camarillo, CA)で染色した。両抗体とも、染色バッファーにおける1:100希釈で37°Cで60分間用いた。染色した細胞を2%パラホルムアルデヒドにおいて固定し、封入し、そしてNikon蛍光

50

顕微鏡上で調べた。二重反復単層からの一次抗体の削除は、二次コンジュゲートの非特異的結合を示さなかった。免疫蛍光分析は、擬似感染及びKSHV感染したDMVEC並びにc-Kitタンパク質を発現するアデノウイルス構築物を感染させたDMVEC上で実施した。

SCF ELISA

擬似感染及びKSHV感染したDMVECの合流した単層から6～48時間に及びインキュベーション期間の後に上清を採取した。採取した上清に存在するSCFは、SCF ELISA検出キット(R&D)を製造業者の説明書に従って用いて定量した。

増殖アッセイ

擬似感染及びKSHV感染したDMVEC、並びにSCLC系統HTB-172の増殖を、XTTに基づくアッセイを用いて定量した。細胞を 1×10^4 もしくは 5×10^4 細胞/ウェルでPrimaria 96ウェルトレー(Becton-Dickinson)に加えた。外因性SCF(20、50及び100 ng/ml)及びSTI571(0.01、0.1、1及び10 μ M)を実験プロトコルにより示すように平板培養の24時間後に加えた。XTT(Roche, Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)を製造業者の説明書に従って48時間後に加えた。4～6時間後に吸光度をマイクロプレート読み取り装置上で読み取った。HTB-172系統は、American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD)から入手した。

アデノウイルスベクターの構築及び使用

ドミナントネガティブc-Kit突然変異体(c-Kit/DN)は、標準的なPCRに基づく突然変異誘発を用いて細胞質ドメイン中のSer614での未熟終止コドンの挿入により構築した。この部位でのc-Kitの欠失は、二量化ドメインに影響を与えずにATP結合及びホスホトランスフェラーゼドメインを欠失する。突然変異誘発を確認するためのDNA配列分析の後、以前に記述されているように⁽¹¹⁵⁾c-Kit/DNをアデノウイルス発現ベクターにクローン化した。これは、c-Kit/DNをtet応答性プロモーター/エンハンサー要素の制御下に置き、そしてタンパク質発現は、'tet-オフ'トランスアクチベーターを発現するアデノウイルス(Ad/trans)との共感染により導かれる。組換えウイルスは、PCRによりスクリーニングし、そしてタンパク質発現は、c-KitのN末端に対して向けられるウサギポリクローナル抗体(H-300; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)を用いて感染細胞ライセートのウェスタン免疫プロットにより確かめた。KSHVの非存在下でのDMVECにおけるc-Kitの過剰発現のために、野生型c-Kitを発現するアデノウイルス(c-Kit/WT)を同様に構築した。全ての組換えアデノウイルスをプラーク精製し、ウイルスストックを増殖させ、そして293細胞上で滴定した。DMVEC感染には、単層を1:10～1:100の感染多重度(MOI)のc-Kit/WTもしくはc-Kit/DN及びMOI 1:10のAd/transと37で4時間インキュベーションした。最適MOI用量は前もって決定した。ウイルスストックは、2%ヒト血清及びポリブレン(4 μ g/ml)を含有する培地において希釈した。アデノウイルス感染の感染効率及び非特異的作用のコントロールとして、グリーン蛍光タンパク質を発現するアデノウイルスベクター(Ad/GFP)を二重反復単層に感染させた。それぞれ1:100及び1:10のMOIのAd/GFP及びAd/transでの感染は、最小の細胞変性効果で培養における細胞の>80%の感染を与えた。

トランスフォーメーションアッセイ

トランスフォームした表現型を促進するために、KSHVに感染したDMVECを35 mm Primaria培養皿において合流後(post-confluency)培養した。これらの条件下で、細胞は顕著な紡錘形態をとり、無秩序な増殖パターンを示し、そして単層内に多層フォーカスを生じた。同様の条件下で培養した感染していないDMVECは増殖阻止を示し、そして整った細胞境界を有する丸石表現型を維持した。合流後の細胞は、上記のようにアデノウイルス構築物を感染させるか、もしくは増加する用量(0.

10

20

30

40

50

0.1、0.1、1及び10 μ M)のSTI571にさらした。STI571は、凍結ストックから新しく調製した希釈物を用いて48~36時間ごとに補充した。細胞を表現型変化の徴候に関して位相差顕微鏡を用いて毎日調べ、そして結果を写真撮影により記録した。

試薬

2-フェニルアミノピリミジン誘導体STI571は、Elisabeth Buchdunger博士(Novartis, Basel, Switzerland)によって開発され、そして寛大に提供された。STI571のストック溶液は、5mgのSTI571を1mlのPBSに溶解することにより10mmol/Lで調製し、そして即時に使用するかもしくは-20で保存した。使用溶液は、使用直前にEndothelial-SFMにおいて希釈した。

10

【0093】

PDTC(ピロリジンジチオカルバメート)、トランス-レチノイン酸及びSB203580は、Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)から購入した。カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)及びCGRP-8-37ペプチドは、Bachemから購入した。InCElect AKAP St-Ht31及びSt-Ht31-コントロールペプチドは、Promega Corporation(Madison, WI)から購入した。ハロペリドール及びホルボール-12-ミリステート-13-アセテート(PMA)は、Calbiochem(San Diego, CA)から購入した。T22は、American Peptides International, Inc.(Sunnyvale, CA)から購入した。ガンシクロビル、BQ788は、Peptides International, Inc.(Louisville, KY)から購入した。15-デオキシ⁽¹²⁻¹⁴⁾プロスタグランジンJ2は、Cayman Chemicals(Ann Arbor, MI)から購入した。

20

RT-PCR

KSHV遺伝子ORF64及びK12(カポシン(kaposin))を以前に記述されているように⁽⁴³⁾逆転写酵素PCR(RT-PCR)鋳型として用いた。ORF65配列は、プライマー5'-GGCGTTAATTAAGCTAGCATGTCCTCAACTTTAAGGTGAGA(配列番号:5)及び5'-AAACCTATTTCTTTTGGCCAGAGG(配列番号:6)で増幅した。cDNA合成のコントロールとして細胞性遺伝子(HPRT、GAPDHもしくは-アクチン)を各サンプルから増幅した。PCR産物は、アガロース-臭化エチジウムゲル上での電気泳動後に視覚化した。

30

KSHVを感染させた細胞における広域RNA変化

我々は以前に、皮膚微小血管内皮細胞(DMVEC)のKSHV感染に基づくインビトロモデルを記述しており、ここで、ウイルスで攻撃した細胞の大部分は潜伏ウイルスを保有し、そして40%までの細胞は、増殖複製を受けるように化学的に誘導することができる⁽⁴³⁾。この系における潜伏ウイルスを保有する細胞の高いパーセンテージ及び増殖複製の誘導の高効率のために、感染細胞のさらなる濃縮なしに組織培養細胞からRNAを直接単離することが可能であった。3種の感染した及び2種の感染していないDMVEC系からのRNAサンプルを、誘導していない細胞並びにPMAで6及び48時間誘導した細胞から調製した。感染していない細胞及び感染した細胞のRNAをそれぞれcy-3で蛍光的に標識したcDNAに転化し、そして全部で4428個のPCRフラグメントを展示するDNAチップにハイブリダイズさせた。各チップは、2組のPCRフラグメントを含有し、そしてチップ内並びにチップ間変動の両方を制御するためにハイブリダイゼーションを二重反復で行った。2つの独立したハイブリダイゼーションの比較を図1cに示す。チップ~チップシグナル間の変動は、シグナルの99.9%に対して1.8倍未満であった。従って、1.8より大きい比率は、有意であるとみなした。相加平均を計算するために、同じクローンで得られる全てのハイブリダイゼーションシグナルを用いた。個々のクローンは、1時点当たり3回の実験のうち少なくとも2回において1.8倍より大きく誘導されることが見出され、一方、他のクローンは、分析した3時点の少なくとも一つで1

40

50

．8倍より大きく（比率＜0.55）抑制された。全てのクローンの比率を表2に示す。いくつかのクローンが同じ遺伝子に相当する場合、全ての個々のクローンの結果を示す。これらの場合において認められるシグナル比率の変動は、ハイブリダイゼーションシグナルが同じ遺伝子の異なるセグメントに対して異なり得るという事実によって引き起こされる。

血管新生に關与する遺伝子

KSHVに感染した細胞において誘導される遺伝子の中には、細胞外マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）ファミリーのいくつかのメンバーがあった（表2）。MMPは、細胞外マトリックス（ECM）の成分を分解させる。様々なタイプのMMP並びにECM分解プロテアーゼがアップレギュレーションされた。従って、本発明はまた、内皮細胞トランスフォーメーション、トランスフォームした内皮細胞の侵襲性、並びに新生血管形成の調節のための方法及び組成物も包含する。

10

【0094】

データはさらに、KSHVが、内皮細胞の増殖を調節する因子の遺伝子発現パターンを調節することを示す。KSHVによるプロ-血管新生因子の誘導は、感染していない細胞より増殖優位性を与えることができ、これは、KSHVに感染した内皮細胞のパーセンテージがKSの進行中に増加する結果⁽²⁰⁾を説明するかもしれない。従って、本発明はまた、内皮細胞増殖を増やすこともしくは減らすことを包含する、内皮細胞増殖の調節のための方法及び組成物にも關する。

インターフェロンにより誘導される遺伝子

KSHVに感染した細胞において強く誘導される遺伝子の別の群は、インターフェロンにより誘導されることが既知である（表2）。

20

炎症

いくつかの前炎症性サイトカイン及びいくつかの前炎症性遺伝子は、KSHVによりアップレギュレーションされた（表2）。潜伏期と比較して感染の溶菌期の間のこれらの前炎症性及び化学誘引物質サイトカインの強い誘導は、KSHVに感染した細胞が、KS腫瘍への単球及び白血球の誘引において主要な役割を果たすことを示唆する。

分化マーカー

KSHVは、いくつかの既知の分化マーカー並びに細胞分化における既知の機能を有する遺伝子の発現パターンを調節した（表2）。最も顕著には、c-kitは、内皮細胞におけるその通常の発現レベルを超えて増加した。KSHVにより調節される分化マーカーは、骨髓ストロマ細胞に由来する異なる間充織系統に相応する。脂肪細胞、骨芽細胞及び軟骨細胞は多能性間充織幹細胞に由来し⁽⁵⁴⁾、一方、EC及び造血細胞は共通の前駆細胞、血管芽細胞から分化する⁽¹⁸⁾。これらの様々な系統に対応する分化マーカーの発現は、KSHVが、感染した内皮細胞の脱分化を誘導することを示す。

30

DMVECにおけるc-Kitの発現は、KSHV感染によりアップレギュレーションされる。

【0095】

KSHVに感染したDMVECのDNAマイクロアレイ分析において最も一貫してアップレギュレーションされる遺伝子の一つは、c-Kit遺伝子であった（表2）。マイクロアレイ結果と一致して、KSHVに感染したDMVEC上のc-Kit mRNA及び表面タンパク質の増大した発現が、それぞれ、RT-PCR（図1A）及び免疫蛍光染色（図1B）により示された。過去の研究により、臍静脈及び大動脈からの内皮細胞は、c-Kit及びSCFリガンドを共発現することが示されている^(100, 101, 102, 103)。DMVECがc-Kitに加えてSCFを発現するどうかを決定するために、SCF mRNAのRT-PCR分析を行った。SCF mRNAは、KSHVに感染した及び感染していないDMVECの両方において容易に検出され、これらの細胞における受容体及びリガンドの共発現を示したが、SCF発現レベルにおけるウイルスにより誘導されるいかなる変化も認められなかった（図2A）。選択的RNAスプライシングのために、SCFタンパク質は膜結合型及び可溶性型の両方で存在する⁽¹⁰⁴⁾。図2Aに示す小

40

50

さい方のPCR産物は、該タンパク質の膜結合型を表し、DMVECにおける可溶性に対する膜結合型SCFの比率もまたKSHV感染により影響を受けないことを示唆する。膜結合型及び可溶性SCF転写産物間を直接区別するためのアイソフォーム特異的プライマーを用いるRT-PCR⁽¹⁰⁵⁾は、この結論を裏付けた。RT-PCR結果と一致して、SCFの分泌を測定するためのSCF特異的ELISAを用いるDMVEC培養上清の分析は、KSHV感染と関連するタンパク質レベルにおけるいかなる有意な変化も示さなかった(図2B)。従って、KSHV感染が、c-Kit/SCFにより調節されるシグナリング経路を改変する場合、ウイルス感染の寄与は、おそらくc-Kit発現のレベルにおいてである。

KSHVに感染したDMVECにおけるc-Kit発現は、外因性SCFに応答する増殖を促進する。 10

【0096】

KSHVにより誘導されるc-Kitのアップレギュレーションが機能性結果を有するかどうかを調べるために、外因性SCFに対するDMVECの細胞分裂誘起応答がKSHV感染後に高められるかどうかを試験した。擬似感染及びKSHV感染したDMVECを組換えSCFの非存在下及び存在下で増殖因子枯渇培地において培養し、そして増殖をXTTに基づく色素還元アッセイ⁽¹¹²⁾を用いて測定した。擬似感染及びKSHV感染したDMVECは両方とも、50~100ng/mlで最大である外因性SCFに応答する用量依存性増殖を示した。しかしながら、感染したDMVECは、擬似感染したDMVECより外因性リガンドに対して有意に大きく応答した(図3A)。擬似感染した培養物において、組換えSCFの非存在下での基礎増殖を超える増加は決して40%より大きくなく、一方、KSHVに感染したDMVECの増殖は85%ほども増加した。KS疾患中に、隣接する内皮細胞によりもしくはKS病巣に浸潤するマクロファージ及びマスト細胞により生産されるSCFに応答するKSHV感染内皮細胞の増大した能力は、ウイルス感染細胞のより迅速な増殖を促進する。

c-KitチロシンキナーゼインヒビターSTI571は、KSHVに感染したDMVECの増殖を阻止する。 20

【0097】

KSHVに感染したDMVECの増大した増殖応答におけるc-Kit/SCFの役割を確かめるために、外因性SCFに応答する感染したDMVECの増殖をc-Kitチロシンキナーゼ活性のインヒビター⁽⁹⁹⁾、2-フェニルアミノピリミジン誘導体、STI571(正式にはCGP 57148Bとして知られている)^(106, 97)の増加する濃度の存在下で測定した。図3Bにおいて例示するように、外因性SCFに対するKSHVに感染したDMVECの増殖応答は、1µM用量のSTI571により完全に阻止された。トリパンプル排除によるDMVEC生存能力の試験により、増殖阻止はSTI571の非特異的細胞毒性のためではないことが示された。さらに、STI571は、外因性IL-2に応答して増殖するヒトJurkat T細胞系の能力にいかなる影響ももたなかった。KSHVに感染したDMVEC増殖を阻止するSTI571の能力は、KSHVに感染した細胞の増殖応答におけるc-Kitシグナリングの役割を裏付け、そしてさらにKS治療の新規な戦略を示唆する。

DMVECにおけるc-Kitの発現は、形態学的トランスフォーメーションの誘導のために十分である。 40

【0098】

増殖シグナリンググループの誘導は、腫瘍細胞系における異常なc-Kit/SCF活性の最も一般に記述されている結果であるが、増大したc-Kit発現はまた、細胞形態における変化及びトランスフォームした表現型の獲得とも直接関連している。例えば、マウス繊維芽細胞におけるc-Kitの異所性発現は、形態変化、軟寒天における増殖及びヌードマウスにおける腫瘍形成を誘導する^(107, 108, 109)。我々は以前に、KSHVに感染したDMVECが、紡錘形態並びに無秩序な増殖、フォーカス形成及び半固体寒天における足場非依存性増殖を包含するトランスフォーメーションの特徴を生じること 50

を示した⁽⁴³⁾。c-Kitアップレギュレーションは、KSHV感染により引き起こされる形態変化を誘導するために十分であるかどうかを決定するために、c-KitをあらゆるKSHV遺伝子の非存在下で正常なDMVECにおいて過剰発現させた。c-Kit過剰発現は、c-Kit遺伝子発現の誘導に必要なトランスアクチベーターを発現するアデノウイルス(Ad/trans)と一緒に野生型c-Kitタンパク質を発現するアデノウイルスベクター(Ad/c-KitWT)をDMVECに感染させることにより実施した。アデノウイルス感染の感染効率及び非特異的作用を確認するために、並行DMVEC培養物にグリーン蛍光タンパク質を発現するアデノウイルス(Ad/GFP)及びAd/transを感染させた。GFPは、蛍光顕微鏡検査により視覚化した場合に、DMVECの大部分(>80%)において高レベルで発現された。匹敵する感染多重度(MOI)でAd/c-KitWTを感染させたDMVECの免疫蛍光染色は、約50%の細胞上でc-Kitタンパク質の強い表面発現を示した。図4Aにおいて例示するように、c-Kit過剰発現は、KSHV感染後に認められるものと同様であるDMVEC形態に対する用量依存性結果を有した。Ad/c-KitWTに感染した細胞は、単層の過剰増殖及び別個の細胞境界の喪失を有して、紡錘状で且つ無秩序になった。紡錘形成は、細胞表面上で高レベルのc-Kitタンパク質を発現する細胞に限られた(図4B)。形態変化は、感染後(PI)5日で最初に認められ、そしてPI10日までに顕著であった。Ad/GFPを感染させたDMVECは表現型変化なしに3週までの間維持されたので、これらの変化は、c-Kitを過剰発現するアデノウイルス感染培養物に特異的であった。Ad/GFPもしくはAd/c-KitWTに感染したDMVECへの外因性SCFの添加は形態変化を誘導もしくは助長せず、そしてアデノウイルス感染は、DMVECによるSCF生産を改変しなかった。これらの結果は、DMVECにより生産される内因性SCFが、形態学的トランスフォーメーションを引き起こす経路を活性化するために十分であることを示す。重要なことには、これらの研究は、DMVECにおけるc-Kitの増加した発現が、DMVECのKSHV感染後に認められるものに匹敵する形態変化を誘導するために十分であることを示す。

c-Kit活性の阻害は、KSHVにより誘導されるトランスフォーメーションを打ち消す。

【0099】

KSHVによるc-Kitの誘導が、ウイルスにより誘導されるトランスフォーメーションに必要なかどうかを直接試験するために、KSHVによりトランスフォームしたDMVECにおけるc-Kitシグナリングを阻害することの結果を評価した。図5Aにおいて例示するように、KSHVによりトランスフォームしたDMVECは、単層培養において無秩序な増殖、接触阻止の喪失及びフォーカス形成を示す。しかしながら、内因性c-Kitチロシンキナーゼ活性を阻害するためのSTI571でのDMVECの処理の後、フォーカス形成は阻止され、そして別個の細胞縁を有する整った単層が再建された。STI571の影響は用量依存性であり、そして1 μ Mの薬剤濃度で完全であった。STI571の除去は、10 μ M用量に細胞をさらした後でさえ、トランスフォームした表現型の再生を引き起こしたので、トランスフォームした増殖特性の喪失は、薬剤により誘発される細胞毒性のためではなかった。感染していないDMVECは、合流の状態で維持した場合に整った丸石表現型を有する正常な増殖を示し、そしてSTI571にさらすことにより、細胞形態もしくは生存能力にいかなる影響もなかった。

【0100】

STI571はAb1及び血小板由来増殖因子(PDGF)受容体チロシンキナーゼに対しても有効であるので^(106, 98)、DMVECにおける阻害活性は、KSHVにより誘導されるトランスフォーメーションにおけるこれらの受容体のいずれかの役割を含む可能性がある。DMVECのDNAマイクロアレイ分析は、KSHVにより誘導されるAb1、PDGFもしくはPDGF受容体遺伝子のいかなるアップレギュレーションも示さず、c-Kitが主要な薬剤標的であることを示唆した。しかしながら、KSHVにより誘導されるDMVECトランスフォーメーションにおけるc-Kitの中心的役割を確

かめるために、KSHVによりトランスフォームしたDMVECにおけるc-Kitシグナリングを特異的に阻害する相補的方法を考案した。この方法では、c-Kitシグナリングに必要な細胞質ATP結合及びホストトランスフェラーゼドメインを欠くドミナントネガティブc-Kitタンパク質(Ad/c-KitDN)を上記に略述するアデノウイルス送達系を用いてKSHV感染細胞において発現させた。Ad/GFPのみを感染させたコントロール培養物では、トランスフォームした表現型のいかなる変化も認められなかった。それに反して、KSHVによりトランスフォームしたDMVECにおけるドミナントネガティブc-Kitタンパク質の発現は、トランスフォームしたフォーカスの劇的な喪失をもたらし、細胞は、STI571処理後に認められるものと同じように平らになりそして整うようになった(図5B)。KSHVに誘導される形態学的トランスフォーメーションをc-Kit活性の特異的阻害によって打ち消すことができることは、KSHVにより誘導される内皮細胞のトランスフォーメーションにおけるc-Kitシグナリングの重要な役割を示し、そしてKS腫瘍形成における因子としてのc-Kitのアプレギュレーションの役割を裏付ける。

10

増殖複製中に誘導される宿主遺伝子産物の機能

ウイルス感染による細胞経路の誘導もしくは抑制は、細胞防御機構、ウイルス遺伝子産物のいくつかによる宿主遺伝子発現の選択的調節、もしくは中立傍観者効果(neutral bystander effect)のいずれかである。これらの可能性を区別する方法の一つの方法は、既定の細胞経路の阻害もしくは活性化がウイルス複製に影響を及ぼすかどうかを調べることによる。

20

【0101】

増殖複製中に特に誘導される宿主遺伝子は、処置していない及びPMAで処置した感染していない細胞と一緒に対応する誘導していないKSHV感染細胞と6時間もしくは48時間誘導したKSHV感染細胞(17)間のハイブリダイゼーション強度を比較することにより同定した。コントロールのいずれかにおいて得られる最大ハイブリダイゼーションシグナルを少なくとも2倍超えるハイブリダイゼーションシグナルを示す遺伝子をさらなる分析のために選択した。これらの規準を満たした23個の遺伝子を表1に示す。KSHV感染細胞のPMA誘導の6及び48時間後にアプレギュレーションされる遺伝子は、様々な化合物により標的とされる。直接標的は、化合物により標的とされる遺伝子であり、間接標的は、標的とされる遺伝子と異なる場合にチップ上でアプレギュレーションされる遺伝子である。

30

【0102】

ウイルス複製のためのこれらの遺伝子の重要性を評価するために、我々は、特定の宿主遺伝子の誘導もしくは遺伝子産物の機能のいずれかを調節することが既知である化合物を選択した。大部分の遺伝子に対して、特異的アンタゴニストを同定することが可能であった。誘導後6時間で誘導されるいくつかの遺伝子は、前炎症性刺激により誘導されることが既知である。周知の例は、A20、IL-8、ICAM-1及びcox-2である。しかしながら、jagged1、MMP-10もしくはアンジオポエチン-2のようなこの群の他の遺伝子はまた、炎症性シグナルにより誘導されることも示されている。NF- κ Bの活性化はこの転写応答にとって必須であるので、NF- κ B活性化のインヒビター⁽⁶¹⁾、1-ピロリジンカルボジチオン酸(PDTC)が、増殖複製中にKSHV遺伝子の発現を調節するかどうかを分析した。6時間で誘導される他の遺伝子の中には、プリンヌクレオシドのそれらのそれぞれのプリン塩基及び対応するペントース-1-リン酸への加リン酸分解を可逆的に触媒するプリンヌクレオシドホスホリラーゼ(PNP)があった。PNP活性は、8-アミノグアノシンにより阻害することができる⁽⁵⁸⁾。4種のGタンパク質共役受容体、カルシトニン遺伝子関連ペプチド受容体(CGRP-1)、ラットPDC1のヒト相同物、エンドセリンB受容体及びケモカイン受容体(及びHIV-共受容体)CXCR4もまた、増殖サイクル中に特に誘導された。RDC1及びCGRP-1は両方とも、そのリガンドの欠失バージョン、カルシトニン遺伝子関連ペプチドで阻害することができる^(59, 60)。エンドセリンB受容体へのエンドセリン結合は、アンタゴニ

40

50

ストペプチド B Q 7 8 8 により阻止することができる⁽⁶¹⁾。同様に、C X C R 4 へのストロマ細胞由来因子 - 1 結合、並びに H I V 融合は、ペプチド T 2 2 により阻害することができる。P D G F によりもたらされる M C P - 1 の誘導は、トランス - レチノイン酸で阻害することができる⁽⁵³⁾。シグナル伝達に關与するいくつかの遺伝子が増殖感染中に誘導された。H s p 2 7 は、p 3 8 M A P K により活性化されるストレス経路の一部であり、そして M A P K によりもたらされる H s p 2 7 のリン酸化は、S B 2 0 3 5 8 0 により阻害することができる。グラビン (G r a v i n) は、プロテインキナーゼ A の細胞内局在化を招くアンカリングタンパク質のファミリーに属する⁽⁶³⁾。グラビンと P K A 間の相互作用は、インピトロ及び細胞の両方において A K A P - フラグメントペプチド H t 3 1 で阻害することができる^(64, 65)。I 型シグマ受容体活性化は、N - メチル - D - アスパラギン酸 (N M D A) 受容体からのシグナリングを増大し⁽⁶⁶⁾、そしてその活性化は、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (C G R P) 及び神経ペプチド Y (N P Y) 受容体により調節することができる⁽⁶⁷⁾。I 型シグマ受容体は、抗精神病薬ハロペリドールにより中和される。

10

20

30

【0103】

細胞を阻害化合物もしくはペプチドで 1 時間処理し、そして増殖複製を 4 8 時間の P M A 処理により誘導した。K S H V 複製及び後期遺伝子発現の阻害のコントロール化合物としてガンシクロビルを用いた⁽¹⁰⁾。4 8 時間後に、細胞を採取し、そして潜伏遺伝子 K 1 2 並びに後期遺伝子 O R F 6 5 の発現を R T - P C R により分析した。コントロールには、細胞性遺伝子 - アクチンもしくは H P R T の発現をモニターした。予想されるように、ガンシクロビルは、潜伏遺伝子発現を妨げなかったが、O R F 6 5 転写を阻害した (図 7)。それに反して、大部分の他のインヒビターは、K S H V 潜伏もしくは後期遺伝子発現のいずれも妨げなかった。しかしながら、H t 3 1 及びハロペリドールは両方とも後期遺伝子発現を阻害したが、潜伏遺伝子発現を阻害しなかった。両方のインヒビターは潜在的に P K C シグナリングを妨げるので、H t 3 1 もしくはハロペリドールが、P M A によりもたらされる前初期遺伝子の誘導を阻害するかどうかを調べた。しかしながら、いずれの化合物も前初期遺伝子 K 3 の誘導を妨げなかった。さらに、ペプチド H t - 3 1 は、A キナーゼアンカリングタンパク質 (A K A P s) と P K A 間の会合を阻害する (2 1 , 6 4)。2 5 μ M の H t - 3 1 は、K 1 2 R N A のレベルに影響を与えずに O R F 6 5 発現を阻害した (図 7 B 、 レーン 6)。従って、I 型シグマ受容体及び A K A P により調

【0104】

P K A - A K A P 相互作用及び I 型シグマ受容体は、O R F 6 5 発現に必要とされる。A K A P グラビン (A K A P 2 5 0) は、重症筋無力症を患っている患者における自己抗原として最初に同定された⁽²⁵⁾。グラビンは、ベータ - 2 アドレナリン受容体からのシグナリングに關与することができる⁽⁶⁴⁾、そして P K A と P K C 経路間のクロストークをもたらしすることができる⁽⁴⁷⁾。グラビンが感染細胞においてアップレギュレーションされたことを確証するために、R T - P C R を行った (図 7 A)。R T - P C R 分析は、グラビンが感染細胞において過剰発現されることを裏付け、最高レベルの発現は、誘導後 6 及び 4 8 時間で認められた (図 7 A)。

40

【0105】

同定されるグラビンの特異的インヒビターはないが、しかしながら、ヒト甲状腺 A K A P の P K A R - I I 結合ドメインから得られる H t - 3 1 ペプチドは、インピボ及びインピトロにおいて A K A P / P K A 相互作用を阻害する^(21, 64)。このペプチドのステアレート化 (s t e a r a t e d) バージョンは膜透過性であり、そして組織培養において A K A P / P K A 相互作用を阻害することができる。P K A シグナリングの必要条件は、グラビンのアップレギュレーションから推論することができる、そして K S H V 後期遺伝子発現のための A K A P / P K A 相互作用の必要条件をさらに調べるために、感染した及び感染していない細胞を 2 つの濃度のステアレート化 H t - 3 1 で処理した (図 7 B)。2 5 μ M 及び 5 μ M 濃度の両方で、H t - 3 1 は、O R F 6 5 発現を感染していない細

50

胞において認められるものより低いレベルまで効率よく抑制した(図4B、レーン2-3を1と比較せよ)。PKAと相互作用することができないステアレート化コントロールペプチド、Ht-31Pは、後期遺伝子発現に対する影響がなかった(図7B、レーン4-5)。これらの結果は、異なる株の感染細胞を用いて再現可能に得られた。これらのデータは、PKAシグナリングがORF65遺伝子の発現に必要とされることを示す。Ht-31は広範囲のAKAP/PKA相互作用を阻害するので、Ht-31の阻害作用がグラビンもしくはいずれかの他のAKAPを通して起こるかどうか結論を下すことはできない。

【0106】

I型シグマ受容体は、多種多様な細胞タイプにおいて発現され⁽³¹⁾、そして細胞内カルシウム濃度の調節に關与することができる。I型シグマ受容体が感染細胞においてアップレギュレーションされたことを確証するために、RT-PCRアッセイを実施した(図7C)。RT-PCR分析は、シグマ受容体が、潜在的に感染した細胞では低レベルで発現され、そして増殖複製中に有意に誘導されることを裏付けた(図7C)。しかしながら、RT-PCR分析は、チップから得られるデータと異なり、I型シグマ受容体が誘導後6時間ですでに有意に誘導されることを示唆する(図4C、レーン2)。これは、実験条件間のある種の変動もしくは感染細胞の異なる株間の変動を反映する可能性がある。しかしながら、データは、シグマ受容体が溶菌期中に有意にアップレギュレーションされることを裏付ける。

【0107】

I型シグマ受容体は、抗精神病薬ハロペリドールにより中和される⁽⁶⁶⁾。後期遺伝子発現のためのシグマ受容体機能の必要条件を調べるために、細胞をPMA添加の前に1時間5 μ Mのハロペリドールで処理した。RT-PCR分析により、ハロペリドールは潜伏K12遺伝子の発現に影響を与えないが、ORF65発現は有意に減少することが示された(図7D、レーン5)。後期遺伝子発現の阻害は、ガンシクロビルよりハロペリドールでいっそう完全であった(図7D、レーン5-6)。それに反して、プリンヌクレオチドホスホリラーゼインヒビター、8-アミノグアノシン(8-AMG)は、ウイルス遺伝子発現に対していかなる影響もなかった(図7D、レーン4)。これらのデータは、異なる株の感染細胞を用いて再現され、従って、I型シグマ受容体がORF65発現に必要とされることを裏付けた。我々の結果は、DNAマイクロアレイ分析が、後期遺伝子発現に必要とされる細胞性因子を同定するために使用でき、従って、抗ウイルス研究の新規な手段であることを示す。

【0108】

実施例2

c - k i t アンチセンスオリゴマーを利用するアンチセンス治療は、KSHVに感染したDMVECにおいてc - k i t タンパク質発現を阻害しそしてトランスフォームした表現型の発生を妨げる。

【0109】

DMVECにおけるKSHVにより誘導されるc - k i t 発現と関連する表現型変化を改善するアンチセンス治療の能力を調べるために、タンパク質翻訳を阻止するためのc - k i t の開始コドンを標的とするホスホロジアミデートアンチセンス(PMO-AS)オリゴマーを考案した。PMO-ASオリゴマーは、立体障害により翻訳を妨げると考えられ、そしてRNアーゼHを活性化しないという利点を有する。オリゴマーのエンドサイトーシス取り込み及びサイトゾルへの送達を促進するために、PMO-ASと陰イオン複合体を形成するエトキシル化ポリエチレンイミン(EPEI)を送達試薬として用いた。蛍光顕微鏡検査による取り込み効率のモニタリングを可能にするためにFITC成分をオリゴマーに導入した。

【0110】

KSHVに感染したDMVEC上での初期滴定実験を一続きの異なるオリゴマー/EPEI容量で行った。35mm皿当たり2.5 μ lのEPEI試薬と1.25nMolのオリ

ゴマーを加えることは、E P E Iにより誘導される非特異的な毒性なしに効率のよいアンチセンスの取り込みを与えた。c - k i tオリゴマーがc - K i tをダウンレギュレーションすることにおいて有効であることを確かめるために、K S H Vに感染したD M V E Cに抗 - c - k i tオリゴマー - E P E I複合体を加え、そしてオリゴマーの取り込みを可能にするために無血清培地において37 で3時間インキュベーションした。コントロールとして、D M V E C培養物をE P E I試薬と滅菌水もしくは滅菌水のみで処理するか、もしくは関係のないF I T C標識オリゴマーを含有するオリゴマー / E P E I複合体を加えた。オリゴマー - E P E I溶液の除去の際に、細胞単層を無血清培地においてすすぎ、完全培地を与え、そしてオリゴマーの取り込み及び安定性を評価するために毎日調べた。強い細胞質蛍光が添加後1日までに認められ、そして10日までにわたって十分に維持された。添加後4日で、細胞を固定し、そしてc - k i t発現レベルを評価するためにc - k i tに対するモノクローナル抗体及びヤギ - 抗 - マウス - A l e x aコンジュゲートで染色した。c - k i t発現は、コントロールオリゴマーもしくは送達試薬のみで処理した細胞において強かったが、c - k i tオリゴマーで処理した培養物は、有意に減少したc - k i tレベルを示した。重要なことには、c - k i tオリゴマーを取り込まなかったところどころの個々の細胞 (F I T C - 陰性) は、依然として強いc - k i t発現を示し、そして一貫してごくわずかのc - k i t発現を示すオリゴマーを取り込んだ細胞 (F I T C - 陽性) に隣接して認めることができた。この結果の代表的な例を図8 Aにおいて示し、そしてそれはアンチセンス活性が、認められたc - k i t発現の減少を直接招くことを強く示唆する。

10

20

【0111】

次に、アンチセンス治療は、c - k i t過剰発現が重要な役割を果たすことが示されたK S H Vにより誘導されるトランスフォーメーションを防ぐことにおいて有効であるかどうかを確かめた。これらの実験のために、K S H Vに感染したD M V E Cを35 mm皿において合流まで増殖させ、上記のようにアンチセンスを加え、そしてフォーカス形成を与えるために合流後状態で維持した。試験的実験により、前もって形成したフォーカスを有する細胞はE P E I毒性に異常に感受性であることが示されたので、この方法は、すでにフォーカスを形成した細胞の添加より好ましかった。我々の以前の実験から予想されるように、合流後のK S H V感染D M V E Cは接触阻止の喪失を示し、そして添加後6日までに非常に明白である無秩序な多層フォーカスを形成した (図8 B)。しかしながら、それに反して、1 . 2 5 n M o lの抗 - c - k i tオリゴマー及び2 . 5 μ lのE P E Iを加えた細胞はフォーカスを発生せず、静止性の接触阻止された単層を維持した (図8 C)。2 . 5 μ lのE P E Iのみと培養した細胞は、処理していない細胞と同様のフォーカス形成を示した (図8 D)。擬似感染したK S H V単層は、合流の状態で静止性になり、そしてアンチセンス処理にかかわらずフォーカスを形成せず、また、処理に関連するいかなる毒性も認められなかった。我々の以前の実験は、D M V E Cトランスフォーメーションにおけるc - k i t過剰発現の直接的役割を示している。c - k i tアンチセンスオリゴマーで処理した培養物がトランスフォームした表現型を発生できないことは、c - k i t機能を阻害することにおけるアンチセンスの効果的な役割を強く示唆する。

30

40

【0112】

表 1

直接標的	間接標的	インヒビター	
NF- κ B	Jagged1	PDTC	
NF- κ B	ヘパリン結合EGF様	PDTC	
NF- κ B	シクロオキシゲナーゼ-2	PDTC	
NF- κ B	A20	PDTC	
NF- κ B	MMP-10	PDTC	
NF- κ B	ADAMTS-1	PDTC	
NF- κ B	IL-8	PDTC	
NF- κ B	ICAM-1	PDTC	
NF- κ B	アンジオポエチン-2	PDTC	10
NF- κ B	アルファ-1インテグリン	PDTC	
RAR	PDGF-B	トランス-レチノイン酸	
p38MAPK	Hsp27	SB203580	
CGRP-1		CGRP [8-37]	
グラビン/AKAPs		Ht-31	
I型シグマ受容体		ハロペリドール	
プリンヌクレオシドホスホリラーゼ		8-アミノグアノシン	
RDC1		CGRP [8-37]	
CXCR-4		t22	
エンドセリンB受容体		BQ788	20

表 2

各時点の一つで3つの感染培養物のうち2つにおいて1.8倍より大きく変化する細胞転写産物

遺伝子ID	名称	
	トロンボスポンジン/コラーゲンI受容体CD36	
	機能未知タンパク質DKFZp761J17121	
	インシュリン様増殖因子結合タンパク質-2	
	MHCにおいてコードされるジユビキチン (diubiquitin)	
	推定の膜貫通タンパク質E3-16の相同物 c-Kit	30
	ガレクチン-9 (galectin-9)	
	溶質輸送体ファミリー19 (葉酸輸送体) 1	
	B-myb	
	ダイオキシン誘導性シトクロムP450 (CYP1B1)	
	コクサッキーウイルス及びアデノウイルス受容体	
	サイクリンD2	
	Gタンパク質シグナリング16の調節因子	
	オーファンGタンパク質共役受容体 (RDC1)	
	ESTs	40
	ESTs	
	ベータ-グルクロニダーゼ	
	B7相同物3	
	インシュリン受容体	
	骨芽細胞AB000115において発現されるmRNA	
	マトリックスメタロプロテイナーゼ1	
	ミオシン-I, Myr1c (選択的スプライシングされた) -r	
a	プレプロマルチメリン (prepromulimerin)	
	DNA結合1のインヒビター (Id1)	50

セレノプロテイン (selenoprotein) P、血漿、1
 低分子量誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys-Cys)
 15
 ヒアルロノグルコサミニダーゼ2
 ペルオキシソーム増殖性活性化受容体 γ
 Rac/Cdc42グアニン交換因子 (GEF) 6
 原癌遺伝子c-metに非常に類似
 ジンクフィンガータンパク質143 (クローンpHZ-1)
 LIMドメイン2のみ (ロンボチン (rhombotinn) 様1

)

マンノースリン酸イソメラーゼ

10

遺伝子ID 名称

フォンビルプラント因子

ミオシン重鎖-B

繊維束化及び伸長タンパク質ゼータ1 (ジギン (zygin) I)

ESTs

アンドロゲンにより誘導されるタンパク質

ESTs

ニューリチン (Neuritin)

ESTs

DKFZP586P2219タンパク質

20

システイン及びグリシンリッチプロテイン2

アンドロゲンにより誘導されるタンパク質

ESTs

III型受容体チロシンキナーゼ

アルファー1XV型コラーゲン

グラビン

核因子I/B

インターロイキン1受容体、I型

ユビキチン化因子E4A
 ホスホグルコムターゼ1
 複製因子C (アクチベーター1) 1 (145 kD)
 ESTs
 sk1癌遺伝子
 CEA関連CAM1 (胆汁糖タンパク質)
 アミロイドベータ前駆体タンパク質結合タンパク質2
 フォークヘッドボックスM1
 MADSボックス転写エンハンサー因子2C
 コロニー刺激因子2受容体、ベータ
 ESTs
 hR1fベータサブユニット (p102タンパク質)
 多発性筋炎/強皮症自己抗原1 (75 kD)
 CDC6相同物
 ESTs
 ESTs
 ESTs

10

遺伝子ID 名称

RAD51 (サッカロミセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*))、RecA (エシェリキア・コリ (*E. coli*)) の相同物
 転写因子Dp-1
 セリン (もしくはシステイン) プロテイナーゼインヒビター2、クレ

20

ードB

インターフェロン誘導性56Kdタンパク質
 A20腫瘍壊死因子アルファ誘導性タンパク質
 類似BAZF (Bcl6関連ジンクフィンガータンパク質)
 cAMP応答配列結合CRE-BPa
 ケラチン5
 ギャップ結合タンパク質、アルファ1、43kD (コネキシン43)

ESTs

単球走化性タンパク質1

jun D原癌遺伝子

リソソーム関連マルチスパンタンパク質-5 (Lysosomal-associated multi-spanning protein-5)

サイクリン依存性キナーゼインヒビター2D

ESTs

KIAA1223タンパク質

腫瘍壊死因子(リガンド)10

中心粒外周物質1

プロテインチロシンホスファターゼ、受容体型、E

インシュリン様増殖因子1(ソマトメジンC)

ESTs

ユビキチン輸送タンパク質E2-C

増殖細胞核抗原

フォークヘッドボックスC1

機能未知タンパク質FLJ10604

トランスフォーミング増殖因子、ベータ1

ロイシンアミノペプチダーゼ

機能未知タンパク質DKFZp762E1312

ESTs

イカロス/LyF-1相同物

ガラクトース-4-エピメラーゼ、UDP-

複製因子C(アクチベーター1)3(38kD)

KIAA1268タンパク質

CDC28プロテインキナーゼ1

セリンパルミトイルトランスフェラーゼサブユニット2

サイクリン依存性キナーゼインヒビター3

ゼステのエンハンサーに類似

10

20

遺伝子ID 名称

プレクストリン相同性、Sec7及びサイトヘシン (cytohesin) 1

サイクリンA2 (CCNA2)

ハンチンチン相互作用タンパク質2

キネシン様2

機能未知タンパク質FLJ20345

TGF- β 誘導性初期タンパク質

ESTs

脂肪酸-補酵素Aリガーゼ、長鎖3

トポイソメラーゼ (DNA) IIアルファ (170kD) 10

溶質輸送体ファミリー1 (中性アミノ酸) 5

結合 (junction) プラコグロビン

アルド-ケトレダクターゼファミリー1、メンバーC1

アネキシンA11

機能未知タンパク質FLJ21776

組織因子経路インヒビター2

KIAA0009遺伝子産物

前初期応答3

リポコルチン

JWAタンパク質 20

内皮細胞タンパク質C/APC受容体 (EPCR)

トランスグルタミナーゼ

テストカン (testican)

骨小型プロテオグリカンI (パイグリカン) PGI

S100カルシウム結合タンパク質A11 (カルギザリン (calgizzarin))

インシュリン様増殖因子結合タンパク質6

ESTs

プロテオグリカン1、分泌顆粒
 ラント関連転写因子1 (am11)
 神経前駆細胞発現
 チオレドキシシンレダクターゼ (GRIM-1)
 NAD (P) H:キノンオキシレダクターゼ
 シグナル伝達アダプター分子1
 コラーゲン、1型、アルファ2
 ミクロソームグルタチオンS-トランスフェラーゼ1

遺伝子ID 名称

<p>fer-1 (セノラブディティス・エレガンス (C. elegans)))) 様3 (ミオフィェルリン (myoferlin))</p>	<p>10</p>
<p>膜メタローエンドペプチダーゼCALLA、CD10 ESTs Rasサブプレッサータンパク質1 ESTs 腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデューサー2 アルファ-2-マクログロブリン受容体 ESTs メタキシン1 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ 腫瘍タンパク質、翻訳的に制御される1 微小管関連タンパク質 アクアポリン3 ミトコンドリア生成物のPNUTL 2核遺伝子 ESTs ジスコイジン (discoidin) ドメイン受容体ファミリー、メンバー2 コラーゲン、XIV型、アルファ1 (アンデュリン (undulin))</p>	<p>20</p>

セリン／トレオニンプロテインキナーゼs g k
 トロンボスポンジン1
 ESTs
 HIV-1 rev結合タンパク質2
 ESTs
 脳由来神経栄養因子
 プロリンイソメラーゼFK506結合タンパク質FKBP13
 新規タンパク質CGI-06
 KIAA0172タンパク質
 転写因子AP-2ガンマ
 多形腺腫遺伝子1
 アクチニン、アルファ4

10

遺伝子ID 名称

ヘルマンスキーパドラック症候群
 ESTs
 液胞型ATPアーゼアイソフォームVA68に類似
 シスタチンC
 RPB5媒介(RPB5-mediated)タンパク質
 ピロリン-5-カルボン酸シンテターゼ
 TATAボックス結合タンパク質(TBP)関連因子
 NGFI-A結合タンパク質2(ERG1結合タンパク質2)
 サイクリンH
 KIAA0084タンパク質
 フマリルアセト酢酸ヒドロラーゼ
 ESTs
 ESTs
 PRO0132タンパク質
 KRAB-ジンクフィンガータンパク質SZF1-1
 トランスフォーミング増殖因子、ベータにより誘導される、68kD

20

ESTs
 トランスフォーミング増殖因子ベータ結合タンパク質4
 ESTs
 ESTs
 ESTs
 ESTs
 hsp105

30

色コード :

3つ全てにおいて1.8倍より多く0時間で減少した。
 3つのうち2つにおいて1.8倍より多く0時間で減少した。
 3つのうち2つにおいて1.8倍より多く6時間で増加した。
 3つ全てにおいて1.8倍より多く0時間で増加した。
 3つのうち2つにおいて1.8倍より多く0時間で増加した。
 3つのうち2つにおいて1.8倍より多く6時間で減少した。
 3つのうち2つにおいて1.8倍より多く48時間で増加した。
 3つ全てにおいて1.8倍より多く48時間で減少した。
 3つのうち2つにおいて1.8倍より多く48時間で減少した。
 3つ全てにおいて1.8倍より多く6時間で増加した。
 3つ全てにおいて1.8倍より多く6時間で増加した。
 3つ全てにおいて1.8倍より多く48時間で増加した。

40

~ - 擬似及び感染サンプルの平均強度 < 80

50

表の説明文：示すのは、KSHVに感染した内皮細胞及び感染していない内皮細胞間の比率である。各時点で試験した3つの感染細胞培養物のうち少なくとも2つにおいて1.8倍（アップもしくはダウン）より大きく変化した転写産物のみ。～は、感染した及び感染していない細胞サンプルの両方が80未満の平均強度を有したことを示し、従って、両方のサンプルにおける弱いシグナルを示す。

【0113】

【表1】

遺伝子ID	名称	i7_0	i8_0	i9_0	i7_6	i8_6	i9_6	i7_48	i8_48	i9_48
N39161	トロンボスポンジン/コラーゲンI 受容体CD36	2.14	14.22	25.83	4.26	13.69	22.11	5.3	6.53	22.93
N57594	機能未知タンパク質DKFZp761J17121	-2.38	-3.63	-3.88	2.5	-4.31	-5.38	3.22	-3.00	-3.71
H79047	インシュリン様増殖因子結合タンパク質-2	2.17	-2.05	-3.74	1.94	-2.19	-3.44	1.35	-2.56	-2.44
N49629	MHCにおいてコードされるジユビキチン(diubiquitin)	3.97	-1.90	-2.62	2.91	6.14	6.09	1.06	-1.57	1.05
AA034213	推定の膜貫通タンパク質E3-16の相同物	1.92	3.41	6.06	1.7	2.74	4.97	2.15	3.85	5.19
N20798	c-kit	1.82	2.55	4.75	-1.03	4.21	-2.39	2.67	6.34	5
AA434102	ガレクチン-9(galectine-9)	3.15	3.07	2.18	1.9	3.61	1.48	1.68	6.33	4.51
R49999	溶質輸送体ファミリー19(葉酸輸送体)1	1.89	4.06	6.19	-1.48	3.69	4.22	-1.38	2.36	2.79
AA456878	B-myb	2.12	3.09	5.71	1.38	-2.72	-1.88	2.24	-1.19	-1.22
AA448157	タイロキシン誘導性シクロムP450(CYP1B1)	2.83	-4.94	10.75	3.27	-1.62	-2.31	-1.08	-1.08	-1.15
N31467	コサッキーウイルス及びアデノウイルス受容体	1.81	6.84	8.12	1.69	3.03	5.43	-1.33	1.45	1.02
H84153	サイクリンD2	-1.88	-2.09	2.51	-1.31	-1.57	-1.20	-1.41	-1.30	-1.09
AA453774	Gタンパク質シグナリング16の調節因子	-2.03	1.06	-2.35	-2.34	4.29	5.71	-2.55	-2.47	4.21
N53172	オーファンGタンパク質共役受容体(RDC1)	3.61	-1.70	4.45	3.4	44.62	89.86	7.56	17.93	32.21
H69048	ESTs	1.23	6.31	15.86	2.46	7.21	16.11	2.63	3.06	8.23
T70413	ESTs	1.02	3.07	4.44	2.15	4.21	4.32	1.41	-4.11	-3.63
N34827	ペーターグルクロニダーゼ	2.33	1.76	3.28	1.89	2.08	2.81	1.42	1.52	1.59
N54338	B7相同物3	2.63	-1.40	2.7	2.67	1.66	1.94	2.74	5.69	7.77
AA001614	インシュリン受容体	NA	1.87	3.07	1.53	3.81	2.32	7.16	4.64	4.38
AA410567	骨芽細胞AB000115において発現されるmRNA	7.54	8	1.46	4.21	8.07	2.00	3.18	5.86	1.17
X54925	マトリックスメタロプロテイナーゼ1	5.31	-2.96	1.19	7.6	6.21	1.15	15.63	2.44	-1.03
W95682	ミオン- I、Myr1c(選択的スライシングされた)	1.57	-1.85	2.85	-1.12	2.3	2.57	2.08	1.6	2.01
AA423867	プレプロマルチリン(prepromultimerin)	NA	8.58	4.75	-2.09	11.04	15.48	-6.6	4.63	4.23
AA457158	DNA結合1のインヒター (Id1)	NA	3.68	5.73	-2.82	3.4	7.36	-5.06	-2.00	2.11
AA070226	セレンプロテイン(selenoprotein)P、血漿、1 低分子量誘導性サイトカインサブファミリーA(Cys-Cys)	-1.09	3.3	3.3	1.15	-2.41	5.16	-1.99	3.5	10.84
R96668	15	-1.07	5.15	36.9	-1.4	-4.23	9.15	-3.03	6.64	15.86
AA453909	ヒアルロゲルコサミニダーゼ2	1.82	1.52	1.86	1.17	3.31	2.68	1.74	1.9	1.95
AA088517	ヘルペクシウム増殖性活性化受容体γ	1.36	3.99	5.53	1.61	2.1	3.25	-1.05	1.89	2.21
AA236617	Rac/Cdc42ゲアノン交換因子(GEF)6	1.04	-2.08	-2.92	-1.09	-1.90	-3.67	1.06	-2.10	-2.52
AA436591	原癌遺伝子c-merlに非常に類似	-1.51	-2.47	-2.82	-1.11	-2.38	-2.85	-1.52	-1.90	-2.10
AA443659	ジnkフィンガータンパク質143(クロンpHZ-1)	1.04	1.87	3.53	1.19	2.87	5.6	1.14	2.06	2.75
AA464644	LIMドメイン2のみ(ロンボチン(rhombotinn)様1)	-1.09	3.48	7.62	-1.15	6.03	13.77	1.5	8.71	17.33
AA482198	マンノースリン酸イソメラーゼ	-1.33	-1.95	-2.55	-1.03	-2.25	-2.81	-1.00	-2.89	-2.61

【0114】

【表2】

10

20

30

40

遺伝子ID	名称	i7_0	i8_0	i9_0	i7_6	i8_6	i9_6	i7_48	i8_48	i9_48
AA4877S7	フォンヒルプラント因子	-1.24	4.19	8.71	1.22	4.42	8.09	-1.65	3.35	4.25
AA490477	ミオシン重鎖-B	1.72	3.82	6.04	1.77	3.47	4	1.27	3.02	3.02
H20758	繊維束化及び伸長タンパク質ゼー1(シギン(zygin) I)	1.43	3.69	3.31	1.12	-2.89	-2.89	-1.07	-2.89	-2.83
H65042	ESTs	-1.06	2.33	3.68	1.12	2.59	3.48	-1.12	2.03	2.79
R01796	アンドロゲンにより誘導されるタンパク質	-1.33	-2.59	-3.06	-1.10	-2.69	-3.50	-1.35	-3.40	-3.80
R06370	ESTs	-1.10	2.26	3.16	1.06	3.03	3.85	-1.17	-2.05	-2.32
R66101	ニューリン(Neuritin)	-1.01	4.84	7.42	-1.21	6.77	15.92	1.05	-5.20	6.67
R69677	ESTs	-1.21	4.44	13.33	1.06	-3.00	-5.69	-1.13	-3.47	-4.60
R91083	DKFZP586P2219タンパク質	-1.36	2.75	3.5	-1.07	2.95	4.18	-1.07	-2.26	-2.16
T59334	システイン及びグリシンリッチプロテイン2	1.40	-2.68	-2.26	1.03	-2.60	-3.05	1.08	-2.00	-2.22
T67558	アンドロゲンにより誘導されるタンパク質	1.54	3.4	3.28	1.34	3.52	4.35	1.58	3.9	-3.52
W02617	ESTs	1.76	4.63	11.46	1.5	5.15	6.9	1.37	6.1	8.35
AA026831	III型受容体チロシンキナーゼ	NA	3.53	3.95	-1.05	4.99	7.3	NA	4.38	6.44
AA464342	アルファ-1XV型コラーゲン	2.97	-1.63	-2.13	3.63	-2.55	-1.73	3.48	-1.09	1.05
N91307	グラヘリン	NA	2.07	2.54	2.29	1.61	2.93	2.43	-1.55	-1.29
W87611	核因子 I /B	-2.14	2.02	2.68	-3.54	2.01	2.99	-3.17	1.42	1.13
AA464525	インターロイキン受容体、I型	-1.09	-3.59	7.41	-1.05	-1.87	-4.60	2.03	-1.08	-1.67
AA447528	ユビキチン化因子E4A	1.09	-2.04	-3.29	-1.08	-2.00	-2.25	-1.07	-1.86	-1.62
AA488504	ホスホグルコムターゼ1	-1.29	4.97	3.11	-1.13	3.61	4.64	-1.79	-1.93	-1.80
H73714	複製因子C(アクチンヘター)1(145kD)	-1.32	2.46	2.13	-1.33	2.09	2.49	-1.33	1.71	1.88
H80158	ESTs	-1.35	-2.71	8.59	1.12	-4.57	6.14	1.01	-1.20	-2.07
W69471	ski癌遺伝子	-1.25	2.73	5.35	-1.00	3.04	5.13	-1.21	1.67	2.06
AA411757	CEA関連CAM1(胆汁糖タンパク質)	1.68	2.46	3.24	2.2	1.39	2.63	-1.17	-1.24	-1.33
AA046411	アミロイドヘター前駆体タンパク質結合タンパク質2	1.02	6.5	3.38	-1.21	-3.13	-3.35	1.03	1.55	1.24
AA129552	フォークヘッドボックスM1	-1.13	3.28	3.3	-1.32	2.23	-1.93	1.29	1.24	-1.02
AA234897	MADSボックス転写エンハンサー因子2C	-1.01	2.53	-2.31	-1.17	2.15	2.66	1.49	1.35	1.59
AA279147	コラーゲン刺激因子2受容体、ヘター	1.02	-3.15	-2.00	1.07	-2.47	-2.41	-1.20	-1.48	-1.33
AA452909	ESTs	1.03	1.82	3.22	1	2.32	3.11	-1.47	1.28	1.75
AA455786	hRlfヘターサブユニット(p102タンパク質)	-1.22	2.05	2.03	-1.47	2.41	2.59	-1.31	1.19	1.23
AA458994	多発性筋炎/強皮症自己抗原1(75kD)	-1.47	3.19	-2.13	1.18	-2.00	-2.25	1.19	1.42	-1.25
H59203	CDC6相同物	-1.23	3.5	-2.50	1.15	-3.28	-2.72	-1.21	-1.25	-1.33
R16604	ESTs	-1.27	2.64	3.56	1.03	1.92	1.88	1.65	-1.22	1
R63109	ESTs	-1.09	4.6	7.52	-1.13	2.49	2.86	1.06	-1.31	-1.66
R63982	ESTs	-1.00	2.7	3.22	1.06	-2.19	3.37	-1.12	1.59	1.57

10

20

30

【 0 1 1 5 】

【 表 3 】

遺伝子ID	名称	i7_0	i8_0	i9_0	i7_6	i8_6	i9_6	i7_48	i8_48	i9_48
W00895	RAD51(サッカロミセス・セレビシエ(S.cerevisiae)), RecA (エシェリキア・コリ(E.Coli))の相同物	-1.27	3.41	2.97	1.14	-2.12	-2.31	-1.15	-1.01	1.11
W33012	転写因子Dp-1	1.28	1.81	1.95	1.03	1.88	2.67	1.03	-1.17	1
T49159	セリン(もしくはシステイン)プロテイナーゼインヒビター-2, クレドトB	-1.09	-2.12	2.7	-1.30	-2.04	-2.22	-1.03	-1.94	-2.17
M24594	インターフェロン誘導性56Kdタンパク質	2.5	2.12	-4.6	-1.76	-1.47	-19.09	-1.83	3.94	1.42
M59465	A20腫瘍壊死因子アルファ誘導性タンパク質	1.92	1.84	-1.47	5.49	1.15	-1.12	3.03	1.56	2.47
N78611	類似BAZF(Bcl6関連ジンクフィンガータンパク質)	2.78	1.59	1.89	5.34	-1.04	1.07	3.55	1.7	2.46
R21172	cAMP応答配列結合CRE-BPa	-1.92	1.07	-1.93	-1.33	-1.45	-3.27	-1.85	-1.36	-4.00
AA160507	クラチン5	-1.06	2.13	2.28	1.03	2.05	1.69	-1.13	1.96	1.94
AA487623	ギャップ結合タンパク質, アルファ1, 43kD(コネクシン43)	-1.38	2.17	2.1	1.37	1.29	1.99	1.59	2.09	2.53
R28344	ESTs	1.26	-1.88	-2.21	1.7	-1.58	-1.79	1.48	-2.09	-2.09
AA425102	単球走化性タンパク質1	1.75	6.49	8.49	3.29	1.3	-1.61	-2.05	-1.10	-2.38
AA418670	jun D原癌遺伝子	-1.08	4.96	7.26	1.05	1.29	-1.3	-1.35	-2.75	-2.13
AA410265	リソソーム関連マルチスパンタンパク質-5(Lysosomal- associated multi-spanning protein-5)	1.86	1.55	2.63	1.92	-1.16	1.22	2.48	-1.28	1.13
R77517	サイクリン依存性キナーゼインヒビター-2D	-1.85	-1.17	2.34	1.02	-1.39	-1.81	-1.95	1.73	1.71
N55339	ESTs	-3.43	2.37	2.77	-3.37	1.48	2.73	-3.38	1.35	1.55
R23302	KIAA1223タンパク質	-1.93	2.58	-1.94	-1.43	-1.33	-1.67	-2.06	-1.48	-1.26
H54629	腫瘍壊死因子(リガンド)10	1.07	3.89	3.52	-1.48	1.37	-2.09	-1.57	-2.59	-1.56
AA164439	中心粒外周物質1	1.23	3.6	3.1	1.2	1.51	-1.54	-1.01	-1.83	-1.25
T69540	プロテインチロシンホスファターゼ, 受容体型, E	-1.19	2.21	2.4	-1.39	1.74	2.44	-1.78	-1.93	-1.4
AA456321	インシュリン様増殖因子1(ソマトロニンC)	-1.81	-1.13	-4.13	-1.37	-1.75	-2.83	-1.15	-1.17	-3.08
T82944	ESTs	-1.90	-1.08	-1.92	-1.62	-1.17	-1.83	-1.79	-1.55	-2.36
AA430504	エビキチン輸送タンパク質E2-C	1.42	4.06	3.3	-1.2	1.84	1.34	1.36	-1.11	-1.26
AA450265	増殖細胞核抗原	-1.04	1.84	1.91	-1.49	1.96	1.3	-1.22	-1.54	-1.77
AA495846	フォークヘッドボックスC1	-1.19	3.09	3.1	-1.78	2.38	1.71	-1.68	1.43	1.28
N72697	機能未知タンパク質FLJ10604	1.32	-2.00	4.36	1.17	-1.82	-1.59	1.36	-1.35	-1.11
R36467	トランスフォーミング増殖因子, ヘヘチ1	1.34	1.91	2.21	1.05	1.95	1.51	-1.11	1.77	1.6
R69307	ロシンアミノヘプチターゼ	1.29	4.77	2.02	1.4	2.82	1.11	1.23	1.61	1.13
T66936	機能未知タンパク質DKFZp762E1312	1.59	2.4	2.63	-1.17	-1.89	-1.29	-1.79	1.16	1.21
T67104	ESTs	1.61	1.9	2.58	1.35	2.83	-1.70	1.15	-1.25	1.69
AA280931	イカス/LyF-1相同物	1.47	2.28	2.08	1.45	-1.55	-2.15	1.44	-1.63	-1.63
AA281030	ガラクトース-4-エピメラーゼ, UDP-	1.44	2.4	2.36	-1.03	-1.54	-1.95	-1.05	-1.22	-1.36
H94617	複製因子C(アクチヘター-1)3(38kD)	1.21	-1.84	-1.84	1.05	-1.61	-2.04	-1.20	1.17	-1.14
T64956	K I AA1268タンパク質	1.9	1.82	-1.43	1.25	1.23	-2.29	1.46	1.25	-1.73
AA459292	CDC2877プロテインキナーゼ1	-1.81	2.55	2.04	-1.73	1.21	1.57	-1.29	1.12	1.08
AA160852	セリン/チロシントランスフェラーゼサブユニット2	-1.5	2.32	2.09	-1.31	1.35	1.55	-1.54	1.34	1.64
AA284072	サイクリン依存性キナーゼインヒビター-3	1.57	2.59	2.76	1.11	-1.64	-1.53	-1.36	-1.02	-1.47
AA430744	ゼステのエンハンサーに類似	1.37	1.95	1.87	-1.15	-1.17	-1.08	-1.03	-1.39	-1.26

10

20

30

【 0 1 1 6 】

【 表 4 】

遺伝子ID	名称	i7_0	i8_0	i9_0	i7_6	i8_6	i9_6	i7_48	i8_48	i9_48
AA480859	プレクストリン相同性、Sec7及びサイトヘシン(cytohesin)1	-1.44	2.26	2.36	-1.07	-1.32	-1.38	-1.38	1.02	-1.08
AA608568	サイクリンA2(CCNA2)	-1.73	-3.14	-2.38	-1.29	-1.50	-1.50	-1.58	-1.10	-1.04
H78483	ハンチンチン相互作用タンパク質2	-1.22	3.18	1.95	-1.41	1.74	1.52	-1.14	1.6	1.79
N69491	キネシン様2	-1.39	-2.27	-2.20	1.22	-1.50	-1.20	-1.66	1.02	1.24
R70925	機能未知タンパク質FLJ20345	-1.05	2.44	2	1.09	1.41	1.46	1.07	-1.73	-1.38
R79935	TGF- β 誘導性初期タンパク質	-1.37	-2.10	-1.90	-1.15	-1.79	-1.73	1.11	1.07	1.10
T85698	ESTs	1.36	-2.79	-3.37	-1.62	-1.03	-1.55	-1.31	1.28	1.23
W31074	脂肪酸-補酵素Aリガーゼ、長鎖3	1.02	2.33	1.94	-1.03	1.49	1.79	-1.06	1.04	1.27
AA504348	トポイソメラーゼ(DNA)IIアルファ(170kD)	1.33	3.45	3.5	1.07	NA	NA	1.54	1.32	1.04
T70098	溶質輸送体ファミリー1(中性アミノ酸)5	NA	2.03	2.35	1.43	1.55	1.87	NA	1.01	1.89
R06417	結合(junction)アラゴロピン	-1.96	-1.87	-2.20	-2.66	-1.29	-1.08	NA	1.56	1.79
R93124	アルドケトレダクターゼファミリー1、メンバーC1	-1.97	-2.46	-3.02	-2.85	-2.2	-6.45	-2.21	-1.65	-2.02
AA465051	アネキシンA11	-2.07	-2.62	-2.49	-2.9	-2.47	-2.09	-1.8	-1.74	-1.74
H58644	機能未知タンパク質FLJ21776	-2.67	-5.41	-18.5	1.66	-6.89	-8.16			
L27624	組織因子経路インヒビター2	-1.96	-2.26	-3.82	-1.33	-2.3	-7.2		-1.48	
AA459109	KIAA0009遺伝子産物	1.92	-2.03	-3.41	1.44	-1.55	-1.14	1.38	-1.64	-1.66
AA480815	前初期応答3	-3.9	-1.53	-1.95	-3.07	-2.29	-2.96			
H63077	リボコルチン	-1.81	-1.56	-4.17	-3.25	-2.19	-6.62			
R78725	JWAタンパク質	-2.71	-1.5	-3.01	-2.75	-2.41	-2.78		-1.67	-2.09
T47442	内皮細胞タンパク質C/APC受容体(EPCR)	-2.69	-1.1	-2.21	-3.01	-2.25	-4.41		1.3	-2.23
R97066	トランスグルタミナーゼ	-1.05	-3.89	-4.79	-1.35	-4.05	-4.57		-1.78	-1.76
AA436142	テストカン(testican)	2.03	-1.8	-8	-2.76	-3.68	-2.33	1.56	-2.5	-1.07
R77226	骨小型プロテオグリカンI(ハイグリカン)PG I	-3.82	-3.59	-1.79	-2.17	-1.99	-2.14	-6.33	-1.52	-1.74
AA464731	S100カルシウム結合タンパク質A11(カルギザリン(calgizzarin))	-1.38	-2.16	-4.05	-2.93	-2.1	-5.96	-1.48	-1.24	-1.87
AA478724	インシュリン様増殖因子結合タンパク質6	1.29	-2.15	-5.24	-2.13	-2.05	-4.06	1.28	1.24	2.56
R95811	ESTs	1.56	-2.91	-3.84	-2.85	1.70	2.09	1.67		
AA278759	プロテオグリカン1、分泌顆粒	1.38	-2.26	-10.07	1.35	-2.64	-7.32	1.37		
AA425238	ラト関連転写因子1(aml 1)	-1.06	2.13	5.10	1.21	-3.73	-6.59	1.03		
AA442095	神経前駆細胞発現	-1.14	-2.11	-9.96	1.21	-3.29	-12.65	1.14		
AA453335	チオレドキシシレクターゼ(GRIM-1)	1.38	-2.21	-4.17	1.41	-2.73	-3.88	1.44		
AA455538	NAD(P)H:キノンオキシレクターゼ	1.05	-2.52	-6.86	-1.21	-3.48	-5.57	1.24		
AA485996	シグナル伝達アダプター分子1	-1.18	-1.9	-2.11	-1.00	-2.09	-2.28	-1.03		
AA490172	コラーゲン、I型、アルファ2	1.51	-4.89	-11.09	1.74	-5.11	-13.98	1.45		
AA495936	ミクロソームグルタチオンS-トランスフェラーゼ1	1.21	-7.09	-10.4	1.29	-7.33	-7.54	1.12		

10

20

30

【 0 1 1 7 】

【 表 5 】

遺伝子ID	名称	i7_0	i8_0	i9_0	i7_6	i8_6	i9_6	i7_48	i8_48	i9_48
H26176	fer-1(セラブテイン・エレガンス(C.elegans))様3 (ミオフィリン(myoferlin))	-1.02	-2.18	-4.05	-1.21	-2.39	-3.75	1.21	2.27	-3.35
R98851	膜メタロ-エンドペプチダーゼCALLA, CD10	-1.14	-5.91	-8.82	1.02	-7.23	-13.25	1.51	2.35	-1.73
N91330	ESTs	1.26	-2.15	-2.94	1.37	-2.88	-3.79	1.12	1.97	1.74
AA235332	Rasサプレッサータンパク質1	-1.67	-2.38	-1.91	-2.03	-2.06	-1.54	-1.57	-1.49	-1.28
AA447098	ESTs	-1.1	2.50	3.82	-1.14	-2.01	-4.97	-1.11	1.5	1.56
AA454810	腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデューサー-2	1.7	-5.87	-2.45	1.35	-3.35	-3.64	-1.15	1.22	1.37
AA464566	アルファ-2-マクログロブリン受容体	-1.33	3.00	3.64	-1.00	4.50	3.71	-1.17	1.62	1.73
H53316	ESTs	-1.27	2.12	3.60	-1.14	2.31	2.64	-1.18	1.10	1.30
N69540	マキシン1	1.14	-2.28	-1.86	1.27	2.00	2.00	1.06	1.03	1.16
N77326	3-ヒドロキシシロコ酸ヒドロゲナーゼ	1.14	-2.02	-1.85	1.40	-2.24	-1.84	1.48	1.60	1.60
R09634	腫瘍タンパク質、翻訳的に制御される1	1.06	-2.86	-2.34	-1.03	-2.18	-2.34	-1.11	1.32	1.70
R27680	微小管関連タンパク質	-1.16	2.08	2.68	1.03	-2.24	-2.71	1.4	1.15	1.11
R91904	アクアホリン3	-1.25	2.36	2.54	-1.00	4.23	2.75	-1.17	-1.00	-1.09
T64878	ミトコンドリア生成物のPNUTL2核遺伝子	-1.06	2.13	2.13	1.03	2.14	1.88	-1.13	-1.00	-1.00
T97870	ESTs	-1.20	2.00	2.60	-1.64	2.24	2.95	-1.44	1.30	1.67
AA243828	ジスコイジン(discoidin)ドメイン受容体ファミリー、メンバ-2	-2.36	-2.95	-1.8	-2.04	2.14	1.13	00	1.38	1.35
AA167222	コラーゲン, XIV型、アルファ1(アンデュリン(undulin))	-1.24	3.61	4.06	-1.15	4.13	3.65	00	1.47	1.37
AA486082	セリン/トレオニンプロテインキナーゼ'sgk	-2.01	-1.33	-3.93	1.93	-1.08	-2.78	2.23	2.16	-3.07
AA464630	トロポスポンジン1	-2.04	1.7	-2.13	-1.51	1.23	-1.53	2.05	2.73	-0.04
R67991	ESTs	-1.14	-2.09	-6.13	1.06	-1.76	-4.38	-1.13	2.25	-4.35
W52273	HIV-1 rev結合タンパク質2	-1.11	2.05	4.56	1.09	1.78	2.67	-1.03	2.75	-3.10
R70601	ESTs	-2.08	-1.05	-2.08	1.11	1.08	-1.35	-1.21	2.15	-2.74
AA262988	脳由来神経栄養因子	-1.19	3.00	6.00	1.14	1.08	1.18	-1.10	1.92	-2.09
R75819	プロリンイソメラーゼFK506結合タンパク質FKBP13	-1.87	-2.27	-1.14	-1.5	-1.28	-1.12	-2.04	1.72	1.97
H83225	新規タンパク質CGI-06	-2.02	-1.81	-1.36	-2.02	-1.73	-1.64	-2	-1.05	1.02
AA464605	KIAA0172タンパク質	-2.44	1.67	2.26	-1.19	2.37	1.51	1.88	1.49	1.77
AA399334	転写因子AP-2ガンマ	-1.28	2.00	2.36	-1.03	1.33	-1.00	-1.22	1.82	1.43
AA418251	多形線腫遺伝子1	1.86	1.71	3.00	1.50	1.74	1.74	1.43	1.43	1.83
H50993	アクチニン、アルファ4	-1.91	-1.77	-2.32	-1.82	-1.26	-1.23	-1.35	-1.1	-1.19

10

20

30

【 0 1 1 8 】

【 表 6 】

遺伝子ID	名称	i7_0	i8_0	i9_0	i7_6	i8_6	i9_6	i7_48	i8_48	i9_48
AA418773	ヘルムスキー-パドリック症候群	1.18	-3.4	-1.87	-1.1	-2.22	-1.65	1.02	1.37	1.24
AA432023	ESTs	1.65	1.92	2.82	1.65	1.91	1.79	1.41	1.61	1.71
AA284568	液胞型ATPアーゼアイソフォームVA68に類似	1.12	-3.45	-3.87	1.18	-1.54	-2.12	1.2	1.1	-1.08
AA599177	シスタチンC	1.02	-3.71	-2.29	-1.75	-1.39	-2.11	-1.05	-1.37	-1.49
R63137	RPB5媒介(RPB5-mediated)タンパク質	-1.19	-2.27	-2.43	1.10	1.66	1.87	-1.18	1.44	1.72
AA143509	ピロリン-5-カルボン酸シンターゼ	-1.98	-1.41	-1.98	-1.65	-1.43	-1.14	-1.62	-1.44	-1.65
AA292583	TATAボックス結合タンパク質(TBP)関連因子	1.36	-2.59	-1.94	1.02	-1.71	-1.38	-1.12	1.26	1.3
AA434487	NGF I-A結合タンパク質2(ERG1結合タンパク質2	1.03	2.59	2.44	-1.61	1.29	1.78	-1.13	-1.14	-1.55
AA454146	サイクリンH	-1.01	-2.54	-2.2	1.01	-1.49	-1.62	1.31	-1.42	-1.5
AA457047	KIAA0084タンパク質	1.03	2.06	2.96	1.06	1.45	-1.03	-1.09	1.43	1.48
H44956	アマリア酢酸ヒドロラーゼ	-1.02	-2.15	-2.15	-1.12	1.60	1.72	-1.18	1.30	1.33
H56438	ESTs	-1.08	2.00	2.00	-1.35	1.75	1.62	-1.34	1.42	1.21
H58834	ESTs	-1.31	2.00	2.00	1.10	1.37	1.09	-1.18	1.45	1.27
H77554	PRO0132タンパク質	1.10	1.85	2.00	1.20	1.25	1.07	1.14	1.67	1.54
R06036	KRAB-ジンクフィンガータンパク質SZF1-1	-1.53	2.00	1.89	-1.18	1.29	1.12	-1.05	-1.00	-1.22
R31321	トランスフォーミング増殖因子、ヘータにより誘導される、68kD	-1.29	2.87	3.31	-1.11	1.67	1.33	-1.30	1.67	1.79
R87194	ESTs	1.09	2.35	3.39	1.35	1.22	1.65	1.4	1.33	1.33
R87406	トランスフォーミング増殖因子ヘータ結合タンパク質4	1.28	1.94	1.94	1.05	1.59	1.29	1.69	1.54	1.43
T62529	ESTs	-1.16	-2.23	-1.82	-1.62	-1.13	-1.19	-1.36	1.23	1.16
T95238	ESTs	-1.23	-2.11	-1.85	-1.35	1.23	1.58	-1.02	1.22	1.24
T95262	ESTs	-1.12	1.90	1.81	1.07	1.18	1.13	-1.15	1.24	1.18
H64850	ESTs	-NA.	00	2.15	2.67	1.37	1.50	1.17	1.09	1.48
AA485036	hsp105	1.65	-2.26	-1.95	NA	1.08	1.47	-1.17	1.49	1.32

10

20

30

【 0 1 1 9 】

【 表 7 】

色コード:

- 3つ全てにおいて1.8倍より多く0時間で減少した。
- 3つのうち2つにおいて1.8倍より多く0時間で減少した。
- 3つのうち2つにおいて1.8倍より多く6時間で増加した。
- 3つ全てにおいて1.8倍より多く0時間で増加した。
- 3つのうち2つにおいて1.8倍より多く0時間で増加した。
- 3つのうち2つにおいて1.8倍より多く6時間で減少した。
- 3つのうち2つにおいて1.8倍より多く48時間で増加した。
- 3つ全てにおいて1.8倍より多く48時間で減少した。
- 3つのうち2つにおいて1.8倍より多く48時間で減少した。
- 3つ全てにおいて1.8倍より多く6時間で増加した。
- 3つ全てにおいて1.8倍より多く6時間で増加した。
- 3つ全てにおいて1.8倍より多く48時間で増加した。

10

-- 類似及び感染サンプルの平均強度<80

表の説明文: 示すのは、KSHVに感染した内皮細胞及び感染していない内皮細胞間の比率である。各時点で試験した3つの感染細胞培養物のうち少なくとも2つにおいて1.8倍(アップもしくはダウン)より大きく変化した転写産物のみ。～は、感染した及び感染してない細胞サンプルの両方が80未満の平均強度を有したことを示し、従って、両方のサンプルにおける弱いシグナルを示す。

20

【 0 1 2 0 】

【 表 8 】

参考文献:

1. Aoki, Y., E. S. Jaffe, Y. Chang, K. Jones, J. Teruya-Feldstein, P. S. Moore, and G. Tosato, "Angiogenesis and Hematopoiesis Induced by Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus-Encoded Interleukin-6" *Blood* (1999) **93**:4034-43.
2. Aoki, Y., and G. Tosato, "Role of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor in the Pathogenesis of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Infected Primary Effusion Lymphomas" *Blood* (1999) **94**:4247-54.
3. Arvanitakis, L., E. Geras-Raaka, A. Varma, M. C. Gershengorn, and E. Cesarman, "Human Herpesvirus KSHV Encodes a Constitutively Active G-Protein-coupled Receptor Linked to Cell Proliferation" *Nature* (1997) **385**:347-50.
4. Asou, H., J. W. Said, R. Yang, R. Munker, D. J. Park, N. Kamada, and H. P. Koeffler, "Mechanisms of Growth Control of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpes Virus-Associated Primary Effusion Lymphoma Cells" *Blood* (1998) **91**:2475-81.

30

40

【 0 1 2 1 】

【 表 9 】

5. Bais, C., B. Santomaso, O. Coso, L. Arvanitakis, E. G. Raaka, J. S. Gutkind, A. S. Asch, E. Cesarman, M. C. Gershengorn, E. A. Mesri, and M. C. Gerhengorn, "G-Protein-Coupled Receptor of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus is a Viral Oncogene and Angiogenesis" [published erratum in *Nature* 392(6672): 210] *Nature* (1998) **391**:86-9.
6. Bayes-Genis, A., C. A. Conover, and R. S. Schwartz, "The Insulin-like Growth Factor Axis: A Review of Atherosclerosis and Restenosis" *Circ. Res.* (2000) **86**:125-130.
7. Bird, G., G. Burgess, and J. J. Putney, "Sulfhydryl Reagents and cAMP-dependent Kinase Increase the Sensitivity of the Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor in Hepatocytes" *J Biol Chem.* (1993) **268**:17917-17923. 10
8. Bodo, M., T. Baroni, F. Carinci, E. Becchetti, C. Bellucci, C. Conte, F. Pezzetti, R. Evangelisti, M. Tognon, and P. Carinci, "A Regulatory Role of Fibroblast Growth Factor in the Expression of Decorin, Biglycan, Betaglycan, and Syndecan in Osteoblasts from Patients with Crouzon's Syndrome" *Eur. J. Cell Biol.* (1999) **78**:323-330.
9. Boshoff, C., S.J. Gao, L. E. Healy, S. Matthews, A. J. Thomas, L. Coignet, R. A. Warnke, J. A. Strauchen, E. Matutes, O. W. Karmel, P. S. Moore, R. A. Weiss, and Y. Chang, "Establishing a KSHV+ Cell Line (BCP-1) from Peripheral Blood and Characterizing its Growth in nod/SCID mice" *Blood* (1998) **91**:1671-1679. 20
10. Cannon, J., F. Hamzeh, S. Moore, J. Nicholas, and R. Ambinder, "Human Herpesvirus 8-Encoded Thymidine Kinase and Phosphotransferase Homologues Confer Sensitivity to Ganciclovir" *J Virol.* (1999) **73**:4786-4793.
11. Cesarman, E., Y. Chang, P. S. Moore, J. W. Said, and D. M. Knowles, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-Related Body Cavity-Based Lymphomas" *N Engl. J Med.* (1995) **332**:1186-91. 30
12. Cesarman, E., R. G. Nador, F. Bai, R. A. Bohenzky, J. J. Russo, P. S. Moore, Y. Chang, and D. M. Knowles, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Contains G Protein-Coupled Receptor and Cyclin D Homologs which are Expressed in Kaposi's Sarcoma and Malignant Lymphoma" *J Virol.* (1996) **70**:8218-23.
13. Chang, J., R. Renne, D. Dittmer, and D. Ganem, "Inflammatory Cytokines and the Reactivation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Lytic Replication" *Virology.* (2000) **266**:17-25. 40

【 0 1 2 2 】

【 表 1 0 】

14. Chang, Y., E. Cesarman, M. S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. M. Knowles, and P. S. Moore, "Identification of Herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma" *Science*. (1994) **266**:1865-9.
15. Chang, Y. E., and L. A. Laimins, "Microarray Analysis Identifies Interferon-Inducible Genes and Stat-1 as Major Transcriptional Targets of Human Papillomavirus Type 31" *J. Virol.* (2000) **74**:4174-4182.
16. Cheng, E. H., J. Nicholas, D. S. Bellows, G. S. Hayward, H. G. Guo, M. S. Reitz, and J. M. Hardwick, "A Bcl-2 Homolog Encoded by Kaposi Sarcoma-Associated Virus, Human Herpesvirus 8, Inhibits Apoptosis but Does Not Heterodimerize with Bax or Bak" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (1997) **94**:690-4. 10
17. Chin, Y. E., M. Kitagawa, W.C. S. Su, Z.-H. You, Y. Iwamoto, and X.-Y. Fu, "Cell Growth Arrest and Induction of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21WAF1/CIP1 mediated by STAT1" *Science* (Washington, D.C.) (1996) **272**:719-22.
18. Choi, K., M. Kennedy, A. Kazarov, J. C. Papadimitriou, and G. Keller, "A Common Precursor for Hematopoietic and Endothelial Cells" *Development* (1998) **125**:725-32. 20
19. Djerbi, M., V. Screpanti, A. I. Catrina, B. Bogen, P. Biberfeld, and A. Grandien, "The Inhibitor of Death Receptor Signaling, FLICE-Inhibitory Protein Defines a New Class of Tumor Progression Factors" *J. Exp. Med.* (1999) **190**:1025-32.
20. Dupin, N., C. Fisher, P. Kellam, S. Ariad, M. Tulliez, N. Franck, E. Van Marck, D. Salmon, I. Gorin, J.-P. Escande, R. A. Weiss, K. Alitalo, and C. Boshoff, "Distribution of Human Herpesvirus-8 Latently Infected Cells in Kaposi's Sarcoma, Multicentric Castleman's Disease, and Primary Effusion Lymphoma" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1999) **96**:4546-4551.
21. Edwards, A. S., and J. D. Scott, "A-Kinase Anchoring Proteins: Protein Kinase A and Beyond" *Curr. Opin. Cell Biol.* (2000) **12**:217-221. 30
22. Ellis, M., Y. P. Chew, L. Fallis, S. Freddersdorf, C. Boshoff, R. A. Weiss, X. Lu, and S. Mittnacht, "Degradation of p27Kip cdk Inhibitor Triggered by Kaposi's Sarcoma Virus Cyclin-cdk6 Complex" *EMBO J.* (1999) **18**:644-653.
23. Flore, O., S. Rafii, S. Ely, J. J. O'Leary, E. M. Hyjek, and E. Cesarman, "Transformation of Primary Human Endothelial Cells by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus" *Nature*. (1998) **394**:588-92. 40

【 0 1 2 3 】

【 表 1 1 】

24. Gao, S. J., C. Boshoff, S. Jayachandra, R. A. Weiss, Y. Chang, and P. S. Moore, "KSHV ORF K9 (vIRF) is an Oncogene which Inhibits the Interferon Signaling Pathway" *Oncogene*. (1997) **15**:1979-85.
25. Gordon, T., B. Grove, J. C. Loftus, T. O'Toole, R. McMillan, J. Lindstrom, and M. H. Ginsberg, "Molecular Cloning and Preliminary Characterization of a Novel Cytoplasmic Antigen Recognized by Myasthenia Gravis Sera" *J. Clin. Invest.* (1992) **90**:992-9.
26. Gray, P., J. Scott, and W. Catterall, "Regulation of Ion Channels by cAMP-dependent Protein Kinase and A-Kinase Anchoring Proteins" *Curr. Op. Neurobiol.* (1998) **8**:330-334. 10
27. Grimberg, A., and P. Cohen, "Role of Insulin-like Growth Factors and Their Binding Proteins in Growth Control and Carcinogenesis" *J. Cell. Physiol.* (2000) **183**:1-9.
28. Hayashi, T., A. Kagaya, M. Takebayashi, M. Shimizu, Y. Uchitomi, N. Motohashi, and S. Yamawaki, "Modulation by Sigma Ligands of Intracellular Free Ca⁺⁺ Mobilization by N-methyl-D-Aspartate in Primary Culture of Rat Frontal Cortical Neurons" *J Pharmacol. Exp Ther.* (1995) **275**:207-214. 20
29. Hayashi, T., T. Maurice, and T. Su, "Ca(2+) Signaling Via Sigma(1)-Receptors: Novel Regulatory Mechanism Affecting Intracellular Ca(2+) Concentration" *J Pharmacol. Exp Ther.* (2000) **293**:788-798.
30. Holash, J., P. C. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, C. R. Alexander, D. Zagzag, G. D. Yancopoulos, and S. J. Wiegand, "Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF" *Science* (1999) **284**:1994-1998.
31. Jbilo, O., H. Vidal, R. Paul, N. De Nys, M. Bensaid, S. Silve, P. Carayon, D. Davi, S. Galiegue, B. Bourrie, J.C. Guillemot, P. Ferrara, G. Loison, J.P. Maffrand, G. Le Fur, and P. Casellas, "Purification and Characterization of the Human SR 31747A-Binding Protein. A Nuclear Membrane Protein Related to Yeast Sterol Isomerase" *J. Biol. Chem.* (1997) **272**:27107-27115. 30
32. Klette, K., Y. Lin, L. Clapp, M. DeCoster, J. Moreton, and F. Tortella, "Neuroprotective Sigma Ligands Attenuate NMDA and Trans-ACPD-Induced Calcium Signaling in Rat Primary Neurons" *Brain Res.* (1997) **756**:231-240.
33. Leonard, B. E, "The Potential Contribution of Sigma Receptors to Antidepressant Actions" *Antidepressants*: (1997) 159-172. 40

【 0 1 2 4 】

【 表 1 2 】

34. Li, M., H. Lee, J. Guo, F. Neipel, B. Fleckenstein, K. Ozato, and J. U. Jung, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral Interferon Regulatory Factor" *J. Virol.* (1998) **72**:5433-5440.
35. Li, M., H. Lee, D. W. Yoon, J. C. Albrecht, B. Fleckenstein, F. Neipel, and J. U. Jung, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Encodes a Functional Cyclin" *J. Virol.* (1997) **71**:1984-91.
36. Lowell, B. B., "PPAR.gamma.: An Essential Regulator of Adipogenesis and Modulator of Fat Cell Function" *Cell* (1999) **99**:239-242. 10
37. Mann, D. J., E. S. Child, C. Swanton, H. Laman, and N. Jones, "Modulation of p27Kip1 Levels by the Cyclin Encoded by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus" *EMBO J.* (1999) **18**:654-663.
38. Marumo, T., V. B. Schini-Kerth, B. Fisslthaler, and R. Busse, "Platelet-Derived Growth Factor-Stimulated Superoxide Anion Production Modulates Activation of Transcription Factor NF- κ B and Expression of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Human Aortic Smooth Muscle Cells" *Circulation* (1997) **96**:2361-2367.
39. Masood, R., J. Cai, T. Zheng, D. L. Smith, Y. Naidu, and P. S. Gill, "Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor is an Autocrine Growth Factor for AIDS-Kaposi Sarcoma" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (1997) **94**:979-84. 20
40. Meade-Tollin, L. C., D. Way, and M. H. Witte, "Expression of Multiple Matrix Metalloproteinases and Urokinase Type Plasminogen Activator in Cultured Kaposi Sarcoma Cells" *Acta Histochem.* (1999) **101**:305-316.
41. Miles, S. A., A. R. Rezai, J. F. Salazar-Gonzalez, M. Vander Meyden, R. H. Stevens, D. M. Logan, R. T. Mitsuyasu, T. Taga, T. Hirano, T. Kishimoto, and et al, "AIDS Kaposi Sarcoma-Derived Cells Produce and Respond to Interleukin 6" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (1990) **87**:4068-72. 30
42. Morin-Surun, M. P., T. Collin, M. Denavit-Saubie, E. E. Baulieu, and F. P. Monnet, "Intracellular σ .1 Receptor Modulates Phospholipase C and Protein Kinase C Activities in the Brainstem" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1999) **96**:8196-8199.
43. Moses, A. V., K. N. Fish, R. Ruhl, P. P. Smith, J. G. Strussenberg, L. Zhu, B. Chandran, and J. A. Nelson, "Long-Term Infection and Transformation of Dermal Microvascular Endothelial Cells by Human Herpesvirus 8" *J. Virol.* (1999) **73**:6892-6902. 40

【 0 1 2 5 】

【 表 1 3 】

44. Moses, H. L., and R. Serra, "Regulation of Differentiation by TGF- β " *Curr. Opin. Genet. Dev.* (1996) **6**:581-586.
45. Nair, B. C., A. L. DeVico, S. Nakamura, T. D. Copeland, Y. Chen, A. Patel, T. O'Neil, S. Oroszlan, R. C. Gallo, and M. G. Sarngadharan, "Identification of a Major Growth Factor for AIDS-Kaposi's Sarcoma Cells as Oncostatin" *M. Science* (1992) **255**:1430-2.
46. Nakamura, S., K. Murakami-Mori, N. Rao, H. A. Weich, and B. Rajeev, "Vascular Endothelial Growth Factor is a Potent Angiogenic Factor in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma-Derived Spindle Cells" *J Immunol.* (1997) **158**:4992-5001. 10
47. Nauert, J. B., T. M. Klauck, L. K. Langeberg, and J. D. Scott, "Gravin, An Autoantigen Recognized by Serum from Myasthenia Gravis Patients, is a Kinase Scaffold Protein" *Curr. Biol.* (1997) **7**:52-62.
48. Neipel, F., J. C. Albrecht, A. Ensser, Y. Q. Huang, J. J. Li, A. E. Friedman-Kien, and B. Fleckenstein, "Human Herpesvirus 8 Encodes a Homolog of Interleukin-6" *J Virol.* (1997) **71**:839-42. 20
49. Nemerow, G. R., and N. R. Cooper, "Infection of B Lymphocytes by a Human Herpesvirus, Epstein-Barr Virus, is Blocked by Calmodulin Antagonists" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1984) **81**:4955-9.
50. Nicholas, J., V. Ruvolo, J. Zong, D. Ciuffo, H. G. Guo, M. S. Reitz, and G. S. Hayward, "A Single 13-Kilobase Divergent Locus in the Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Genome Contains Nine Open Reading Frames that are Homologous to or Related to Cellular Proteins" *J Virol.* (1997) **71**:1963-74.
51. Ohtomo, T., Y. Sugamata, Y. Ozaki, K. Ono, Y. Yoshimura, S. Kawai, Y. Koishihara, S. Ozaki, M. Kosaka, T. Hirano, and M. Tsuchiya, "Molecular Cloning and Characterization of a Surface Antigen Preferentially Overexpressed on Multiple Myeloma Cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999) **258**:583-591. 30
52. Okabe, S., T. Fukuda, K. Ishibashi, S. Kojima, S. Okada, M. Hatano, M. Ebara, H. Saisho, and T. Tokuhisa, "BAZF, A Novel Bcl6 Homolog, Functions as a Transcriptional Repressor" *Mol. Cell. Biol.* (1998) **18**:4235-4244.

【 0 1 2 6 】

【 表 1 4 】

40

53. Ping, D., G. Boekhoudt, and J. M. Boss, "Trans-Retinoic Acid Blocks Platelet-Derived Growth Factor- β -Induced Expression of the Murine Monocyte Chemoattractant-1 Gene by Blocking the Assembly of a Promoter Proximal CpG Binding Site" *J. Biol. Chem.* (1999) **274**:31909-31916.
54. Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak, "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells" *Science*. (1999) **284**:143-147.
55. Roth, W. K., S. Werner, C. G. Schirren, and P. H. Hofschneider, "Depletion of PDGF from Serum Inhibits Growth of AIDS-Related and Sporadic Kaposi's Sarcoma Cells in Culture" *Oncogene*. (1989) **4**:483-7. 10
56. Russo, J. J., R. A. Bohenzky, M. C. Chien, J. Chen, M. Yan, D. Maddalena, J. P. Parry, D. Peruzzi, I. S. Edelman, Y. Chang, and P. S. Moore, "Nucleotide Sequence of the Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (HHV8)" *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1996) **93**:14862-7.
57. Salunga, R. C., H. Guo, L. Luo, A. Bittner, K. C. Joy, J. R. Chambers, J. S. Wan, J. R. Jackson, and M. G. Erlander, "Gene Expression Analysis Via cDNA Microarrays of Laser Capture Microdissected Cells from Fixed Tissue" (1999) In M. Schena (ed.), *DNA Microarrays. A Practical Approach*. Oxford Press, Oxford, pp. 121-136. 20
58. Sarid, R., O. Flore, R. A. Bohenzky, Y. Chang, and P. S. Moore, "Transcription Mapping of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Genome in a Body Cavity-Based Lymphoma Cell Line (BC-1)" *J. Virol.* (1998) **72**:1005-1012.
59. Sarid, R., T. Sato, R. A. Bohenzky, J. J. Russo, and Y. Chang, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Encodes a Functional bcl-2 homologue" *Nat Med*. (1997) **3**:293-8. 30
60. Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown, "Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray" *Science*. (1995) **270**:467-70.
61. Schreck, R., B. Meier, D. Mannel, W. Droge, and P. Baeuerle, "Dithiocarbamates as Potent Inhibitors of Nuclear Factor Kappa B Activation in Intact Cells" *J Exp Med*. (1992) **175**:1181-1194.

【 0 1 2 7 】

【 表 1 5 】

40

62. Sciacca, F. L., M. Stuerzl, F. Bussolino, M. Sironi, H. Brandstetter, C. Zietz, D. Zhou, C. Matteucci, G. Peri, and et al, "Expression of Adhesion Molecules, Platelet-Activating Factor, and Chemokines by Kaposi's Sarcoma Cells" *J. Immunol.* (1994) **153**:4816-25.
63. Shaywitz, A., and M. Greenberg, "CREB: A Stimulus-Induced Transcription Factor Activated by a Diverse Array of Extracellular Signals" *Ann Rev Biochem.* (1999) **68**:821-861.
64. Shih, M., F. Lin, J. D. Scott, H.-Y. Wang, and C. C. Malbon, "Dynamic Complexes of Beta2 Adrenergic Receptors with Protein Kinases and Phosphatases and the Role of Gravin" *J. Biol. Chem.* (1999) **274**:1588-1595. 10
65. Soulier, J., L. Grollet, E. Oksenhendler, P. Cacoub, D. Cazals-Hatem, P. Babinet, M. F. d'Agay, J. P. Clauvel, M. Raphael, L. Degos, and et al, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-like DNA Sequences in Multicentric Castleman's Disease" *Blood* (1995) **86**:1276-80.
66. Su, T., S. Schell, F. Ford-Rice, and E. London, "Correlation of Inhibitory Potencies of Putative Antagonists for Sigma Receptors in Brain and Spleen" *Eur. J. Pharmacol.* (1988) **148**:467-470. 20
67. Swanton, C., D. J. Mann, B. Fleckenstein, F. Neipel, G. Peters, and N. Jones, "Herpes Viral Cyclin/cdk6 Complexes Evade Inhibition by cdk Inhibitor Proteins" *Nature* (1997) **390**:184-187.
68. Taraboletti, G., R. Benelli, P. Borsotti, M. Rusnati, M. Presta, R. Giavazzi, L. Ruco, and A. Albini, "Thrombospondin-1 Inhibits Kaposi's Sarcoma (KS) Cell and HIV-1 Tat-Induced Angiogenesis and is Poorly Expressed in KS Lesions" *J. Pathol.* (1999) **188**:76-81.
69. Wellstein, A., R. Lupu, G. Zugmaier, S. L. Flamm, A. L. Cheville, P. Delli Bovi, C. Basilico, M. E. Lippman, and F. G. Kern, "Autocrine Growth Stimulation by Secreted Kaposi Fibroblast Growth Factor but not by Endogenous Basic Fibroblast Growth Factor" *Cell Growth Differ* (1990) **1**:63-71. 30
70. Westphal, R., S. Tavalin, J. Lin, N. Alto, I. Fraser, L. Langeberg, M. Sheng, and J. Scott, "Regulation of NMDA Receptors by an Associated Phosphatase-Kinase Signaling Complex" *Science* (1999) **285**:93-96.
71. Zhang, Q. Y., C. Hammerberg, J. J. Baldassare, P. A. Henderson, D. Burns, M. Ceska, J. J. Voorhees, and G. J. Fisher, "Retinoic Acid and Phorbol Ester Synergistically Up-Regulate IL-8 Expression and Specifically Modulate Protein Kinase C-epsilon in Human Skin Fibroblasts" *J. Immunol.* (1992) **149**:1402-8. 40

【 0 1 2 8 】

【 表 1 6 】

72. Zhong, W., H. Wang, B. Herndier, and D. Ganem, "Restricted Expression of Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Genes in Kaposi Sarcoma" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1996) **93**:6641-6646.
73. Zhu, H., J. P. Cong, G. Mamtora, T. Gingeras, and T. Shenk, "Cellular Gene Expression Altered by Human Cytomegalovirus: Global Monitoring with Oligonucleotide Arrays" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (1998) **95**:14470-5.
74. Zimring, J. C., S. Goodbourn, and M. K. Offermann, "Human Herpesvirus 8 Encodes an Interferon Regulatory Factor (IRF) Homolog that Represses IRF-1-Mediated Transcription" *J. Virol.* (1998) **72**:701-707. 10
75. Raab, G. and M. Klagsbrun "Heparin-binding EGF-like Growth Factor" *Biochim. Biophys. Acta.* (1997) **1333**:F179-F200.
76. Kekuda, R., P.D. Prasad, Y.J. Fei, F.H. Leibach, and V. Ganapathy "Cloning and Functional Expression of the Human Type 1 Sigma Receptor (hSigmaR1)" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996) **229**: 553-558.
77. Heinrich, M.C., D.J. Griffith, B.J. Druker, C.L. Wait, K.A. Ott And A.J. Zigler "Inhibition of C-Kit Receptor Tyrosine Kinase Activity by STI 571, a Selective Tyrosine Kinase Inhibitor [In Process Citation]" (2000) *Blood* **96**:925-32. 20
78. Boshoff, C., T.F. Schulz, M.M. Kennedy, A.K. Graham, C. Fisher, A. Thomas, J.O. McGee, R.A. Weiss, and J.J. O'Leary, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infects Endothelial and Spindle Cells" (1995) *Nat Med* **1**:1274-8.
79. Li, J. J., Y.Q. Huang, C.J. Cockerell, and A. E. Friedman-Kien, "Localization of Human Herpes-Like Virus Type 8 in Vascular Endothelial Cells and Perivascular Spindle-Shaped Cells of Kaposi's Sarcoma Lesions by In Situ Hybridization" (1996) *Am J Pathol.* **148**:1741-8.
80. Staskus, K. A., W. Zhong, K. Gebhard, B. Herndier, H. Wang, R. Renne, J. Beneke, J. Pudney, D. J. Anderson, D. Ganem, A.T. and Haase, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Gene Expression in Endothelial (Spindle) Tumor Cells" (1997) *J Virol.* **71**:715-9. 30
81. Sturzl, M., C. Blasig, A. Schreier, F. Neipel, C. Hohenadl, E. Cornali, G. Ascherl, S. Esser, N.H. Brockmeyer, M. Ekman, E.E. Kaaya, E. Tschachler, and P. Biberfeld, "Expression of HHV-8 Latency-Associated T0.7 RNA in Spindle Cells and Endothelial Cells of AIDS-Associated, Classical and African Kaposi's Sarcoma" (1997) *Int J Cancer* **72**:68-71.

【 0 1 2 9 】

【 表 1 7 】

40

82. Rainbow, L., G.M. Platt, G. R. Simpson, R. Sarid, S.J. Gao, H. Stoiber, C.S. Herrington, P.S. Moore, and T.F. Schulz, "The 222- to 234-Kilodalton Latent Nuclear Protein (LNA) of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) is Encoded by Orf 73 and is a Component of the Latency-Associated Nuclear Antigen" (1997) *J Virol* **71**:50915-21.
83. Yarden, Y., W.J. Kuang, T. Yang-Feng, L. Coussens, S. Munemitsu, T.J. Dull, E. Chen, J. Schlessinger, U. Francke, and A. Ullrich, "Human Proto-Oncogene c-kit: A New Cell Surface Receptor Tyrosine Kinase for an Unidentified Ligand" (1987) *Embo J* **6**:3341-51. 10
84. Martin, F. H., S.V. Suggs, K.E. Langley, H.S. Lu, J. Ting, K.H. Okino, C.F. Morris, I.K. McNiece, F.W. Jacobsen, E.A. Mendiaz, and et al., "Primary Structure and Functional Expression of Rat and Human Stem Cell Factor DNAs" (1990) *Cell* **63**:203-11.
85. Hirota, S., K. Isozaki, Y. Moriyama, K. Hashimoto, T. Nishida, S. Ishiguro, K. Kawano, M. Hanada, A. Kurata, M. Takeda, G. Muhammad Tunio, Y. Matsuzawa, Y. Kanakura, Y. Shinomura, and Y. Kitamura, "Gain-of-Function Mutations of c-kit in Human Gastrointestinal Stromal Tumors" (1998) *Science* **279**:577-80. 20
86. Nishida, T., S. Hirota, M. Taniguchi, K. Hashimoto, K. Isozaki, H. Nakamura, Y. Kanakura, T. Tanaka, A. Takabayashi, H. Matsuda, H., and Y. Kitamura, "Familial Gastrointestinal Stromal Tumours with Germline Mutation of the KIT Gene" [letter] (1998) *Nat Genet* **19**:323-4.
87. Tian, Q., H.F. Frierson, Jr., G.W. Krystal, and C.A. Moskaluk, "Activating c-kit Gene Mutations in Human Germ Cell Tumors" (1999) *Am J Pathol* **154**:1643-7.
88. Lux, M. L., B.P. Rubin, T.L. Biase, C.J. Chen, T. Maclure, G. Demetri, S. Xiao, S. Singer, C.D. Fletcher, and J.A. Fletcher, "KIT Extracellular and Kinase Domain Mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors" (2000) *Am J Pathol* **156**:791-5. 30
89. Turner, A. M., K.M. Zsebo, F. Martin, F.W. Jacobsen, L.G. Bennett, and V.C. Broudy, "Nonhematopoietic Tumor Cell Lines Express Stem Cell Factor and Display c-kit Receptors" (1992) *Blood* **80**:374-81.
90. Matsuda, R., T. Takahashi, S. Nakamura, Y. Sekido, K. Nishida, M. Seto, T. Seito, T. Sugiura, Y. Ariyoshi, and et al., "Expression of the c-kit Protein in Human Solid Tumors and in Corresponding Fetal and Adult Normal Tissues" (1993) *Am J Pathol* **142**:339-46. 40

【 0 1 3 0 】

【 表 1 8 】

91. Inoue, M., S. Kyo, M. Fujita, T. Enomoto, and G. Kondoh, "Coexpression of the c-kit Receptor and the Stem Cell Factor in Gynecological Tumors" (1994) *Cancer Res* **54**:3049-53.
92. Hines, S. J., C. Organ, M.J. Kornstein, and G.W. Krystal, "Coexpression of the c-kit and Stem Cell Factor Genes in Breast Carcinomas" (1995) *Cell Growth Differ* **6**:769-79.
93. Krystal, G. W., S.J. Hines, and C.P. Organ, "Autocrine Growth of Small Cell Lung Cancer Mediated by Coexpression of c-kit and Stem Cell Factor" (1996) *Cancer Res* **56**:370-6. 10
94. Miettinen, M., M. Sarlomo-Rikala, and J. Lasota, "KIT Expression in Angiosarcomas and Fetal Endothelial Cells: Lack of Mutations of Exon 11 and Exon 17 of c-kit" (2000) *Mod Pathol* **13**:536-41.
95. Druker, B. J., and N.B. Lydon, "Lessons Learned from the Development of an abl Tyrosine Kinase Inhibitor for Chronic Myelogenous Leukemia" (2000) *J Clin Invest* **105**:3-7.
96. Wang, W. L., M.E. Healy, M. Sattler, S. Verma, J. Lin, G. Maulik, C.D. Stiles, J.D. Griffin, B.E. Johnson, and R. Salgia, "Growth Inhibition and Modulation of Kinase Pathways of Small Cell Lung Cancer Cell Lines by the Novel Tyrosine Kinase Inhibitor STI 571" (2000) *Oncogene* **19**:3521-8. 20
97. Buchdunger, E., J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Muller, B.J. Druker, and N.B. Lydon, "Inhibition of the Abl Protein-Tyrosine Kinase In Vitro and In Vivo by a 2-Phenylaminopyrimidine Derivative" (1996) *Cancer Res* **56**:100-4.
98. Druker, B. J., S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G.M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, and N.B. Lydon, "Effects of a Selective Inhibitor of the abl Tyrosine Kinase on the Growth of bcr-abl Positive Cells" (1996) *Nat Med* **2**:561-6. 30
99. Streblov, D. N., Soderberg-Naucler, C., Vieira, J., Smith, P., Wakabayashi, E., Ruchti, F., Mattison, K., Altschuler, Y., and Nelson, J. A. (1999). "The Human Cytomegalovirus Chemokine Receptor US28 Mediates Vascular Smooth Muscle Cell Migration" (1999) *Cell* **99**:511-20.
100. Aye, M. T., S. Hashemi, B. Leclair, A. Zeibdawi, E. Trudel, M. Halpenny, V. Fuller, and G. Cheng, "Expression of Stem Cell Factor and C-Kit mRNA in Cultured Endothelial Cells, Monocytes and Cloned Human Bone Marrow Stromal Cells (CFU-RF)" (1992) *Exp Hematol* **20**:523-7. 40

【 0 1 3 1 】

【 表 1 9 】

101. Broudy, V. C., N.L. Kovach, L.G. Bennett, N. Lin, F.W. Jacobsen, and P.G. Kidd, "Human Umbilical Vein Endothelial Cells Display High-Affinity c-kit Receptors and Produce a Soluble Form of the c-kit Receptor" (1994) *Blood* **83**:2145-52.
102. Buzby, J. S., E.M. Knoppel, and M.S. Cairo, "Coordinate Regulation of Steel Factor, its Receptor (Kit), and Cytoadhesion Molecule (ICAM-1 and ELAM-1) mRNA Expression in Human Vascular Endothelial Cells of Differing Origins" (1994) *Exp Hematol* **22**:122-9.
103. Yamaguchi, H., E. Ishii, S. Saito, K. Tashiro, I. Fujita, S. Yoshidomi, M. Ohtubo, K. Akazawa, and S. Miyazaki, "Umbilical Vein Endothelial Cells are an Important Source of C-Kit and Stem Cell Factor Which Regulate the Proliferation of Haemopoietic Progenitor Cells" (1996) *Br J Haematol.* **94**:606-11. 10
104. Flanagan, J. G., D.C. Chan, and P. Leder, "Transmembrane Form of the Kit Ligand Growth Factor is Determined by Alternative Splicing and is Missing in the Sld Mutant" (1991) *Cell* **64**:1025-35.
105. Heinrich, M. C., D.C. Dooley, A.C. Freed, L. Band, M.E. Hoatlin, W.W. Keeble, S.T. Peters, K.V. Silvey, F.S. Ey, D. Kabat, and et al., "Constitutive Expression of Steel Factor Gene by Human Stromal Cells" (1993) *Blood* **82**:771-83. 20
106. Buchdunger, E., J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Muller, U. Regenass, and N.B. Lydon, "Selective Inhibition of the Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction Pathway by a Protein-Tyrosine Kinase Inhibitor of the 2-Phenylaminopyrimidine Class" (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**:2558-62.
107. Lev, S., Y. Yarden, and D. Givol, "Receptor Functions and Ligand-Dependent Transforming Potential of a Chimeric Kit Proto-Oncogene" (1990) *Mol Cell Biol* **10**:6064-8.
108. Alexander, W. S., S.D. Lyman, and E.F. Wagner, "Expression Of Functional C-Kit Receptors Rescues The Genetic Defect of W Mutant Mast Cells" (1991) *Embo. J.* **10**:3683-91. 30
109. Caruana, G., A.C. Cambareri, T.J. Gonda, and L.K. Ashman, "Transformation of NIH3T3 Fibroblasts by the c-kit Receptor Tyrosine Kinase: Effect of Receptor Density and Ligand-Requirement" (1998) *Oncogene* **16**:179-90.
110. Chan, S. R., C. Bloomer, and B. Chandran, "Identification and Characterization of Human Herpesvirus-8 Lytic Cycle-Associated ORF 59 Protein and the Encoding cDNA by Monoclonal Antibody" (1998) *Virology* **240**:118-26. 40

【 0 1 3 2 】

【 表 2 0 】

111. Chandran, B., C. Bloomer, S.R. Chan, L. Zhu, E. Goldstein, and R. Horvat, "Human Herpesvirus-8 ORF K8.1 Gene Encodes Immunogenic Glycoproteins Generated by Spliced Transcripts" (1998) *Virology* **249**:140-9.
112. Roehm, N. W., G.H. Rodgers, S.M. Hatfield, and A.L. Glasebrook, "An Improved Colorimetric Assay for Cell Proliferation and Viability Utilizing the Tetrazolium Salt XTT" (1991) *J Immunol Methods* **142**:257-65.
113. Renne, R., D. Blackbourn, D. Whitby, J. Levy, and D. Ganem, "Limited Transmission of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus in Cultured Cells" (1998) *J Virol.* **72**:5182-8.

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】

パネル A、B 及び C : KSHV 感染後の DMVEC 上の c - K i t mRNA 及びタンパク質発現の誘導

A) 擬似感染 (Mock) 及び KSHV 感染 (KSHV) した DMVEC から調製した逆転写した全 RNA を用いる c - K i t mRNA の RT - PCR。RT - PCR 反応は、c - K i t の 242 bp フラグメントを増幅するように設計したプライマーを用いて行った。HPRT の RT - PCR を各サンプルのコントロールとして行った。増幅産物は、アガロースゲルの臭化エチジウム染色により視覚化した。

20

B) KSHV に感染した (KSHV) DMVEC の表面上の c - K i t タンパク質のアップレギュレーションを示す免疫蛍光顕微鏡検査。擬似感染した細胞 (Mock) の表面上では低レベルの構成的 c - K i t 発現が検出された。

C) ヒト遺伝子発現のマイクロアレイ分析の再現性。感染していない細胞から単離した RNA の 2 つの独立したマイクロアレイハイブリダイゼーション間の相関関係を示す散布図分析。各実験の蛍光強度を示す。

【図 2】

パネル A 及び B : SCF の DMVEC 生産は KSHV 感染により影響を受けない。

A) 擬似感染 (Mock) 及び KSHV 感染 (KSHV) した DMVEC から調製した逆転写した全 RNA を用いる SCF mRNA の RT - PCR。RT - PCR 反応は、SCF の 274 bp フラグメントを増幅するように設計したプライマーを用いて行った。HPRT の RT - PCR を各サンプルのコントロールとして行った。増幅産物は、アガロースゲルの臭化エチジウム染色により視覚化した。

30

B) 擬似感染した DMVEC (開いた棒) 及び KSHV に感染した DMVEC の 2 つの異なる系統 (線影をつけた及び中身の詰まった棒) により 24 及び 48 時間馴化した上清中の可溶性 SCF (pg/ml)。SCF レベルは、ELISA により定量した。三重反復サンプルからの結果 (±SD) を示す。

40

【図 3】

パネル A 及び B : DMVEC の SCF 依存性増殖は KSHV 感染により高められる。

A) 外因性 SCF に対する擬似感染 (開いた四角) 及び KSHV に感染 (詰まった四角) した DMVEC の増殖応答。増殖は、XTT に基づくアッセイを用いて測定した (方法を参照)。三重反復ウェルからの結果 (±SD) を外因性 SCF の非存在下で測定した基礎増殖を超える増加パーセンテージとして表す。3 回の独立した実験の 1 つからの代表的結果を示す。

B) c - K i t チロシンキナーゼ活性のインヒビター (STI571) は、SCF 依存性 DMVEC 増殖を阻止する。KSHV に感染した DMVEC を、増加する用量の STI571 の存在下で且つ外因性 SCF (50 ng/ml) の存在下 (詰まった丸) もしくは非

50

存在下（開いた丸）で培養した。KSHVに感染したDMVECの増殖は、上記のようにXTTに基づくアッセイで測定したが、SCF（50 ng/ml）と同時に加えた。三重反復ウェルからの結果（±SD）をSCF及びSTI571の非存在下で測定した基礎増殖（100%として表す）のパーセンテージとして表す。3回の独立した実験の1つからの代表的結果を示す。

【図4】

パネルA及びB：正常なDMVECにおけるc-Kitの異所性発現は形態変化を誘導する。

A) c-Kitを発現するアデノウイルスベクター（Ad/c-KitWT）を10もしくは100のMOIで感染させた後の正常なDMVECにおける紡錘形態及び無秩序な増殖の用量依存的発生を例示する光学顕微鏡検査。100のMOIでAd/GFP（Ad/GFP）を感染させたDMVECは、正常な丸石形態を維持した。

10

B) Ad/c-KitWTを感染させた後に紡錘形態を生じたDMVEC上に特にc-Kitタンパク質の強い発現を示す免疫蛍光顕微鏡検査。

【図5】

パネルA及びB：c-Kitチロシンキナーゼ活性の阻害は、KSHVに感染したDMVECのトランスフォームした表現型を取り消す。

A) 無秩序な増殖及びフォーカス形成を示すKSHVに感染したDMVECを未処理のままにしておく（コントロール）か、もしくはSTI571（0.1及び1 μM）で5日間処理した。STI571により引き起こされるフォーカス喪失及び単層再構築が認められ、ニコン光学顕微鏡で記録した。

20

B) 無秩序な増殖及びフォーカス形成を示すKSHVに感染したDMVECを未処理のままにしておく（0）か、もしくはドミナントネガティブc-Kitタンパク質を発現するアデノウイルスベクター（Ad/c-KitDN）を10もしくは100のMOIで5日間感染させ、そしてフォーカス形成の阻止を上記のように記録した。薬理的及びドミナントネガティブタンパク質阻害プロトコルの両方について、3回の独立した実験の1つからの結果を示す。撮影した視野は、処理した細胞の全単層に相応した。

【図6】

KSHV後期遺伝子発現の阻害

KSHVに感染したDMVECをホルボールエステルで誘導し、そしてRNA単離及びRT-PCRの前に48時間示す化合物で処理した。化合物の濃度は5 μMであった。K12（潜伏遺伝子）もしくはORF65（増殖遺伝子）、細胞性遺伝子HPRTもしくはベータ-アクチンに特異的なプライマーをRT-PCRに使用した。

30

【図7】

パネルA、B、C及びD：AKAP/PKA相互作用及びI型シグマ受容体は後期遺伝子発現に必要とされる。

A) 感染していない及びKSHVに感染した内皮細胞におけるグラビン発現のRT-PCR分析。細胞を示す時間にわたってPMAで処理した；

B) 示す濃度のAKAP/PKA阻害ペプチドHt-31もしくはコントロールペプチドHt-31Pでの処置後のORF65遺伝子発現のRT-PCR分析；

40

C) 感染していない細胞及びKSHVに感染した細胞におけるI型シグマ受容体発現のRT-PCR分析。細胞を示す時間にわたってPMAで処理した。細胞性GAPDH遺伝子をcDNA合成のコントロールとして増幅した；

D) 様々な阻害化合物での処理後の潜伏（K12）もしくは後期（ORF65）遺伝子発現のRT-PCR分析。最終薬剤濃度は以下のとおりであった：5 μM ハロペリドール、10 μM 8-アミノグアノシン及び25 μM ガンシクロビル。細胞性HPRT遺伝子をcDNA合成のコントロールとして増幅した。

【図8】

パネルA、B、C及びD：c-kitアンチセンスオリゴマーは、KSHVに感染したDMVECにおいてc-kitタンパク質発現を阻害しそしてトランスフォームした表現型

50

の発生を防ぐ。

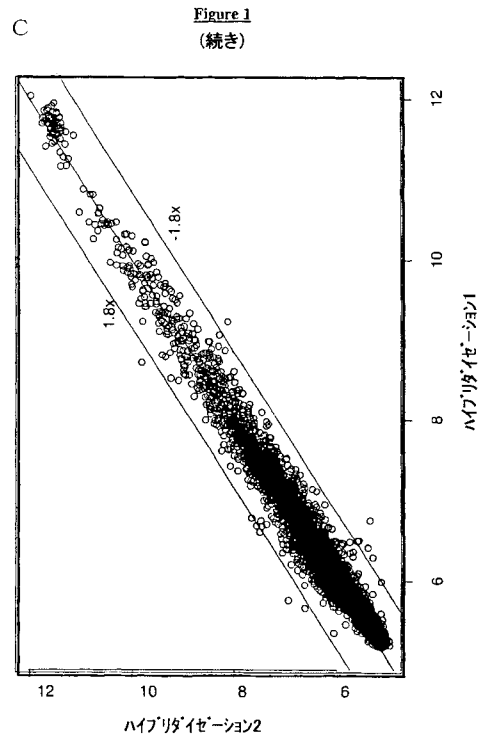
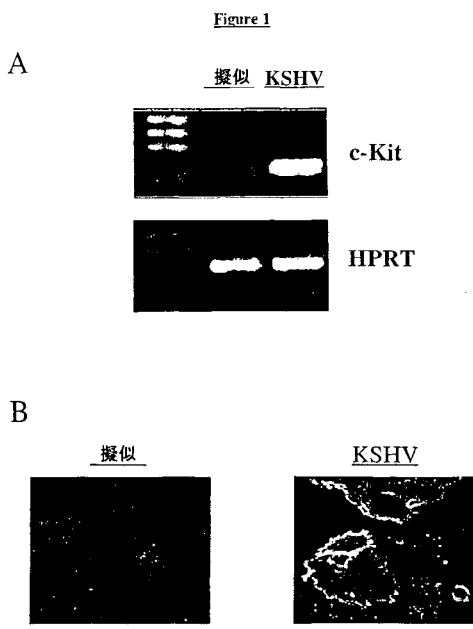
A) アンチセンス - 陰性 (FITC 陰性) 細胞の、ヤギ抗 - マウス Alexa 594 二次抗体の結合により視覚化した (赤色)、強い c - Kit 発現に対して、FITC 標識した c - kit アンチセンスオリゴマーを取り込んでいる細胞 (緑色) における c - kit 発現の阻害を示す KSHV 感染 DMVEC 単層上で行った免疫蛍光顕微鏡検査 ;

B) 合流後に培養した KSHV 感染 DMVEC におけるフォーカス形成 ;

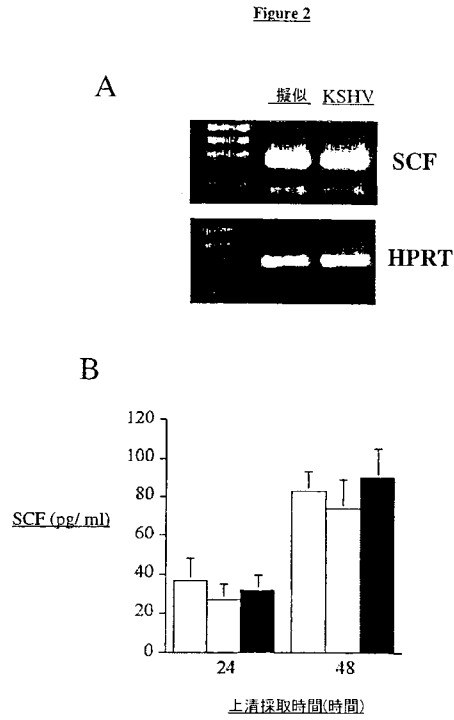
C) 合流状態で c - kit アンチセンスオリゴマーで処理した KSHV 感染 DMVEC におけるフォーカス形成の阻止 ;

D) 合流状態で EPEI 送達試薬にさらしたコントロール KSHV 感染 DMVEC におけるフォーカス形成。

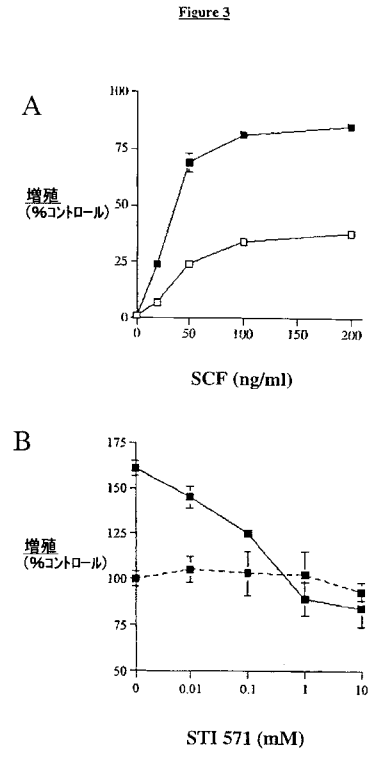
【 図 1 】



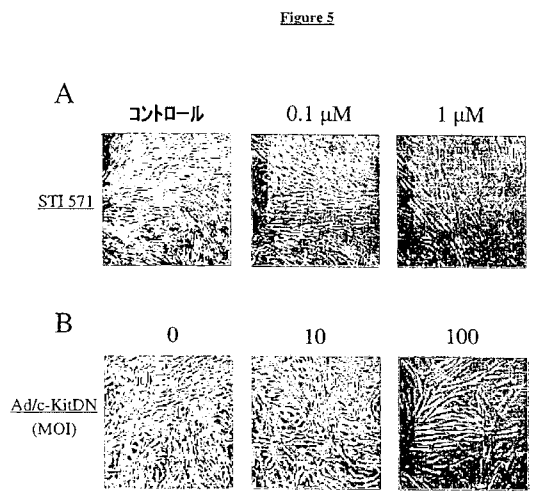
【 図 2 】



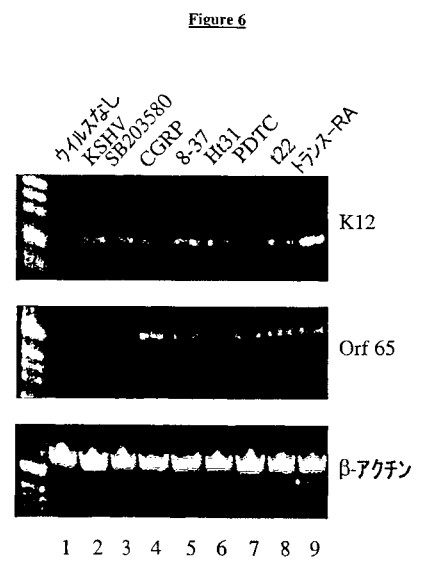
【 図 3 】



【 図 5 】

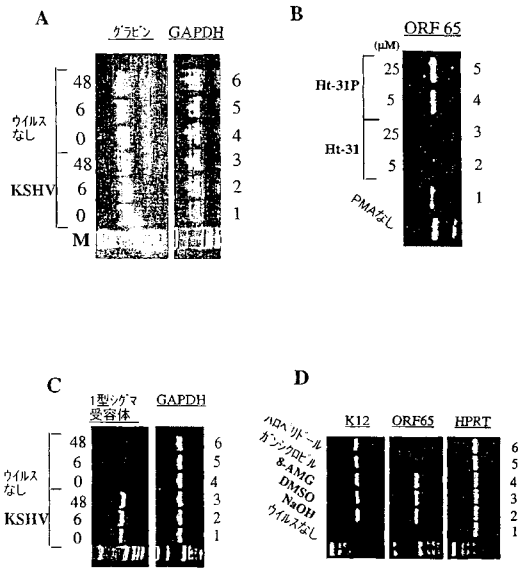


【 図 6 】



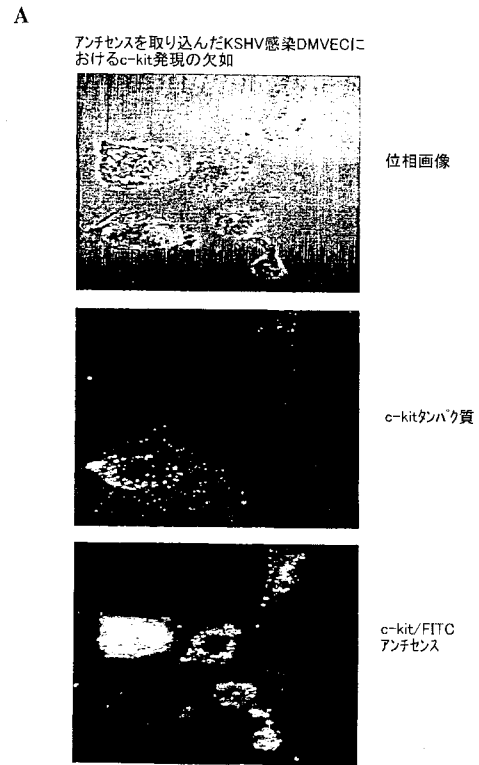
【 図 7 】

Figure 7



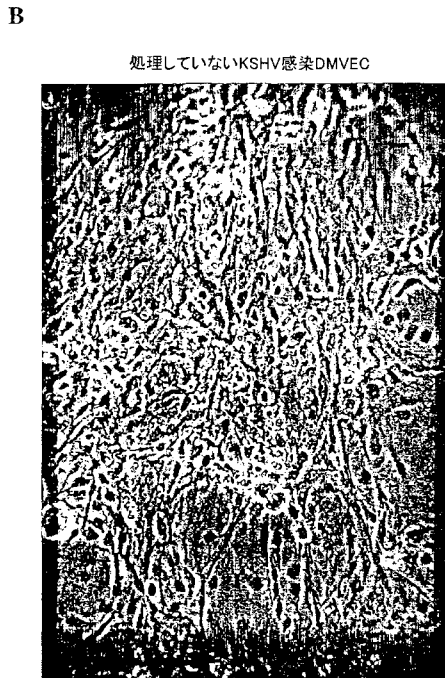
【 図 8 A 】

Figure 8



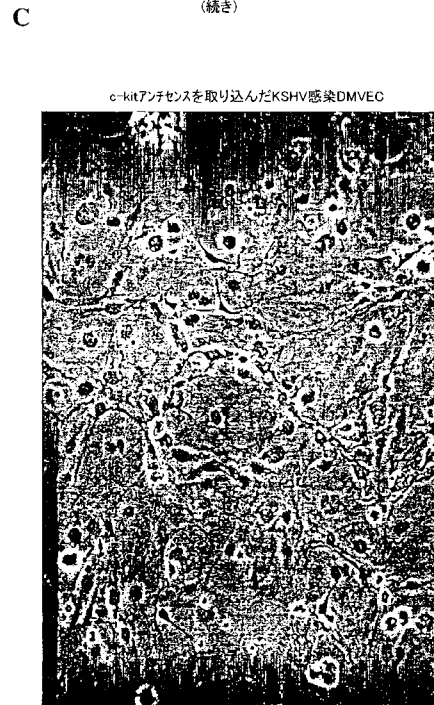
【 図 8 B 】

Figure 8 (続き)



【 図 8 C 】

Figure 8 (続き)

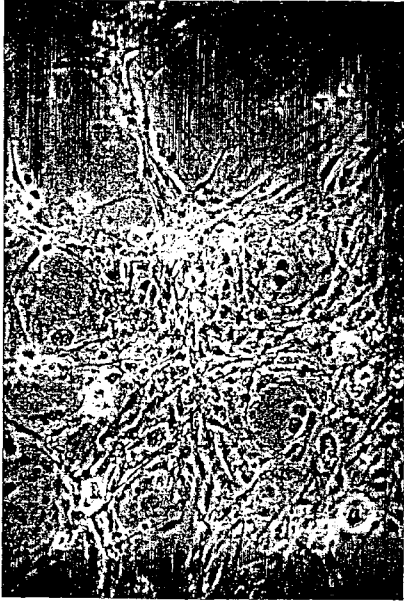


【 図 8 D 】

Figure 8
(続き)

D

コントロールKSHV感染DMVEC
(EPEIのみ)



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/10339 A2

- (51) International Patent Classification: C12N
- (21) International Application Number: PCT/US01/24469
- (22) International Filing Date: 1 August 2001 (01.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/222,162 2 August 2000 (02.08.2000) US
- (71) Applicants: ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC. [US/US], US Route 202, Raritan, NJ 08869 (US); OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY [US/US], OHSU West Campus, 505 NW 185th Avenue, Beaverton, OR 97006 (US).
- (72) Inventors: LUUKKONEN, Mattias, 8270 Calle Nueva, San Diego, CA 92126 (US); MOSES, Ashlee, 3007 SW 11th Avenue, Apt. #1, Portland, OR 97201 (US); FRUEH, Klaus, 1980 NW 113th Avenue, Portland, OR 97229 (US); NELSON, Jay, 21067 SW Meadow Way, Tualatin, OR 97062 (US); BELL, Yolanda, 6109 Paseo Tapajos, Carlsbad, CA 92009 (US); HEINRICH, Michael, 4649 Winthrop Court, Lake Oswego, OR 97035 (US); SIMMEN, Kenneth, 10725 Calle Mar de Pariposa, San Diego, CA 92130 (US).
- (74) Agent: WALLEN, John, W., III; Johnson & Johnson, One Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, NJ 08933-7003 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/10339 A2

(54) Title: GENE EXPRESSION PROFILE FOR KSHV INFECTION AND METHODS FOR TREATING SAME

(57) Abstract: The present invention utilizes nucleic acid microarray technology to identify changes in the host endothelial cell transcription pattern that occurs during the latent and lytic phase of the KSHV life cycle. The production or activity of some genes up regulated during the lytic cycle were subsequently inhibited, and two such targets were shown to have a role in expression of late viral genes. Using this combined approach we have identified cellular pathways previously unknown to be important for KSHV infection, and present evidence for the efficiency of the novel antiviral approaches thus discovered. In addition, the present invention identifies a wide variety of endothelial cells genes and pathways that are involved in a variety of endothelial cell-mediated activity, including angiogenesis and transformation.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

TITLE OF THE INVENTION

GENE EXPRESSION PROFILE FOR KSHV INFECTION AND METHODS FOR
TREATING SAME

5 CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

This application claims the benefit of United States Provisional Application Serial No. 60/222,162, filed 2 August 2000.

BACKGROUND OF THE INVENTION

- 10 Kaposi's Sarcoma (KS) is a vascular neoplasm characterized by angioproliferative lesions on the skin and visceral organs. The lesions are distinguished by the presence of proliferating spindle-shaped tumor cells of endothelial origin and exhibit abnormal vascularization with extensive extravasation of inflammatory cells and erythrocytes. While KS is a rare condition in immunocompetent individuals, it is the most common
- 15 malignancy associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Human herpesvirus 8 (HHV8) or Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is the infectious agent associated with KS development⁽¹⁴⁾. The virus infects the majority of spindle cells in the lesion, as well as lesional endothelial cells and infiltrating leukocytes^(78, 79, 80, 81). The majority of spindle cells harbor the KSHV genome in latent
- 20 form with a small percentage of cells entering lytic cycle and producing infectious virus^(72, 82, 80, 81). The exact role of latent and lytic virus gene expression in the complex biology of KSHV has yet to be fully elucidated. In addition, little is known about the influence of virus gene expression on cellular gene profiles or how these virus-cell interactions contribute to tumorigenesis. The establishment of valid in vitro culture systems should
- 25 allow resolution of many questions associated with KSHV and KS. We recently developed such a culture system using immortalized dermal microvascular endothelial cells that are extremely permissive for KSHV infection and maintain the genome indefinitely in a primarily latent state. Infection of DMVEC with KSHV leads to phenotypic changes including spindle cell formation, loss of contact inhibition and growth

WO 02/10339

PCT/US01/24469

in soft agar, suggesting virus-cell interactions that mimic those driving KS lesion formation in vivo.

5 The changes induced by KSHV infection are reflected in an altered transcriptional program of the host cell. DNA microarray analysis enables the contemporaneous monitoring of transcriptional changes for several thousands of host genes⁽⁶⁰⁾. Automated quantitation of RNA samples hybridized to glass slides imprinted with known DNA fragments allows for comparison of transcriptional differences under various experimental conditions.

10

SUMMARY OF THE INVENTION

Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus infection of human endothelial cells leads to spindle cell formation and malignant transformation. DNA microarray analysis demonstrated that virus infection caused profound changes of multiple cellular pathways including those governing angiogenesis, inflammation and differentiation. Upon induction of the lytic cycle, KSHV further modulated the host cell response. To evaluate whether genes overexpressed during the lytic cycle constitute potential antiviral targets, we systematically inhibited their induction or function. Haloperidol, an antagonist of the type I Sigma receptor, and Ht-31, a peptide inhibitor of the interaction between kinase anchoring proteins (AKAP) and protein kinase A (PKA), inhibited expression of lytic, but not latent viral gene expression. One of the genes significantly up regulated following KSHV infection was the gene for the c-Kit (CD117) protein, a receptor tyrosine kinase that functions as the receptor for stem cell factor (steel factor, SCF)^(83, 84). KSHV-infected DMVEC exhibit an enhanced proliferative responsive to exogenous SCF and inhibition of c-Kit signalling leads to a reduction in ligand-dependent proliferation and reverses the KSHV-induced transformed phenotype. Furthermore, inhibition of c-kit signal transduction prevents KSHV-induced spindle cell formation whereas adenovirus vector-mediated expression of c-kit induces spindle cell formation in uninfected endothelial cells. Thus, KSHV contributes to KS development through modulation of c-Kit expression and function. The present invention provides methods and compositions for treating and

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

diagnosing KSHV infection, as well as Kaposi's Sarcoma. The present invention also provides the gene expression profile for KSHV infected cells at various stages of viral replication. In addition, the present invention provides methods and compositions for the treatment and diagnosis of endothelial cell transformation. The present invention also provides methods and compositions for modulating angiogenesis, including to stimulate or inhibit neo-vascularization, as well as modulating the extracellular matrix surrounding endothelial cells. The present invention provides methods and compositions for the modulation of interferon mediated gene expression. Additionally, the present invention provides methods and compositions for the modulation of endothelial cell inflammation. Also included in the present invention are methods and compositions for the dedifferentiation of endothelial cells. The present invention is also directed to methods of using said gene expression profiles and microarrays, and business methods directed to said use of gene expression profiles and microarrays.

15 **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING**

Figure 1, Panels A, B and C: Induction of c-Kit mRNA and protein expression on DMVEC following KSHV infection.

- 20 A) RT-PCR for c-Kit mRNA using reverse transcribed total RNA prepared from mock- (Mock) and KSHV-infected (KSHV) DMVEC. RT-PCR reactions were performed using primers designed to amplify a 242 bp fragment of c-Kit. RT-PCR for HPRT was performed as a control for each sample. Amplification products were visualized by ethidium bromide staining of agarose gels,
- 25 B) Immunofluorescence microscopy showing up-regulation of c-Kit protein on the surface of KSHV-infected (KSHV) DMVEC. Low levels of constitutive c-Kit expression were detected on the surface of mock-infected cells (Mock),

WO 02/10339

PCT/US01/24469

- C) reproducibility of microarray analysis of human gene expression. Scatter plot analysis showing correlation between 2 independent microarray hybridizations of RNA isolated from uninfected cells. The fluorescence intensities are shown for each experiment.

5

Figure 2, Panels A and B: DMVEC production of SCF is not affected by KSHV infection.

- A) RT-PCR for SCF mRNA using reverse transcribed total RNA prepared from mock- (Mock) and KSHV-infected (KSHV) DMVEC. RT-PCR reactions were performed using primers designed to amplify a 274-bp fragment of SCF. RT-PCR for HPRT was performed as a control for each sample. Amplification products were visualized by ethidium bromide staining of agarose gels.
- B) Soluble SCF (pg/ml) in supernatant conditioned by mock-infected DMVEC (open bars) and two different lines of KSHV-infected DMVEC (hatched and solid bars) for 24 and 48 hours. SCF levels were quantitated by ELISA. Results from triplicate samples (\pm SD) are shown.

10

15

Figure 3, Panels A and B: SCF-dependent proliferation of DMVEC is enhanced by KSHV infection.

- A) Proliferative response of mock- (open squares) and KSHV-infected (filled squares) DMVEC to exogenous SCF. Proliferation was measured using an XTT-based assay (see Methods). Results from triplicate wells (\pm SD) are expressed as the percentage increase over basal proliferation measured in the absence of exogenous SCF. Representative results from 1 of 3 independent experiments are shown.
- B) An inhibitor of c-Kit tyrosine kinase activity (STI 571) abrogates SCF-dependent DMVEC proliferation. KSHV-infected DMVEC

25

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

were cultured in the presence of increasing doses of STI 571 and in the presence (filled circles) or absence (open circles) of exogenous SCF (50 ng/ml). Proliferation of KSHV-infected DMVEC was measured with an XTT-based assay as described above but were added at the same time as SCF (50 ng/ml). Results for triplicate wells (\pm SD) are expressed as a percentage of basal proliferation measured in the absence of SCF and STI 571 (expressed as 100%). Representative results from 1 of 3 independent experiments are shown.

5

10

Figure 4, Panels A and B: Ectopic expression of c-Kit in normal DMVEC induces morphological changes.

- A) Light microscopy illustrating the dose-dependent development of spindle morphology and disorganized growth in normal DMVEC following infection with an adenovirus vector expressing c-Kit (Ad/c-KitWT) at an MOI of 10 or 100. DMVEC infected with Ad/GFP at an MOI of 100 (Ad/GFP) maintained a normal cobblestone morphology.
- B) Immunofluorescence microscopy showing strong expression of c-Kit protein specifically on DMVEC that developed spindle morphology following infection with Ad/c-KitWT.

15

20

Figure 5, Panels A and B: Inhibition of c-Kit tyrosine kinase activity reverses the transformed phenotype of KSHV-infected DMVEC.

- A) KSHV-infected DMVEC exhibiting disorganized growth and focus formation were left untreated (Control) or treated with STI 571 (0.1 and 1 μ M) for 5 days. The STI 571-induced foci loss and monolayer re-organization was observed and recorded with a Nikon light microscope.

25

WO 02/10339

PCT/US01/24469

5 B) KSHV-infected DMVEC exhibiting disorganized growth and focus formation were left untreated (0), or infected with an adenovirus vector expressing a dominant negative c-Kit protein (Ad/c-KitDN) at an MOI of 10 or 100 for 5 days and the abrogation of focus formation recorded as described above. For both the pharmacological and dominant negative protein inhibition protocols, results from one of three independent experiments are shown. Fields photographed were representative of the entire monolayer of treated cells.

10

Figure 6: Inhibition of KSHV late gene expression.

15 KSHV-infected DMVEC were induced with phorbol esters and treated with the indicated compounds for 48 hours prior to RNA isolation and RT-PCR. Concentration for compounds were 5 μ M. Primers specific for K12 (latent gene) or ORF 65 (lytic gene), the cellular gene HPRT or beta-actin were used for RT PCR.

Figure 7, Panels A, B, C and D: The AKAP/PKA interaction, and the type I Sigma receptor are required for late gene expression.

- 20 A) RT-PCR analysis of Gravin expression in uninfected and KSHV infected endothelial cells. Cells were treated with PMA for the times indicated;
- 25 B) RT-PCR analysis of ORF65 gene expression after treatment with the AKAP/PKA inhibitory peptide Ht-31 or control peptide Ht-31P at indicated concentrations;
- C) RT-PCR analysis of the type I Sigma receptor expression in uninfected cells and cells infected with KSHV. Cells were treated with PMA for the times indicated. The cellular GAPDH gene was amplified as control for the cDNA synthesis;

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

- 5 D) RT-PCR analysis of latent (K12) or late (ORF 65) gene expression after treatment with various inhibitory compounds. Final drug concentrations were as follows: 5uM Haloperidol, 10uM 8-aminoguanosine and 25uM Ganciclovir. The cellular HPRT gene was amplified as control for the cDNA synthesis.

Figure 8, Panels A, B, C and D: A c-kit antisense oligomer inhibits c-kit protein expression and prevents development of the transformed phenotype in KSHV-infected DMVEC.

- 10 A) Immunofluorescence microscopy performed on a KSHV-infected DMVEC monolayer demonstrating inhibition of c-kit expression in cells that have taken up a FITC-tagged c-kit antisense oligomer (green), relative to the strong c-Kit expression, visualized by binding of a goat anti-mouse Alexa 594 secondary antibody (red), of antisense-negative (FITC negative) cells;
- 15 B) Focus formation in KSHV-infected DMVEC cultured post confluency;
- C) Inhibition of focus formation in KSHV-infected DMVEC treated with a c-kit-antisense oligomer at confluence;
- 20 D) Focus formation in control KSHV-infected DMVEC exposed to the EPEI delivery reagent at confluence.

DETAILED DESCRIPTION

25 The analysis of host cell-virus interactions by DNA microarrays allows for detection of previously unknown relationships between cellular pathways and viral infection. By employing this technology to endothelial cells harboring KSHV, we identified cellular genes whose expression is regulated by KSHV. One of the cellular transcripts that was consistently upregulated in all three experiments was c-kit. C-kit is a receptor tyrosine kinase activated by stem cell factor (SCF). c-Kit over expression following KSHV

30 infection affects both paracrine and autocrine c-Kit/SCF interactions. The enhanced

WO 02/10339

PCT/US01/24469

expression with functional consequences raises the possibility that c-Kit expression may play a role in the development of KS. KSHV-infection of DMVEC enhances expression of the SCF receptor, c-Kit, and increased expression promotes enhanced proliferation in response to exogenous SCF. Further, DMVEC co-express the c-Kit ligand SCF, and that

5 inhibition of autocrine c-Kit tyrosine kinase activity inhibits the transformed phenotype induced in DMVEC by KSHV infection. While c-Kit expression and c-Kit/SCF interactions are crucial for the normal development of hematopoietic cells and a restricted number of non-hematopoietic cells, expression of c-Kit has also been associated with various malignancies. In c-Kit-associated cancers, different roles for c-Kit have been

10 identified. For example, in GISTs and germ cell neoplasms, gain-of function mutations in juxtamembrane and tyrosine kinase domains have been described, permitting, respectively, ligand-independent dimerization or constitutive activation without dimerization^(85, 86, 87, 88). In small cell lung carcinoma (SCLC) and breast cancer, co-expression of c-Kit and SCF occurs and is thought to generate an autocrine growth loop^{(89,}

15 ^{90, 91, 92, 93)}. Since endothelial cells are the precursors of KS spindle cells, our finding that KSHV infection of dermal endothelial cells enhances c-Kit expression with functional consequences raises the possibility that c-Kit expression may play a role in the development of KS. A recent report documented for the first time expression of c-Kit in KS tissue⁽⁹⁴⁾ and, in one case examined in more detail, no activating mutations in

20 juxtamembrane or tyrosine kinase domains were observed. This in vivo finding supports that c-Kit plays a role in the pathogenesis of KS.

During KS disease, the presence of KSHV in atypical endothelial cells in KS lesions suggests a role for KSHV in spindle cell development and tumor progression. In our study,

25 the observation that KSHV infection of DMVEC up-regulates functional c-Kit receptors, combined with the demonstration that c-Kit activity is required for cellular transformation, strongly supports a role for c-Kit/SCF in the development of KS.

Identification of a causative role for c-Kit in KSHV-associated cellular transformation suggests a novel therapeutic target for KS. STI 571, the c-Kit tyrosine kinase inhibitor

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

described in this report, has shown considerable promise in phase I/II clinical trials for the treatment of chronic myelogenous leukemia⁽⁹⁵⁾, a disease associated with Bcr-Abl kinase activity. Recently, STI 571 was also shown to inhibit the growth of SCLC cell lines *in vitro* via inhibition of c-Kit activity^(93, 96). Over 70% of SCLC co-express c-Kit and SCF, suggesting that inhibitors of c-Kit activity may have clinical application for treatment of this and other cancers in which autocrine c-Kit signaling plays a role. In conclusion, c-Kit should be considered a primary target in KS tumorigenesis. Consequently, STI 571, or other pharmacological inhibitors of c-Kit signaling, should be evaluated as potential therapeutic agents for the treatment of KS.

10

STI 571 (GLEEVEC[®]), the pharmacological inhibitor of c-Kit tyrosine kinase activity described in this report, is a 2-phenylaminopyrimidine derivative that was originally selected for specificity against the Abl tyrosine kinase⁽⁹⁷⁾. This inhibitor was subsequently shown to display an extended but narrow range of specificity, being active against the Bcr-Abl fusion protein, platelet-derived growth factor receptor and c-kit receptor tyrosine kinases^(97, 98, 99). The Bcr-Abl fusion gene is found in 95% of patients with chronic myelogenous leukemia (CML) and the enhanced tyrosine kinase activity of Bcr-Abl is thought to be a major factor in the disease. STI 571 inhibits the proliferation and tumor formation of Bcr-Abl-expressing cells⁽⁹⁸⁾ and been approved for the treatment of CML⁽⁹⁵⁾. Our results show that STI 571, as well as other inhibitors of c-Kit signalling have therapeutic potential for the treatment of KS and in inhibiting the replication of KSHV.

We also identified cellular genes required for viral gene expression. By subtracting all genes expressed in non-induced cells as well as those induced in non-infected cells, we identified a small group of genes specifically and significantly induced by KSHV 6 hours or 48 hours after PMA stimulation. A large fraction of this group contained genes induced by pro-inflammatory stimuli and thus most likely regulated by NFkB. Induction of pro-inflammatory genes during lytic replication could represent an innate immune response of the host, or could be caused by viral activation of NF-kB. Consistently, inhibition of NFkB activation induced KSHV-mediated apoptosis in B cells. However, this could not be

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

confirmed with the small molecule NF κ B inhibitor used in this study. The function or induction of 23 genes were directly targeted by inhibitors. Of these, two targets were found to be required for late gene expression. Thus, a significant fraction of the up-regulated genes are essential for viral gene expression, and a less stringent search would reveal additional genes required for the viral life cycle. For instance, expanding the pool of putative target genes to those induced during latency may reveal cellular gene products essential for tumor cell proliferation or reactivation of the latent provirus. Therefore, the DNA chip represents a powerful tool to rapidly identify potential cellular drug targets.

10 We have identified the AKAP/PKA interaction, and the type I Sigma receptor as essential cellular components for expression of the ORF 65 gene. PKA is a ubiquitous signaling component activated by intracellular cAMP. The association with various AKAPs mediates intracellular localization of PKA, and ensures timely activation in response to extracellular stimuli^(21, 26). PKA has been found associated with cell surface receptors like the NMDA and Glutamate receptors, and with intracellular structures such as mitochondria^(21, 26). The AKAP Yotiao tethers PKA to protein phosphatase 1 and the NMDA receptor, and PKA activation can thereby modulate the activity of ion channels⁽⁷⁰⁾. In addition, PKA controls transcription by phosphorylation of nuclear factors like the cAMP-response element binding protein⁽⁶³⁾.

20

The type I Sigma receptor was characterized as the binding site for anti-psychotic drugs such as Haloperidol⁽³³⁾. The receptor is localized to the ER, and may translocate to the cell surface upon activation⁽⁴²⁾. Like PKA, the type I Sigma receptor has been implicated in control of ion channel activity. For instance, type I Sigma agonists affect NMDA-induced calcium signaling in neurons^(28, 32). It has been demonstrated that the type I Sigma receptor affected both IP3 mediated calcium release from the ER, and extracellular calcium influx after membrane depolarization⁽²⁹⁾. Interestingly, PKA phosphorylation of the IP3 receptor increases its sensitivity⁽⁷⁾, suggesting a common site of action for the drug targets identified. Little is known about the importance of calcium signaling during KSHV infection, however it has been reported that ionomycin strongly augmented the

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

reactivation process induced by phorbol esters⁽¹³⁾. Taken together, this suggests calcium signaling may be required for efficient reactivation or replication of KSHV. Interestingly, Haloperidol has been shown to inhibit replication of another gamma-herpesvirus, the Epstein-Barr Virus (EBV), in tissue culture⁽⁴⁹⁾. Experiments to further investigate the requirements for calcium signaling in gamma-herpesvirus reactivation and replication are currently underway.

Our approach represents a novel strategy for anti-viral research. Different from traditional, hypothesis-driven approaches, we used a data-driven approach to identify potential targets for intervention with the lytic cycle of KSHV. From the large body of data obtained by global transcriptional analysis of virus-infected host cells we selected genes that met certain predetermined criteria. By inhibiting either upstream regulators or the function of most of the proteins encoded by these genes, host cell pathways important for viral replication can be identified. These pathways offer novel routes of intervention, or even novel applications for known drugs. Thus, DNA-microarrays can be applied to the development of novel treatments for viral diseases.

The present invention relates to nucleic acid molecules and the polypeptides encoded thereby, that are identified in Table 2, which represent the endothelial cell genes whose expression is modulated by KSHV infection. The complete amino acid sequence of the KSHV modulated endothelial cell genes may or may not be known, and the complete nucleotide sequence encoding the full length genomic DNA or the amino acid coding region may or may not be known. It is predicted that a wide variety of mammalian cells and cell types of endothelial cell lineage that are readily available from depositions such as The American Type Culture Collection, will contain the described genes. Endothelial cells of human origin capable of producing one or more of the KSHV modulated endothelial cell genes include, but are not limited to HUV-EC-C (CRL-1730), HAAE-1 (CRL-2472), HAAE-2 (CRL-2473), HFAE-2 (CRL-2474), HIAE-78 (CRL-2475), HIAE-101 (CRL-2478), HUVE-12 (CRL-2480) and DMVEC.

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

Other cells and cell lines may also be suitable for use to isolate KSHV modulated endothelial cell genes cDNA. Selection of suitable cells may be done by screening for KSHV modulated endothelial cell gene expression activity in cell extracts or in whole cell assays. Cells that possess KSHV modulated endothelial cell gene activity in any one of these assays may be suitable for the isolation of KSHV modulated endothelial cell gene DNA or mRNA.

Any of a variety of procedures known in the art may be used to molecularly clone KSHV modulated endothelial cell gene DNA. These methods include, but are not limited to, direct functional expression of the KSHV modulated endothelial cell genes following the construction of a cDNA library from appropriate cells in an appropriate expression vector system. Another method is to screen a cDNA library constructed in a bacteriophage or plasmid shuttle vector with a labelled oligonucleotide probe designed from the amino acid sequence encoded by one or more of the KSHV modulated endothelial cell genes. An additional method consists of screening a cDNA library constructed in a bacteriophage or plasmid shuttle vector with a partial cDNA encoding the protein encoded by a KSHV modulated endothelial cell gene. This partial cDNA is obtained by the specific PCR amplification of DNA fragments through the design of degenerate oligonucleotide primers from the amino acid sequence of the purified protein encoded by one or more KSHV modulated endothelial cell genes.

Another method is to isolate RNA from cells and translate the RNA into protein via an *in vitro* or an *in vivo* translation system. The translation of the RNA into a peptide a protein will result in the production of at least a portion of the protein of interest which can be identified by, for example, immunological reactivity with an anti-protein antibody or by biological activity of the protein. In this method, pools of RNA isolated from appropriate cells can be analyzed for the presence of an RNA that encodes at least a portion of the desired protein. Further fractionation of the RNA pool can be done to purify the appropriate RNA from unwanted RNA. The peptide or protein produced by this method may be analyzed to provide amino acid sequences which in turn are used to provide

WO 02/10339

PCT/US01/24469

primers for production of KSHV modulated endothelial cell gene cDNA, or the RNA used for translation can be analyzed to provide nucleotide sequences encoding KSHV modulated endothelial cell gene products and produce probes for this production of cDNA. This method is known in the art and can be found in, for example, Maniatis, T.,
5 Fritsch, E.F., Sambrook, J. in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

It is readily apparent to those skilled in the art that other types of libraries, as well as libraries constructed from other cells or cell types, may be useful for isolating KSHV
10 modulated endothelial cell genes-encoding DNA. Other types of libraries include, but are not limited to, cDNA libraries derived from other cells, and genomic DNA libraries that include YAC (yeast artificial chromosome) and cosmid libraries.

It is readily apparent to those skilled in the art that suitable cDNA libraries may be
15 prepared from cells or cell lines which have KSHV modulated endothelial cell gene activity. The selection of cells or cell lines for use in preparing a cDNA library to isolate KSHV modulated endothelial cell gene cDNA may be done by first measuring cell associated biological activity using the measurement of the appropriate biological activity or a ligand binding assay.

20 Preparation of cDNA libraries can be performed by standard techniques well known in the art. Well known cDNA library construction techniques can be found for example, in Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

25 It is also readily apparent to those skilled in the art that DNA encoding KSHV modulated endothelial cell genes may also be isolated from a suitable genomic DNA library. Construction of genomic DNA libraries can be performed by standard techniques well known in the art. Well known genomic DNA library construction techniques can be found

WO 02/10339

PCT/US01/24469

in Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

5 In order to clone the KSHV modulated endothelial cell genes by the above methods, the amino acid sequence of the gene product may be necessary. To accomplish this, protein may be purified and partial amino acid sequence determined by automated sequenators. It is not necessary to determine the entire amino acid sequence, but the linear sequence of two regions of 6 to 8 amino acids from the protein is determined for the production of primers for PCR amplification of a partial KSHV modulated endothelial cell gene DNA
10 fragment.

Once suitable amino acid sequences have been identified, the DNA sequences capable of encoding them are synthesized. Because the genetic code is degenerate, more than one codon may be used to encode a particular amino acid, and therefore, the amino acid
15 sequence can be encoded by any of a set of similar DNA oligonucleotides. Only one member of the set will be identical to the KSHV modulated endothelial cell gene sequence but will be capable of hybridizing to DNA even in the presence of DNA oligonucleotides with mismatches. The mismatched DNA oligonucleotides may still sufficiently hybridize to the KSHV modulated endothelial cell gene DNA to permit identification and isolation
20 of KSHV modulated endothelial cell gene encoding DNA. DNA isolated by these methods can be used to screen DNA libraries from a variety of cell types, from invertebrate and vertebrate sources, and to isolate homologous genes.

Because the genetic code is degenerate, more than one codon may be used to encode a
25 particular amino acid, and therefore, the amino acid sequence can be encoded by any of a set of similar DNA oligonucleotides. Only one member of the set will be identical to the KSHV modulated endothelial cell gene sequence but will be capable of hybridizing to KSHV modulated endothelial cell gene nucleic acids even in the presence of DNA oligonucleotides with mismatches under appropriate conditions. Under alternate
30 conditions, the mismatched DNA oligonucleotides may still hybridize to the KSHV

WO 02/10339

PCT/US01/24469

modulated endothelial cell gene DNA or RNA to permit identification and/or isolation of KSHV modulated endothelial cell gene encoding DNA.

Recombinant Expression of KSHV Modulated Endothelial Cell Genes

- 5 The cloned KSHV modulated endothelial cell gene DNA obtained through the methods described herein may be recombinantly expressed by molecular cloning into an expression vector containing a suitable promoter and other appropriate transcription regulatory elements, and transferred into prokaryotic or eukaryotic host cells to produce recombinant KSHV modulated endothelial cell gene protein. Techniques for such manipulations are
10 fully described in Maniatis, T. *et al.*, *supra*, and are well known in the art.

- Expression vectors are defined herein as DNA sequences that are required for the transcription of cloned copies of genes and the translation of their mRNAs in an appropriate host. Such vectors can be used to express eukaryotic genes in a variety of
15 hosts such as bacteria including *E. coli*, blue-green algae, plant cells, insect cells, fungal cells including yeast cells, and animal cells.

- Specifically designed vectors allow the shuttling of DNA between hosts such as bacteria-yeast or bacteria-animal cells or bacteria-fungal cells or bacteria-invertebrate cells. An
20 appropriately constructed expression vector should contain: an origin of replication for autonomous replication in host cells, selectable markers, a limited number of useful restriction enzyme sites, a potential for high copy number, and active promoters. A promoter is defined as a DNA sequence that directs RNA polymerase to bind to DNA and initiate RNA synthesis. A strong promoter is one that causes mRNAs to be initiated at
25 high frequency. Expression vectors may include, but are not limited to, cloning vectors, modified cloning vectors, specifically designed plasmids or viruses.

- A variety of mammalian expression vectors may be used to express recombinant KSHV modulated endothelial cell genes in mammalian cells. Commercially available mammalian
30 expression vectors which may be suitable for recombinant KSHV modulated endothelial

WO 02/10339

PCT/US01/24469

cell genes expression, include but are not limited to, pMAMneo (Clontech), pcDNA3 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593) pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo(342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146),
5 pUCtag (ATCC 37460), and IZD35 (ATCC 37565).

A variety of bacterial expression vectors may be used to express recombinant KSHV modulated endothelial cell genes in bacterial cells. Commercially available bacterial expression vectors which may be suitable for recombinant KSHV modulated endothelial cell gene expression include, but are not limited to pET vectors (Novagen) and pQE
10 vectors (Qiagen).

A variety of fungal cell expression vectors may be used to express recombinant proteins in fungal cells such as yeast. Commercially available fungal cell expression vectors which may be suitable for recombinant KSHV modulated endothelial cell gene expression include but are not limited to pYES2 (Invitrogen) and Pichia expression vector (Invitrogen).
15

A variety of insect cell expression vectors may be used to express recombinant KSHV modulated endothelial cell genes in insect cells. Commercially available insect cell expression vectors which may be suitable for recombinant expression of KSHV modulated endothelial cell genes include but are not limited to pBlueBacII (Invitrogen).
20

DNA encoding KSHV modulated endothelial cell genes may be cloned into an expression vector for expression in a recombinant host cell. Recombinant host cells may be prokaryotic or eukaryotic, including but not limited to bacteria such as *E. coli*, fungal cells such as yeast, mammalian cells including but not limited to cell lines of human, bovine, porcine, monkey and rodent origin, and insect cells including but not limited to drosophila and silkworm derived cell lines. Cell lines derived from mammalian species which may be suitable and which are commercially available, include but are not limited to, CV-1
30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

(ATCC CCL 70), COS-1 (ATCC CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), CHO-K1 (ATCC CCL 61), 3T3 (ATCC CCL 92), NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), HeLa (ATCC CCL 2), C127I (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26), MRC-5 (ATCC CCL 171), L-cells, and HEK-293 (ATCC CRL1573).

5

The expression vector may be introduced into host cells via any one of a number of techniques including but not limited to transformation, transfection, protoplast fusion, lipofection, and electroporation. The expression vector-containing cells are clonally propagated and individually analyzed to determine whether they produce protein encoded

10 by the KSHV modulated endothelial cell genes. Identification of KSHV modulated endothelial cell gene expressing host cell clones may be done by several means, including but not limited to immunological reactivity with antibodies, and the presence of host cell-associated protein biological activity.

- 15 Expression of KSHV modulated endothelial cell gene DNA may also be performed using *in vitro* produced synthetic mRNA. Synthetic mRNA or mRNA isolated from the appropriate cells can be efficiently translated in various cell-free systems, including but not limited to wheat germ extracts and reticulocyte extracts, as well as efficiently translated in cell based systems, including but not limited to microinjection into frog
- 20 oocytes, with microinjection into frog oocytes being generally preferred.

Assay Methods for KSHV Modulated Endothelial Cell Genes

- Host cell transfectants and microinjected oocytes may be used to assay both the levels of functional KSHV modulated endothelial cell gene activity and levels of total protein
- 25 encoded by KSHV modulated endothelial cell genes by the following methods. In the case of recombinant host cells, this involves the co-transfection of one or possibly two or more plasmids, containing the DNA encoding one or more fragments or subunits of the proteins encoded by KSHV modulated endothelial cell genes. In the case of oocytes, this involves the co-injection of synthetic RNAs for protein encoded by the KSHV modulated
- 30 endothelial cell genes. Following an appropriate period of time to allow for expression,

WO 02/10339

PCT/US01/24469

cellular protein is metabolically labelled with, for example ³⁵S-methionine for 24 hours, after which cell lysates and cell culture supernatants are harvested and subjected to immunoprecipitation with polyclonal antibodies directed against the protein.

- 5 Levels of the appropriate protein in host cells are quantitated by immunoaffinity and/or ligand affinity techniques. Cells expressing KSHV modulated endothelial cell genes can be assayed for the number of protein molecules expressed by measuring the amount of radioactive [ligand] binding to cell membranes. Protein-specific affinity beads or protein-specific antibodies are used to isolate for example ³⁵S-methionine labelled or unlabelled
- 10 protein. Labelled protein is analyzed by SDS-PAGE. Unlabelled protein is detected by Western blotting, ELISA or RIA assays employing protein-specific antibodies.

- Other methods for detecting KSHV modulated endothelial cell gene activity involve the direct measurement of KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein activity in
- 15 whole cells transfected with cDNA or oocytes injected with mRNA. The desired protein activity is measured by specific ligand binding or biological characteristics of the host cells expressing KSHV modulated endothelial cell gene DNA.

Cell Based Assays

- 20 The present invention provides a whole cell method to detect compound modulation of either KSHV modulated endothelial cell gene expression or the gene product. The method comprises the steps:
- 1) contacting a test compound with a cell that contains functional protein encoded by a KSHV modulated endothelial cell gene, or with

25 an endothelial cell or cell line, and

 - 2) measuring a change in the cell in response to modified KSHV modulated endothelial cell gene or gene product function by the test compound.

- The amount of time necessary for cellular contact with the test compound is empirically
- 30 determined, for example, by running a time course with a known modulator of the activity

WO 02/10339

PCT/US01/24469

of the KSHV modulated endothelial cell gene or its gene product, and measuring cellular changes as a function of time.

5 The measurement means of the method of the present invention can be further defined by comparing a cell that has been exposed to a test compound to an identical cell that has not been similarly expose to the test compound. Alternatively two cells, one containing functional KSHV modulated endothelial cell gene and a second cell identical to the first, but lacking functional KSHV modulated endothelial cell gene could both be contacted with the same compound and compared for differences between the two cells. This
10 technique is also useful in establishing the background noise of these assays. One of average skill in the art will appreciate that these control mechanisms also allow easy selection of cellular changes that are responsive to modulation of functional KSHV modulated endothelial cell gene or its gene product.

15 The term "cell" refers to at least one cell, but includes a plurality of cells appropriate for the sensitivity of the detection method. Cells suitable for the present invention may be bacterial, yeast, or eukaryotic.

The assay methods to determine compound modulation of functional KSHV modulated
20 endothelial cell genes or gene products can be in conventional laboratory format or adapted for high throughput. The term "high throughput" refers to an assay design that allows easy analysis of multiple samples simultaneously, and capacity for robotic manipulation. Another desired feature of high throughput assays is an assay design that is optimized to reduce reagent usage, or minimize the number of manipulations in order to
25 achieve the analysis desired. Examples of assay formats include 96-well or 384-well plates, levitating droplets, and "lab on a chip" micro-channel chips used for liquid handling experiments. It is well known by those in the art that as miniaturization of plastic molds and liquid handling devices are advanced, or as improved assay devices are designed, that greater numbers of samples may be performed using the design of the
30 present invention.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

The cellular changes suitable for the method of the present invention comprise directly measuring changes in the function or quantity of KSHV modulated endothelial cell genes or gene products, or by measuring downstream effects of KSHV modulated endothelial cell gene function, for example by measuring secondary messenger concentrations or changes in transcription or by changes in protein levels of genes that are transcriptionally influenced by KSHV modulated endothelial cell genes, or by measuring phenotypic changes in the cell. Preferred measurement means include changes in the quantity of KSHV modulated endothelial cell genes or the encoded protein, changes in the functional activity of KSHV modulated endothelial cell genes or the encoded proteins, changes in the quantity of mRNA, changes in intracellular protein, changes in cell surface protein, or secreted protein, or changes in Ca²⁺, cAMP or GTP concentration. Changes in the levels of mRNA are detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) or by differential gene expression. Immunoaffinity, ligand affinity, or enzymatic measurement quantifies changes in levels of protein in host cells. Protein-specific affinity beads or specific antibodies are used to isolate for example ³⁵S-methionine labelled or unlabelled protein. Labelled protein is analyzed by SDS-PAGE. Unlabelled protein is detected by Western blotting, cell surface detection by fluorescent cell sorting, cell image analysis, ELISA or RIA employing specific antibodies. Where the protein is an enzyme, the induction of protein is monitored by cleavage of a fluoro-genic or colorimetric substrate.

Preferred detection means for cell surface protein include flow cytometry or statistical cell imaging. In both techniques the protein of interest is localized at the cell surface, labeled with a specific fluorescent probe, and detected via the degree of cellular fluorescence. In flow cytometry, the cells are analyzed in a solution, whereas in cellular imaging techniques, a field of cells is compared for relative fluorescence.

A preferred detection means for secreted proteins that are enzymes such as alkaline phosphatase or proteases, would be fluorescent or colorimetric enzymatic assays. Fluorescent/luminescent/color substrates for alkaline phosphatase are commercially available and such assays are easily adaptable to high throughput multi-well plate screen

WO 02/10339

PCT/US01/24469

format. Fluorescent energy transfer based assays are used for protease assays. Fluorophore and quencher molecules are incorporated into the two ends of the peptide substrate of the protease. Upon cleavage of the specific substrate, separation of the fluorophore and quencher allows the fluorescence to be detectable. When the secreted protein could be measured by radioactive methods, scintillation proximity technology could be used. The substrate of the protein of interest is immobilized either by coating or incorporation on a solid support that contains a fluorescent material. A radioactive molecule, brought in close proximity to the solid phase by enzyme reaction, causes the fluorescent material to become excited and emit visible light. Emission of visible light forms the basis of detection of successful ligand/target interaction, and is measured by an appropriate monitoring device. An example of a scintillation proximity assay is disclosed in United States Patent No. 4,568,649, issued February 4, 1986. Materials for these types of assays are commercially available from Dupont NEN® (Boston, Massachusetts) under the trade name FlashPlate™.

A preferred detection means where the endogenous gene results in phenotypic cellular structural changes is statistical image analysis the cellular morphology or intracellular phenotypic changes. For example, but not by way of limitation, and cell may change morphology such a rounding versus remaining flat against a surface, or may become growth-surface independent and thus resemble transformed cell phenotype well known in the art of tumor cell biology, or a cell may produce new outgrowths. Phenotypic changes that may occur intracellularly include cytoskeletal changes, alteration in the endoplasmic reticulum/Golgi complex in response to new gene transcription, or production of new vesicles.

Where the endogenous gene encodes a soluble intracellular protein, changes in the endogenous gene may be measured by changes of the specific protein contained within the cell lysate. The soluble protein may be measured by the methods described herein.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

The present invention is also directed to methods for screening for compounds that modulate the expression of KSHV modulated endothelial cell genes as well as the function of the encoded protein *in vivo*. Compounds may modulate by increasing or attenuating the expression of DNA or RNA encoding the protein, or the function of the protein.

5 Compounds that modulate the expression of KSHV modulated endothelial cell genes or the function of the encoded protein may be detected by a variety of assays. The assay may be a simple "yes/no" assay to determine whether there is a change in expression or function. The assay may be made quantitative by comparing the expression or function of a test sample with the levels of expression or function in a standard sample. Modulators

10 identified in this process are useful as therapeutic agents.

Protein Based Assay

The present invention provides an *in vitro* protein assay method to detect test compound modulation of KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein activity. The method comprises the steps:

15

- 1) contacting a test-compound, and functional KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein, and
- 2) measuring a change to the protein function by the test compound.

The amount of time necessary for cellular contact with the compound is empirically determined, for example, by running a time course with a known protein modulator and measuring changes as a function of time.

20

Methods for detecting compounds that modulate proteolytic activity comprise combining a punitive modulating compound, functional protein, and a suitable labeled substrate and monitoring an effect of the compound on the protease by changes in the amount of substrate either as a function of time or after a predefined period of time. Labeled substrates include, but are not limited to; substrate that is radiolabeled (Coolican et al. (1986). *J. Biol. Chem.* 261:4170-6), fluorometric (Loneragan et al. (1995). *J. Food Sci.* 60:72-3, 78; Twining (1984). *Anal. Biochem.* 143:30-4) or colorimetric (Buroker-Kilgore and Wang (1993). *Anal. Biochem.* 208:387-92). Radioisotopes useful for use in the

25

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

present invention include those well known in the art, specifically ^{125}I , ^{131}I , ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{32}P , and ^{33}P . Radioisotopes are introduced into the peptide by conventional means, such as iodination of a tyrosine residue, phosphorylation of a serine or threonine residue, or incorporation of tritium, carbon or sulfur utilizing radioactive amino acid precursors.

5 Zymography following SDS polyacrylamide gel electrophoresis (Wadstroem and Smyth (1973). *Sci. Tools* 20:17-21), as well as by fluorescent resonance energy transfer (FRET)-based methods (Ng and Auld (1989). *Anal. Biochem.* 183:50-6) are also methods used to detect compounds that modulate proteolytic activity. Compounds that are agonists will increase the rate of substrate degradation and will result in less remaining substrate as a

10 function of time. Compounds that are antagonists will decrease the rate of substrate degradation and will result in greater remaining substrate as a function of time.

A preferred assay format useful for the method of the present invention is a FRET based method using peptide substrates that contain a fluorescent donor with either a quencher or acceptor that are separated by a peptide sequence encoding the protease cleavage site. A

15 fluorescent donor is a fluoro-genic compound that can adsorb energy and transfers a portion of the energy to another compound. Examples of fluorescent donors suitable for use in the present invention include, but are not limited to, coumarins, xanthene dyes such as fluoresceins, rhodols, and rhodamines, resorufins, cyanine dyes bimanes, acridines,

20 isoindols, dansyl dyes, aminophthalic hydrazides such as Luminol and isoluminol derivatives, aminophthalimides, aminonaphthalimides, aminobenzofurans, aminoquinolines, dicanohydroquinones, and europium and terbium complexes and related compounds.

25 A quencher is a compound that reduces the emission from the fluorescent donor when it is appropriately proximally located to the donor, and do not generally re-emit the energy in the form of fluorescence. Examples of such moieties include indigos, bezoquinones, anthraquinones, azo compounds, nitro compounds, indoanilines, and di- and triphenylmethanes. A FRET method using a donor/quencher pair measures increased

30 emission from the fluorescent donor as a function of enzymatic activity upon the peptide

WO 02/10339

PCT/US01/24469

substrate. Therefore a test compound that antagonizes KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein will generate an emission signal between two control samples – a low (basal) fluorescence from the FRET peptide alone and a higher fluorescence from the FRET peptide digested by the activity of enzymatically active protein.

5

An acceptor is a fluorescent molecule that adsorbs energy from the fluorescent donor and re-emits a portion of the energy as fluorescence. An acceptor is a specific type of quencher that enables a separate mechanism to measure proteolytic efficacy. Methods that utilize a donor/acceptor pair measure a decrease in acceptor emission as a function of enzymatic activity upon the peptide substrate. Therefore a test compound that antagonizes KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein will generate an emission signal between two control samples – a higher basal fluorescence from the FRET peptide alone and a lower fluorescence from the FRET peptide digested by the activity of enzymatically active protein. Examples of acceptor useful for methods of the present invention include, but are not limited to, coumarins, fluoresceins, rhodols, rhodamines, resorufins, cyanines, difluoroboradiazindacenes, and phthalocyanines.

Production and Use of Antibodies that Bind to KSHV Modulated Endothelial Cell Gene Encoded Proteins

20 Monospecific antibodies to KSHV modulated endothelial cell gene encoded proteins are purified from mammalian antisera containing antibodies reactive against the protein or are prepared as monoclonal antibodies reactive with the protein using the technique originally described by Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975). Immunological techniques are well known in the art and described in, for example, Antibodies: A
25 laboratory manual published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ISBN 0879693142. Monospecific antibody as used herein is defined as a single antibody species or multiple antibody species with homogenous binding characteristics for a protein. Homogenous binding as used herein refers to the ability of the antibody species to bind to a specific antigen or epitope, such as those associated with
30 the KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein, as described above. Protein

WO 02/10339

PCT/US01/24469

specific antibodies are raised by immunizing animals such as mice, rats, guinea pigs, rabbits, goats, horses and the like, with rabbits being preferred, with an appropriate concentration of protein either with or without an immune adjuvant.

- 5 Preimmune serum is collected prior to the first immunization. Each animal receives between about 0.001 mg and about 1000 mg of protein associated with an acceptable immune adjuvant. Such acceptable adjuvants include, but are not limited to, Freund's complete, Freund's incomplete, alum-precipitate, water in oil emulsion containing Corynebacterium parvum and tRNA. The initial immunization consists of protein in, preferably, Freund's complete adjuvant at multiple sites either subcutaneously (SC),
10 intraperitoneally (IP) or both. Each animal is bled at regular intervals, preferably weekly, to determine antibody titer. The animals may or may not receive booster injections following the initial immunization. Those animals receiving booster injections are generally given an equal amount of the antigen in Freund's incomplete adjuvant by the same route. Booster injections are given at about three-week intervals until maximal titers
15 are obtained. At about 7 days after each booster immunization or about weekly after a single immunization, the animals are bled, the serum collected, and aliquots are stored at about -20°C.
- 20 Monoclonal antibodies (mAb) reactive with KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein are prepared by immunizing inbred mice, preferably Balb/c, with the protein. The mice are immunized by the IP or SC route with about 0.001 mg to about 1.0 mg, preferably about 0.1 mg, of protein antigen in about 0.1 ml buffer or saline incorporated in an equal volume of an acceptable adjuvant, as discussed above. Freund's
25 adjuvant is preferred, with Freund's complete adjuvant being used for the initial immunization and Freund's incomplete adjuvant used thereafter. The mice receive an initial immunization on day 0 and are rested for about 2 to about 30 weeks. Immunized mice are given one or more booster immunizations of about 0.001 to about 1.0 mg of protein antigen in a buffer solution such as phosphate buffered saline by the intravenous
30 (IV) route. Lymphocytes, from antibody positive mice, preferably splenic lymphocytes,

WO 02/10339

PCT/US01/24469

are obtained by removing spleens from immunized mice by standard procedures known in the art. Hybridoma cells are produced by mixing the splenic lymphocytes with an appropriate fusion partner, preferably myeloma cells, under conditions that will allow the formation of stable hybridomas. Fusion partners may include, but are not limited to:

5 mouse myelomas P3/NS1/Ag 4-1; MPC-11; S-194 and Sp2/0, with Sp2/0 being generally preferred. The antibody producing cells and myeloma cells are fused in polyethylene glycol, about 1000 mol. wt., at concentrations from about 30% to about 50%. Fused hybridoma cells are selected by growth in hypoxanthine, thymidine and aminopterin supplemented Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) by procedures known in the art.

10 Supernatant fluids are collected from growth positive wells on about days 14, 18, and 21 and are screened for antibody production by an immunoassay such as solid phase immunoradioassay (SPIRA) using KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein as the antigen. The culture fluids are also tested in the Ouchterlony precipitation assay to determine the isotype of the mAb. Hybridoma cells from antibody positive wells are

15 cloned by a technique such as the soft agar technique of MacPherson, Soft Agar Techniques, in Tissue Culture Methods and Applications, Kruse and Paterson, Eds., Academic Press, 1973 or by the technique of limited dilution.

Monoclonal antibodies are produced *in vivo* by injection of pristane primed Balb/c mice,

20 approximately 0.5 ml per mouse, with about 1×10^6 to about 6×10^6 hybridoma cells at least about 4 days after priming. Ascites fluid is collected at approximately 8-12 days after cell transfer and the monoclonal antibodies are purified by techniques known in the art.

25 *In vitro* production of mAb is carried out by growing the hybridoma in tissue culture media well known in the art. High density *in vitro* cell culture may be conducted to produce large quantities of mAbs using hollow fiber culture techniques, air lift reactors, roller bottle, or spinner flasks culture techniques well known in the art. The mAb are purified by techniques known in the art.

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

Antibody titers of ascites or hybridoma culture fluids are determined by various serological or immunological assays which include, but are not limited to, precipitation, passive agglutination, enzyme-linked immunosorbent antibody (ELISA) technique and radioimmunoassay (RIA) techniques. Similar assays are used to detect the presence of

5 KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein in body fluids or tissue and cell extracts.

It is readily apparent to those skilled in the art that the above described methods for producing monospecific antibodies may be utilized to produce antibodies specific for

10 polypeptide fragments, or full-length nascent polypeptide, or the individual subunits. Specifically, it is readily apparent to those skilled in the art that monospecific antibodies may be generated which are specific for only one protein subunit or the fully functional protein. It is also apparent to those skilled in the art that monospecific antibodies may be generated that inhibit normal function of KSHV modulated endothelial cell gene encoded

15 protein.

Antibody affinity columns are made by adding the antibodies to a gel support such that the antibodies form covalent linkages with the gel bead support. Preferred covalent linkages are made through amine, aldehyde, or sulfhydryl residues contained on the antibody.

20 Methods to generate aldehydes or free sulfhydryl groups on antibodies are well known in the art; amine groups are reactive with, for example, N-hydroxysuccinimide esters.

Kit Compositions Containing KSHV Modulated Endothelial Cell Gene or Gene Product Specific Reagents

25 Kits containing KSHV modulated endothelial cell genes DNA or RNA, antibodies to KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein, or the KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein may be prepared. Such kits are used to detect DNA which hybridizes to KSHV modulated endothelial cell gene DNA or to detect the presence of KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein or peptide fragments in a

WO 02/10339

PCT/US01/24469

sample. Such characterization is useful for a variety of purposes including but not limited to forensic analyses, diagnostic applications, and epidemiological studies.

5 The DNA molecules, RNA molecules, recombinant protein and antibodies of the present invention may be used to screen and measure levels of KSHV modulated endothelial cell gene DNA, KSHV modulated endothelial cell gene RNA or KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein. The recombinant proteins, DNA molecules, RNA molecules and antibodies lend themselves to the formulation of kits suitable for a variety of uses, including but not limited to, the detection and typing of KSHV infected cells, Kaposi's
10 sarcoma tissue, or tumor cells. Such a kit would comprise a compartmentalized carrier suitable to hold in close confinement at least one container. The carrier would further comprise reagents such as recombinant KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein or anti-protein antibodies suitable for detecting KSHV modulated endothelial cell genes or gene products. The carrier may also contain a means for detection such as
15 labeled antigen or enzyme substrates or the like.

Gene Therapy

Nucleotide sequences that are complementary to the KSHV modulated endothelial cell gene encoding DNA sequence can be synthesized for antisense therapy. These antisense
20 molecules may be DNA, stable derivatives of DNA such as phosphorothioates or methylphosphonates, RNA, stable derivatives of RNA such as 2'-O-alkylRNA, or other KSHV modulated endothelial cell gene antisense oligonucleotide mimetics. KSHV modulated endothelial cell gene antisense molecules may be introduced into cells by microinjection, liposome encapsulation or by expression from vectors harboring the
25 antisense sequence. KSHV modulated endothelial cell gene antisense therapy may be particularly useful for the treatment of diseases where it is beneficial to reduce KSHV modulated endothelial cell genes or the gene products' activity.

KSHV modulated endothelial cell gene gene therapy may be used to introduce KSHV
30 modulated endothelial cell genes into the cells of target organisms. The KSHV modulated

WO 02/10339

PCT/US01/24469

endothelial cell genes can be ligated into viral vectors that mediate transfer of the KSHV modulated endothelial cell gene DNA by infection of recipient host cells. Suitable viral vectors include retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus, herpes virus, vaccinia virus, polio virus and the like. Alternatively, KSHV modulated endothelial cell gene DNA can be transferred into cells for gene therapy by non-viral techniques including receptor-mediated targeted DNA transfer using ligand-DNA conjugates or adenovirus-ligand-DNA conjugates, lipofection membrane fusion or direct microinjection. These procedures and variations thereof are suitable for *ex vivo* as well as *in vivo* KSHV modulated endothelial cell genes gene therapy. KSHV modulated endothelial cell gene therapy may be particularly useful for the treatment of diseases where it is beneficial to elevate KSHV modulated endothelial cell genes activity. Protocols for molecular methodology of gene therapy suitable for use with the KSHV modulated endothelial cell genes is described in Gene Therapy Protocols, edited by Paul D. Robbins, Human press, Totawa NJ, 1996.

15

Pharmaceutical Compositions

Pharmaceutically useful compositions comprising KSHV modulated endothelial cell gene DNA, KSHV modulated endothelial cell gene RNA, or KSHV modulated endothelial cell gene encoded protein, or modulators of KSHV modulated endothelial cell genes and/or gene products activity, may be formulated according to known methods such as by the admixture of a pharmaceutically acceptable carrier. Examples of such carriers and methods of formulation may be found in Remington's Pharmaceutical Sciences. To form a pharmaceutically acceptable composition suitable for effective administration, such compositions will contain an effective amount of the protein, DNA, RNA, or modulator.

25

Therapeutic or diagnostic compositions of the invention are administered to an individual in amounts sufficient to treat or diagnose disorders in which modulation of KSHV modulated endothelial cell gene or gene product-related activity is indicated. The effective amount may vary according to a variety of factors such as the individual's condition, weight, sex and age. Other factors include the mode of administration. The pharmaceutical

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

compositions may be provided to the individual by a variety of routes such as subcutaneous, topical, oral and intramuscular.

5 The term "chemical derivative" describes a molecule that contains additional chemical moieties that are not normally a part of the base molecule. Such moieties may improve the solubility, half-life, absorption, etc. of the base molecule. Alternatively the moieties may attenuate undesirable side effects of the base molecule or decrease the toxicity of the base molecule. Examples of such moieties are described in a variety of texts, such as Remington's Pharmaceutical Sciences.

10

Compounds identified according to the methods disclosed herein may be used alone at appropriate dosages defined by routine testing in order to obtain optimal inhibition of the KSHV modulated endothelial cell gene, gene product or its activity while minimizing any potential toxicity. In addition, co-administration or sequential administration of other agents may be desirable. For example, compounds that are useful for the treatment of Kaposi's sarcoma, such as daunorubicin, doxorubicin, interferon alpha, retinoids, and taxol, may be used in combination with a modulator of KSHV modulated endothelial cell genes or their gene products described herein. In addition, other known antitumor agents can be combined with the modulators of KSHV modulated endothelial cell genes or their gene products described herein.

15
20

The present invention also has the objective of providing suitable topical, oral, systemic and parenteral pharmaceutical formulations for use in the novel methods of treatment of the present invention. The compositions containing compounds or modulators identified according to this invention as the active ingredient for use in the modulation of KSHV modulated endothelial cell genes can be administered in a wide variety of therapeutic dosage forms in conventional vehicles for administration. For example, the compounds or modulators can be administered in such oral dosage forms as tablets, capsules (each including timed release and sustained release formulations), pills, powders, granules, elixirs, tinctures, solutions, suspensions, syrups and emulsions, or by injection. Likewise,

25
30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

they may also be administered in intravenous (both bolus and infusion), intraperitoneal, subcutaneous, topical with or without occlusion, or intramuscular form, all using forms well known to those of ordinary skill in the pharmaceutical arts. An effective but non-toxic amount of the compound desired can be employed as a KSHV modulated endothelial cell gene or gene product modulating agent.

The daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per patient, per day. For oral administration, the compositions are preferably provided in the form of scored or unscored tablets containing 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, and 50.0 milligrams of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the patient to be treated. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level of from about 0.0001 mg/kg to about 100 mg/kg of body weight per day. The range is more particularly from about 0.001 mg/kg to 10 mg/kg of body weight per day. The dosages of the compounds or modulators are adjusted when combined to achieve desired effects. On the other hand, dosages of these various agents may be independently optimized and combined to achieve a synergistic result wherein the pathology is reduced more than it would be if either agent were used alone.

Advantageously, compounds or modulators of the present invention may be administered in a single daily dose, or the total daily dosage may be administered in divided doses of two, three or four times daily. Furthermore, compounds or modulators for the present invention can be administered in intranasal form via topical use of suitable intranasal vehicles, or via transdermal routes, using those forms of transdermal skin patches well known to those of ordinary skill in that art. To be administered in the form of a transdermal delivery system, the dosage administration will, of course, be continuous rather than intermittent throughout the dosage regimen.

For combination treatment with more than one active agent, where the active agents are in separate dosage formulations, the active agents can be administered concurrently, or they each can be administered at separately staggered times.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

The dosage regimen utilizing the compounds or modulators of the present invention is selected in accordance with a variety of factors including type, species, age, weight, sex and medical condition of the patient; the severity of the condition to be treated; the route of administration; the renal and hepatic function of the patient; and the particular
5 compound thereof employed. A physician or veterinarian of ordinary skill can readily determine and prescribe the effective amount of the drug required to prevent, counter or arrest the progress of the condition. Optimal precision in achieving concentrations of drug within the range that yields efficacy without toxicity requires a regimen based on the kinetics of the drug's availability to target sites. This involves a consideration of the
10 distribution, equilibrium, and elimination of a drug.

In the methods of the present invention, the compounds or modulators herein described in detail can form the active ingredient, and are typically administered in admixture with suitable pharmaceutical diluents, excipients or carriers (collectively referred to herein as
15 "carrier" materials) suitably selected with respect to the intended form of administration, that is, oral tablets, capsules, elixirs, syrups and the like, and consistent with conventional pharmaceutical practices.

For instance, for oral administration in the form of a tablet or capsule, the active drug
20 component can be combined with an oral, non-toxic pharmaceutically acceptable inert carrier such as ethanol, glycerol, water and the like. Moreover, when desired or necessary, suitable binders, lubricants, disintegrating agents and coloring agents can also be incorporated into the mixture. Suitable binders include, without limitation, starch, gelatin, natural sugars such as glucose or beta-lactose, corn sweeteners, natural and synthetic gums
25 such as acacia, tragacanth or sodium alginate, carboxymethylcellulose, polyethylene glycol, waxes and the like. Lubricants used in these dosage forms include, without limitation, sodium oleate, sodium stearate, magnesium stearate, sodium benzoate, sodium acetate, sodium chloride and the like. Disintegrators include, without limitation, starch, methyl cellulose, agar, bentonite, xanthan gum and the like.

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

For liquid forms the active drug component can be combined in suitably flavored suspending or dispersing agents such as the synthetic and natural gums, for example, tragacanth, acacia, methyl-cellulose and the like. Other dispersing agents that may be employed include glycerin and the like. For parenteral administration, sterile suspensions and solutions are desired. Isotonic preparations, which generally contain suitable preservatives, are employed when intravenous administration is desired.

Topical preparations containing the active drug component can be admixed with a variety of carrier materials well known in the art, such as, eg., alcohols, aloe vera gel, allantoin, glycerine, vitamin A and E oils, mineral oil, PPG2 myristyl propionate, and the like, to form, eg., alcoholic solutions, topical cleansers, cleansing creams, skin gels, skin lotions, and shampoos in cream or gel formulations.

The compounds or modulators of the present invention can also be administered in the form of liposome delivery systems, such as small unilamellar vesicles, large unilamellar vesicles and multilamellar vesicles. Liposomes can be formed from a variety of phospholipids, such as cholesterol, stearylamine or phosphatidylcholines.

Compounds of the present invention may also be delivered by the use of monoclonal antibodies as individual carriers to which the compound molecules are coupled. The compounds or modulators of the present invention may also be coupled with soluble polymers as targetable drug carriers. Such polymers can include polyvinyl-pyrrolidone, pyran copolymer, polyhydroxypropylmethacryl-amidephenol, polyhydroxy-ethylaspartamidephenol or polyethyl-eneoxidepolylysine substituted with palmitoyl residues. Furthermore, the compounds or modulators of the present invention may be coupled to a class of biodegradable polymers useful in achieving controlled release of a drug, for example, polylactic acid, polyepsilon caprolactone, polyhydroxy butyric acid, polyorthoesters, polyacetals, polydihydro-pyrans, polycyanoacrylates and cross-linked or amphipathic block copolymers of hydrogels.

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

For oral administration, the compounds or modulators may be administered in capsule, tablet, or bolus form or alternatively they can be mixed in the animals feed. The capsules, tablets, and boluses are comprised of the active ingredient in combination with an appropriate carrier vehicle such as starch, talc, magnesium stearate, or di-calcium phosphate. These unit dosage forms are prepared by intimately mixing the active ingredient with suitable finely-powdered inert ingredients including diluents, fillers, disintegrating agents, and/or binders such that a uniform mixture is obtained. An inert ingredient is one that will not react with the compounds or modulators and which is non-toxic to the animal being treated. Suitable inert ingredients include starch, lactose, talc, magnesium stearate, vegetable gums and oils, and the like. These formulations may contain a widely variable amount of the active and inactive ingredients depending on numerous factors such as the size and type of the animal species to be treated and the type and severity of the infection. The active ingredient may also be administered as an additive to the feed by simply mixing the compound with the feedstuff or by applying the compound to the surface of the feed. Alternatively the active ingredient may be mixed with an inert carrier and the resulting composition may then either be mixed with the feed or fed directly to the animal. Suitable inert carriers include corn meal, citrus meal, fermentation residues, soya grits, dried grains and the like. The active ingredients are intimately mixed with these inert carriers by grinding, stirring, milling, or tumbling such that the final composition contains from 0.001 to 5% by weight of the active ingredient.

The compounds or modulators may alternatively be administered parenterally via injection of a formulation consisting of the active ingredient dissolved in an inert liquid carrier. Injection may be either intramuscular, intraruminal, intratracheal, or subcutaneous. The injectable formulation consists of the active ingredient mixed with an appropriate inert liquid carrier. Acceptable liquid carriers include the vegetable oils such as peanut oil, cottonseed oil, sesame oil and the like as well as organic solvents such as solketal, glycerol formal and the like. As an alternative, aqueous parenteral formulations may also be used. The vegetable oils are the preferred liquid carriers. The formulations are

WO 02/10339

PCT/US01/24469

prepared by dissolving or suspending the active ingredient in the liquid carrier such that the final formulation contains from 0.005 to 10% by weight of the active ingredient.

5 Topical application of the compounds or modulators is possible through the use of a liquid drench or a shampoo containing the instant compounds or modulators as an aqueous solution or suspension. These formulations generally contain a suspending agent such as bentonite and normally will also contain an antifoaming agent. Formulations containing from 0.005 to 10% by weight of the active ingredient are acceptable. Preferred formulations are those containing from 0.01 to 5% by weight of the instant compounds or
10 modulators.

This invention also relates to methods of doing business comprising the steps of determining the level of RNA expression for an RNA sample, wherein the RNA sample is amplified and fluorescently labeled, hybridizing the fluorescently labeled RNA to a
15 microarray containing a plurality of nucleic acid sequences representing a gene expression profile for a particular cell or tissue type (e.g., neuronal cell or disease tissue), and scanning the microarray for fluorescence detection; normalizing said fluorescence; and using a signature extraction algorithm (e.g., MaxCor or Mean Log algorithms) to create a gene expression profile. In a preferred embodiment, the RNA sample is obtained from a
20 patient and the patient sample includes, but is not limited to, blood, amniotic fluid, plasma, semen, bone marrow, and tissue biopsy.

The present invention also relates to business methods where gene expression profiles are used for analyzing test samples (e.g., patient samples). In a specific embodiment, this
25 method may be accomplished using the gene expression profile microarrays of the present invention. For example, a user (e.g., a health practitioner such as a physician) may obtain a sample (e.g., blood, tissue biopsy) from a patient. The sample may be prepared in-house, for example, using hospital facilities or the sample may be sent to a commercial laboratory facility. Briefly, RNA is extracted from the patient sample using methods that are well-known in the art (Sambrook, et al. (1989)). The RNA is, for example, then amplified by
30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

PCR, labeled with a fluorophore, and hybridized to a support representing a particular gene expression profile. The support is scanned for fluorescence and the results of the scan may be sent to a central gene expression profile database for analysis. In another embodiment, the sample itself is sent to a central laboratory facility for scanning analysis.

5 The scanning results may be sent to the central laboratory facility for analysis via a computer terminal and through the Internet or other means. The connection between the user and the computer system is preferably secure. In practice, the user may input, for example, information relating to the fluorescence scanning results of the support as well as additional information concerning the patient such as the patient's disease state, clinical
10 chemistry (e.g., red blood cell count, electrolytes), and other factors relating to the patient's disease state. The central computer system may then, through the use of resident computer programs, provide an analysis of the patient's sample and generate a gene expression profile reflecting the patient's genetic profile.

15 Those skilled in the art will appreciate that the methods and apparatus of the present invention apply to any computer system, regardless of whether the computer system is a complicated multi-user computing apparatus or a single user device such as a personal computer or workstation. Computer system suitably comprises a processor, main memory, a memory controller, an auxiliary storage interface, and a terminal interface, all of which
20 are interconnected. Note that various modifications, additions, or deletions may be made to the computer system within the scope of the present invention such as the addition of cache memory or other peripheral devices.

The processor performs computation and control functions of the computer system, and
25 comprises a suitable central processing unit (CPU). The processor may comprise a single integrated circuit, such as a microprocessor, or may comprise any suitable number of integrated circuit devices and/or circuit boards working in cooperation to accomplish the functions of a processor.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

In a preferred embodiment, the auxiliary storage interface allows the computer system to store and retrieve information from auxiliary storage devices, such as magnetic disk (e.g., hard disks or floppy diskettes) or optical storage devices (e.g., CD-ROM). One suitable storage device is a direct access storage device (DASD). A DASD may be a floppy disk
5 drive which may read programs and data from a floppy disk. It is important to note that while the present invention has been (and will continue to be) described in the context of a fully functional computer system, those skilled in the art will appreciate that the mechanisms of the present invention are capable of being distributed as a program product in a variety of forms, and that the present invention applies equally regardless of the
10 particular type of signal bearing media to actually carry out the distribution. Examples of signal bearing media include: recordable type media such as floppy disks and CD ROMS, and transmission type media such as digital and analog communication links, including wireless communication links.

15 The computer systems may also comprise a memory controller, through use of a separate processor, which is responsible for moving requested information from the main memory and/or through the auxiliary storage interface to the main processor. While for the purposes of explanation, the memory controller is described as a separate entity, those skilled in the art understand that, in practice, portions of the function provided by the
20 memory controller may actually reside in the circuitry associated with the main processor, main memory, and/or the auxiliary storage interface.

Furthermore, the computer systems may comprise a terminal interface that allows system administrators and computer programmers to communicate with the computer system,
25 normally through programmable workstations. It should be understood that the present invention applies equally to computer systems having multiple processors and multiple system buses. Similarly, although the system bus of the preferred embodiment is a typical hardwired, multidrop bus, any connection means that supports bidirectional communication in a computer-related environment could be used.

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

The main memory of the computer systems suitably contains one or more computer programs relating to the algorithms used to generate the gene expression profiles and an operating system. Computer program in memory is used in its broadest sense, and includes any and all forms of computer programs, including source code, intermediate code, machine code, and any other representation of a computer program. The term "memory" as used herein refers to any storage location in the virtual memory space of the system. It should be understood that portions of the computer program and operating system may be loaded into an instruction cache for the main processor to execute, while other files may well be stored on magnetic or optical disk storage devices. In addition, it is to be understood that the main memory may comprise disparate memory locations.

Another preferred embodiment of the present invention comprises a variety of business methods including methods for screening drug and toxicity effects on tissue or cell samples, as well as methods for the discovery of new drugs to treat disease. A further embodiment of the present invention comprises a business method of providing gene expression profiles for normal and disease tissues. Also within the scope of this invention are business methods providing diagnostics and predictors for patient samples.

The business methods of the present application relate to the commercial and other uses, of the methodologies of the present invention. In one aspect, the business methods include the marketing, sale, or licensing of the present methodologies in the context of providing consumers, *i.e.*, patients, medical practitioners, medical service providers, and pharmaceutical distributors and manufacturers, with the gene expression profiles provided by the present invention.

The gene expression profile database may be an internal database designed to include annotation information about the gene expression profiles generated by the methods of the present invention. Such information may include, for example, the microarray in which a given nucleic acid sequence was found, descriptive information about a related cDNAs associated with the sequence, tissue or cell source, sequence data obtained from external

WO 02/10339

PCT/US01/24469

sources, and preparation methods. The database may divide into two sections: one for storing the sequences and the other for storing the associated information. This database may be maintained as a private database with a fire-wall within the central computer facility. However, this invention is not so limited and the gene expression profile database may be made available to the public.

The database may be a network system connecting the network server with clients. The network may be any one of a number of conventional network systems, including a local area network (LAN) or a wide area network (WAN), as is known in the art (e.g., Ethernet). The server may include software to access database information for processing user requests, and to provide an interface for serving information to client machines. The server may support the World Wide Web and maintain a web-site and Web browser for client use. Client/server environments, database servers, and networks are well-documented in the technical, trade, and patent literature.

Through the Web browser, clients may construct search requests for retrieving data from a microarray database and a gene expression database. For example, the user may "point and click" to user interface elements such as buttons, pull down menus, and scroll bars. The client requests may be transmitted to a Web application which formats them to produce a query that may be used to gather information from the microarray database or gene expression database. In addition, the web-site may provide hypertext links to public databases such as GenBank and associated databases maintained by the National Center for Biotechnology Information (NCBI), part of the National Library of Medicine as well as, any links providing relevant information for gene expression analysis, genetic disorders, scientific literature, and the like.

The following examples illustrate the present invention without, however, limiting the same thereto.

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

EXAMPLE 1Derivation of KSHV-Infected DMVEC

Establishment of KSHV-infected DMVEC has been described previously in detail⁽⁴³⁾.

- 5 Briefly, dermal microvascular cells immortalized by retroviral expression of the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 (DMVEC) were infected with KSHV derived from the supernatant of tetradecanoyl phorbol acetate (TPA)-stimulated BCBL-1 cells. Infection was verified by DNA PCR for amplification of the KS330 BamHI fragment of the ORF 26 gene, RT-PCR for the spliced mRNA from the ORF29 gene⁽¹¹³⁾. The percentage of latently infected cells was determined by immunofluorescent staining for LANA/ORF73⁽⁶²⁾. Lytic induction was evaluated with antibodies against an early lytic protein ORF59/PF-8⁽¹¹⁰⁾ and a late lytic glycoprotein protein ORF K8.1A/B⁽¹¹¹⁾. DMVEC were used for experiments when >90% of cells expressed ORF73. In the absence of chemical induction, 2-5% of infected cells expressed ORF59 with approximately 10% of
- 10
- 15 ORF59-positive cells expressing K8.1A/B. Antibodies against viral proteins were a generous gift from Dr. Bala Chandran.

DNA Microarrays

DNA microarrays were prepared as described in Salunga et al. (57) by spotting PCR fragments of human cDNAs onto glass slides (Molecular Dynamics) using a microarrayer (Molecular Dynamics). One DNA microarrays was used: Mega-A chip: 4428 clones. Each clone was spotted in duplicate. Each microarray contained 30 plant genes as background controls⁽⁶⁰⁾. Hybridization signals were scanned and normalized as described⁽⁵⁷⁾.

25

Probe Preparation and Hybridization

Transformed dermal microvascular endothelial cells infected with KSHV were propagated as previously described⁽⁴³⁾. Two different uninfected and three different infected cell lines were either not induced or induced with PMA for 6 hours or 48 hours and harvested by trypsinization. Total RNA was prepared using RNeasy columns (Qiagen), after which

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

each sample was DNase (Promega) treated and re-purified on RNeasy columns. Messenger RNA was amplified once using a T7 polymerase linear amplification protocol⁽⁵⁷⁾. After amplification, the RNA was labeled by reverse transcription in the presence of Cy3-Cytidine.

5

Corresponding infected and non-infected samples were hybridized as described⁽⁵⁷⁾. Each labeled and amplified RNA was hybridized to at least two separate chips to enable a coefficient of variation (CV) determination, and the average intensity for genes with a CV below 50% was used for subsequent calculation of expression ratios. Results for each microarray were normalized to the 75th percentile as described⁽⁵⁷⁾.

10

RT-PCR for SCF and c-Kit

Total RNA was isolated from mock and KSHV-infected DMVEC using an RNeasy Total RNA kit (Qiagen, Chatsworth, CA) according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified by spectrophotometry and cDNA was synthesized using superscript reverse transcriptase (RT; Life Technologies, Gaithersburg, MD) at 200U/1 μ g of RNA. The primers used for amplification of c-Kit and SCF mRNA were: c-Kit, 5'-CTCAACCATCTGTGAGTCCA-3' (SEQ ID NO: 1) and 5'-AAGCCGTGTTTGTGGTGC CA-3' (SEQ ID NO: 2)⁽⁶³⁾, and SCF, 5'-CCATTGATGCCTTCAAGGAC-3' (SEQ ID NO: 3) and 5'-CTTCCAGTATAAGGCTCCAA-3' (SEQ ID NO: 4)⁽⁶⁶⁾, which yielded products of 242bp and 274 bp for c-Kit and SCF respectively. The cellular gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) was amplified from each sample as a control for cDNA synthesis. Consistent HPRT amplicates were obtained from samples under comparison. For each reaction, samples in the absence of RT were included. PCR products were resolved by agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining.

20

25

Immunofluorescent Staining

For detection of c-Kit protein, DMVEC monolayers were rinsed in PBS containing 1% bovine serum albumen (BSA) and 0.02% sodium azide (staining buffer), and stained with anti-c-Kit monoclonal antibodies, clone Nu-c-kit (Research Diagnostics, Flanders, NJ) or

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

Clone 57A5 (Ansell, Bayport, MN) followed by a goat anti-mouse FITC-conjugated antibody (Biosource International, Camarillo, CA). Both antibodies were used at a 1: 100 dilution in staining buffer for 60 minutes at 37°C. Stained cells were fixed in 2% paraformaldehyde, mounted and examined on a Nikon fluorescent microscope. Omission of primary antibody from duplicate monolayers revealed no non-specific binding of second conjugate. Immunofluorescent analysis was performed on mock and KSHV-infected DMVEC as well as DMVEC infected with adenovirus constructs expressing c-Kit proteins.

10 SCF ELISA

Supernatants were harvested from confluent monolayers of mock and KSHV-infected DMVEC after incubation periods ranging from 6 to 48 hours. SCF present in harvested supernatants was quantitated using an SCF ELISA detection kit (R&D) according to the manufacturers instructions.

15

Proliferation Assays

Proliferation of mock and KSHV-infected DMVEC, and the SCLC line HTB-172, was quantitated using an XTT-based assay. Cells were added to Primaria 96 well trays (Becton-Dickinson) at 1×10^4 or 5×10^4 cells/well. Exogenous SCF (20, 50 and 100 ng/ml) and STI 571 (0.01, 0.1, 1 and 10 μ M) were added 24 hours after plating as designated by the experimental protocol. XTT (Roche, Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) was added 48 hours later according to the manufacturers instructions. Absorbance was read after 4 to 6 hours on a microplate reader. The HTB-172 line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD).

25

Construction and Use of Adenovirus Vectors

A dominant-negative c-Kit mutant (c-Kit/DN) was constructed by insertion of a premature stop codon at Ser614 in the cytoplasmic domain using standard PCR-based mutagenesis. Truncation of c-Kit at this site deletes the ATP-binding and phosphotransferase domains without affecting the dimerization domain. Following DNA sequence analysis to confirm

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

mutagenesis, c-Kit/DN was cloned into an adenoviral expression vector as previously described⁽¹¹⁵⁾. This places c-Kit/DN under the control of a tet-responsive promoter/enhancer element and protein expression is driven by coinfection with an adenovirus expressing the 'tet-off' trans-activator (Ad/trans). Recombinant viruses were screened by PCR, and protein expression was confirmed by western immunoblot of infected cell lysates using a rabbit polyclonal antibody directed against the N-terminus of c-Kit (H-300; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). For over expression of c-Kit in DMVEC in the absence of KSHV, an adenovirus expressing wild-type c-Kit (c-Kit/WT) was constructed in an identical manner. All recombinant adenoviruses were plaque-purified and viral stocks were grown and titered on 293 cells. For DMVEC infection, monolayers were incubated with c-Kit/WT or c-Kit/DN at a multiplicity of infection (MOI) of 1:10 to 1:100 and Ad/trans at an MOI 1:10 for four hours at 37°C. Optimal MOI doses were previously determined. Virus stocks were diluted in medium containing 2% human serum and polybrene (4 µg/ml). As a control for infection efficiency and non-specific effect of adenovirus infection, duplicate monolayers were infected with an adenovirus vector expressing green fluorescent protein (Ad/GFP). Infection with Ad/GFP and Ad/trans at MOI of 1:100 and 1:10 respectively allowed infection of >80% of cells in culture with minimal cytopathic effect.

20 Transformation Assays

To promote a transformed phenotype, KSHV-infected DMVEC were cultured post-confluency in 35mm Primaria culture dishes. Under these conditions, cells assumed a pronounced spindle morphology, exhibited a disorganized growth pattern and developed multilayered foci within the monolayer. Uninfected DMVEC cultured under similar conditions displayed growth inhibition and maintained a cobblestone phenotype with organized cell borders. Post-confluent cells were infected with adenovirus constructs as described above or exposed to STI 571 at increasing doses (0.01, 0.1, 1 and 10 µM). STI 571 was replenished every 48 to 36 hours using dilutions freshly prepared from a frozen stock. Cells were examined daily for evidence of phenotypic change using a phase-contrast microscope and results recorded photographically.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

Reagents

The 2-phenylaminopyrimidine derivative STI 571 was developed and generously provided by Dr. Elisabeth Buchdunger (Novartis, Basel, Switzerland). Stock solutions of STI 571 were prepared at 10 mmol/L by dissolving 5 mg STI 571 in 1 ml PBS, and used fresh or stored at -20°C. Working solutions were diluted in Endothelial-SFM immediately prior to use.

PDTC (pyrrolidinedithiocarbamate), trans-retinoic acid, and SB203580 were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and CGRP-8-37 peptide were purchased from Bachem. InCELLect AKAP St-H131 and St-H131-control peptide were purchased from Promega Corporation (Madison, WI). Haloperidol and phorbol-112-myristate-13-acetate (PMA) were purchased from Calbiochem (San Diego, CA). T22 was purchased American Peptides International, Inc. (Sunnyvale, CA). Ganciclovir, BQ788 was purchased from Peptides International, Inc. (Louisville, KY). 15-deoxy⁽¹²⁻¹⁴⁾ prostaglandin J2 was purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI).

RT PCR

KSHV genes ORF 64 and K12 (kaposin) were used as reverse transcriptase PCR (RT-PCR) templates as described previously⁽⁴³⁾. ORF 65 sequences were amplified with primers 5-GGCGTTAATTAAGCTAGCATGTCCAACCTTAAGGTGAGA (SEQ ID NO: 5) and 5'-AAACCTATTTCTTTTGCCAGAGG (SEQ ID NO: 6). Cellular genes (HPRT, GAPDH, or -actin) were amplified from each sample as a control for cDNA synthesis. PCR products were visualized following electrophoresis on agarose-ethidium bromide gels.

Global RNA Changes in Cells Infected with KSHV

We have previously described an in vitro model based on KSHV infection of dermal microvascular endothelial cells (DMVEC) where the majority of virus-challenged cells

WO 02/10339

PCT/US01/24469

harbor latent virus and up to 40% of cells can be chemically induced to undergo lytic replication⁽⁴³⁾. Due to the high percentage of cells harboring latent virus and the high efficiency of induction of lytic replication in this system, it was possible to directly isolate RNA from tissue culture cells without further enrichment of infected cells. RNA samples
5 from three infected and two uninfected DMVEC lines were prepared from non-induced cells and cells induced with PMA for 6 and 48 hours. RNA of non-infected cells and infected cells was converted into cy-3 fluorescently labeled cDNA, respectively and hybridized to a DNA chips displaying a total of 4428 PCR fragments. Each chip contained two sets of the PCR fragments and hybridizations were performed in duplicate so that both
10 intra- as well as interchip variation was controlled for. A comparison of two independent hybridizations is shown in Figure 1c. Variations between chip to chip signals were less than 1.8 fold for 99.9 % of the signals. Therefore ratios greater than 1.8 were considered significant. All hybridization signals obtained with the same clone were used to calculate the arithmetic mean. individual clones were found to be induced more than 1.8 fold in at
15 least 2 out of three experiments per time point, whereas other clones were repressed more than 1.8 fold (ratio < 0.55) for at least one of the three time points analyzed. Ratios for all clones are shown in Table 2, If several clones represented the same gene, results for all individual clones are shown. Variations in signal ratios observed in these cases are caused by the fact that hybridization signals can differ for different segments of the same gene.

20

Genes Involved in Angiogenesis

Among the induced genes in KSHV-infected cells were several members of the extracellular matrix metalloproteinases (MMP) family (table 2). MMPs degrade components of the extracellular matrix (ECM). Various types of MMPs were up regulated
25 as well as ECM degrading proteases. The present invention also, therefore, includes methods and compositions for the modulation of endothelial cell transformation, invasiveness of transformed endothelial cells, and neo-vascularization.

The data further shows that KSHV modulates the gene expression pattern of factors
30 regulating the proliferation of endothelial cells. Induction of pro-angiogenic factors by

WO 02/10339

PCT/US01/24469

KSHV could impose a growth advantage over uninfected cells, which might explain the observation that the percentage of KSHV-infected endothelial cells increases during progression of KS⁽²⁰⁾. The present invention is, therefore, also drawn to methods and compositions for the modulation of endothelial cell proliferation, including increasing or decreasing endothelial cell proliferation.

Interferon-Induced Genes

Another group of genes strongly induced in KSHV-infected cells is known to be induced by interferon (Table 2).

10

Inflammation

Several pro-inflammatory cytokines and several pro-inflammatory genes were upregulated by KSHV (Table 2). The strong induction of these pro-inflammatory and chemoattractant cytokines during the lytic phase of infection compared to the latent phase, suggests that KSHV-infected cells play a major role in the attraction of monocytes and leukocytes to KS tumors.

15

Differentiation Markers

KSHV modulated the expression pattern of several known differentiation markers as well as genes with known functions in cell differentiation (Table 2). Most prominently c-kit was increased above its normal expression level in endothelial cells. The KSHV-regulated differentiation markers are representative of different mesenchymal lineage originating from bone marrow stromal cells. Adipocytes, osteoblasts and chondrocytes are derived from multipotent mesenchymal stem cells⁽⁵⁴⁾ whereas ECs and hematopoietic cells differentiate from a common progenitor, the hemangioblast⁽¹⁸⁾. Expression of differentiation markers corresponding to these various lineages indicates that KSHV induces dedifferentiation of infected endothelial cells.

20

25

30

Expression of c-Kit in DMVEC is Up-Regulated by KSHV Infection

One of the most consistently upregulated genes in the DNA microarray analysis of KSHV-infected DMVEC was the *c-Kit* gene (Table 2). In agreement with microarray results, enhanced expression of c-Kit mRNA and surface protein on KSHV-infected DMVEC was shown by RT-PCR (Figure 1A), and immunofluorescent staining (Figure 1B), respectively. Earlier studies have shown that endothelial cells from umbilical vein and aorta co-express c-Kit and the SCF ligand^(100, 101, 102, 103). To determine whether DMVEC expressed SCF in addition to c-Kit, we performed RT-PCR analysis for SCF mRNA. Although SCF mRNA was readily detected in both KSHV-infected and uninfected DMVEC, indicating co-expression of receptor and ligand in these cells, no virus-induced change in SCF expression levels was noted (Figure 2A). Due to alternative RNA splicing, the SCF protein exists in both membrane-bound and soluble forms⁽¹⁰⁴⁾. The smaller PCR product depicted in Figure 2A reflects the membrane bound form of the protein, suggesting that the ratio of membrane-bound to soluble SCF in DMVEC is also unaffected by KSHV infection. RT-PCR using isoform-specific primers to directly distinguish between membrane-bound and soluble SCF transcripts⁽¹⁰⁵⁾ confirmed this conclusion. Consistent with RT-PCR results, analysis of DMVEC culture supernatants using a SCF-specific ELISA to measure secretion of SCF showed no significant changes in protein levels associated with KSHV infection (Figure 2B). Thus, if KSHV infection alters c-Kit/SCF regulated signaling pathways, the contribution of virus infection is presumably at the level of c-Kit expression.

c-Kit expression in KSHV-infected DMVEC promotes proliferation in response to exogenous SCF

To examine whether KSHV-induced up-regulation of c-Kit had functional consequences, we tested whether the mitogenic response of DMVEC to exogenous SCF was enhanced following KSHV infection. Mock- and KSHV-infected DMVEC were cultured in growth factor depleted medium in the absence and presence of recombinant SCF and proliferation was measured using an XTT-based dye reduction assay⁽¹¹²⁾. Both mock- and KSHV-infected DMVEC exhibited a dose-dependent proliferation in response to exogenous SCF

WO 02/10339

PCT/US01/24469

that was maximal at 50 to 100 ng/ml. However, infected DMVEC were significantly more responsive to exogenous ligand than mock-infected DMVEC (Figure 3A). In mock-infected cultures, the increase over basal proliferation in the absence of recombinant SCF was never more than 40%, while proliferation of KSHV-infected DMVEC was increased
5 by as much as 85%. During KS disease, an enhanced capacity of KSHV-infected endothelial cells to respond to SCF produced by adjacent endothelial cells, or by macrophages and mast cells infiltrating the KS lesion, would promote more rapid growth of virus infected cells.

10 The c-Kit tyrosine kinase inhibitor STI 571 inhibits the proliferation of KSHV-infected DMVEC

To confirm a role for c-Kit/SCF in the enhanced growth response of KSHV-infected DMVEC, proliferation of infected DMVEC in response to exogenous SCF was measured in the presence of increasing concentrations of a 2-phenylaminopyrimidine derivative, STI
15 571 (formally known as CGP 57148B)^(106, 97) an inhibitor of c-Kit tyrosine kinase activity⁽⁹⁹⁾. As illustrated in Figure 3B, the proliferative response of KSHV-infected DMVEC to exogenous SCF was completely inhibited by a 1 μ M dose of STI 571. Testing of DMVEC viability by trypan blue exclusion showed that growth inhibition was not due to non-specific cytotoxicity of STI 571. In addition, STI 571 had no effect on the capacity
20 of the human Jurkat T cell line to proliferate in response to exogenous IL-2. The capacity of STI 571 to inhibit KSHV-infected DMVEC proliferation confirms a role for c-Kit signaling in the growth response of KSHV-infected cells and further suggests a novel strategy for KS therapy.

25 Expression of C-Kit in DMVEC is Sufficient for Induction of Morphological Transformation

While induction of growth signaling loops is the most widely described consequence of abnormal c-Kit/SCF activity in tumor cell lines, enhanced c-Kit expression has also been directly associated with changes in cell morphology and acquisition of a transformed
30 phenotype. For example, ectopic expression of c-Kit in murine fibroblasts induces

WO 02/10339

PCT/US01/24469

morphologic alteration, growth in soft agar and tumorigenicity in nude mice^(107, 108, 109). We previously demonstrated that KSHV-infected DMVEC develop a spindle morphology and characteristics of transformation including disorganized growth, focus formation and anchorage-independent growth in semi-solid agar⁽⁴³⁾. To determine whether c-Kit up-regulation was sufficient to induce the morphologic changes caused by KSHV infection, c-Kit was over-expressed in normal DMVEC in the absence of any KSHV genes. The c-Kit over-expression was achieved by infecting DMVEC with an adenovirus vector expressing wild type c-Kit protein (Ad/c-KitWT) along with an adenovirus expressing a transactivator (Ad/trans) necessary for induction of c-Kit gene expression. To control for infection efficiency and non-specific effects of adenovirus infection, parallel DMVEC cultures were infected with an adenovirus expressing green fluorescent protein (Ad/GFP) and Ad/trans. GFP, as visualized by fluorescence microscopy, was expressed at high levels in the majority (>80%) of DMVEC. Immunofluorescent staining of DMVEC infected with Ad/c-KitWT at a comparable multiplicity of infection (MOI) showed strong surface expression of the c-Kit protein on approximately 50% of cells. As illustrated in Figure 4A, c-Kit over-expression had a dose-dependent effect on DMVEC morphology that was identical to that observed following KSHV infection. Ad/c-KitWT-infected cells became spindle-shaped and disorganized, with overgrowth of the monolayer and a loss of discrete cell borders. Spindle formation was restricted to those cells that expressed high levels of c-Kit protein on the cell surface (Figure 4B). Morphological changes were first noted at day 5 post-infection (PI), and were prominent by day 10 PI. The changes were specific to adenovirus-infected cultures over-expressing c-Kit, since DMVEC infected with Ad/GFP were maintained for up to three weeks without phenotypic alteration. Addition of exogenous SCF to Ad/GFP or Ad/c-KitWT-infected DMVEC did not induce or accentuate morphologic change, and adenovirus infection did not alter SCF production by DMVEC. These results show that the endogenous SCF produced by DMVEC is sufficient to activate the pathways leading to morphologic transformation. Importantly, these studies demonstrate that increased expression of c-Kit in DMVEC is sufficient to induce morphologic changes comparable to those observed following KSHV infection of DMVEC.

Inhibition of C-Kit Activity Reverses KSHV-Induced Transformation

To directly test whether KSHV-induction of c-Kit is necessary for virus-induced transformation, the consequence of inhibiting c-Kit signaling in KSHV-transformed DMVEC was evaluated. As illustrated in Figure 5A, KSHV-transformed DMVEC exhibit disorganized growth, loss of contact inhibition and focus formation in monolayer culture. However, following treatment of DMVEC with STI 571 to inhibit endogenous c-Kit tyrosine kinase activity, focus formation was inhibited and an organized monolayer with distinct cell margins was re-established. The effect of STI 571 was dose-dependent and complete at a drug concentration of 1 μ M. The loss of transformed growth characteristics was not due to drug-induced cytotoxicity since removal of STI 571 led to regeneration of the transformed phenotype, even after exposure of cells to a 10 μ M dose. Uninfected DMVEC exhibited normal growth with an organized cobblestone phenotype when maintained at confluency, and exposure to STI 571 had no effect on cell morphology or viability.

Because STI 571 is also active against the Abl and platelet-derived growth factor (PDGF) β receptor tyrosine kinases^(106, 98), the inhibitory activity in DMVEC could imply a role for one or other of these receptors in KSHV-induced transformation. DNA microarray analysis of DMVEC did not reveal any KSHV-induced up-regulation of Abl, PDGF or PDGF-receptor genes suggesting that c-Kit was the primary drug target. However, to confirm a central role for c-Kit in KSHV-induced DMVEC transformation, we designed a complementary approach to specifically inhibit c-Kit signaling in KSHV-transformed DMVEC. In this approach, a dominant negative c-Kit protein lacking the cytoplasmic ATP-binding and phosphotransferase domains necessary for c-Kit signaling (Ad/c-KitDN) was expressed in KSHV-infected cells using the adenovirus delivery system outlined above. In control cultures infected with Ad/GFP alone, no change in the transformed phenotype was observed. In contrast, expression of the dominant negative c-Kit protein in KSHV-transformed DMVEC resulted in a dramatic loss of transformed foci with cells flattening out and becoming organized in a manner identical to that observed following STI 571 treatment (Figure 5B). The ability to reverse KSHV-induced morphological

WO 02/10339

PCT/US01/24469

transformation through specific inhibition of c-Kit activity demonstrates a critical role for c-Kit signaling in KSHV-induced transformation of endothelial cells and supports a role for up-regulation of c-Kit as a factor in KS tumorigenesis.

5 Function of Host Gene Products Induced During Lytic Replication

The induction or repression of cellular pathways by viral infection is either a cellular defense mechanism, a directed modulation of host gene expression by some of the viral gene products, or a neutral bystander effect. One way to distinguish between these possibilities is by examining whether or not the inhibition or activation of a given cellular
10 pathway affects viral replication.

Host genes specifically induced during lytic replication were identified by comparing hybridization intensities between KSHV-infected cells (17) induced for 6 hours or 48 hours with corresponding non-induced KSHV-infected cells together with untreated and
15 PMA-treated non-infected cells. Genes showing hybridization signals at least two-fold above the maximum hybridization signal obtained in any of the controls were selected for further analysis. The 23 genes that fulfilled these criteria are shown in Table 1. Genes up-regulated 6 and 48 hours after PMA induction of KSHV-infected cells targeted by various compounds. Direct target is the gene targeted by the compound, indirect target is the gene
20 up-regulated on the chip if different from the gene targeted.

To evaluate the significance of these genes for viral replication, we selected compounds known to modulate either the induction of specific host genes or the function of the gene product. For most genes it was possible to identify specific antagonists. Several genes
25 induced at 6 hours post-induction are known to be induced by pro-inflammatory stimuli. Well-known examples are A20, IL-8, ICAM-1 and cox-2. However, other genes in this group, such as jagged1, MMP-10 or angiopoietin-2 have also been shown to be induced by inflammatory signals. Since activation of NFkB is essential for this transcriptional response, we analyzed whether 1-pyrrolidinedithioic acid (PDTC), an inhibitor of
30 NFkB activation⁽⁶¹⁾, would modulate the expression of KSHV genes during lytic

WO 02/10339

PCT/US01/24469

replication. Among other genes induced at 6 hours was the purine nucleoside phosphorylase (PNP) that reversibly catalyzes the phosphorolysis of purine nucleoside to their respective purine bases and the corresponding pentose-1-phosphate. PNP activity can be inhibited by 8-aminoguanosine⁽⁵⁸⁾. Four G-protein coupled receptors, the calcitonin gene-related peptide receptor (CGRP-1), a human homolog of rat RDC1, the endothelin B receptor, and the chemokine receptor (and HIV-coreceptor) CXCR4, were also specifically induced during the lytic cycle. Both RDC1 and CGRP-1 can be inhibited with a truncated version of its ligand, the calcitonin gene-related peptide^(59, 60). Endothelin binding to the endothelin B receptor can be blocked by the antagonist peptide BQ 788⁽⁶¹⁾. Likewise, stromal cell derived factor-1 binding to CXCR4, as well as HIV fusion, can be inhibited by peptide T22. PDGF-mediated induction of MCP-1 can be inhibited with trans-retinoic acid⁽⁶³⁾. Several genes involved in signal transduction were induced during lytic infection. Hsp27 is part of the stress pathway activated by p38MAPK, and the MAPK-mediated phosphorylation of Hsp27 can be inhibited by SB203580. Gravin belongs to a family of anchoring proteins responsible for subcellular localization of protein kinase A⁽⁶³⁾. The interaction between Gravin and PKA can be inhibited with the AKAP-fragment peptide Ht31 both in vitro and in cells^(64, 65). Type I sigma receptor activation augments signaling from the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor⁽⁶⁶⁾, and its activity can be modulated by the calcitonin gene-related peptide (CGRP) and neuropeptide Y (NPY) receptors⁽⁶⁷⁾. The type 1 sigma receptor is antagonized by the anti-psychotic drug haloperidol.

Cells were treated with inhibitory compounds or peptides for one hour and lytic replication was induced by PMA treatment for 48 hours. Ganciclovir was used as control compound for inhibition of KSHV-replication and late gene expression⁽¹⁰⁾. After 48 hours, cells were harvested and expression of the latent gene K12 as well as the late gene ORF 65 was analyzed by RT-PCR. For control, expression of cellular genes α -actin or HPRT was monitored. As expected Ganciclovir did not interfere with latent gene expression but inhibited ORF 65 transcription (Figure 7). In contrast, most other inhibitors did not interfere with either KSHV latent or late gene expression. However, both Ht31 and

WO 02/10339

PCT/US01/24469

Haloperidol inhibited late gene expression, but not latent gene expression. Since both inhibitors potentially interfere with PKC signaling, we examined whether Ht31 or Haloperidol would inhibit the PMA-mediated induction of immediate early genes. However, neither compound prevented induction of the immediate early gene K3. In addition, the peptide Ht-31 inhibits the association between A kinase anchoring proteins (AKAPs) and PKA (21, 64). 25 μ M Ht-31 inhibited ORF65 expression without affecting the level of K12 RNA (Figure 7B, lane 6). Therefore we conclude that the signal transduction pathways regulated by the type I sigma receptor and AKAPs are required for lytic progression of KSHV.

10

The PKA-AKAP interaction and the type I Sigma receptor are required for ORF 65 expression. The AKAP Gravin (AKAP250) was initially identified as an autoantigen in patients suffering from myasthenia gravis⁽²⁵⁾. Gravin may be involved in signaling from beta-2 adrenergic receptors⁽⁶⁴⁾, and may mediate cross-talk between the PKA and PKC pathways⁽⁴⁷⁾. To corroborate that Gravin was up-regulated in infected cells, an RT-PCR was performed (Figure 7A). The PCR analysis confirmed that Gravin was overexpressed in infected cells, the highest level of expression being observed at 6 and 48 hours post-induction (Figure 7A).

20

There is no specific inhibitor of Gravin identified, however the Ht-31 peptide derived from the PKA R-II binding domain of the human thyroid AKAP inhibits the AKAP/PKA interactions in vivo and in vitro^(21, 64). A steared version of this peptide is membrane permeable and can block the AKAP/PKA interaction in tissue culture. A requirement for PKA signaling can be inferred from the up-regulation of Gravin, and to further investigate the requirement for the AKAP/PKA interaction for KSHV late gene expression, infected and uninfected cells were treated with steared Ht-31 at two concentrations (Figure 7B). At both the 25 μ M and 5 μ M concentrations, Ht-31 efficiently repressed ORF 65 expression to levels below those seen in un-induced cells (Figure 4B, compare lanes 2-3 with 1). A steared control peptide that is unable to interact with PKA, Ht-31P, had no effect on late gene expression (Figure 7B, lanes 4-5). These results were reproducibly

30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

obtained using different strains of infected cells. These data demonstrate that PKA signaling is required for expression of the ORF 65 gene. It is not possible to conclude whether the inhibitory effect of Ht-31 occurs through Gravin or any other AKAP, since Ht-31 inhibits a wide range of AKAP/PKA interactions.

5

The type I Sigma receptor is expressed in a wide variety of cell types⁽⁶¹⁾, and may be involved in regulation of intracellular calcium concentrations. To corroborate that the type I Sigma receptor was up-regulated in infected cells, an RT-PCR assay was performed (Figure 7C). The RT-PCR analysis confirmed that the Sigma receptor is expressed at low levels in latently infected cells, and significantly induced during lytic replication (Figure 7C). However, the RT-PCR analysis suggests that the type I Sigma receptor is significantly induced already 6 hours post-induction (Figure 4C, lane 2), in contrast to the data obtained from the chip. This may reflect a certain variation between experimental conditions, or a variation between different strains of infected cells. However, the data confirms that the Sigma receptor is significantly up-regulated during the lytic phase.

10

The type I Sigma receptor is antagonized by the antipsychotic drug Haloperidol⁽⁶⁶⁾. To investigate the requirement of Sigma receptor function for late gene expression, cells were treated with 5 μ M Haloperidol for 1 hour prior to PMA addition. RT-PCR analysis demonstrated that whereas Haloperidol did not affect expression of the latent K12 gene, ORF 65 expression was significantly reduced (Figure 7D, lane 5). The inhibition of late gene expression was more complete with Haloperidol than with Ganciclovir (Figure 7D, lanes 5-6). In contrast, the purine nucleotide phosphorylase inhibitor 8-aminoguanosine (8-AMG) had no effect on viral gene expression (Figure 7D, lane 4). These data were reproduced using different strains of infected cells thus confirming that the type I Sigma receptor is required for ORF 65 expression. Our results demonstrate that DNA microarray analysis can be used to identify cellular factors required for late gene expression, and thus represents a new tool for antiviral research.

15

EXAMPLE 2**Antisense Therapy Utilizing a c-kit Antisense Oligomer Inhibits c-kit Protein Expression and Prevents Development of the Transformed Phenotype in KSHV-Infected DMVEC.**

- 5 To investigate the ability of antisense therapy to ameliorate the phenotypic changes associated with KSHV-induced c-kit expression in DMVEC, we designed a phosphorodiamidate antisense (PMO-AS) oligomer targeting the start codon of c-kit to block protein translation. PMO-AS oligomers are thought to inhibit translation by steric hindrance and have the advantage of not activating RNAse H. To facilitate endocytic
- 10 uptake of the oligomer and delivery to the cytosol, ethoxylated polyethylenimine (EPEI) that forms an anionic complex with the PMO-AS was used as a delivery reagent. A FITC moiety was incorporated into the oligomer to allow monitoring of loading efficiency by fluorescence microscopy.
- 15 An initial titration experiment on KSHV-infected DMVEC was performed with a range of different oligomer/EPEI volumes. Loading 1.25 nMol oligomer with 2.5 μ l EPEI reagent per 35mm dish allowed efficient antisense uptake without non-specific EPEI-induced toxicity. To verify that the c-kit oligomer was effective in down-regulating c-Kit, KSHV-infected DMVEC were loaded with the anti-c-kit oligomer-EPEI complex and incubated
- 20 for 3 hours at 37°C in serum-free medium to allow for oligomer uptake. As controls, DMVEC cultures were treated with EPEI reagent and sterile water or sterile water alone, or were loaded with an oligomer/EPEI complex containing an irrelevant FITC-tagged oligomer. Upon removal of the oligomer-EPEI solution, cell monolayers were rinsed in serum-free medium, fed with complete medium and examined daily to evaluate oligomer
- 25 uptake and stability. A strong cytoplasmic fluorescence was observed by day 1 post loading and was well maintained for up to 10 days. On day 4 post loading, cells were fixed and stained with a monoclonal antibody against c-kit and a goat-anti-mouse-Alexa conjugate to evaluate c-kit expression levels. While c-kit expression was strong in cells treated with control oligomer or delivery reagents only, cultures treated with the c-kit
- 30 oligomer demonstrated significantly decreased c-kit levels. Importantly, occasional

WO 02/10339

PCT/US01/24469

individual cells that had not taken up the c-kit oligomer (FITC-negative) still exhibited strong c-kit expression and could be observed adjacent to oligomer-loaded cells (FITC-positive) that consistently displayed negligible c-kit expression. A representative example of this observation is shown in Figure 8A and strongly suggests that antisense activity is directly responsible for the observed reduction in c-kit expression.

We next ascertained whether antisense therapy was effective in preventing the KSHV-induced transformation in which c-kit overexpression was shown to play a crucial role. For these experiments, KSHV-infected DMVEC were grown to confluence in 35mm dishes, loaded with antisense as described above, and maintained in a post-confluent state to allow focus formation. This approach was favored over loading of cells that had already formed foci since trial experiments revealed that cells with pre-formed foci were abnormally sensitive to EPEI toxicity. As expected from our previous experiments, post-confluent KSHV-infected DMVEC exhibited loss of contact inhibition and formed disorganized multi-layered foci that were extremely evident by day 6 post-loading (Figure 8B). In contrast however, cells loaded with 1.25 nMol of the anti-c-kit oligomer and 2.5 μ l EPEI did not develop foci but maintained a quiescent contact-inhibited monolayer (Figure 8C). Cells cultured with 2.5 μ l EPEI alone showed similar focus formation to untreated cells (Figure 8D). Mock-infected KSHV monolayers became quiescent at confluence and did not form foci regardless of antisense treatment, but no treatment-related toxicity was observed. Our previous experiments have demonstrated a direct role for c-kit overexpression in DMVEC transformation. The inability of cultures treated with a c-kit antisense oligomer to develop a transformed phenotype strongly suggests an effective role for antisense in inhibiting c-kit function.

25

Table 1

	Direct Target	Indirect Target	Inhibitor
5	NF- κ B	Jagged1	PDTC
	NF- κ B	Heparin-binding EGF-like	PDTC
	NF- κ B	Cyclooxygenase-2	PDTC
	NF- κ B	A20	PDTC
10	NF- κ B	MMP-10	PDTC
	NF- κ B	ADAMTS-1	PDTC
	NF- κ B	IL-8	PDTC
	NF- κ B	ICAM-1	PDTC
	NF- κ B	Angiotensin-2	PDTC
15	NF- κ B	Alpha-1 Integrin	PDTC
	RAR	PDGF-B	Trans-retinoic acid
	p38 MAPK	Hsp27	SB203580
	CGRP-1		CGRP[8-37]
	Gravin/AKAPs		Ht-31
20	Type I Sigma receptor		Haloperidol
	Purine nucleoside phosphorylase		8-aminoguanosine
	RDC1		CGRP[8-37]
	CXCR-4		t22
	Endothelin B receptor		BQ 788
25			

WO 02/10339

PCT/US01/24469

TABLE 2											
CELLULAR TRANSCRIPTS CHANGING MORE THAN 1.8 FOLD IN TWO OUT OF THREE INFECTED CULTURES AT ONE OF EACH TIME POINTS											
GeneID	Name	17_0	18_0	19_0	17_6	18_6	19_6	17_48	18_48	19_48	
N39161	Thrombospondin / collagen I receptor CD36	2.14	14.22	25.83	-4.26	13.69	22.11	5.3	6.53	22.93	
N57594	Hypothetical protein DKFZp761J17121	-2.38	-3.63	-3.88	2.5	-4.31	-5.38	3.22	-3.00	-3.71	
H79047	Insulin-like growth factor binding protein-2	2.17	-2.05	-3.74	1.94	-2.19	-3.44	1.35	-2.56	-2.44	
N49629	Diubiquitin encoded in MHC	3.97	-1.90	-2.62	2.91	6.14	6.09	1.06	-1.57	1.05	
AA034213	homolog to putative transmembrane protein E3-16	1.92	3.41	6.06	1.7	2.74	4.97	2.15	3.85	5.19	
N20798	c-kit	1.82	2.55	4.75	-1.03	4.21	-2.39	2.67	6.34	5	
AA434102	galectin-9	3.15	3.07	2.18	1.9	3.61	1.48	1.68	6.33	4.51	
R49999	solute carrier family 19 (folate transporter) 1	1.89	4.06	6.19	-1.48	3.69	4.22	-1.38	2.36	2.79	
AA456878	B-myb	2.12	3.09	5.71	1.38	-2.72	-1.88	2.24	-1.19	-1.22	
AA448157	dioxin-inducible cytochrome P450 (CYP1B1)	2.83	-4.94	10.75	3.27	-1.62	-2.31	-1.08	-1.08	-1.15	
N31467	Coxsackie virus and adenovirus receptor	1.81	6.84	8.12	1.69	3.03	5.43	-1.33	1.45	1.02	
H84153	cyclin D2	-1.88	-2.09	2.51	-1.31	-1.57	-1.20	-1.41	-1.30	-1.09	
AA453774	regulator of G-protein signalling 16	-2.03	1.06	-2.35	-2.34	4.29	5.71	-2.55	-2.47	4.21	
N53172	orphan G protein-coupled receptor (RDC1)	3.61	-1.70	4.45	3.4	46.62	89.86	7.56	17.93	32.21	
H69048	ESTs	1.23	6.31	15.86	2.46	7.21	16.11	2.63	3.06	8.23	
T70413	ESTs	1.02	3.07	4.44	2.15	4.21	4.32	1.41	-4.11	-3.63	
N34827	beta-glucuronidase	2.33	1.76	3.28	1.89	2.08	2.81	1.42	1.52	1.59	
N54338	B7 homolog 3	2.63	-1.40	2.7	2.67	1.66	1.94	2.74	5.69	7.77	
AA001614	insulin receptor	NA	1.87	3.07	1.53	3.81	2.32	7.16	4.64	4.38	
AA410567	mRNA expressed in osteoblast AB000115	7.54	8	1.46	4.21	8.07	2.00	3.18	5.86	1.17	
X54925	Matrix metalloproteinase 1	5.31	-2.96	1.19	7.6	6.21	1.15	15.63	2.44	-1.03	
W95682	myosin-I, Myr 1c (alternatively spliced) - ra	1.57	-1.83	2.85	-1.12	2.3	2.57	2.08	1.6	2.01	
AA423867	Prepromulterin	NA	8.58	4.75	-2.09	11.04	15.48	-6.6	4.63	4.23	
AA457158	Inhibitor of DNA binding 1 (Id1)	NA	3.68	5.73	-2.82	3.4	7.36	-5.06	-2.00	2.11	
AA070226	selenoprotein P, plasma, 1	-1.09	3.3	3.3	1.15	-2.41	5.16	-1.99	3.5	10.84	
R96668	15	-1.07	5.15	36.9	-1.4	-4.23	9.15	-3.03	6.64	15.86	
AA453909	Hyaluronoglucosaminidase 2	1.82	1.52	1.86	1.17	3.31	2.68	1.74	1.9	1.95	
AA088517	peroxisome proliferative activated receptor gamma	1.36	3.99	5.53	1.61	2.1	3.25	-1.05	1.89	2.21	
AA236617	Rac/Cdc42 guanine exchange factor (GEF) 6	1.04	-2.08	-2.92	-1.09	-1.90	-3.67	1.06	-2.10	-2.52	
AA436591	highly similar to proto-oncogene c-mer	-1.51	-2.47	-2.82	-1.11	-2.38	-2.85	-1.52	-1.90	-2.10	
AA443659	zinc finger protein 143 (clone pHZ-1)	1.04	1.87	3.53	1.19	2.87	5.6	1.14	2.06	2.75	
AA464644	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	-1.09	3.48	7.62	-1.15	6.03	13.77	1.5	8.71	17.33	
AA482198	mannose phosphate isomerase	-1.33	-1.95	-2.55	-1.03	-2.25	-2.81	-1.00	-2.89	-2.61	

WO 02/10339

PCT/US01/24469

GeneID	Name	17_0	18_0	19_0	17_6	18_6	19_6	17_48	18_48	19_48
AA487787	von Willebrand factor	-1.24	4.19	8.71	1.22	4.42	8.09	-1.65	3.35	4.25
AA490477	myosin heavy chain-B	1.72	3.82	6.04	1.77	3.47	4	1.27	3.02	3.02
H20758	fasciculation and elongation protein zeta 1 (zyglin I)	1.43	3.69	3.31	1.12	-2.89	-2.89	-1.07	-2.89	-2.83
H65042	ESTs	-1.06	2.33	3.68	1.12	2.59	3.48	-1.12	2.03	2.79
R01796	androgen induced protein	-1.33	-2.59	-3.06	-1.10	-2.69	-3.50	-1.35	-3.40	-3.80
R06370	ESTs	-1.10	2.26	3.16	1.06	3.03	3.85	-1.17	-2.05	-2.32
R66101	Neuritin	-1.01	4.84	7.42	-1.21	6.77	15.92	1.05	-5.20	6.67
R69677	ESTs	-1.21	4.44	13.33	1.06	-3.00	-5.69	-1.13	-3.47	-4.60
R91083	DKFZP586P2219 protein	-1.36	2.75	3.5	-1.07	2.95	4.18	-1.07	-2.26	-2.16
T59334	cysteine and glycine-rich protein 2	1.40	-2.68	-2.26	1.03	-2.60	-3.05	1.08	-2.00	-2.22
T67558	androgen induced protein	1.54	3.4	3.28	1.34	3.52	4.35	1.58	3.9	-3.52
W02617	ESTs	1.76	4.63	11.46	1.5	5.15	6.9	1.37	6.1	8.35
AA026831	a type III receptor tyrosine kinase	NA	3.33	3.95	-1.05	4.99	7.3	NA	4.38	6.44
AA464342	alpha-1 type XV collagen	2.97	-1.63	-2.13	3.63	-2.55	-1.73	3.48	-1.09	1.05
N91307	Gravin	NA	2.07	2.54	2.29	1.61	2.93	2.43	-1.55	-1.29
W87611	nuclear factor I/B	-2.14	2.02	2.68	-3.54	2.01	2.99	-3.17	1.42	1.13
AA464525	interleukin 1 receptor, type I	-1.09	-3.59	7.41	-1.05	-1.87	-4.60	2.03	-1.08	-1.67
AA447528	ubiquitination factor E4A	1.09	-2.04	-3.29	-1.08	-2.00	-2.25	-1.07	-1.86	-1.62
AA488504	phosphoglucomutase 1	-1.29	4.97	3.11	-1.13	3.61	4.64	-1.79	-1.93	-1.80
H73714	replication factor C (activator 1) 1 (145kD)	-1.32	2.46	2.13	-1.33	2.09	2.49	-1.33	1.71	1.88
H80158	ESTs	-1.35	-2.71	8.59	1.12	-4.57	6.14	1.01	-1.20	-2.07
W69471	ski oncogene	-1.25	2.73	5.35	-1.00	3.04	5.13	-1.21	1.67	2.06
AA411757	CEA-related CAM 1 (biliary glycoprotein)	1.68	2.46	3.24	2.2	1.39	2.63	-1.17	-1.24	-1.33
AA046411	amyloid beta precursor protein binding protein 2	1.02	6.5	3.38	-1.21	-3.13	-3.35	1.03	1.55	1.24
AA129552	forkhead box M1	-1.13	3.28	3.3	-1.32	2.23	-1.93	1.29	1.24	-1.02
AA234897	MADS box transcription enhancer factor 2C	-1.01	2.53	-2.31	-1.17	2.15	2.66	1.49	1.35	1.59
AA279147	colony stimulating factor 2 receptor, beta	1.02	-3.15	-2.00	1.07	-2.47	-2.41	-1.20	-1.48	-1.33
AA452909	ESTs	1.03	1.82	3.22	1	2.32	3.11	-1.47	1.28	1.75
AA455786	hRif beta subunit (p102 protein)	-1.22	2.05	2.03	-1.47	2.41	2.59	-1.31	1.19	1.23
AA458994	polymyositis/scleroderma autoantigen 1 (75kD)	-1.47	3.19	-2.13	1.18	-2.00	-2.25	1.19	1.42	-1.25
H59203	CDC6 homolog	-1.23	3.5	-2.50	1.15	-3.28	-2.72	-1.21	-1.25	-1.33
R16604	ESTs	-1.27	2.64	3.56	1.03	1.92	1.88	1.65	-1.22	1
R63109	ESTs	-1.09	4.6	7.52	-1.13	2.49	2.86	1.06	-1.31	-1.66
R63982	ESTs	-1.00	2.7	3.22	1.06	-2.19	3.37	-1.12	1.59	1.57

WO 02/10339

PCT/US01/24469

GeneID	Name	17.0	18.0	19.0	17.6	18.6	19.6	17.48	18.48	19.48
W00895	homolog to RAD51 (S.cerevisiae), RecA (E.coli)	-1.27	3.41	2.97	1.14	-2.12	-2.31	-1.15	-1.01	1.11
W33012	transcription factor Dp-1	1.28	1.81	1.95	1.03	1.88	2.67	1.03	-1.17	1
T49159	serine (or cysteine) proteinase inhibitor 2, clade B	-1.09	-2.12	2.7	-1.30	-2.04	-2.22	-1.03	-1.94	-2.17
M24594	Interferon-inducible 56 Kd protein	2.5	2.12	-4.6	-1.76	-1.47	-19.09	-1.83	3.94	1.42
M59465	A20 tumor necrosis factor alpha inducible protein Similar BAZF (Bcl6-associated zinc finger protein)	1.92	1.84	-1.47	5.49	1.15	-1.12	3.03	1.56	2.47
N78611		2.78	1.59	1.89	5.34	-1.04	1.07	3.55	1.7	2.46
R21172	cAMP response element-binding CRE-BPa	-1.92	1.07	-1.93	-1.33	-1.45	-3.27	-1.85	-1.36	-4.00
AA160507	keratin 5	-1.06	2.13	2.28	1.03	2.05	1.69	-1.13	1.96	1.94
AA487623	gap junction protein, alpha 1, 43kD (connexin 43)	-1.38	2.17	2.1	1.37	1.29	1.99	1.59	2.09	2.53
R28344	ESTs	1.26	-1.88	-2.21	1.7	-1.58	-1.79	1.48	-2.09	-2.09
AA425102	monocyte chemotactic protein 1	1.75	6.49	8.49	3.29	1.3	-1.61	1.85	1.79	1.79
AA418670	jun D proto-oncogene	-1.08	4.96	7.26	1.05	1.29	-1.3	-1.35	1.77	1.77
AA410265	Lysosomal-associated multi-spanning protein-5	1.86	1.55	2.63	1.92	-1.16	1.22	2.48	-1.28	1.13
R77517	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D	-1.85	-1.17	2.34	1.02	-1.39	-1.81	-1.95	1.73	1.71
N55339	ESTs	-3.43	2.37	2.77	-3.37	1.48	2.73	-3.38	1.35	1.55
R23302	KIAA1223 protein	-1.93	2.58	-1.94	-1.43	-1.33	-1.67	-2.06	-1.48	-1.26
H54629	tumor necrosis factor (ligand) 10	1.07	3.89	3.52	-1.48	1.37	-2.09	-1.57	-2.59	-1.56
AA164439	pericentriolar material 1	1.23	3.6	3.1	1.2	1.51	-1.54	-1.01	-1.83	-1.25
T69540	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	-1.19	2.21	2.4	-1.39	1.74	2.44	-1.78	-1.93	-1.4
AA456321	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	-1.81	-1.13	-4.13	-1.37	-1.75	-2.83	-1.15	-1.17	-3.08
T82944	ESTs	-1.90	-1.08	-1.92	-1.62	-1.17	-1.83	-1.79	-1.55	-2.36
AA430504	ubiquitin carrier protein E2-C	1.42	4.06	3.3	-1.2	1.84	1.34	1.36	-1.11	-1.26
AA450265	proliferating cell nuclear antigen	-1.04	1.84	1.91	-1.49	1.96	1.3	-1.22	-1.54	-1.77
AA495846	forkhead box C1	-1.19	3.09	3.1	-1.78	2.38	1.71	-1.68	1.43	1.28
N72697	hypothetical protein FLJ10604	1.32	-2.00	4.56	1.17	-1.82	-1.59	1.36	-1.35	-1.11
R36467	transforming growth factor, beta 1	1.34	1.91	2.21	1.05	1.95	1.51	-1.11	1.77	1.6
R69307	leucine aminopeptidase	1.29	4.77	2.02	1.4	2.82	1.11	1.23	1.61	1.13
T66936	hypothetical protein DKFPz762E1312	1.59	2.4	2.63	-1.17	-1.89	-1.29	-1.79	1.16	1.21
T67104	ESTs	1.61	1.9	2.58	1.35	2.83	-1.70	1.15	-1.25	1.69
AA280931	Ikaros/LyF-1 homolog	1.47	2.28	2.08	1.45	-1.55	-2.15	1.44	-1.63	-1.63
AA281030	galactose-4-epimerase, UDP-	1.44	2.4	2.36	-1.03	-1.34	-1.95	-1.05	-1.22	-1.36
H94617	replication factor C (activator 1) 3 (38kD)	1.21	-1.84	-1.84	1.05	-1.61	-2.04	-1.20	1.17	-1.14
T64956	KIAA1268 protein	1.9	1.82	-1.43	1.25	1.23	-2.29	1.46	1.25	-1.73
AA459292	CDC28 protein kinase 1	-1.81	2.55	2.04	-1.73	1.21	1.57	-1.29	1.12	1.08
AA160852	serine palmitoyltransferase subunit 2	-1.5	2.32	2.09	-1.31	1.35	1.55	-1.54	1.34	1.64
AA284072	cyclin-dependent kinase inhibitor 3	1.57	2.59	2.76	1.11	-1.64	-1.53	-1.36	-1.02	-1.47
AA430744	similar to enhancer of zeste	1.37	1.95	1.87	-1.15	-1.17	-1.08	-1.03	-1.39	-1.26

WO 02/10339

PCT/US01/24469

GeneID	Name	17.0	18.0	19.0	17.6	18.6	19.6	17.48	18.48	19.48
AA480859	pleckstrin homology, Sec7 and cytohesin 1	-1.44	2.26	2.36	-1.07	-1.32	-1.38	-1.38	1.02	-1.08
AA608568	cyclin A2 (CCNA2)	-1.73	-3.14	-2.38	-1.29	-1.50	-1.50	-1.58	-1.10	-1.04
H78483	huntingin interacting protein 2	-1.22	3.18	1.95	-1.41	1.74	1.52	-1.14	1.6	1.79
N69491	kinesin-like 2	-1.39	-2.27	-2.20	1.22	-1.50	-1.20	-1.66	1.02	1.24
R70925	hypothetical protein FLJ20345	-1.05	2.44	2	1.09	1.41	1.46	1.07	-1.73	-1.38
R79935	TGF-beta inducible early protein	-1.37	-2.10	-1.90	-1.15	-1.79	-1.73	1.11	1.07	1.10
T85698	ESTs	1.36	-2.79	-3.37	-1.62	-1.03	-1.55	-1.31	1.28	1.23
W31074	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3	1.02	2.33	1.94	-1.03	1.49	1.79	-1.06	1.04	1.27
AA504348	topoisomerase (DNA) II alpha (170kD)	1.33	3.45	3.5	1.07	NA	NA	1.54	1.32	1.04
T70098	solute carrier family 1 (neutral amino acid) 5	NA	2.03	2.35	1.43	1.55	1.87	NA	1.01	1.89
R06417	junction plakoglobin	-1.96	-1.87	-2.20	-2.66	-1.29	-1.08	NA	1.56	1.79
R93124	aldo-keto reductase family 1, member C1	-1.97	-2.46	-3.02	-2.85	-4.2	-6.45	-1.27	-1.65	-1.72
AA465051	annexin A11	-2.07	-2.62	-2.49	-2.9	-2.47	-2.09	-1.8	-1.74	-1.74
H58644	hypothetical protein FLJ21776	-2.67	-5.41	-18.5	1.66	-6.89	-8.16	1.61	1.5	1.5
L27624	tissue factor pathway inhibitor 2	-1.96	-2.26	-3.82	-1.33	-2.3	-7.2	1.08	-1.48	1.1
AA459109	KIAA0009 gene product	1.92	-2.03	-3.41	1.44	-1.55	-1.14	1.38	-1.64	-1.66
AA480815	immediate early response 3	-3.9	-1.53	-1.93	-3.07	-2.29	-2.06	1.67	1.67	1.67
H63077	Lipocortin	-1.81	-1.56	-4.17	-2.2	-2.19	-6.62	1.67	1.67	1.67
R78725	JWA protein	-2.71	-1.5	-3.01	-2.73	-2.41	-2.28	1.67	1.67	1.67
T47442	endothelial cell protein C/APC receptor (EPCR)	-2.69	-1.1	-2.21	-3.0	-2.25	-4.1	1.3	1.3	1.3
R97066	Transglutaminase	-1.05	-3.89	-4.79	1.8	1.05	1.57	1.67	1.67	1.67
AA436142	Testican	2.03	-1.8	-8	-2.76	-1.68	-1.33	1.56	1.56	1.56
R77226	bone small proteoglycan I (biglycan) PGI	-3.82	-3.59	-1.79	-2.1	-1.99	-2.04	-6.33	-1.52	-1.74
AA464731	S100 calcium-binding protein A11 (calgizzarin)	-1.38	-2.16	-4.05	-2.93	-2.1	-5.96	-1.48	-1.24	-1.87
AA478724	Insulin-like growth factor binding protein 6	1.29	-2.15	-5.24	-2.13	-2.03	-4.06	1.28	1.24	2.56
R95811	ESTs	1.56	-2.91	-3.84	-2.85	1.70	2.09	1.67	1.67	1.67
AA278759	proteoglycan 1, secretory granule	1.38	-2.26	-10.07	1.35	-2.64	-7.32	1.37	1.37	1.37
AA425238	runt-related transcription factor 1 (aml1)	-1.06	2.13	5.10	1.21	-3.73	-6.59	1.03	1.03	1.03
AA442095	neural precursor cell expressed	-1.14	-2.11	-9.96	1.21	-3.29	-12.65	1.14	1.14	1.14
AA453335	Thioredoxin reductase (GRIM-1)	1.38	-2.21	-4.17	1.41	-2.73	-3.88	1.44	1.44	1.44
AA455538	NAD(P)H: quinone oxidoreductase	1.05	-2.52	-6.86	-1.21	-3.48	-5.57	1.24	1.24	1.24
AA485996	signal transducing adaptor molecule 1	-1.18	-1.9	-2.11	-1.00	-2.09	-2.28	-1.03	-1.03	-1.03
AA490172	collagen, type I, alpha 2	1.51	-4.89	-11.09	1.74	-5.11	-13.98	1.45	1.45	1.45
AA495936	microsomal glutathione S-transferase 1	1.21	-7.09	-10.4	1.29	-7.33	-7.54	1.12	1.12	1.12

WO 02/10339

PCT/US01/24469

GeneID	Name	17_0	18_0	19_0	17_6	18_6	19_6	17_48	18_48	19_48
H26176	fer-1 (C.elegans)-like 3 (myoferlin)	-1.02	-2.18	-4.05	-1.21	-2.39	-3.75	1.21		
R98851	membrane metallo-endopeptidase CALLA, CD10	-1.14	-5.91	-8.82	1.02	-7.23	-13.23	1.51		
N91330	ESTs	1.26	-2.15	-2.94	1.37	-2.88	-3.79	1.12	1.97	1.74
AA235332	Ras suppressor protein 1	-1.67	-2.38	-1.91	-2.03	-2.06	-1.54	-1.57	-1.49	-1.28
AA447098	ESTs	-1.1	2.50	3.82	-1.14	-2.01	-4.97	-1.11	1.5	1.56
AA454810	tumor-associated calcium signal transducer 2	1.7	-5.87	-2.45	1.35	-3.35	-3.64	-1.15	1.22	1.37
AA464566	alpha-2-macroglobulin receptor	-1.33	3.00	3.64	-1.00	4.50	3.71	-1.17	1.62	1.73
H53316	ESTs	-1.27	2.12	3.60	-1.14	2.31	2.64	-1.18	1.10	1.30
N69540	metaxin 1	1.14	-2.28	-1.86	1.27	2.00	2.00	1.06	1.03	1.16
N77326	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	1.14	-2.02	-1.85	1.40	-2.24	-1.84	1.48	1.60	1.60
R09634	tumor protein, translationally-controlled 1	1.06	-2.86	-2.34	-1.03	-2.18	-2.34	-1.11	1.32	1.70
R27680	microtubule-associated protein	-1.16	2.08	2.68	1.03	-2.24	-2.71	1.4	1.15	1.11
R91904	aquaporin 3	-1.25	2.36	2.54	-1.00	4.23	2.75	-1.17	-1.00	-1.09
T64878	PNUTL2 nuclear gene for mitochondrial product	-1.06	2.13	2.13	1.03	2.14	1.88	-1.13	-1.00	-1.00
T97870	ESTs	-1.20	2.00	2.60	-1.64	2.24	2.95	-1.44	1.30	1.67
AA243828	discoidin domain receptor family, member 2	-2.36	-2.95	-1.8	-2.04	2.14	1.13	00	1.38	1.35
AA167222	collagen, type XIV, alpha 1 (undulin)	-1.24	3.61	4.06	-1.15	4.13	3.65	00	1.47	1.57
AA486082	serine/threonine protein kinas sgk	-2.01	-1.33	-3.93	1.93	-1.08	-2.78			
AA464630	thrombospondin 1	-2.04	1.7	-2.13	-1.51	1.23	-1.53			
R67991	ESTs	-1.14	-2.09	-6.13	1.06	-1.76	-4.38	-1.13		
W52273	HIV-1 rev binding protein 2	-1.11	2.05	4.56	1.09	1.78	2.67	-1.03		
R70601	ESTs	-2.08	-1.05	-2.08	1.11	1.08	-1.35	-1.21		
AA262988	brain-derived neurotrophic factor	-1.19	3.00	6.00	1.14	1.08	1.18	-1.10		
R75819	proline isomerase FK506-binding protein FKBP13	-1.87	-2.27	-1.14	-1.5	-1.28	-1.12	-2.04	1.72	1.97
H83225	novel protein CGI-06	-2.02	-1.81	-1.36	-2.02	-1.73	-1.64	-2	-1.05	1.02
AA464605	KIAA0172 protein	-2.44	1.67	2.26	-1.19	2.37	1.51	1.88	1.49	1.77
AA399334	transcription factor AP-2 gamma	-1.28	2.00	2.36	-1.03	1.33	-1.00	-1.22	1.82	1.43
AA418251	pleiomorphic adenoma gene 1	1.86	1.71	3.00	1.50	1.74	1.74	1.43	1.43	1.83
H50993	actinin, alpha 4	-1.91	-1.77	-2.32	-1.82	-1.26	-1.23	-1.35	-1.1	-1.19

WO 02/10339

PCT/US01/24469

GeneID	Name	17.0	18.0	19.0	17.6	18.6	19.6	17.48	18.48	19.48
AA418773	Hermansky-Pudlak syndrome	1.18	-3.4	-1.87	-1.1	-2.22	-1.65	1.02	1.37	1.24
AA432023	ESTs	1.65	1.92	2.82	1.65	1.91	1.79	1.41	1.61	1.71
AA284568	Similar to vacuolar ATPase isoform VA68	1.12	-3.45	-3.87	1.18	-1.54	-2.12	1.2	1.1	-1.08
AA599177	cystatin C	1.02	-3.71	-2.29	-1.75	-1.39	-2.11	-1.05	-1.37	-1.49
R63137	RPB5-mediating protein	-1.19	-2.27	-2.43	1.10	1.66	1.87	-1.18	1.44	1.72
AA143509	pyrroline-5-carboxylate synthetase	-1.98	-1.41	1.65	-1.65	-1.43	-1.14	-1.62	-1.44	-1.65
AA292583	TATA box binding protein (TBP)-associated factor	1.36	-2.59	-1.94	1.02	-1.71	-1.38	-1.12	1.26	1.3
AA434487	NGFI-A binding protein 2 (ERG1 binding protein 2)	1.03	2.59	2.44	-1.61	1.29	1.78	-1.13	-1.14	-1.55
AA454146	cyclin H	-1.01	-2.54	-2.2	1.01	-1.49	-1.62	1.31	-1.42	-1.5
AA457047	KIAA0084 protein	1.03	2.06	2.96	1.06	1.45	-1.03	-1.09	1.43	1.48
H44956	fumarylacetoacetate hydrolase	-1.02	-2.15	-2.15	-1.12	1.60	1.72	-1.18	1.30	1.33
H56438	ESTs	-1.08	2.00	2.00	-1.35	1.75	1.62	-1.34	1.42	1.21
H58834	ESTs	-1.31	2.00	2.00	1.10	1.37	1.09	-1.18	1.45	1.27
H77554	PRO0132 protein	1.10	1.85	2.00	1.20	1.25	1.07	1.14	1.67	1.54
R06036	KRAB-zinc finger protein SZF1-1	-1.53	2.00	1.89	-1.18	1.29	1.12	-1.05	-1.00	-1.22
R31321	transforming growth factor, beta-induced, 68kD	-1.29	2.87	3.31	-1.11	1.67	1.33	-1.30	1.67	1.79
R87194	ESTs	1.09	2.35	3.39	1.35	1.22	1.65	1.4	1.33	1.33
R87406	transforming growth factor beta binding protein 4	1.28	1.94	1.94	1.05	1.59	1.29	1.69	1.54	1.43
T62529	ESTs	-1.16	-2.23	-1.82	-1.62	-1.13	-1.19	-1.36	1.23	1.16
T95238	ESTs	-1.23	-2.11	-1.85	-1.35	1.23	1.58	-1.02	1.22	1.24
T95262	ESTs	-1.12	1.90	1.81	1.07	1.18	1.13	-1.15	1.24	1.18
H64850	ESTs	00	2.15	2.67	1.37	1.50	1.17	1.09	1.48	1.68
AA485036	hsp105	1.65	-2.26	-1.95	NA	1.08	1.47	-1.17	1.49	1.32

WO 02/10339

PCT/US01/24469

Color Code :

0 HR-Decreased over 1.8 fold in all 3
 0 HR-Decreased over 1.8 fold 2 of 3
 6 HR-Increased over 1.8 fold 2 of 3
 0 HR-Increased over 1.8 fold in all 3
 0 HR-Increased over 1.8 fold 2 of 3
 6 HR-Decreased over 1.8 fold 2 of 3
 48 HR-Increased over 1.8 fold 2 of 3
 48 HR-Decreased over 1.8 fold in all 3
 48 HR-Decreased over 1.8 fold 2 of 3
 6 HR-Increased over 1.8 fold in all 3
 6 HR-Increased over 1.8 fold in all 3
 48 HR-Increased over 1.8 fold in all 3
 -- Avg. intensity of mock and infected sample < 80

5

Legend to Table: Shown are the ratios between KSHV-infected endothelial cells and uninfected endothelial cells. Only transcripts that changed more than 1.8 fold (up or down) in at least 2 out of the three infected cell cultures tested at each time point. A ~ indicates that both the infected and uninfected cell sample had an average intensity below 80 thus indicating a weak signal in both samples.

10 REFERENCES:

1. Aoki, Y., E. S. Jaffe, Y. Chang, K. Jones, J. Teruya-Feldstein, P. S. Moore, and G. Tosato, "Angiogenesis and Hematopoiesis Induced by Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus-Encoded Interleukin-6" *Blood* (1999) **93**:4034-43.
- 15 2. Aoki, Y., and G. Tosato, "Role of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor in the Pathogenesis of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Infected Primary Effusion Lymphomas" *Blood* (1999) **94**:4247-54.
- 20 3. Arvanitakis, L., E. Geras-Raaka, A. Varma, M. C. Gershengorn, and E. Cesarman, "Human Herpesvirus KSHV Encodes a Constitutively Active G-Protein-coupled Receptor Linked to Cell Proliferation" *Nature* (1997) **385**:347-50.
- 25 4. Asou, H., J. W. Said, R. Yang, R. Munker, D. J. Park, N. Kamada, and H. P. Koeffler, "Mechanisms of Growth Control of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpes Virus-Associated Primary Effusion Lymphoma Cells" *Blood* (1998) **91**:2475-81.
- 30

WO 02/10339

PCT/US01/24469

5. Bais, C., B. Santomaso, O. Coso, L. Arvanitakis, E. G. Raaka, J. S. Gutkind, A. S. Asch, E. Cesarman, M. C. Gershengorn, E. A. Mesri, and M. C. Gerhengorn, "G-Protein-Coupled Receptor of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus is a Viral Oncogene and Angiogenesis" [published erratum in *Nature* 392(6672): 210] *Nature* (1998) **391**:86-9.
6. Bayes-Genis, A., C. A. Conover, and R. S. Schwartz, "The Insulin-like Growth Factor Axis: A Review of Atherosclerosis and Restenosis" *Circ. Res.* (2000) **86**:125-130.
7. Bird, G., G. Burgess, and J. J. Putney, "Sulfhydryl Reagents and cAMP-dependent Kinase Increase the Sensitivity of the Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor in Hepatocytes" *J Biol Chem.* (1993) **268**:17917-17923.
8. Bodo, M., T. Baroni, F. Carinci, E. Becchetti, C. Bellucci, C. Conte, F. Pezzetti, R. Evangelisti, M. Tognon, and P. Carinci, "A Regulatory Role of Fibroblast Growth Factor in the Expression of Decorin, Biglycan, Betaglycan, and Syndecan in Osteoblasts from Patients with Crouzon's Syndrome" *Eur. J. Cell Biol.* (1999) **78**:323-330.
9. Boshoff, C., S.J. Gao, L. E. Healy, S. Matthews, A. J. Thomas, L. Coignet, R. A. Warnke, J. A. Strauchen, E. Matutes, O. W. Karnel, P. S. Moore, R. A. Weiss, and Y. Chang, "Establishing a KSHV+ Cell Line (BCP-1) from Peripheral Blood and Characterizing its Growth in nod/SCID mice" *Blood* (1998) **91**:1671-1679.
10. Cannon, J., F. Hamzeh, S. Moore, J. Nicholas, and R. Ambinder, "Human Herpesvirus 8-Encoded Thymidine Kinase and Phosphotransferase Homologues Confer Sensitivity to Ganciclovir" *J Virol.* (1999) **73**:4786-4793.
11. Cesarman, E., Y. Chang, P. S. Moore, J. W. Said, and D. M. Knowles, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-Related Body Cavity-Based Lymphomas" *N Engl. J Med.* (1995) **332**:1186-91.
12. Cesarman, E., R. G. Nador, F. Bai, R. A. Bohenzky, J. J. Russo, P. S. Moore, Y. Chang, and D. M. Knowles, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Contains G Protein-Coupled Receptor and Cyclin D Homologs which are Expressed in Kaposi's Sarcoma and Malignant Lymphoma" *J Virol.* (1996) **70**:8218-23.
13. Chang, J., R. Renne, D. Dittmer, and D. Ganem, "Inflammatory Cytokines and the Reactivation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Lytic Replication" *Virology.* (2000) **266**:17-25.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

14. Chang, Y., E. Cesarman, M. S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. M. Knowles, and P. S. Moore, "Identification of Herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma" *Science*. (1994) **266**:1865-9.
- 5 15. Chang, Y. E., and L. A. Laimins, "Microarray Analysis Identifies Interferon-Inducible Genes and Stat-1 as Major Transcriptional Targets of Human Papillomavirus Type 31" *J. Virol.* (2000) **74**:4174-4182.
- 10 16. Cheng, E. H., J. Nicholas, D. S. Bellows, G. S. Hayward, H. G. Guo, M. S. Reitz, and J. M. Hardwick, "A Bcl-2 Homolog Encoded by Kaposi Sarcoma-Associated Virus, Human Herpesvirus 8, Inhibits Apoptosis but Does Not Heterodimerize with Bax or Bak" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (1997) **94**:690-4.
- 15 17. Chin, Y. E., M. Kitagawa, W.C. S. Su, Z.-H. You, Y. Iwamoto, and X.-Y. Fu, "Cell Growth Arrest and Induction of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21WAF1/CIP1 mediated by STAT1" *Science* (Washington, D.C.) (1996) **272**:719-22.
- 20 18. Choi, K., M. Kennedy, A. Kazarov, J. C. Papadimitriou, and G. Keller, "A Common Precursor for Hematopoietic and Endothelial Cells" *Development* (1998) **125**:725-32.
- 25 19. Djerbi, M., V. Screpanti, A. I. Catrina, B. Bogen, P. Biberfeld, and A. Grandien, "The Inhibitor of Death Receptor Signaling, FLICE-Inhibitory Protein Defines a New Class of Tumor Progression Factors" *J. Exp. Med.* (1999) **190**:1025-32.
- 30 20. Dupin, N., C. Fisher, P. Kellam, S. Ariad, M. Tulliez, N. Franck, E. Van Marck, D. Salmon, I. Gorin, J.-P. Escande, R. A. Weiss, K. Alitalo, and C. Boshoff, "Distribution of Human Herpesvirus-8 Latently Infected Cells in Kaposi's Sarcoma, Multicentric Castlemans Disease, and Primary Effusion Lymphoma" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1999) **96**:4546-4551.
- 35 21. Edwards, A. S., and J. D. Scott, "A-Kinase Anchoring Proteins: Protein Kinase A and Beyond" *Curr. Opin. Cell Biol.* (2000) **12**:217-221.
22. Ellis, M., Y. P. Chew, L. Fallis, S. Freddersdorf, C. Boshoff, R. A. Weiss, X. Lu, and S. Mittnacht, "Degradation of p27Kip cdk Inhibitor Triggered by Kaposi's Sarcoma Virus Cyclin-cdk6 Complex" *EMBO J.* (1999) **18**:644-653.
- 40 23. Flore, O., S. Rafii, S. Ely, J. J. O'Leary, E. M. Hyjek, and E. Cesarman, "Transformation of Primary Human Endothelial Cells by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus" *Nature*. (1998) **394**:588-92.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

24. Gao, S. J., C. Boshoff, S. Jayachandra, R. A. Weiss, Y. Chang, and P. S. Moore, "KSHV ORF K9 (vIRF) is an Oncogene which Inhibits the Interferon Signaling Pathway" *Oncogene*. (1997) **15**:1979-85.
- 5 25. Gordon, T., B. Grove, J. C. Loftus, T. O'Toole, R. McMillan, J. Lindstrom, and M. H. Ginsberg, "Molecular Cloning and Preliminary Characterization of a Novel Cytoplasmic Antigen Recognized by Myasthenia Gravis Sera" *J. Clin. Invest.* (1992) **90**:992-9.
- 10 26. Gray, P., J. Scott, and W. Catterall, "Regulation of Ion Channels by cAMP-dependent Protein Kinase and A-Kinase Anchoring Proteins" *Curr. Op. Neurobiol.* (1998) **8**:330-334.
- 15 27. Grimberg, A., and P. Cohen, "Role of Insulin-like Growth Factors and Their Binding Proteins in Growth Control and Carcinogenesis" *J. Cell. Physiol.* (2000) **183**:1-9.
28. Hayashi, T., A. Kagaya, M. Takebayashi, M. Shimizu, Y. Uchitomi, N. Motohashi, and S. Yamawaki, "Modulation by Sigma Ligands of Intracellular Free Ca⁺⁺ Mobilization by N-methyl-D-Aspartate in Primary Culture of Rat Frontal Cortical Neurons" *J Pharmacol. Exp Ther.* (1995) **275**:207-214.
- 20 29. Hayashi, T., T. Maurice, and T. Su, "Ca(2+) Signaling Via Sigma(1)-Receptors: Novel Regulatory Mechanism Affecting Intracellular Ca(2+) Concentration" *J Pharmacol. Exp Ther.* (2000) **293**:788-798.
- 25 30. Holash, J., P. C. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, C. R. Alexander, D. Zagzag, G. D. Yancopoulos, and S. J. Wiegand, "Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF" *Science* (1999) **284**:1994-1998.
- 30 31. Jbilo, O., H. Vidal, R. Paul, N. De Nys, M. Bensaid, S. Silve, P. Carayon, D. Davi, S. Galiegue, B. Bourrie, J.C. Guillemot, P. Ferrara, G. Loison, J.P. Maffrand, G. Le Fur, and P. Casellas, "Purification and Characterization of the Human SR 31747A-Binding Protein. A Nuclear Membrane Protein Related to Yeast Sterol Isomerase" *J. Biol. Chem.* (1997) **272**:27107-27115.
- 35 32. Klette, K., Y. Lin, L. Clapp, M. DeCoster, J. Moreton, and F. Tortella, "Neuroprotective Sigma Ligands Attenuate NMDA and Trans-ACPD-Induced Calcium Signaling in Rat Primary Neurons" *Brain Res.* (1997) **756**:231-240.
- 40 33. Leonard, B. E, "The Potential Contribution of Sigma Receptors to Antidepressant Actions" *Antidepressants*: (1997) 159-172.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

34. Li, M., H. Lee, J. Guo, F. Neipel, B. Fleckenstein, K. Ozato, and J. U. Jung, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral Interferon Regulatory Factor" *J. Virol.* (1998) **72**:5433-5440.
- 5 35. Li, M., H. Lee, D. W. Yoon, J. C. Albrecht, B. Fleckenstein, F. Neipel, and J. U. Jung, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Encodes a Functional Cyclin" *J. Virol.* (1997) **71**:1984-91.
36. Lowell, B. B., "PPAR γ : An Essential Regulator of Adipogenesis and Modulator of Fat Cell Function" *Cell* (1999) **99**:239-242.
- 10 37. Mann, D. J., E. S. Child, C. Swanton, H. Laman, and N. Jones, "Modulation of p27Kip1 Levels by the Cyclin Encoded by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus" *EMBO J.* (1999) **18**:654-663.
- 15 38. Marumo, T., V. B. Schini-Kerth, B. Fisslthaler, and R. Busse, "Platelet-Derived Growth Factor-Stimulated Superoxide Anion Production Modulates Activation of Transcription Factor NF- κ B and Expression of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Human Aortic Smooth Muscle Cells" *Circulation* (1997) **96**:2361-2367.
- 20 39. Masood, R., J. Cai, T. Zheng, D. L. Smith, Y. Naidu, and P. S. Gill, "Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor is an Autocrine Growth Factor for AIDS-Kaposi Sarcoma" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (1997) **94**:979-84.
- 25 40. Meade-Tollin, L. C., D. Way, and M. H. Witte, "Expression of Multiple Matrix Metalloproteinases and Urokinase Type Plasminogen Activator in Cultured Kaposi Sarcoma Cells" *Acta Histochem.* (1999) **101**:305-316.
- 30 41. Miles, S. A., A. R. Rezai, J. F. Salazar-Gonzalez, M. Vander Meyden, R. H. Stevens, D. M. Logan, R. T. Mitsuyasu, T. Taga, T. Hirano, T. Kishimoto, and et al, "AIDS Kaposi Sarcoma-Derived Cells Produce and Respond to Interleukin 6" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (1990) **87**:4068-72.
- 35 42. Morin-Surun, M. P., T. Collin, M. Denavit-Saubie, E. E. Baulieu, and F. P. Monnet, "Intracellular σ 1 Receptor Modulates Phospholipase C and Protein Kinase C Activities in the Brainstem" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1999) **96**:8196-8199.
- 40 43. Moses, A. V., K. N. Fish, R. Ruhl, P. P. Smith, J. G. Strussenberg, L. Zhu, B. Chandran, and J. A. Nelson, "Long-Term Infection and Transformation of Dermal Microvascular Endothelial Cells by Human Herpesvirus 8" *J. Virol.* (1999) **73**:6892-6902.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

44. Moses, H. L., and R. Serra, "Regulation of Differentiation by TGF- β " *Curr. Opin. Genet. Dev.* (1996) **6**:581-586.
- 5 45. Nair, B. C., A. L. DeVico, S. Nakamura, T. D. Copeland, Y. Chen, A. Patel, T. O'Neil, S. Oroszlan, R. C. Gallo, and M. G. Sarngadharan, "Identification of a Major Growth Factor for AIDS-Kaposi's Sarcoma Cells as Oncostatin" *M. Science* (1992) **255**:1430-2.
- 10 46. Nakamura, S., K. Murakami-Mori, N. Rao, H. A. Weich, and B. Rajeev, "Vascular Endothelial Growth Factor is a Potent Angiogenic Factor in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma-Derived Spindle Cells" *J Immunol.* (1997) **158**:4992-5001.
- 15 47. Nauert, J. B., T. M. Klauck, L. K. Langeberg, and J. D. Scott, "Gravin, An Autoantigen Recognized by Serum from Myasthenia Gravis Patients, is a Kinase Scaffold Protein" *Curr. Biol.* (1997) **7**:52-62.
- 20 48. Neipel, F., J. C. Albrecht, A. Ensser, Y. Q. Huang, J. J. Li, A. E. Friedman-Kien, and B. Fleckenstein, "Human Herpesvirus 8 Encodes a Homolog of Interleukin-6" *J Virol.* (1997) **71**:839-42.
- 25 49. Nemerow, G. R., and N. R. Cooper, "Infection of B Lymphocytes by a Human Herpesvirus, Epstein-Barr Virus, is Blocked by Calmodulin Antagonists" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1984) **81**:4955-9.
- 30 50. Nicholas, J., V. Ruvolo, J. Zong, D. Ciuffo, H. G. Guo, M. S. Reitz, and G. S. Hayward, "A Single 13-Kilobase Divergent Locus in the Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Genome Contains Nine Open Reading Frames that are Homologous to or Related to Cellular Proteins" *J Virol.* (1997) **71**:1963-74.
- 35 51. Ohtomo, T., Y. Sugamata, Y. Ozaki, K. Ono, Y. Yoshimura, S. Kawai, Y. Koishihara, S. Ozaki, M. Kosaka, T. Hirano, and M. Tsuchiya, "Molecular Cloning and Characterization of a Surface Antigen Preferentially Overexpressed on Multiple Myeloma Cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999) **258**:583-591.
- 40 52. Okabe, S., T. Fukuda, K. Ishibashi, S. Kojima, S. Okada, M. Hatano, M. Ebara, H. Saisho, and T. Tokutsuma, "BAZF, A Novel Bcl6 Homolog, Functions as a Transcriptional Repressor" *Mol. Cell. Biol.* (1998) **18**:4235-4244.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

53. Ping, D., G. Boekhoudt, and J. M. Boss, "Trans-Retinoic Acid Blocks Platelet-Derived Growth Factor- β -Induced Expression of the Murine Monocyte Chemoattractant-1 Gene by Blocking the Assembly of a Promoter Proximal Sp1 Binding Site" *J. Biol. Chem.* (1999) **274**:31909-31916.
54. Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak, "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells" *Science*. (1999) **284**:143-147.
55. Roth, W. K., S. Werner, C. G. Schirren, and P. H. Hofschneider, "Depletion of PDGF from Serum Inhibits Growth of AIDS-Related and Sporadic Kaposi's Sarcoma Cells in Culture" *Oncogene*. (1989) **4**:483-7.
56. Russo, J. J., R. A. Bohenzky, M. C. Chien, J. Chen, M. Yan, D. Maddalena, J. P. Parry, D. Peruzzi, I. S. Edelman, Y. Chang, and P. S. Moore, "Nucleotide Sequence of the Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (HHV8)" *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1996) **93**:14862-7.
57. Salunga, R. C., H. Guo, L. Luo, A. Bittner, K. C. Joy, J. R. Chambers, J. S. Wan, J. R. Jackson, and M. G. Erlander, "Gene Expression Analysis Via cDNA Microarrays of Laser Capture Microdissected Cells from Fixed Tissue" (1999) In M. Schena (ed.), *DNA Microarrays. A Practical Approach*. Oxford Press, Oxford, pp. 121-136.
58. Sarid, R., O. Flore, R. A. Bohenzky, Y. Chang, and P. S. Moore, "Transcription Mapping of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Genome in a Body Cavity-Based Lymphoma Cell Line (BC-1)" *J. Virol.* (1998) **72**:1005-1012.
59. Sarid, R., T. Sato, R. A. Bohenzky, J. J. Russo, and Y. Chang, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Encodes a Functional bcl-2 homologue" *Nat Med.* (1997) **3**:293-8.
60. Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown, "Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray" *Science*. (1995) **270**:467-70.
61. Schreck, R., B. Meier, D. Mannel, W. Droge, and P. Baeuerle, "Dithiocarbamates as Potent Inhibitors of Nuclear Factor Kappa B Activation in Intact Cells" *J Exp Med.* (1992) **175**:1181-1194.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

62. Sciacca, F. L., M. Stuerzl, F. Bussolino, M. Sironi, H. Brandstetter, C. Zietz, D. Zhou, C. Matteucci, G. Peri, and et al, "Expression of Adhesion Molecules, Platelet-Activating Factor, and Chemokines by Kaposi's Sarcoma Cells" *J. Immunol.* (1994) **153**:4816-25.
- 5 63. Shaywitz, A., and M. Greenberg, "CREB: A Stimulus-Induced Transcription Factor Activated by a Diverse Array of Extracellular Signals" *Ann Rev Biochem.* (1999) **68**:821-861.
- 10 64. Shih, M., F. Lin, J. D. Scott, H.-Y. Wang, and C. C. Malbon, "Dynamic Complexes of Beta2 Adrenergic Receptors with Protein Kinases and Phosphatases and the Role of Gravin" *J. Biol. Chem.* (1999) **274**:1588-1595.
- 15 65. Soulier, J., L. Grollet, E. Oksenhendler, P. Cacoub, D. Cazals-Hatem, P. Babinet, M. F. d'Agay, J. P. Clauvel, M. Raphael, L. Degos, and et al, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-like DNA Sequences in Multicentric Castlemans Disease" *Blood* (1995) **86**:1276-80.
- 20 66. Su, T., S. Schell, F. Ford-Rice, and E. London, "Correlation of Inhibitory Potencies of Putative Antagonists for Sigma Receptors in Brain and Spleen" *Eur. J. Pharmacol.* (1988) **148**:467-470.
- 25 67. Swanton, C., D. J. Mann, B. Fleckenstein, F. Neipel, G. Peters, and N. Jones, "Herpes Viral Cyclin/cdk6 Complexes Evade Inhibition by cdk Inhibitor Proteins" *Nature* (1997) **390**:184-187.
- 30 68. Taraboletti, G., R. Benelli, P. Borsotti, M. Rusnati, M. Presta, R. Giavazzi, L. Ruco, and A. Albini, "Thrombospondin-1 Inhibits Kaposi's Sarcoma (KS) Cell and HIV-1 Tat-Induced Angiogenesis and is Poorly Expressed in KS Lesions" *J. Pathol.* (1999) **188**:76-81.
- 35 69. Wellstein, A., R. Lupu, G. Zugmaier, S. L. Flamm, A. L. Cheville, P. Delli Bovi, C. Basilio, M. E. Lippman, and F. G. Kern, "Autocrine Growth Stimulation by Secreted Kaposi Fibroblast Growth Factor but not by Endogenous Basic Fibroblast Growth Factor" *Cell Growth Differ* (1990) **1**:63-71.
- 40 70. Westphal, R., S. Tavalin, J. Lin, N. Alto, I. Fraser, L. Langeberg, M. Sheng, and J. Scott, "Regulation of NMDA Receptors by an Associated Phosphatase-Kinase Signaling Complex" *Science* (1999) **285**:93-96.
71. Zhang, Q. Y., C. Hammerberg, J. J. Baldassare, P. A. Henderson, D. Burns, M. Ceska, J. J. Voorhees, and G. J. Fisher, "Retinoic Acid and Phorbol Ester Synergistically Up-Regulate IL-8 Expression and Specifically Modulate Protein Kinase C-epsilon in Human Skin Fibroblasts" *J. Immunol.* (1992) **149**:1402-8.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

72. Zhong, W., H. Wang, B. Herndier, and D. Ganem, "Restricted Expression of Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Genes in Kaposi Sarcoma" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1996) **93**:6641-6646.
- 5 73. Zhu, H., J. P. Cong, G. Mamtora, T. Gingeras, and T. Shenk, "Cellular Gene Expression Altered by Human Cytomegalovirus: Global Monitoring with Oligonucleotide Arrays" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (1998) **95**:14470-5.
- 10 74. Zimring, J. C., S. Goodbourn, and M. K. Offermann, "Human Herpesvirus 8 Encodes an Interferon Regulatory Factor (IRF) Homolog that Represses IRF-1-Mediated Transcription" *J. Virol.* (1998) **72**:701-707.
- 15 75. Raab, G. and M. Klagsbrun "Heparin-binding EGF-like Growth Factor" *Biochim. Biophys. Acta.* (1997) **1333**:F179-F200.
76. Kekuda, R., P.D. Prasad, Y.J. Fei, F.H. Leibach, and V. Ganapathy "Cloning and Functional Expression of the Human Type 1 Sigma Receptor (hSigmaR1)" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996) **229**: 553-558.
- 20 77. Heinrich, M.C., D.J. Griffith, B.J. Druker, C.L. Wait, K.A. Ott And A.J. Zigler "Inhibition of C-Kit Receptor Tyrosine Kinase Activity by STI 571, a Selective Tyrosine Kinase Inhibitor [In Process Citation]" (2000) *Blood* **96**:925-32.
- 25 78. Boshoff, C., T.F. Schulz, M.M. Kennedy, A.K. Graharn, C. Fisher, A. Thomas, J.O. McGee, R.A. Weiss, and J.J. O'Leary, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infects Endothelial and Spindle Cells" (1995) *Nat Med* **1**:1274-8.
- 30 79. Li, J. J., Y.Q. Huang, C.J. Cockerell, and A. E. Friedman-Kien, "Localization of Human Herpes-Like Virus Type 8 in Vascular Endothelial Cells and Perivascular Spindle-Shaped Cells of Kaposi's Sarcoma Lesions by In Situ Hybridization" (1996) *Am J Pathol.* **148**:1741-8.
- 35 80. Staskus, K. A., W. Zhong, K. Gebhard, B. Herndier, H. Wang, R. Renne, J. Beneke, J. Pudney, D. J. Anderson, D. Ganem, A.T. and Haase, "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Gene Expression in Endothelial (Spindle) Tumor Cells" (1997) *J Virol.* **71**:715-9.
- 40 81. Sturzl, M., C. Blasig, A. Schreier, F. Neipel, C. Hohenadl, E. Cornali, G. Ascherl, S. Esser, N.H. Brockmeyer, M. Ekman, E.E. Kaaya, E. Tschachler, and P. Biberfeld, "Expression of HHV-8 Latency-Associated T0.7 RNA in Spindle Cells and Endothelial Cells of AIDS-Associated, Classical and African Kaposi's Sarcoma" (1997) *Int J Cancer* **72**:68-71.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

82. Rainbow, L., G.M. Platt, G. R. Simpson, R. Sarid, S.J. Gao, H. Stoiber, C.S. Herrington, P.S. Moore, and T.F. Schulz, "The 222- to 234-Kilodalton Latent Nuclear Protein (LNA) of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) is Encoded by Orf 73 and is a Component of the Latency-Associated Nuclear Antigen" (1997) *J Virol* **71**:50915-21.
83. Yarden, Y., W.J. Kuang, T. Yang-Feng, L. Coussens, S. Munemitsu, T.J. Dull, E. Chen, J. Schlessinger, U. Francke, and A. Ullrich, "Human Proto-Oncogene c-kit: A New Cell Surface Receptor Tyrosine Kinase for an Unidentified Ligand" (1987) *Embo J* **6**:3341-51.
84. Martin, F. H., S.V. Suggs, K.E. Langley, H.S. Lu, J. Ting, K.H. Okino, C.F. Morris, I.K. McNiece, F.W. Jacobsen, E.A. Mendiaz, and et al., "Primary Structure and Functional Expression of Rat and Human Stem Cell Factor DNAs" (1990) *Cell* **63**:203-11.
85. Hirota, S., K. Isozaki, Y. Moriyama, K. Hashimoto, T. Nishida, S. Ishiguro, K. Kawano, M. Hanada, A. Kurata, M. Takeda, G. Muhammad Tunio, Y. Matsuzawa, Y. Kanakura, Y. Shinomura, and Y. Kitamura, "Gain-of-Function Mutations of c-kit in Human Gastrointestinal Stromal Tumors" (1998) *Science* **279**:577-80.
86. Nishida, T., S. Hirota, M. Taniguchi, K. Hashimoto, K. Isozaki, H. Nakamura, Y. Kanakura, T. Tanaka, A. Takabayashi, H. Matsuda, H., and Y. Kitamura, "Familial Gastrointestinal Stromal Tumours with Germline Mutation of the KIT Gene" [letter] (1998) *Nat Genet* **19**:323-4.
87. Tian, Q., H.F. Frierson, Jr., G.W. Krystal, and C.A. Moskaluk, "Activating c-kit Gene Mutations in Human Germ Cell Tumors" (1999) *Am J Pathol* **154**:1643-7.
88. Lux, M. L., B.P. Rubin, T.L. Biase, C.J. Chen, T. Maclure, G. Demetri, S. Xiao, S. Singer, C.D. Fletcher, and J.A. Fletcher, "KIT Extracellular and Kinase Domain Mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors" (2000) *Am J Pathol* **156**:791-5.
89. Turner, A. M., K.M. Zsebo, F. Martin, F.W. Jacobsen, L.G. Bennett, and V.C. Broudy, "Nonhematopoietic Tumor Cell Lines Express Stem Cell Factor and Display c-kit Receptors" (1992) *Blood* **80**:374-81.
90. Matsuda, R., T. Takahashi, S. Nakamura, Y. Sekido, K. Nishida, M. Seto, T. Seito, T. Sugiura, Y. Ariyoshi, and et al., "Expression of the c-kit Protein in Human Solid Tumors and in Corresponding Fetal and Adult Normal Tissues" (1993) *Am J Pathol* **142**:339-46.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

91. Inoue, M., S. Kyo, M. Fujita, T. Enomoto, and G. Kondoh, "Coexpression of the c-kit Receptor and the Stem Cell Factor in Gynecological Tumors" (1994) *Cancer Res* **54**:3049-53.
- 5 92. Hines, S. J., C. Organ, M.J. Kornstein, and G.W. Krystal, "Coexpression of the c-kit and Stem Cell Factor Genes in Breast Carcinomas" (1995) *Cell Growth Differ* **6**:769-79.
- 10 93. Krystal, G. W., S.J. Hines, and C.P. Organ, "Autocrine Growth of Small Cell Lung Cancer Mediated by Coexpression of c-kit and Stem Cell Factor" (1996) *Cancer Res* **56**:370-6.
- 15 94. Miettinen, M., M. Sarlomo-Rikala, and J. Lasota, "KIT Expression in Angiosarcomas and Fetal Endothelial Cells: Lack of Mutations of Exon 11 and Exon 17 of c-kit" (2000) *Mod Pathol* **13**:536-41.
- 20 95. Druker, B. J., and N.B. Lydon, "Lessons Learned from the Development of an abl Tyrosine Kinase Inhibitor for Chronic Myelogenous Leukemia" (2000) *J Clin Invest* **105**:3-7.
- 25 96. Wang, W. L., M.E. Healy, M. Sattler, S. Verma, J. Lin, G. Maulik, C.D. Stiles, J.D. Griffin, B.E. Johnson, and R. Salgia, "Growth Inhibition and Modulation of Kinase Pathways of Small Cell Lung Cancer Cell Lines by the Novel Tyrosine Kinase Inhibitor STI 571" (2000) *Oncogene* **19**:3521-8.
- 30 97. Buchdunger, E., J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Müller, B.J. Druker, and N.B. Lydon, "Inhibition of the Abl Protein-Tyrosine Kinase In Vitro and In Vivo by a 2-Phenylaminopyrimidine Derivative" (1996) *Cancer Res* **56**:100-4.
- 35 98. Druker, B. J., S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G.M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, and N.B. Lydon, "Effects of a Selective Inhibitor of the abl Tyrosine Kinase on the Growth of bcr-abl Positive Cells" (1996) *Nat Med* **2**:561-6.
- 40 99. Streblov, D. N., Soderberg-Naucler, C., Vieira, J., Smith, P., Wakabayashi, E., Ruchti, F., Mattison, K., Altschuler, Y., and Nelson, J. A. (1999). "The Human Cytomegalovirus Chemokine Receptor US28 Mediates Vascular Smooth Muscle Cell Migration" (1999) *Cell* **99**:511-20.
100. Aye, M. T., S. Hashemi, B. Leclair, A. Zeibdawi, E. Trudel, M. Halpenny, V. Fuller, and G. Cheng, "Expression of Stem Cell Factor and C-Kit mRNA in Cultured Endothelial Cells, Monocytes and Cloned Human Bone Marrow Stromal Cells (CFU-RF)" (1992) *Exp Hematol* **20**:523-7.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

101. Broudy, V. C., N.L. Kovach, L.G. Bennett, N. Lin, F.W. Jacobsen, and P.G. Kidd, "Human Umbilical Vein Endothelial Cells Display High-Affinity c-kit Receptors and Produce a Soluble Form of the c-kit Receptor" (1994) *Blood* **83**:2145-52.
- 5 102. Buzby, J. S., E.M. Knoppel, and M.S. Cairo, "Coordinate Regulation of Steel Factor, its Receptor (Kit), and Cytoadhesion Molecule (ICAM-1 and ELAM-1) mRNA Expression in Human Vascular Endothelial Cells of Differing Origins" (1994) *Exp Hematol* **22**:122-9.
- 10 103. Yamaguchi, H., E. Ishii, S. Saito, K. Tashiro, I. Fujita, S. Yoshidomi, M. Ohtubo, K. Akazawa, and S. Miyazaki, "Umbilical Vein Endothelial Cells are an Important Source of C-Kit and Stem Cell Factor Which Regulate the Proliferation of Haemopoietic Progenitor Cells" (1996) *Br J Haematol* **94**:606-11.
- 15 104. Flanagan, J. G., D.C. Chan, and P. Leder, "Transmembrane Form of the Kit Ligand Growth Factor is Determined by Alternative Splicing and is Missing in the Sld Mutant" (1991) *Cell* **64**:1025-35.
- 20 105. Heinrich, M. C., D.C. Dooley, A.C. Freed, L. Band, M.E. Hoatlin, W.W. Keeble, S.T. Peters, K.V. Silvey, F.S. Ey, D. Kabat, and et al., "Constitutive Expression of Steel Factor Gene by Human Stromal Cells" (1993) *Blood* **82**:771-83.
- 25 106. Buchdunger, E., J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Muller, U. Regenass, and N.B. Lydon, "Selective Inhibition of the Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction Pathway by a Protein-Tyrosine Kinase Inhibitor of the 2-Phenylaminopyrimidine Class" (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**:2558-62.
- 30 107. Lev, S., Y. Yarden, and D. Givol, "Receptor Functions and Ligand-Dependent Transforming Potential of a Chimeric Kit Proto-Oncogene" (1990) *Mol Cell Biol* **10**:6064-8.
- 35 108. Alexander, W. S., S.D. Lyman, and E.F. Wagner, "Expression Of Functional C-Kit Receptors Rescues The Genetic Defect of W Mutant Mast Cells" (1991) *Embo. J.* **10**:3683-91.
109. Caruana, G., A.C. Cambareri, T.J. Gonda, and L.K. Ashman, "Transformation of NIH3T3 Fibroblasts by the c-kit Receptor Tyrosine Kinase: Effect of Receptor Density and Ligand-Requirement" (1998) *Oncogene* **16**:179-90.
- 40 110. Chan, S. R., C. Bloomer, and B. Chandran, "Identification and Characterization of Human Herpesvirus-8 Lytic Cycle-Associated ORF 59 Protein and the Encoding cDNA by Monoclonal Antibody" (1998) *Virology* **240**:118-26.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

111. Chandran, B., C. Bloomer, S.R. Chan, L. Zhu, E. Goldstein, and R. Horvat, "Human Herpesvirus-8 ORF K8.1 Gene Encodes Immunogenic Glycoproteins Generated by Spliced Transcripts" (1998) *Virology* **249**:140-9.
- 5 112. Roehm, N. W., G.H. Rodgers, S.M. Hatfield, and A.L. Glasebrook, "An Improved Colorimetric Assay for Cell Proliferation and Viability Utilizing the Tetrazolium Salt XTT" (1991) *J Immunol Methods* **142**:257-65.
- 10 113. Renne, R., D. Blackbourn, D. Whitby, J. Levy, and D. Ganem, "Limited Transmission of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus in Cultured Cells" (1998) *J Virol.* **72**:5182-8.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for inhibiting replication of KSHV comprising administration of a
5 compound that inhibits c-Kit signalling pathway.
2. A method for the treatment of Kaposi sarcoma comprising administration of a
compound that inhibits c-Kit signalling pathway.
- 10 3. A method for inhibiting replication of KSHV comprising administration of a
compound that inhibits type I sigma receptor signalling pathway.
4. A method for the treatment of Kaposi sarcoma comprising administration of a
compound that inhibits type I sigma receptor signalling pathway.
- 15 5. A gene expression profile specific for the lytic phase of KSHV replication
comprising at least one gene selected from a group consisting of the genes listed in
Table 2.
- 20 6. A gene expression profile specific for the latent phase of KSHV replication
comprising at least one gene selected from a group consisting of the genes listed in
Table 2.
7. A microarray comprising nucleic acid encoding a probe to hybridize with one or
25 more of the genes selected from a group consisting of the genes listed in Table 2.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

8. A method for diagnosing KSHV or the stage of KSHV replication comprising:
- a) obtaining a sample of cells suspected of being infected with KSHV;
 - b) extracting RNA from the cells;
 - 5 c) contacting the RNA with a microarray comprising nucleic acid encoding a probe specific for one or more of the genes selected from a group consisting of the genes listed in Table 2; and
 - d) determining the gene expression profile of the sample of cells and comparing it with the gene expression profile of KSHV infected cells.
- 10
9. A method for identifying modulators of KSHV replication, comprising:
- a) selecting a gene product from a group of genes consisting of the genes listed in Table 2;
 - 15 b) combining a test compound with the gene product encoded by the gene to determine whether the test compound inhibits or activates the gene product; and
 - c) combining the test compound with KSHV infected cells to determine whether the test compound inhibits or activates replication of the KSHV.
- 20
10. A method for inhibiting replication of KSHV comprising administration of a compound that inhibits c-Kit and administration of a compound that modulates KSHV replication by a mechanism other than inhibition of c-Kit.
- 25
11. The method of claim 10, wherein said compound that modulates KSHV replication by a mechanism other than inhibition of c-Kit is selected from a group consisting of daunorubicin, doxorubicin, interferon alpha, retinoids, and taxol.

WO 02/10339

PCT/US01/24469

12. A method for the treatment of Kaposi sarcoma comprising administration of a compound that inhibits c-Kit and administration of a compound that modulates Kaposi sarcoma by a mechanism other than inhibition of c-Kit.
- 5 13. The method of claim 12, wherein said compound that modulates KSHV replication by a mechanism other than inhibition of c-Kit is selected from a group consisting of daunorubicin, doxorubicin, interferon alpha, retinoids, and taxol.
14. A method for inhibiting replication of KSHV comprising administration of a compound that inhibits type I sigma receptor and administration of a compound that modulates KSHV replication by a mechanism other than inhibition of type I sigma receptor.
- 10 15. The method of claim 14, wherein said compound that modulates KSHV replication by a mechanism other than inhibition of type I sigma receptor is selected from a group consisting of daunorubicin, doxorubicin, interferon alpha, retinoids, and taxol.
16. A method for the treatment of Kaposi sarcoma comprising administration of a compound that inhibits type I sigma receptor and administration of a compound that modulates Kaposi sarcoma by a mechanism other than inhibition of type I sigma receptor.
- 20 17. The method of claim 16, wherein said compound that modulates Kaposi sarcoma by a mechanism other than inhibition of type I sigma receptor is selected from a group consisting of daunorubicin, doxorubicin, interferon alpha, retinoids, and taxol.
- 25

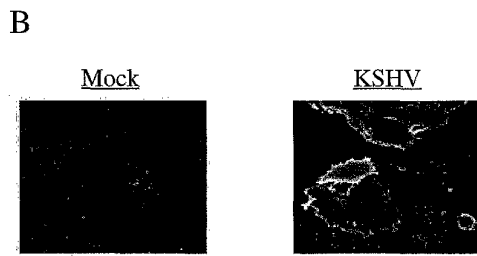
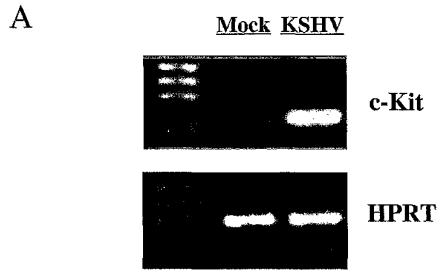
WO 02/10339

PCT/US01/24469

18. A method of doing business comprising the steps of:
- a) determining the level of RNA expression for an RNA sample,
wherein said RNA sample
 - 5 b) is amplified and fluorescently labeled, hybridized to a microarray
containing a plurality of nucleic acid sequences representing a gene
expression profile, and said microarray is scanned for fluorescence;
 - c) normalizing said expression level using an algorithm; and
 - 10 d) scoring said RNA sample against a gene expression profile
database.
19. The method of claim 18, wherein said RNA sample is obtained from a patient.
20. The method of claim 19, wherein said RNA sample is isolated from a patient
15 sample selected from the group consisting of blood, amniotic fluid, plasma, semen,
bone marrow, and tissue biopsy.
21. The method of claim 18, wherein said microarray is a DNA microarray.
- 20 22. The method of claim 18, wherein said database is available via a web-browser
interface.
23. The method of claim 18, wherein said web-browser provides gene sequence
analysis tools
- 25 24. The method of claim 18, wherein a user pays a fee for access to said database.

FIGURES:

Figure 1



C

Figure 1
(cont.)

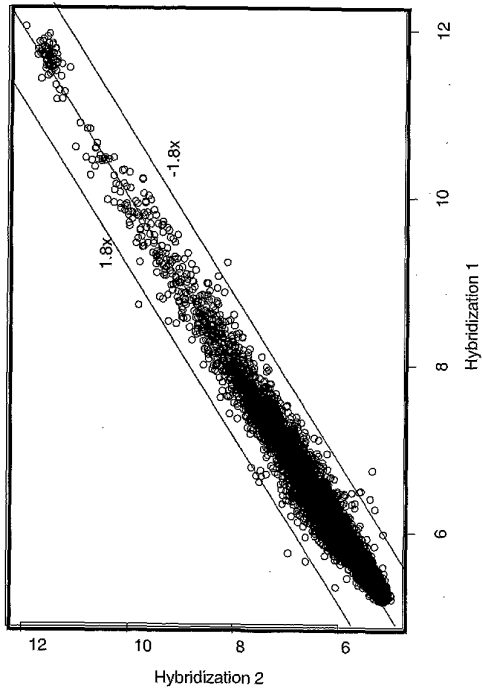


Figure 2

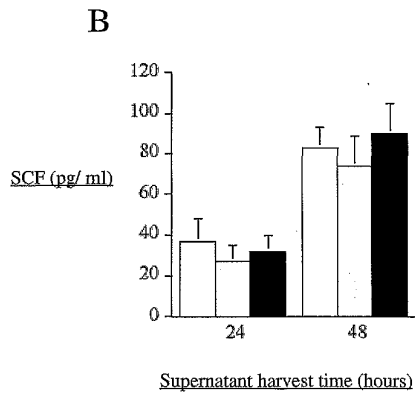
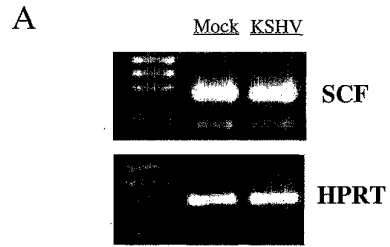


Figure 3

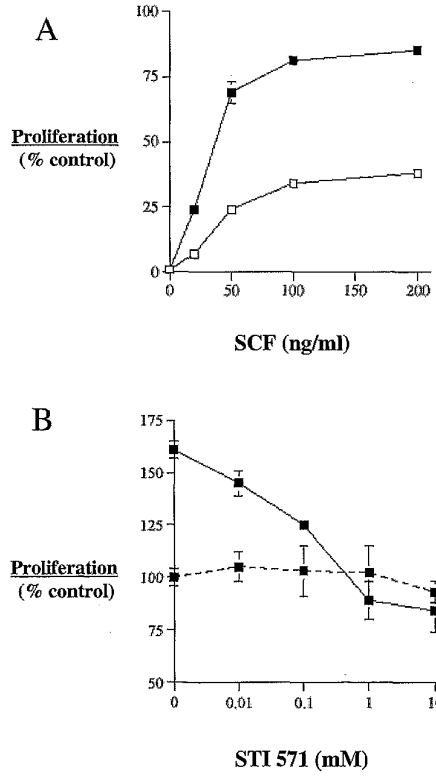
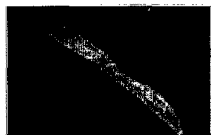


Figure 4

A



Ad/c-KitWT

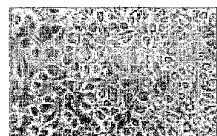
B



**Ad/c-KitWT
(10)**



**Ad/c-KitWT
(100)**



Ad/GFP

WO 02/10339

6/12

PCT/US01/24469

Figure 5

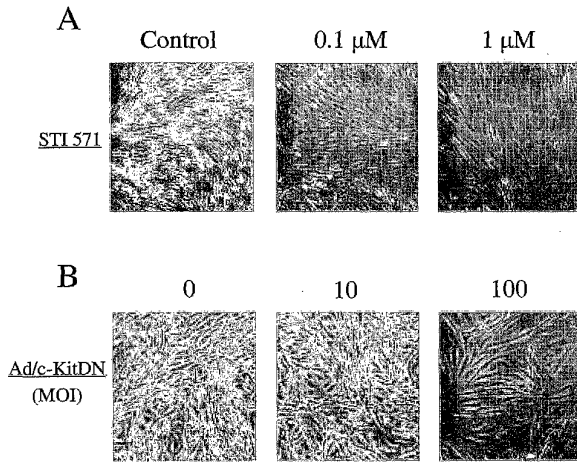


Figure 6

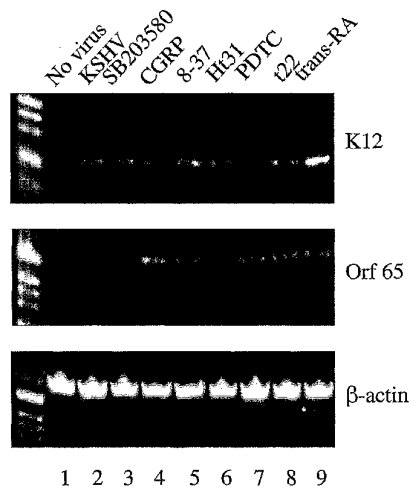
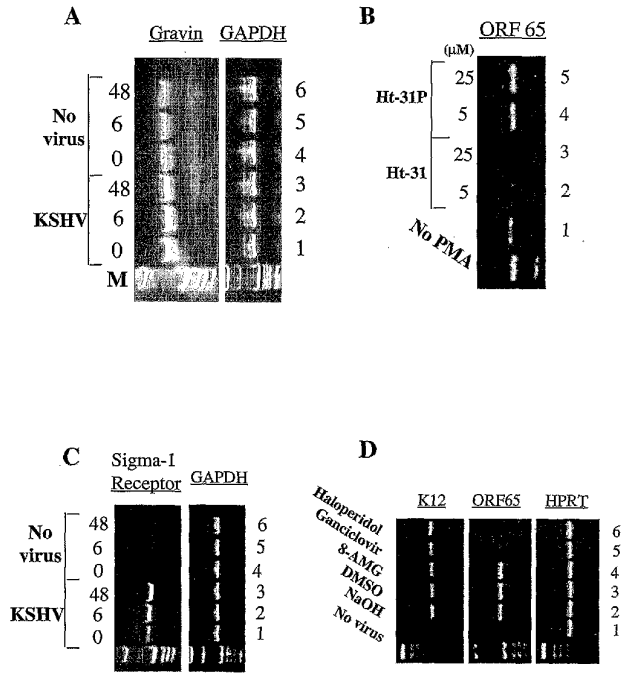


Figure 7



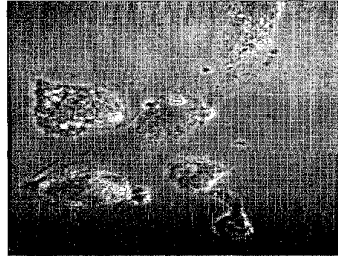
WO 02/10339

PCT/US01/24469

9/12

Figure 8

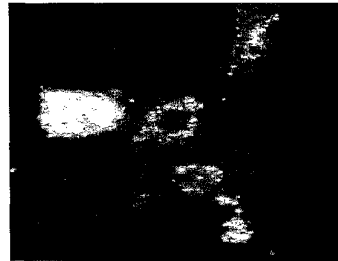
A
Lack of c-kit Expression in Antisense-Loaded KSHV-Infected DMVEC



Phase image



c-Kit protein



c-kit/FITC
antisense

Figure 8
(cont.)

B

Untreated KSHV-Infected DMVEC

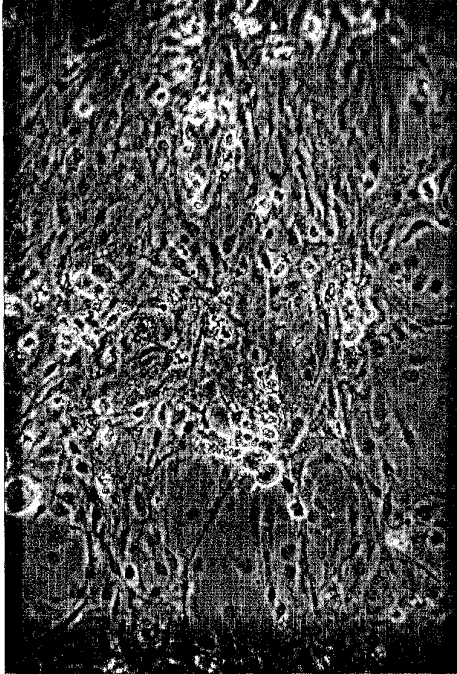


Figure 8
(cont.)

C

**c-Kit antisense-loaded KSHV-
infected DMVEC**

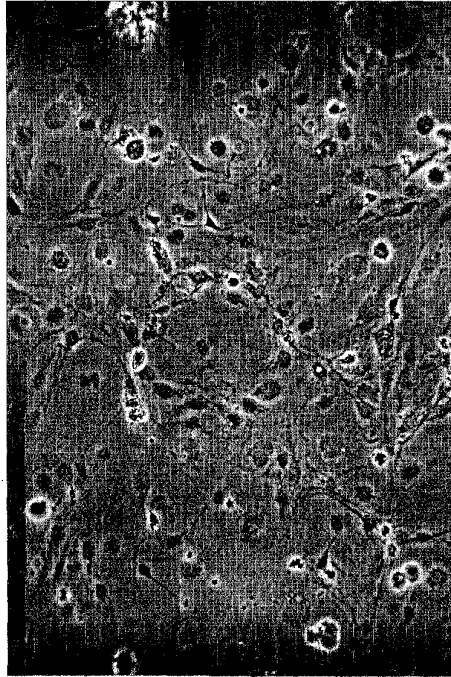
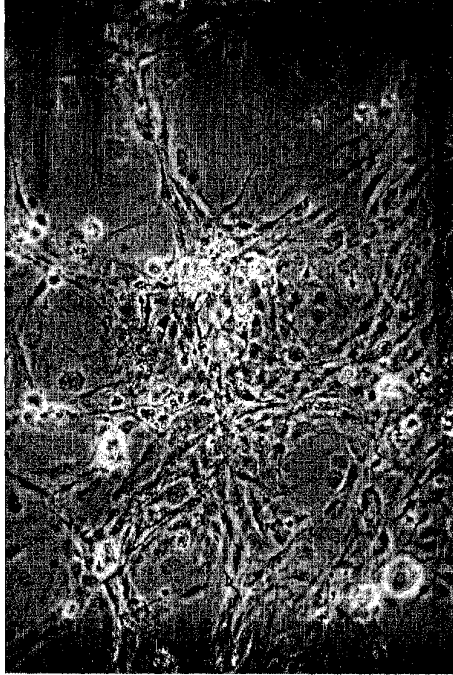


Figure 8
(cont.)

D

**Control KSHV-infected DMVEC
(EPEI only)**



WO 02/10339

PCT/US01/24469

Page 1 of 2

5 SEQUENCE LISTING

10 <110> Luukkonen, Mattias
Moses, Ashlee
Frueh, Klaus
Nelson, Jay
Bell, Yolanda
Heinrich, Michael
Simmen, Kenneth

15 <120> gene expression profile for KSHV infection and methods for
treating same
<130> ORT-1461

20 <140>
<141>
<160> 6

25 <170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 20
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide primer

35 <400> 1
ctcaaccatc tgtgagtcca 20

40 <210> 2
<211> 20
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide primer

<400> 2
aagccgtggtt tgttggtgca . 20

50 <210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

55 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide primer

60

WO 02/10339

PCT/US01/24469

Page 2 of 2

5 <400> 3
ccattgatgc cttcaaggac 20

10 <210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide primer

20 <400> 4
cttccagtat aaggctccaa 20

25 <210> 5
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: Nested probe

30 <400> 5
ggcgttaatt aagctagcat gtccaacttt aaggtgaga 39

35 <210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

40 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide primer

45 <400> 6
aaacctattt ctttttgcca gagg 24

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/10339 A3(51) International Patent Classification: C12Q 1/70, (74) Agent: WALLEN, John, W., III; Johnson & Johnson,
1/68, C12P 21/04, C12N 5/06 One Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, NJ 08933-7003 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/24469

(22) International Filing Date: 1 August 2001 (01.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/222,162 2 August 2000 (02.08.2000) US

(71) Applicants: ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTI-
CAL, INC. [US/US]; US Route 202, Raritan, NJ 08869
(US); OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY
[US/US]; OHSU West Campus, 505 NW 185th Avenue,
Beaverton, OR 97006 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
4 April 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/10339 A3

(54) Title: GENE EXPRESSION PROFILE FOR KSHV INFECTION AND METHODS FOR TREATING SAME

(57) Abstract: The present invention utilizes nucleic acid microarray technology to identify changes in the host endothelial cell transcription pattern that occurs during the latent and lytic phase of the KSHV life cycle. The production or activity of some genes up regulated during the lytic cycle were subsequently inhibited, and two such targets were shown to have a role in expression of late viral genes. Using this combined approach we have identified cellular pathways previously unknown to be important for KSHV infection, and present evidence for the efficiency of the novel antiviral approaches thus discovered. In addition, the present invention identifies a wide variety of endothelial cells genes and pathways that are involved in a variety of endothelial cell-mediated activity, including angiogenesis and transformation.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/24469
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(Int. Cl.) 1/70: 1/06; C12P 21/04; C12N 5/06 U.S. CL. 435/5, 6, 701, 334 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. 435/5, 6, 701, 334 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) DIALOG, MEDLINE, DERWENT, USPATENTS, e-kir, CD117 protein, Rajovi's Sarcoma-associated herpes virus or KSHV, modulation		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	US 6,103,521 A (CAPON et al.) 15 August 2000, column 10, lines 43-65, column 16, lines 58-67.	1-24
<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 "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referred to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "F" 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 "G" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when this document is taken alone "H" 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 "I" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 DECEMBER 2001	Date of mailing of the international search report 24 JAN 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer: HANKYU MOTOHITO Telephone No. (703) 308-0196	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 31/22	4 C 0 8 4
A 6 1 P 31/22	C 1 2 M 1/00	A 4 C 0 8 6
C 1 2 M 1/00	C 1 2 Q 1/02	4 C 2 0 6
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 21/77	Z
G 0 1 N 21/77	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/58	A
G 0 1 N 33/58	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 15/00	F
	A 6 1 K 37/66	G

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

- (72) 発明者 ルーコネン, マテイアス
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 6 サンディエゴ・カレヌエバ 8 2 7 0
- (72) 発明者 モーゼズ, アシユレー
アメリカ合衆国オレゴン州 9 7 2 0 1 ポートランド・アパートメントナンバー 1・サウスウエスト
イレブンスアベニュー 3 0 0 7
- (72) 発明者 フルー, クラウス
アメリカ合衆国オレゴン州 9 7 2 2 9 ポートランド・ノースウエストワンハンドレッドサード
アベニュー 1 9 8 0
- (72) 発明者 ネルソン, ジエイ
アメリカ合衆国オレゴン州 9 7 0 6 2 トウアラティン・サウスウエストメドウウェイ 2 1 0 6 7
- (72) 発明者 ベル, ヨランダ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 0 9 カールスバド・パセオタパジヨス 6 1 0 9
- (72) 発明者 ハイシリヒ, マイケル
アメリカ合衆国オレゴン州 9 7 0 3 5 レイクオスウエゴ・ウインスロプコート 4 6 4 9
- (72) 発明者 シメン, ケネス
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サンディエゴ・カレマルデパリボサ 1 0 7 2 5

F ターム(参考) 2G045 BB20 BB24 BB41 BB51 CB01 DA13 FB02 FB03 FB12 GC15
2G054 AA08 CA22 CE02 EA03 GA04
4B024 AA01 AA11 CA04 CA09 CA11 GA11 HA12
4B029 AA07 AA23 BB20 FA15
4B063 QA19 QA20 QQ08 QQ10 QQ20 QQ42 QR32 QR35 QR55 QR66
QR77 QR82 QS03 QX02
4C084 AA02 AA17 BA44 DA22 NA14 ZB33
4C086 AA01 AA02 BA02 MA01 MA04 NA14 ZB33
4C206 AA01 AA02 CA07 MA01 MA04 NA14 ZB33

专利名称(译)	KSHV感染的基因表达谱及KSHV感染的治疗方法		
公开(公告)号	JP2004520007A	公开(公告)日	2004-07-08
申请号	JP2002516058	申请日	2001-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	奥索 - 麦克尼尔药品公司 俄勒冈健康与科学大学指定		
申请(专利权)人(译)	奥索 - 麦克尼尔杉机俞蒂卡尔酒店股份有限公司每次的Rete 俄勒冈健康与科学大学指定		
[标]发明人	ルーコネンマテイアス モーゼズアシュレー フルークラウス ネルソンジエイ ベルヨランダ ハインリヒマイケル シメンケネス		
发明人	ルーコネン,マテイアス モーゼズ,アシュレー フルー,クラウス ネルソン,ジエイ ベル,ヨランダ ハインリヒ,マイケル シメン,ケネス		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/00 A61K31/07 A61K31/337 A61K31/704 A61K38/21 A61K45/00 A61K45/06 A61P31/22 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6837 C12Q1/6883 G01N21/77 G01N21/78 G01N33/58 G01N37/00 G06Q50/22		
CPC分类号	A61K31/00 A61K31/337 A61K31/704 A61K38/212 A61K45/06 A61P31/22 A61P35/00 C12Q1/6837 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G16H20/10 G16H70/60 Y02A90/22 A61K2300/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/07 A61K31/337 A61K31/704 A61K45/00 A61P31/22 C12M1/00.A C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N21/77.Z G01N21/78.C G01N33/53.M G01N33/58.A G01N37/00.102 C12N15/00. F A61K37/66.G		
F-TERM分类号	2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB41 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/ FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA08 2G054/CA22 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/GA11 4B024/HA12 4B029/ AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/FA15 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ10 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/ /QR82 4B063/QS03 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DA22 4C084/NA14 4C084/ZB33 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BA02 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ /ZB33 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/CA07 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/NA14 4C206/ZB33		
优先权	60/222162 2000-08-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明利用核酸微阵列技术，以确定在该KSHV生命周期的潜和裂解相之间发生的宿主内皮细胞转印图案的变化。然后，以抑制的几个基因在生长周期被上调的产生或活性，并且两个这样的目标显示出具有在晚期病毒基因的表达的作用。使用该组合的方法，来确定细胞通路，这是重要的尚未为KSHV感染先前已知的，并且呈现这个新的抗病毒方法的有效性的证据是在找到。此外，本发明识别了多种内皮细胞的基因和参与多种内皮细胞衍生的活性，包括血管生成和转化途径。

表2
各時点の一つで3つの感染培養物のうち2つにおいて1.8倍より大きく変化する細胞転写産物

遺伝子ID	名称	17.0	18.0	19.0	17.6	18.6	19.6	17.48	18.48	19.48
N59161	120kDaスフィンゴガラクトシド受容体CD36	-2.14	14.22	25.53	4.86	18.69	22.11	4.3	6.83	22.93
N57594	機能未知のペプチドDMP2p761J17121	-2.38	-3.63	-3.88	2.5	-4.31	-3.38	3.22	-3.00	-3.71
H79047	インシリン様増殖因子結合シグナル	2.17	-2.04	-3.74	1.94	-2.19	-3.64	1.35	-2.56	-2.44
N49629	MHCにおいてコードされるジエペプチド(dipeptide)	3.97	-1.90	-2.62	2.01	6.11	6.09	1.06	-1.57	1.05
AA034213	特定の糖基転移酵素Glc3-16の相同物	1.92	3.41	6.06	1.7	2.74	4.97	2.15	3.33	3.19
N20798	G-h1	1.82	2.55	4.75	-1.03	4.21	-2.39	2.67	6.34	4
AA434102	シトクロームP450 (CYP)	3.15	3.07	2.18	1.9	3.61	1.44	1.68	6.23	4.51
R49599	蛋白質輸送体カプラー19(膜輸送体)	1.89	4.06	6.19	-1.48	3.69	4.22	-1.38	2.26	-2.72
AA456878	B-myb	2.13	3.09	5.71	1.38	-2.72	-1.88	2.24	-1.19	-1.22
AA448237	マウスリン脂質性シクロP450(CYP10)	2.83	-4.94	10.75	3.27	-1.62	-2.33	-1.08	-1.08	-1.15
N31467	コウキキレウ酸及び脂肪酸受容体	1.81	6.84	8.12	1.69	3.03	5.43	-1.33	1.45	1.02
H84153	サイクリンD2	-1.88	-2.09	2.51	-1.31	-1.57	-1.20	-1.41	-1.30	-1.09
AA433774	グルコシルセラミド16の調節因子	-2.03	1.06	-2.35	-2.34	4.29	5.71	-2.55	-2.47	4.21
N53172	オプティンシグナル受容体(ODG1)	3.81	-1.70	4.45	3.4	46.62	82.26	7.56	17.93	32.21
H69048	ESTs	1.23	6.31	15.86	2.46	7.21	16.11	2.03	3.05	8.23
T70413	ESTs	1.02	3.07	4.44	2.15	4.21	4.32	1.41	-4.11	-3.63
N34827	ペプチドグルコシダーゼ	2.33	1.76	3.28	1.69	2.06	4.51	1.97	1.32	1.59
N54338	B7相同物	2.63	-1.40	2.7	2.67	1.66	1.94	2.74	5.69	7.77
AA001614	インシリン受容体	NA	1.87	3.07	1.53	3.81	2.22	2.16	4.65	4.53
AA410567	骨芽細胞AR000113において発現されるmRNA	1.54	8	1.46	4.21	8.67	2.00	3.18	3.66	1.17
X54923	サリコスタチンロイコトリエン	5.31	-2.96	1.19	7.6	6.21	1.15	15.63	2.44	-1.03
W95682	シロリン-T1 Myc16選択的アプライングされた	1.57	-1.82	2.85	-1.12	2.3	2.57	2.08	1.6	-2.01
AA423867	プロセチン(Prospromin)	NA	8.38	4.75	-2.09	11.04	15.46	-6.6	4.63	4.23
AA457138	DNA結合1のシグナル (E1)	NA	3.68	5.73	-2.82	3.4	7.36	-0.96	-2.00	3.11
AA070226	セファリン(Seleprotein)P. 血球	-1.09	3.3	3.3	1.15	-2.41	3.16	-1.99	3.5	10.84
R96668	15	-1.07	5.15	36.9	-1.4	-4.23	9.15	-3.03	6.64	15.86
AA453009	EP300(ヒポカリン)	1.82	1.52	1.86	1.17	3.31	2.68	1.74	1.9	1.95
AA088217	ヘモグロビンH(β)	1.36	3.99	5.53	1.61	2.1	3.25	-1.05	1.89	7.21
AA236617	Rac/Cdc42アニオン交換因子(GEF3)	1.04	-2.08	-2.92	-1.09	-1.90	-3.67	1.06	-2.10	-2.52
AA436591	原癌遺伝子c-mycに非関与的	-1.51	-2.47	-2.82	-1.11	-2.38	-2.85	-1.52	-1.90	-2.10
AA443659	シグナルペプチド143(βB-gal2-1)	1.04	1.87	3.53	1.19	2.87	5.6	1.14	2.06	2.75
AA464644	LRP1のシグナルペプチド(LRP1)	-1.09	2.48	7.62	-1.15	6.03	13.77	1.5	8.71	17.23
AA482198	マンノシリン酸ターゼ	-1.33	-1.95	-2.55	-1.03	-2.25	-2.81	-1.00	-2.82	-2.61

【 0 1 1 4 】
【 表 2 】