

(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2008-514925
(P2008-514925A)

(43) 公表日 平成20年5月8日(2008.5.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-533654 (P2007-533654)
 (86) (22) 出願日 平成17年9月23日 (2005. 9. 23)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年5月23日 (2007. 5. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/034179
 (87) 国際公開番号 W02006/034456
 (87) 国際公開日 平成18年3月30日 (2006. 3. 30)
 (31) 優先権主張番号 60/612, 861
 (32) 優先日 平成16年9月23日 (2004. 9. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

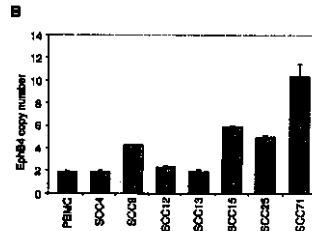
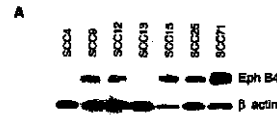
(71) 出願人 505340951
 バスジーン セラピューティクス、 イン
 コーポレイテッド
 アメリカ合衆国 19008 ペンシルベ
 ニア ブルームオール、 1974スプロ
 ルロード、 スイート204
 (74) 代理人 110000523
 アクシス国際特許業務法人
 (72) 発明者 ラマチャンドラ レディ
 アメリカ合衆国 77584 テキサス、
 ピアーランド、 タイデンハーフェン コー
 ト 11408

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍を検出し且つ治療するための組成物及び方法

(57) 【要約】

ある種の態様では、本発明は、試験細胞における E p h B 4 遺伝子を検出するための組成物及び方法を提供する。ある種の態様では、本発明は、腫瘍を有する又は腫瘍を有することが疑われる被検体において腫瘍（癌）状態及び予後を評価するための方法及び組成物を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

E p h B 4 の発現又は機能の阻害剤による治療に好適な腫瘍の同定方法であって、腫瘍において次の特性：

- (a) E p h B 4 蛋白質の異常に高い発現、
- (b) E p h B 4 m R N A の異常に高い発現、及び
- (c) E p h B 4 遺伝子の遺伝子増幅

のうち一つ以上を有する細胞を検出することを含み、

ここで、前記特性 (a)、(b) 及び / 又は (c) の一つ以上を有する細胞が E p h B 4 の発現又は機能の阻害剤による治療に好適である、腫瘍の同定方法。

10

【請求項 2】

前記腫瘍が頭部及び頸部扁平上皮癌 (H N S C C)、前立腺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、結腸直腸細胞、肺腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞及び脳腫瘍細胞よりなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

試験細胞における E p h B 4 遺伝子の遺伝子増幅の評価方法であって、試験細胞内における E p h B 4 遺伝子のコピー数を検出することを含み、ここで、該試験細胞内での E p h B 4 遺伝子のコピー数がコントロール細胞の当該コピー数に対して増加することが該試験細胞内での E p h B 4 遺伝子の遺伝子増幅を示す方法。

20

【請求項 4】

E p h B 4 遺伝子のコピー数をハイブリダイゼーションをベースとするアッセイ法で検出する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ハイブリダイゼーションをベースとするアッセイ法がサザンプロット法、in situ ハイブリダイゼーション法 (I S H) 及び比較ゲノムハイブリダイゼーション (C G H) よりなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

E p h B 4 遺伝子のコピー数を増幅をベースとするアッセイ法で検出する、請求項 3 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記増幅をベースとするアッセイ法が定量 P C R である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 E p h B 4 遺伝子のコピー数を、マイクロアレイベースのプラットフォームを使用して検出する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 9】

前記試験細胞がほ乳類細胞である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 10】

前記試験細胞がヒト細胞である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記試験細胞が腫瘍細胞である、請求項 3 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記腫瘍細胞が頭部及び頸部扁平上皮癌 (H N S C C)、前立腺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、結腸直腸細胞、肺腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞及び脳腫瘍細胞よりなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記試験細胞が腫瘍を有することが疑われる被検体から得られる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 14】

前記試験細胞が腫瘍を有することが分かっている被検体から得られる、請求項 3 に記載

50

の方法。

【請求項 15】

前記試験細胞が腫瘍組織から得られる、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記試験細胞が原発腫瘍から得られる、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記試験細胞が、原発腫瘍由来の転移性細胞が潜伏していることが疑われる組織から得られる、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

前記試験細胞がリンパ節又は骨髄から得られる、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記試験細胞が血液、血清、血漿、血液由来画分、リンパ液、胸膜液、大便、尿及び結腸流出液よりなる群から選択される体液中に存在する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 20】

前記コントロール細胞が細胞当たり 2 コピーの E p h B 4 遺伝子コピー数を有する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 21】

前記試験細胞が試験細胞のプール中に存在する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 22】

被検体の癌状態の評価方法であって、

20

(a) 腫瘍を有することが疑われる又は腫瘍を有することが分かっている被検体から試験細胞を得、

(b) 該試験細胞における E p h B 4 遺伝子のコピー数を検出することを含み、

ここで、コントロール細胞に対する該試験細胞における該 E p h B 4 遺伝子コピー数の増加が、該試験細胞が腫瘍細胞であることを示す、前記方法。

【請求項 23】

前記 E p h B 4 遺伝子コピー数をハイブリダイゼーションをベースとするアッセイ法によって検出する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記 E p h B 4 遺伝子コピー数を増幅をベースとするアッセイ法によって検出する、請求項 22 に記載の方法。

30

【請求項 25】

前記 E p h B 4 遺伝子コピー数をマイクロアレイベースのプラットフォームを使用することによって検出する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

前記試験細胞がほ乳類細胞である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 27】

前記試験細胞がヒト細胞である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記試験細胞が腫瘍細胞である、請求項 22 に記載の方法。

40

【請求項 29】

前記腫瘍細胞が頭部及び頸部扁平上皮癌 (HNSCC)、前立腺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、結腸直腸細胞、肺腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞及び脳腫瘍細胞よりなる群から選択される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記試験細胞が原発腫瘍から得られる、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 31】

前記試験細胞が、原発腫瘍由来の転移性細胞が潜伏していることが疑われる組織から得られる、請求項 22 に記載の方法。

50

- 【請求項 3 2】
前記試験細胞がリンパ節又は骨髄から得られる、請求項 2 2 に記載の方法。
- 【請求項 3 3】
前記試験細胞が血液、血清、血漿、血液由来画分、リンパ液、胸膜液、大便、尿及び結腸流出液よりなる群から選択される体液中に存在する、請求項 2 2 に記載の方法。
- 【請求項 3 4】
前記試験細胞が試験細胞のプール中に存在する、請求項 2 2 に記載の方法。
- 【請求項 3 5】
被検体の予後の評価方法であって、
(a) 腫瘍を有することが疑われる又は腫瘍を有することが分かっている被検体から試験細胞を得、
(b) 該試験細胞における E p h B 4 活性上昇の指標を検出すること
を含み、
ここで、コントロール細胞に対する該試験細胞における E p h B 4 活性の指標の増加が、該被検体が転移癌を有し又は転移癌を発症する危険性が高いことを示す、前記方法。
- 【請求項 3 6】
前記 E p h B 4 活性の指標が E p h B 4 m R N A である、請求項 3 5 に記載の方法。
- 【請求項 3 7】
前記 E p h B 4 活性の指標が E p h B 4 蛋白質である、請求項 3 5 に記載の方法。
- 【請求項 3 8】
前記 E p h B 4 活性の指標が E p h B 4 遺伝子のコピー数である、請求項 3 5 に記載の方法。
- 【請求項 3 9】
E p h B 4 m R N A を、E p h B 4 ヌクレオチドプローブを使用したハイブリダイゼーションベースのアッセイ法によって検出する、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 4 0】
E p h B 4 m R N A を、E p h B 4 ヌクレオチドプライマーを使用した増幅ベースのアッセイ法によって検出する、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 4 1】
前記ヌクレオチドプローブ又はヌクレオチドプライマーが標識されている、請求項 3 9
又は 4 0 に記載の方法。
- 【請求項 4 2】
前記 E p h B 4 蛋白質を、E p h B 4 抗体を使用した免疫アッセイ法によって検出する、請求項 3 7 に記載の方法。
- 【請求項 4 3】
前記 E p h B 4 抗体が E p h B 4 抗体番号 1、2 3、3 5、4 7、5 7、7 9、8 5 L、8 5 H、9 1、9 8、1 2 1、1 3 1 及び 1 3 8 よりなる群から選択される、請求項 4 2 に記載の方法。
- 【請求項 4 4】
前記抗体が標識されている、請求項 4 2 に記載の方法。
- 【請求項 4 5】
E p h B 4 活性の指標を、マイクロアレイベースのプラットフォームを使用して検出する、請求項 3 5 に記載の方法。
- 【請求項 4 6】
前記試験細胞における E p h B 4 活性の指標の増加が、コントロール細胞の前記指標に対して少なくとも 3 倍である、請求項 3 5 に記載の方法。
- 【請求項 4 7】
前記試験細胞がほ乳類細胞である、請求項 3 5 に記載の方法。
- 【請求項 4 8】
前記試験細胞がヒト細胞である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 49】

前記試験細胞が腫瘍細胞である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 50】

前記腫瘍細胞が頭部及び頸部扁平上皮癌（HNSCC）、前立腺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、結腸直腸細胞、肺腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞及び脳腫瘍細胞よりなる群から選択される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 51】

前記試験細胞が原発腫瘍組織から得られる、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 52】

前記試験細胞が、原発腫瘍由来の転移性細胞が潜伏していることが疑われる組織から得られる、請求項 35 に記載の方法。

10

【請求項 53】

前記試験細胞がリンパ節又は骨髄から得られる、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 54】

前記試験細胞が血液、血清、血漿、血液由来画分、リンパ液、胸膜液、大便、尿及び結腸流出液よりなる群から選択される体液中に存在する、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 55】

前記試験細胞が試験細胞のプール中に存在する、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 56】

試験細胞における E p h B 4 遺伝子の遺伝子増幅を検出するためのキットであって、
 (a) 高ストリンジェントな条件下で該 E p h B 4 遺伝子にハイブリダイズすることができる 1 種以上の核酸と、
 (b) 規定の位置に 1 コピーの E p h B 4 を有するヒトゲノム DNA を有するコントロール核酸と

20

を備えるキット。

【請求項 57】

前記 1 種以上の核酸がハイブリダイゼーションベースのアッセイ法においてプローブとして使用される、請求項 56 に記載のキット。

【請求項 58】

前記 1 種以上の核酸が増幅ベースのアッセイ法においてプライマーとして使用される、請求項 56 に記載のキット。

30

【請求項 59】

試験細胞における E p h B 4 遺伝子の遺伝子増幅を検出するためのキットであって、
 (a) 高ストリンジェントな条件下で該 E p h B 4 遺伝子にハイブリダイズすることができる 1 種以上の核酸と、
 (b) 平均約 2 コピーの E p h B 4 遺伝子を有する少なくとも 1 種のコントロール細胞株と

を備えるキット。

【請求項 60】

平均約 4 コピーの E p h B 4 遺伝子を有する少なくとも 1 種のコントロール細胞株をさらに備える、請求項 59 に記載のキット。

40

【請求項 61】

癌に罹患した患者の治療方法であって、

(a) 該患者において、E p h B 4 遺伝子が遺伝子増幅した複数の腫瘍細胞を有する腫瘍を同定し、

(b) 該患者に、次の群：

(i) 生理学的条件下で E p h B 4 転写物にハイブリダイズし且つ細胞内での E p h B 4 発現を減少させる核酸化合物、及び

(ii) E p h B 4 の細胞機能を阻害するポリペプチド

よりなる群から選択される E p h B 4 選択的治療用化合物を投与すること

50

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2004年9月23日に出願された米国仮出願第60/612861号に基づく優先権を主張する。当該出願の全教示は、そのまま参照によって援用するものとする。

本発明は、腫瘍を検出し且つ治療するための組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

10

発明の背景

癌は、米国人の成人において重大な死亡原因である。しかしながら、多くの場合には、早期の癌は外科切除（切除術）によって治療できる。外科治療と化学療法剤とを組み合わせる種々の癌においてさらに高い生存率を達成することができる。ほとんどの癌において、生存率は、転移（末期）結腸癌患者では急激に低下する。

【0003】

罹患した患者の効果的なスクリーニング及び早期発見と適切な治療的介入とを組み合わせることで、例えば、結腸癌における死亡者数が減少することが分かっている。さらに、治療及び癌の進行を監視するための診断テストが、治療計画を作成し、そしてこのような計画を患者の状態に適合させる際に非常に有用である。

20

【0004】

最新の分子生物学によって、所定の生理学的状態と特に関連のある蛋白質及び核酸を同定することが可能になった。これらの分子マーカーは、妊娠からHIVのようなウイルス感染までを範囲とする様々な健康状態の診断法に大変革をもたらした。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

腫瘍の発見及び腫瘍の治療のための薬剤及び方法を提供することが本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

30

【0006】

発明の概略

ある種の態様では、本発明は、EphB4活性が高まるという指標が、癌状態、特に転移癌と関連があるという発見に関する。このような指標としては、EphB4のmRNA及び蛋白質レベルが挙げられる。驚くべきことに、EphB4遺伝子は、多くの癌、特に転移癌で増幅される。EphB4の増幅は、EphB4蛋白質レベルとの相関を示す。従って、EphB4遺伝子増幅（例えば、コピー数）を使用して癌状態を検出し且つ評価することもできる。

【0007】

ある種の態様では、本発明は、EphB4の発現又は機能の阻害剤による治療に適した腫瘍の同定方法を提供する。このような方法は、腫瘍内で、次の特徴の一つ以上：（a）EphB4蛋白質の異常に高い発現；（b）EphB4 mRNAの異常に高い発現；及び（c）EphB4遺伝子の遺伝子増幅を有する細胞を検出することを含むことができる。。（a）～（c）の特徴の一つ以上を有する細胞を含む腫瘍は、EphB4の発現又は機能の阻害剤による治療に感受性がある可能性が高い。EphB4を直接発現しない腫瘍もこれらの蛋白質をターゲットにした治療に感受性を有し得ることに留意すべきである。というのは、これらの蛋白質は、血管内皮で発現し且つ腫瘍の成長を助ける新たな毛細管の形成に参与することが知られているからである。EphB4の発現又は機能の阻害剤は、例えば、（i）EphB4選択的化合物（例えば、生理学的条件下でEphB4転写物にハイブリダイズし且つ細胞内でのEphB4の発現を低減させる核酸化合物、又はEph

40

50

B 4 の細胞機能を阻害するポリペプチド) であることができる。

【0008】

ある種の態様では、本発明は、試験細胞内における E p h B 4 遺伝子の遺伝子増幅の評価方法を提供する。このような方法は、試験細胞内における E p h B 4 遺伝子のコピー数を検出することを含むことができ、ここで、該試験細胞内での E p h B 4 遺伝子のコピー数がコントロール細胞の当該コピー数に対して増加することが該試験細胞内での E p h B 4 遺伝子の遺伝子増幅を示す。この E p h B 4 遺伝子のコピー数は、ハイブリダイゼーションをベースとするアッセイ法（例えば、サザンプロット法、in situ ハイブリダイゼーション法（ISH）及び比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH））又は増幅をベースとするアッセイ法（例えば、定量PCR）によって検出できる。随意に、この E p h B 4 遺伝子のコピー数は、マイクロアレイをベースとするプラットフォームを使用して検出される。好ましくは、これらの方法における試験細胞は、ヒト細胞のようなほ乳類細胞である。所定の場合には、該試験細胞は、頭部及び頸部扁平上皮癌（HNSCC）、前立腺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、結腸直腸細胞、肺腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞及び脳腫瘍細胞（これらに限定されない）を含む腫瘍細胞である。試験細胞は、腫瘍を有する疑いのある被検体又は腫瘍を有することが分かっている被検体から得ることができる。後者の場合には、試験細胞は、腫瘍組織、原発腫瘍又は該原発腫瘍に由来する転移細胞が潜伏している疑いのある組織から得ることができる。具体例として、試験細胞は、リンパ節又は骨髄から得られる。別の具体例として、試験細胞は、血液、血清、血漿、血液由来画分、リンパ液、胸膜液、大便、尿及び結腸流出液よりなる群から選択される体液（中に存在する）から得られる。特定の具体例では、試験細胞は、試験細胞のプール中に存在する。従って、該方法は、複数の試験細胞内での E p h B 4 の遺伝子増幅を同定し又はスクリーニングするために使用できる。

10

20

【0009】

ある種の態様では、本発明は、被検体における細胞の癌状態の評価方法を提供する。当該方法は、(a) 腫瘍を有することが疑われる又は分かっている被検体から試験細胞を得；(b) 該試験細胞内での E p h B 4 遺伝子のコピー数を検出することを含み、ここで、該試験細胞内での E p h B 4 遺伝子のコピー数がコントロール細胞の当該コピー数に対して増加することが、該試験細胞が腫瘍細胞であることを示す。この E p h B 4 遺伝子のコピー数は、ハイブリダイゼーションをベースとするアッセイ法（例えば、サザンプロット法、in situ ハイブリダイゼーション（ISH）及び比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH））又は増幅をベースとするアッセイ法（例えば、定量PCR）によって検出できる。随意に、E p h B 4 遺伝子のコピー数は、マイクロアレイをベースとするプラットフォームを使用して検出される。好ましくは、これらの方法における試験細胞は、ヒト細胞のようなほ乳類細胞である。所定の場合には、該試験細胞は、頭部及び頸部扁平上皮癌（HNSCC）、前立腺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、結腸直腸細胞、肺腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞及び脳腫瘍細胞（これらに限定されない）を含む腫瘍細胞である。例示すると、試験細胞は、腫瘍組織、原発腫瘍又は該原発腫瘍に由来する転移細胞が潜伏している疑いのある組織から得ることができる。具体例として、試験細胞は、リンパ節又は骨髄から得られる。別の具体例として、試験細胞は、血液、血清、血漿、血液由来画分、リンパ液、胸膜液、大便、尿及び結腸流出液よりなる群から選択される体液から得られ又はその中に存在する。特定の具体例では、試験細胞は、試験細胞のプール中に存在する。従って、該方法は、1以上の被検体における複数の細胞の癌状態を評価するために使用できる。

30

40

【0010】

ある種の態様では、本発明は、被検体の予後の評価方法であって、(a) 腫瘍を有することが疑われる又は分かっている被検体から試験細胞を得；(b) 該試験細胞における E p h B 4 活性の上昇という指標を検出することを含み、ここで、該試験細胞における E p h B 4 活性の指標がコントロール細胞の当該指標に対して増加することが、該被検体が転移癌を有する又は発症する危険性が高いことを示す被検体の予後の評価方法を提供する。ここで使用するとき、E p h B 4 活性の指標には、E p h B 4 mRNA、E p h B 4 蛋

50

白質及びE p h B 4 遺伝子のコピー数が含まれる。特定の具体例では、このE p h B 4 m R N A は、E p h B 4 ヌクレオチドプローブを使用したハイブリダイゼーションをベースとするアッセイ法又はE p h B 4 ヌクレオチドプライマーを使用した増幅をベースとするアッセイ法によって検出できる。随意に、この方法で使用されるヌクレオチドプローブ又はプライマーは標識されている。別の特定の具体例では、E p h B 4 蛋白質は、E p h B 4 抗体番号1、23、35、47、57、79、85L、85H、91、98、121、131又は138（これらに限定されない）を含むE p h B 4 抗体を使用した免疫アッセイ法によって検出できる。随意に、この方法で使用される抗体は標識される。さらに別の特定の具体例では、E p h B 4 遺伝子のコピー数は、ハイブリダイゼーションをベースとするアッセイ法又は増幅をベースとするアッセイ法によって検出できる。所定の場合には、E p h B 4 の指標は、マイクロアレイをベースとするプラットフォームを使用して検出される。ある具体例では、試験細胞におけるE p h B 4 の指標の増加は、コントロール細胞の指標に対して少なくとも3倍である。好ましくは、これらの方法における試験細胞は、ヒト細胞のようなほ乳類細胞である。所定の場合には、該試験細胞は、頭部及び頸部扁平上皮癌（H N S C C）、前立腺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、結腸直腸細胞、肺腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞及び脳腫瘍細胞（これらに限定されない）を含む腫瘍細胞である。例示すると、試験細胞は、腫瘍組織（例えば、原発腫瘍）又該原発腫瘍に由来する転移細胞が潜伏している疑いのある組織から得ることができる。具体例として、試験細胞は、リンパ節又は骨髄から得られる。別の具体例として、試験細胞は、血液、血清、血漿、血液由来画分、リンパ液、胸膜液、大便、尿及び結腸流出液よりなる群から選択される体液から得られ又はその中に存在する。特定の具体例では、試験細胞は、試験細胞のプール中に存在する。従って、該方法は、2以上の被検体の予後を評価するために使用できる。

10

20

30

40

50

【0011】

ある種の態様では、本発明は、癌に冒された患者の治療方法であって、(a)該患者において、E p h B 4 遺伝子が遺伝子増幅した複数の癌細胞を有する腫瘍を同定し；(b)該患者にE p h B 4 選択的治療化合物（例えば、E p h B 4 転写産物に生理的条件下でハイブリダイズし、且つ、細胞内でのE p h B 4 の発現を減少させる核酸化合物又はE p h B 4 の細胞機能を阻害するポリペプチド）を投与することを含む治療方法を提供する。このような方法は、診断の一部として、該患者において、E p h B 4 が遺伝子増幅した複数の癌細胞を有する腫瘍を同定することを包含し得る。遺伝子増幅は、ハイブリダイゼーションをベースとするアッセイ法（例えば、in situ ハイブリダイゼーション）及び増幅をベースとするアッセイ法（例えば、定量P C R）を含め、様々な方法で検出できる。

【0012】

ある種の態様では、本発明は、試験細胞内におけるE p h B 4 遺伝子の遺伝子増幅を検出するためのキットを提供する。このようなキットは、(a)高度にストリンジェントな条件下でE p h B 4 遺伝子にハイブリダイズできる1種以上の核酸と、(b)正常な位置で1コピーのE p h B 4 を有するヒトゲノムD N Aを含むコントロール核酸とを備えることができる。例えば、このキットの核酸は、ハイブリダイゼーションをベースとするアッセイ法においてプローブとして使用でき、又は増幅をベースとするアッセイ法においてプライマーとして使用できる。

【0013】

ある種の態様では、本発明は、試験細胞内におけるE p h B 4 遺伝子の遺伝子増幅を検出するためのキットを提供する。このようなキットは、(a)高度にストリンジェントな条件下でE p h B 4 遺伝子にハイブリダイズできる1種以上の核酸と、(b)平均約2コピーのE p h B 4 遺伝子を有する少なくとも1種のコントロール細胞株とを備えることができる。随意に、該キットは、平均約4コピーのE p h B 4 遺伝子を有する少なくとも1種のコントロール細胞株をさらに備えることができる。

【発明を実施するための最良の形態】**【0014】****図面の簡単な説明**

図 1 は、B 4 E C v 3 蛋白質のアミノ酸配列を示す（非開裂 E p h B 4 リーダーペプチドを含む前駆体の予想される配列を示す）。

【 0 0 1 5 】

図 2 は、B 4 E C v 3 N T 蛋白質のアミノ酸配列を示す（非開裂 E p h B 4 リーダーペプチドを含む前駆体の予想される配列を示す）。

【 0 0 1 6 】

図 3 は、B 2 E C 蛋白質のアミノ酸配列を示す（非開裂エフリン B 2 リーダーペプチドを含む前駆体の予想される配列を示す）。

【 0 0 1 7 】

図 4 は、B 4 E C v 3 - F C 蛋白質のアミノ酸配列を示す（非開裂 E p h B 4 リーダーペプチドを含む前駆体の予想される配列を示す）。

【 0 0 1 8 】

図 5 は、B 2 E C - F C 蛋白質のアミノ酸配列を示す（非開裂エフリン B 2 リーダーペプチドを含む前駆体の予想される配列を示す）。

【 0 0 1 9 】

図 6 は、可溶性 E p h B 4 E C 組換え蛋白質のドメイン構造を示す。これらのドメインの名称は次の通りである：L = リーダーペプチド、G = 球状（リガンド結合ドメイン）、C = C y s リッチドメイン、F 1、F 2 = フィブロネクチン III 型反復配列、H = 6 × H i s タグ。

【 0 0 2 0 】

図 7 は、H N S C C 一次組織及び転移組織における E p h B 4 発現と遺伝子増幅を示す。（ A ）上部：該方法に記載したように E p h B 4 モノクローナル抗体で染色し且つ腫瘍細胞に限局された D A B（茶色）で視覚化された代表的なアーカイブ切片の免疫組織化学。下部：隣接切片のヘマトキシリン及びエオシン（H & E）染色。濃い紫の染色は、腫瘍細胞の存在を示す。右手のカラムは、E p h B 4 ポリクローナル抗体（右上）で染色され且つ D A B で視覚化されたリンパ節転移の凍結切片である。コントロール（中央）は、ヤギ血清とのインキュベーションであり、そして H & E（下）から、染色されない間質で取り囲まれた転移中心の位置が明らかになる。（ B ）ランオフ転写によって生じた E p h B 4（左カラム）及びエフリン B 2（右カラム）の D I G 標識アンチセンス又はセンスプロンプをプローブとした H N S C C 症例の連続凍結切片の *in situ* ハイブリダイゼーション。ハイブリダイゼーションシグナル（濃い青）を、アルカリホスファターゼ結合抗 D I G 抗体を使用して検出し、そして切片をヌクレアーファーストレッドで対比染色した。H & E で染色した連続切片染色（左下）は、腫瘍構造を明らかにするために示している。（ C ）腫瘍（T）、腫瘍の浸潤のない正常な組織（N）及びリンパ節生検（LN）からなる患者試料の蛋白質抽出物のウェスタンブロット。試料を 4 ~ 20 % トリス - グリシニングルでのポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分画し、その後ナイロン膜上に電気ブロットした。続いて、膜を E p h B 4 モノクローナル抗体及び α -アクチンモノクローナル抗体で精査した。化学ルミネッセンスシグナルをオートラジオグラフィフィルム上で検出した。示されているのは、120 kD で移動する E p h B 4 に特異的なバンド及び 40 kD で移動する α -アクチンである。この α -アクチンシグナルをそれぞれの試料のローディングと転写のためのコントロールに使用した。（ D ）E p h B 4 遺伝子のコピー数の増加によって示されるような H N S C C 一次組織及び転移組織における E p h B 4 遺伝子増幅の調査。

【 0 0 2 1 】

図 8 は、H N S C C 細胞株における E p h B 4 発現及び遺伝子増幅を示す。（ A ）S C C 細胞株における E p h B 4 発現の調査。図 7 C に記載したような、E p h B 4 モノクローナル抗体を連続的にプローブとし、はぎ取り、そして α -アクチンモノクローナル抗体を再度プローブとした全細胞溶解物のウェスタンブロット。（ B ）E p h B 4 遺伝子のコピー数の増加によって示されるような、S C C 細胞株のいくつかにおける E p h B 4 遺伝子増幅の調査。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

図 9 は、前立腺細胞株における E p h B 4 の発現。(A) E p h B 4 モノクローナル抗体をプローブとした様々な前立腺癌細胞株、正常の前立腺由来細胞株 (M L C) 及び急性骨髄芽球リンパ腫細胞 (A M L) の全細胞溶解物のウェスタンブロット。(B) ウェスタンブロットによって決定される P C - 3 細胞における E p h B 4 の磷酸化。

【 0 0 2 3 】

図 1 0 は、前立腺癌組織での E p h B 4 の発現を示す。 E p h B 4 モノクローナル抗体 (左上) 又はアイソタイプ特異的コントロール (左下) で染色された代表的な前立腺癌凍結切片。 E p h B 4 モノクローナル抗体で染色された隣接 B P H 組織 (右上) 。陽性のシグナルは、腫瘍細胞内では褐色である。基質及び正常の上皮は陰性である。 E p h B 4 の膜貫通の局在と一致する、腫瘍組織内における染色の膜局在に留意されたい。癌試料及び隣接する B P H 組織 (右下) から抽出された R N A の代表的な Q R T - P C R 。

10

【 0 0 2 4 】

図 1 1 は、 R T - P C R (A) 及びウェスタンブロット (B) によって示されるように E p h B 4 及びエフリン B 2 が中皮腫細胞内で発現していることを示す。

【 0 0 2 5 】

図 1 2 は、エフリン B 2 及び E p h B 4 の発現を中皮腫細胞内での *in situ* ハイブリダイゼーションによって示している。アンチセンスプローブと共にエフリン B 2 又は E p h B 4 (上列) にハイブリダイズさせた、チャンバースライド中で培養した N C I H 2 8 中皮腫細胞。それぞれのハイブリダイゼーションについてのコントロールはセンスプローブであった (下列) 。陽性反応は、紺青色の細胞質染色である。

20

【 0 0 2 6 】

図 1 3 は、中皮腫培養液中での E p h B 4 及びエフリン B 2 の細胞発現を示す。悪性中皮腫患者の胸水由来の一次細胞単離体並びに細胞株 N C I H 2 8 、 N C I H 2 3 7 3 及び N C I H 2 0 5 2 をエフリン B 2 及び E p h B 4 に対して免疫蛍光染色したもの。緑色は F I T C 標識二次抗体に対する陽性シグナルである。免疫蛍光染色の特異性を一次抗体なしでのシグナルの欠落によって実証した (最前列) 。細胞核を D A P I (青色) で対比染色して全ての細胞の位置を明らかにした。示されているのは、 D A P I 及び F I T C 蛍光の組み合わせの画像である。原倍率は 2 0 0 倍である。

【 0 0 2 7 】

図 1 4 は、中皮腫におけるエフリン B 2 及び E p h B 4 の発現を示している。悪性中皮腫生検の免疫組織化学。腫瘍構造を明らかにするための H & E 染色切片 ; 左下のパネルは、一次抗体なしのバックグラウンドコントロールである。 E p h B 4 及びエフリン B 2 に特異的な染色は茶色である。原倍率は 2 0 0 倍である。

30

【 0 0 2 8 】

図 1 5 は、エフリン B 2 (E p h B 4 ではない) が K S 生検組織内で発現することを示している。(A) エフリン B 2 及び E p h B 4 についてのアンチセンスプローブによる *in situ* ハイブリダイゼーションと、腫瘍構造を明らかにするための H & E 染色切片。 I S H における紺青色は、エフリン B 2 に対する陽性反応を示している。 E p h B 4 についてのシグナルは、カポジ肉腫生検では全く検出されなかった。対照的に、 E p h B 4 についての I S H シグナルは、扁平上皮癌腫瘍細胞で強い。また、 K S でも、エフリン B 2 が E p h B 4 - A P 融合蛋白質 (左下) を使用して検出された。(B) E p h B 4 / F c 融合蛋白質によるエフリン B 2 の検出。隣接する切片を H & E で染色して (左) 腫瘍構造を示した。長方形で囲った部分は、方法の部分で説明したように F I T C 標識抗ヒト F c 抗体で検出された E p h B 4 / F c 処理切片 (中央) に示される領域を示す。コントロールとして、隣接する切片をヒト F c 断片 (右) で処理した。 E p h B 4 / F c の該切片への結合によって生じる特異的シグナルは、腫瘍細胞の領域にしか見られない。(C) エフリン B 2 と H H V 8 潜伏蛋白質 L A N A 1 の同時発現。凍結 K S 生検材料のエフリン B 2 (赤) 、 L A N A 1 (緑) 又は E p h B 4 (赤) に対する抗体による二重標識共焦点免疫蛍光顕微鏡分析から、 K S 生検における L A N A 1 とエフリン B 2 の同時発現を直接実証す

40

50

る。同時発現は、黄色として観察される。沃化プロピジウム核染色（赤）した細胞における P E C A M - 1 に対する抗体（緑）による生検の二重標識共焦点画像から、腫瘍の脈管性の実証される。

【 0 0 2 9 】

図 1 6 は、H H V - 8 がカボジ肉腫細胞内で動脈マーカーの発現を誘導することを示す。(A) 様々な細胞溶解物についてのエフリン B 2 に対するウェスタンブロット。S L K - v G P C R は H H V - 8 v G P C R を発現する S L K の安定クローンであり、S L K - p C E F L は空の発現ベクターをトランスフェクトした対照の安定クローンである。L A N A 又は L A N A 4 4 0 をトランスフェクトした S L K 細胞は、それぞれ、S L K - L A N A 及び S L K - 4 4 0 である。蛋白質負荷量及び転移量を、 α -アクチンモノクローナル抗体によって再度膜を検査することによって決定した。(B) 発現ベクター p v G P C R - C E F L による K S - S L K 細胞のトランジェントトランスフェクションによって、F I T C による免疫蛍光染色（緑）で示されるように、エフリン B 2 の発現が生じたが、コントロールベクター p C E F L はいかなる影響も及ぼさなかった。K S - S L K 細胞 (0.8×10^5 / ウェル) に $0.8 \mu\text{g}$ の DNA をリポフェクタミン 2 0 0 0 を使用してトランスフェクトした。24 時間後の細胞を固定し、そしてエフリン B 2 ポリクローナル抗体及び F I T C 結合二次抗体で染色した。(C) v G P C R による H U V E C のトランジェントトランスフェクションは、エフリン B 2 ルシフェラーゼ構築物からの転写を誘導する。24 ウェルプレート中 8×10^3 個の H U V E C に、スーパーフェクトを使用して、翻訳開始部位に対して - 2 9 4 1 ~ - 1 1 までの配列又は図のように 2 個の 5' - 欠失を含む $0.8 \mu\text{g}$ / ウェルのエフリン B 2 プロモーター構築物を 80 ng / ウェルの p C E F L 又は p v G P C R - C E F L と共にトランスフェクトした。ルシフェラーゼをトランスフェクション後 48 時間で決定した。その誘導比をグラフの右に示している。p G L 3 B a s i c は、プロモーターを欠くルシフェラーゼコントロールベクターである。ルシフェラーゼは、G P C R が同時トランスフェクトした β -ガラクトシダーゼの発現を誘導したため、蛋白質に基準化された。グラフは、6 回の反復試験の平均 + S E M である。示されているのは、3 つの類似の実験のうちの一つである。

10

20

【 0 0 3 0 】

図 1 7 は、膀胱癌細胞株内での E p h B 4 の発現 (A) 及び E G F R シグナル伝達経路による E p h B 4 発現の調節 (B) を示す。

30

【 0 0 3 1 】

図 1 8 は、ヒト E p h B 4 のゲノムヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 3 2 】

図 1 9 は、ヒト E p h B 4 の c D N A ヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 3 3 】

図 2 0 は、ヒトエフリン B 2 のゲノムヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 3 4 】

図 2 1 は、ヒトエフリン B 2 の c D N A ヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 3 5 】

図 2 2 は、ヒト E p h B 4 のアミノ酸配列を示す。

40

【 0 0 3 6 】

図 2 3 は、ヒトエフリン B 2 のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 7 】

図 2 4 は、E p h B 4 抗体の例及びこれらの抗体のエピトープマッピングを示す。球状ドメイン (G)、システインリッチドメイン (C) 及び 2 個のフィブロネクチン 3 型ドメイン (F 1 及び F 2) を含め、E p h B 4 細胞外ドメインのトポロジーを示している。

【 0 0 3 8 】

発明の詳細な説明

I . 概要

本発明は、一部、エフリン B 2 / E p h B 4 リガンド / 受容体経路を介したシグナル伝

50

達が腫瘍形成に寄与するという発見に基づく。本出願人は、腫瘍細胞内でのエフリン B 2 又は E p h B 4 の発現又は発現の増加を発見し、そしてエフリン B 2 又は E p h B 4 の発現又は活性のいずれかをブロックするための抗腫瘍治療剤を開発した。さらに、本出願人は、E p h B 4 遺伝子がいくつかの腫瘍、例えば、頭部及び頸部扁平上皮癌 (H N S C C)、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膀胱癌及び脳癌内で増幅されることを見いだした。従って、ある種の態様では、本発明は、試験細胞試料における E p h B 4 の遺伝子増幅を評価することを含む検出方法及び診断方法を提供する。

【 0 0 3 9 】

さらに、本発明は、腫瘍におけるエフリン B 2 の遺伝子増幅を意図し、しかして試験細胞試料におけるエフリン B 2 の遺伝子増幅を評価することを含む検出方法及び診断方法を提供する。読みやすさのために、以下の開示は、主として E p h B 4 に関する方法及び組成物に言及する。しかしながら、当業者であれば、同様の方法及び組成物がエフリン B 2 を使用して導き出せることを容易に認識するであろう。

10

【 0 0 4 0 】

本明細書、特に実施例において説明する研究は、エフリン B 2 及び E p h B 4 に言及するものである。しかしながら、本発明は、腫瘍内で発現するエフリンリガンド及び / 又は E p h 受容体であってそれらの各ファミリーの中にあるもののいずれをも意図する。エフリン (リガンド) は、2 種の構造型のものであり、これらは配列の関係に基づき、及び機能として、それらのものが示す 2 種の対応する受容体サブグループに対する選択的結合に基づき、さらに細分化できる。構造的には、2 タイプのエフリンが存在する：グリセロホスファチジルイノシトール (G P I) 結合によって膜に固定されるもの及び膜貫通ドメインを介して固定されるもの。慣例的に、該リガンドは、E p h A 受容体に優先的に結合する G P I 結合蛋白質であるエフリン - A サブクラスと、一般に E p h B 受容体に優先的に結合する膜貫通蛋白質であるエフリン - B サブクラスとに分類されている。

20

【 0 0 4 1 】

該 E p h ファミリー受容体は、E p h に関連する受容体蛋白質 - チロシンキナーゼファミリーであり、エリトロポエチン産生ヒト肝細胞癌細胞株におけるその発現にちなんで名付けられた受容体である。これらは、それらの細胞外ドメイン配列の関係及びエフリン - A 蛋白質又はエフリン - B 蛋白質に対する優先的結合能に基づき、2 つのサブグループに分類される。エフリン - A 蛋白質と優先的に相互作用する受容体が E p h A 受容体であり、エフリン - B 蛋白質と優先的に相互作用する受容体が E p h B 受容体である。

30

【 0 0 4 2 】

E p h B 4 は、膜結合リガンドであるエフリン B 2 に特異的である (Sakano, S. 外, 1996 ; Brambilla R. 外, 1995)。エフリン B 2 は、膜貫通ドメインと、5 個の保存チロシン残基を有する細胞質領域と、P D Z ドメインとを有する E p h リガンドのクラスに属する。E p h 受容体は、クラスターを形成した膜結合エフリンの結合によって活性化される (Davis S 外, 1994) が、これは、該受容体を発現する細胞と該リガンドを発現する細胞との接触が E p h の活性化に必要であることを示す。リガンドが結合すると、E p h 受容体は二量体化し、且つ、近傍の膜チロシン残基を自己燐酸化させて完全な活性化を獲得する (Kalo MS 外, 1999, Binns KS, 2000)。該 E p h 受容体を介した順方向のシグナル伝達に加えて、逆方向のシグナル伝達がエフリン B を介して生じ得る。エフリンの E p h 結合によって、細胞内保存チロシンの迅速な燐酸化が生じ (Bruckner K, 1997)、そして P D Z 結合蛋白質のやや緩やかな動員が生じる (Palmer A 2002)。近年、いくつかの研究から、E p h / エフリンの高発現が腫瘍成長、腫瘍形成及び転移についての高い可能性に関連している可能性があることが示された (Easty DJ, 1999 ; Kiyokawa E, 1994 ; Tang XX, 1999 ; Vogt T, 1998 ; Liu W, 2002 ; Stephenson SA, 2001 ; Steube KG 1999 ; Berclaz G, 1996)。

40

【 0 0 4 3 】

本発明の一態様は、腫瘍又は腫瘍予後の状態を評価するための検出方法を提供し、この場合に、腫瘍はエフリン B 2 及び / 又は E p h B 4 を発現する。このような方法は、試験

50

細胞試料におけるエフリン B 2 又は E p h B 4 の遺伝子増幅を評価することを含む。

【 0 0 4 4 】

本発明の別の態様は、エフリン B 2 及び / 又は E p h B 4 を発現する腫瘍の成長速度を低下させるための治療方法を提供する。このような方法は、エフリン B 2、E p h B 4 又はその両方の発現又は活性を阻害する治療剤の所定量を投与することを含む。

【 0 0 4 5 】

11. 検出試薬及び検出方法

ある具体例では、本発明は、少なくとも部分的に、E p h B 4 遺伝子がいくつかの腫瘍、例えば、頭部及び頸部扁平上皮癌 (H N S C C)、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膀胱癌及び脳癌内で増幅されるという本出願人の発見に基づく。さらに、E p h B 4 の発現は、これらの腫瘍内で E p h B 4 遺伝子の増幅と共にそれに対応して上昇することが分かった。従って、E p h B 4 遺伝子の増幅は、新形成又はその可能性の診断に役立ち得る。或いは、ヒト E p h B 4 をコードする物質 (例えば、m R N A 及び蛋白質) の発現の上昇を検出することも新形成又は悪性形質転換の可能性の診断に役立つ。さらに、E p h B 4 発現の上昇に至る他の遺伝子変化、例えば、E p h B 4 遺伝子の調節領域における突然変異が腫瘍形成にも関与し得ることがさらに考えられる。

10

【 0 0 4 6 】

ある種の態様では、本発明は、被検体 (個人又は患者) における腫瘍の状態、腫瘍予後及び生存可能性を評価する (判断する又は測定する) ための方法であって、E p h B 4 活性の指標を検出することを含むものを提供する。ここで使用するとき、E p h B 4 活性の指標としては、E p h B 4 遺伝子のコピー数、E p h B 4 m R N A 及び E p h B 4 蛋白質が挙げられる。また、ここでは、E p h B 4 m R N A 及び E p h B 4 蛋白質は、E p h B 4 の遺伝子発現産物ともいう。

20

【 0 0 4 7 】

ある種の特定の具体例では、本発明は、E p h B 4 遺伝子増幅の検出方法を提供する。遺伝子増幅の検出は、標的遺伝子のコピー数を決定することによって評価できる。一般に、正常の二倍体細胞は、所定の常染色体遺伝子を 2 コピー有する。しかしながら、このコピー数は、例えば、癌細胞内での遺伝子の増幅又は重複によって増加し得る。特定の遺伝子のコピー数を評価する方法は斯界に周知であり、特に、ハイブリダイゼーションをベースとしたアッセイ法及び増幅をベースとしたアッセイ法が挙げられる。

30

【 0 0 4 8 】

例えば、多数のハイブリダイゼーションをベースとしたアッセイ法を使用して生物学的試料の細胞内における標的遺伝子のコピー数を検出することができる。このような方法の一つはサザンプロット法 (Ausubel 外又は Sambrook 外参照) であり、この方法では、ゲノム D N A を典型的に断片化し、電気泳動によって分離し、膜に転写し、その後特異的なプローブにハイブリダイズさせる。試験細胞試料からのハイブリダイゼーションシグナルの強さと、増幅されていない正常のゲノム D N A を含むコントロール細胞からのシグナルの強さとの比較によって、E p h B 4 遺伝子の相対的なコピー数を推定することができる。コントロールと比較して増大したシグナルが遺伝子増幅の存在を示す。

40

【 0 0 4 9 】

試料中における遺伝子のコピー数を決定するための別法は、in situ ハイブリダイゼーション、例えば、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (F I S H) である (Angerer, 1987 Meth. Enzymol, 152 : 649 を参照)。一般に、in situ ハイブリダイゼーションは、次の主要な段階を含む : (1) 分析すべき組織又は生物学的構造体の固定 ; (2) 標的 D N A の接近性を増大させ且つ非特異的な結合を減少させるための該生物学的構造体の予備ハイブリダイゼーション処理 ; (3) 生物学的構造体又は組織内の核酸に対する核酸混合物のハイブリダイゼーション ; (4) 該ハイブリダイゼーション中に結合しなかった核酸断片を除去するためのハイブリダイゼーション後洗浄及び (5) ハイブリダイズした核酸断片の検出。このような用途において使用されるプローブは、典型的には、例えば、放射性同位体又は蛍光レポーターで標識されている。好ましいプローブは、ストリンジェント

50

な条件下で該標的核酸との特異的なハイブリダイゼーションを可能にするほど十分に長い、例えば、約50、100又は200ヌクレオチド～約1000ヌクレオチド以上である。

【0050】

遺伝子のコピー数を決定するための他の別法は比較ゲノムハイブリダイゼーション（C G H）である。比較ゲノムハイブリダイゼーション方法では、核酸の「試験」採取物が第1標識で標識されると共に、第2採取物（例えば、正常の細胞又は組織由来の）が第2標識で標識される。該核酸のハイブリダイゼーションの比率は、所定の配列でそれぞれの線維に結合する第1標識と第2標識の比によって決定される。これら2種の標識とのシグナルの比の差（例えば、該試験採取物における遺伝子増幅による）を検出し、そしてこの比がE p h B 4遺伝子のコピー数の基準となる。遺伝子コピー数偏差の細胞遺伝学的な図をC G Hによって作成することができるが、これは、区別がつくように標識された試験及び基準ゲノムD N Aからの染色体全長に沿った蛍光比を与える。

10

【0051】

本発明の方法で使用するのに好適なハイブリダイゼーションプロトコールは、例えば、Albertson (1984) EMBO J. 3: 1227 - 1234; Pinkel (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 85: 9138 - 9142; EPO Pub. No. 430: 402; Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In Situ Hybridization Protocols, Choo, 著, Humana Press, Totowa, NJ. (1994)に記載されている。

20

【0052】

或いは、増幅をベースとするアッセイ法を使用して標的遺伝子（例えば、E p h B 4）のコピー数を測定することもできる。このようなアッセイ法では、標的核酸配列は、増幅反応（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、即ちP C R）における鋳型として作用する。定量的な増幅では、増幅産物の量は、元の試料中の鋳型の量に比例する。好適なコントロールとの比較は、上で議論した原理に従い、該遺伝子のコピー数の基準を与える。T a q M a nプローブを使用したリアルタイム定量P C Rの方法が斯界に周知である。リアルタイム定量P C Rについての詳細なプロトコールは、例えば、R N Aについては、「Gibson外., 1996, A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res., 10: 995 - 1001」; 及びD N Aについては、「Heid外., 1996, Real time quantitative PCR. Genome Res., 10: 986 - 994」に与えられている。また、T a q M a nをベースとしたアッセイ法を使用してE p h B 4遺伝子のコピー数を定量することもできる。T a q M a nをベースとしたアッセイ法は、5'蛍光色素及び3'消光剤を含有する蛍光原オリゴヌクレオチドプローブを使用する。このプローブは、所定のP C R産物にハイブリダイズするが、3'末端の遮断剤のためそれ自体は延長できない。該P C R産物がその後のサイクルで増幅されると、そのポリメラーゼ（例えば、A m p l i T a q）の5'ヌクレアーゼ活性によって、T a q M a nプローブが開裂する。この開裂によって5'蛍光色素と3'消光剤とが分離し、それによって増幅の関数として蛍光が増加する（例えば、<http://www2.perkin-elm.com>を参照）。

30

【0053】

E p h B 4遺伝子のコピー数を決定するための定量的な増幅反応に使用する好ましいプライマーの例を以下に与える：

40

E p h B 4 - 順 : 5' - TCC TGC AAG GAG ACC TTC AC - 3'

E p h B 4 - 逆 : 5' - CAG AGG CCT CGC AAC TAC AT - 3'

P C R産物の予想されるサイズ : 195 b p。

【0054】

これらのプライマーは、好ましくは、コピー数の増加が予期されない所定の遺伝子に向けられる、以下のようなコントロールプライマーのセットで使用される：

G A P D H - 順 : 5' - GAG GGG TGA TGT GGG GAG TA - 3'

G A P D H - 逆 : 5' - GAG CTT CCC GTT CAG CTC AG - 3'

予想されるサイズ : 206 b p

50

プライマーの両セットについてのアニーリング温度：64。

【0055】

他の好適な増幅ベース方法としては、例えば、リガーゼ連鎖反応（LCR）（Wu及びWallace, Genomics, 4:560, 1989; Landegren外., Science, 241:1077, 1988; 並びにBarringer外., Gene, 89:117, 1990を参照）、転写増幅（Kwoh外., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173, 1989）、自立配列複製（Guatelli外., Proc Nat Acad Sci, USA 87:1874, 1990）、ドットPCR及びリンカーアダプターPCRが挙げられるが、これらに限定されない。

【0056】

遺伝子のコピー数を決定するための別の強力な方法は、マイクロアレイベースのプラットフォームを使用する。マイクロアレイ技術は、高い分解能を与えるため使用できる。例えば、従来のCGHは、一般に、20Mbに制限されるマッピング分解能を有するが、マイクロアレイベースCGHでは、区別的に標識された試験及び基準ゲノムDNAの蛍光比によってDNAコピー数の変化の位置毎の測定値が与えられ、それによってマッピング分解能の増加が達成される。様々なマイクロアレイ方法の詳細は、文献に見いだすことができる。例えば、米国特許第6,232,068号; Pollack外., Nat. Genet., 23(1):41-6, (1999)などを参照されたい。

【0057】

他の特定の具体例では、本発明は、遺伝子発現産物（例えば、EphB4 mRNA又は蛋白質）の検出に関する。mRNAへの転写は、ノーザンブロット法（Thomas (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205）、ドットブロット法及びin situ ハイブリダイゼーション法を含め、様々な技術によって測定できる。ウェスタンブロット法及び免疫組織化学染色法を含め、遺伝子産物の発現を測定するための様々な方法が存在する。ウェスタンブロットは、ゲル（通常はSDSゲル）上に蛋白質試料を展開し、該ゲルを硝酸セルロースフィルターにブロットし、そして該フィルターを標識抗体でプローブすることによって実施される。免疫組織化学染色技術では、細胞試料を典型的には脱水及び固定し、次いで結合される遺伝子産物に特異的な標識抗体と反応させることによって調製されるが、ここで該標識は、通常、酵素標識、蛍光標識、発光標識などのような視覚によって検出できるものである。本発明で使用するのに好適な特に感度のよい染色技術は、Hsu外. (1980) Am. J. Clin. Path. 75:734-738に説明されている。

【0058】

ある種の態様では、EphB4活性の指標（例えば、遺伝子増幅）レベルの増加が腫瘍の侵襲性及び腫瘍が転移した又は転移するであろう可能性に直接関連する。例えば、EphB4遺伝子の増幅について陽性と検査される患者は生存する見込みが少なく（予後が不十分）且つ通常はこのような遺伝子増幅がない患者よりも腫瘍の外科切除後に受ける再燃時間が短いであろう。別の例として、遺伝子増幅を示す患者は、それらの腫瘍の外科切除後に積極的な治療計画の恩恵を享受し得る。逆に、遺伝子増幅を示さない患者は、このような厳格な治療を必要とする可能性が低いかもしれない。

【0059】

ある種の態様では、本発明は、充実性腫瘍及び造血癌の両方を含めて広く様々な腫瘍性疾患をスクリーニングするために有用である。代表的な腫瘍性疾患としては、腺癌及び黒色腫のような上皮性悪性腫瘍；神経芽腫及び網膜芽細胞腫のような中胚葉性腫瘍；骨肉腫、ユーイング肉腫及び様々な白血病のような肉腫；並びにリンパ腫が挙げられるが、これらに限定されない。特に興味のあるものは、前立腺、頭部及び頸部、乳房、卵巣、結腸及び直腸、肺、胃、脳及び肝臓の上皮性悪性腫瘍である。

【0060】

本発明の一形態によれば、ヒトにおける腫瘍性組織の診断方法を提供する。試験試料（例えば、組織又は体液）をヒトから単離し、そしてヒトEphB4遺伝子のコピー数を決定する。或いは、ヒトEphB4遺伝子発現産物のレベルを決定することができる。これらは、蛋白質及びmRNAを包含する。

10

20

30

40

50

【0061】

癌（腫瘍）の性質に応じて、適切な患者試料が得られる。例えば、充実性腫瘍の場合には、外科切除された腫瘍からの組織試料を得、そして従来技術によって試験のために調製する。リンパ腫及び白血病の場合には、リンパ球、白血病細胞又はリンパ組織を得、そして適切に調製する。所定の場合には、試験組織又は試験細胞は、腫瘍（例えば、原発腫瘍）又は腫瘍性であることが疑われる組織から得られる。通常、試験組織又は試験細胞は、望ましくは、分析のために正常な外見の組織から分離される。これは、斯界に知られているように、パラフィン又は凍結切片法又はフローサイトメトリーによって行うことができる。他の場合では、試験組織又は試験細胞は、原発腫瘍に由来する転移細胞を有することが疑われる組織、例えばリンパ節又は該原発腫瘍に近い組織から得られる。随意に、非腫瘍性組織又は任意の正常組織を使用して遺伝子発現又は遺伝子のコピー数の基準レベルを決定し、これとE p h B 4 遺伝子の発現又は遺伝子増幅の量とを比較することができる。

10

【0062】

別の特定の具体例では、体液のような試験試料も特定の腫瘍での使用に役立つであろう。例えば、体液をアッセイして遺伝子発現産物又は遺伝子増幅のレベル上昇を検出することができる。好適な体液としては、血液、血清、血漿、血液由来画分、リンパ液、唾液、痰、大便、尿、結腸流出液、乳房浸出液が挙げられ、また広く様々な有用な免疫アッセイ法は、特許文献及び科学文献に記載されている。例えば、米国特許第3,791,932号；同3,817,837号；同3,839,153号；同3,850,752号；同3,850,578号；同3,853,987号；同3,867,517号；同3,879,262号；同3,901,654号；同3,935,074号；同3,984,533号；同3,996,345号；同4,034,074号；及び同4,098,876を参照されたい。

20

【0063】

ある種の具体例では、遺伝子増幅の測定は、E p h B 4 遺伝子のコピー数が推定できるように定量的に実施されるであろう。病気の状態は、腫瘍細胞内に存在する遺伝子のコピー数と直接的に関係し得る。例えば、遺伝子増幅を示す患者（例えば、3コピーのE p h B 4 遺伝子）は、遺伝子増幅を示さない患者（例えば、2コピーのE p h B 4 遺伝子）よりも再発の危険性が高い。さらに、E p h B 4 遺伝子のコピー数が増加するにつれて、侵襲性及び転移の可能性も増加するように思われる。随意に、E p h B 4 遺伝子のコピー数は、従来因子と共に、リンパ節状態、エストロゲン受容体状態、プロゲステロン受容体状態などを含めて腫瘍状態を評価する際の重要な因子となるだろう。この利用できる情報の全てを用いて、治療する医師は、腫瘍状態を評価し、そして患者の利益に最良な治療戦略を推奨することができる。

30

【0064】

一般に、ヒトE p h B 4 遺伝子は、細胞がゲノム当たりこの遺伝子の正常のコピー数（2）以上を含む場合に、増幅したとみなされる。遺伝子増幅を検出するための様々な技術が斯界にはよく知られている。遺伝子増幅は、例えば、サザンプロット分析で決定でき、この場合には、ヒト組織からの細胞DNAを消化し、分離し、そしてフィルターに写し、このものに、相補的な核酸を含むプローブをハイブリダイズさせる。或いは、プライマーを用いた定量的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して遺伝子増幅を決定することもできる。好適なプライマーは、ヒトE p h B 4 コード配列を一まとめにした配列に結合するであろう。斯界に知られている遺伝子のコピー数を決定するための他の技術を制限なく使用できる。

40

【0065】

測定される遺伝子産物は、mRNAか蛋白質かのいずれかであることができる。用語「発現の上昇」とは、mRNAの産生又は蛋白質の産生が、非癌細胞によって正常に産生されるよりも増加することを意味する。増幅はヒトの腫瘍で観察されているが、これらの腫瘍又は他の腫瘍にはE p h B 4 の発現の上昇に至る他の遺伝子変化も存在し得る。腫瘍の例としては、HNSCC、肺、乳房、脳、結腸直腸、膀胱、前立腺、脳、肝臓、皮膚及び胃が挙げられるが、これらに限定されない。基準発現レベルを決定する際に使用される非

50

癌細胞は、腫瘍周辺の組織、他のヒト又はヒト細胞株から得ることができる。いかなる増加も診断価値を有し得るが、一般に、mRNA又は蛋白質発現は、非癌細胞において見いだされるものよりも少なくとも約2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、場合によっては約50倍まで上昇するであろう。mRNA又は蛋白質を検出するために使用される技術は周知であり、また斯界では日常的である。mRNA又は蛋白質産生の増加は、例えば、それぞれノーザンブロット分析又はウェスタンブロット分析を使用して、或いはELISA、免疫沈降法、RIAなどのような他の既知の技術を使用して検出できる。これらの技術の全ては当業者に周知である。

【0066】

本発明の別の形態によれば、ヒトEphB4遺伝子の増幅又はmRNA発現の上昇の決定用の核酸プローブ又はプライマーを提供する。このプローブは、リボ核酸又はデオキシリボ核酸を含むことができ、且つ、全ヒトEphB4コードヌクレオチド配列、それに相補的な配列又はそれらの断片を含むことができる。プローブは、例えば、図18及び19に示したようなヌクレオチドを含むことができる。一般に、プローブ又はプライマーは、該ヒト配列の少なくとも約14個の隣接ヌクレオチドを含むが、望ましくは約40、50又は100個のヌクレオチドを含む。プローブは、典型的には、蛍光タグ、放射性同位体又はこれらのものを容易に検出できる同様のものを含むことができる。好ましくは、該プローブは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするであろう。本発明のプローブは、ヒトEphB4遺伝子に相補的である。これは、これらのものがヒトEphB4との高い配列同一性（例えば、95%、98%、99%又は100%）を共有することを意味する。

【0067】

本発明によれば、EphB4蛋白質を、他のヒト蛋白質を実質的に含むことなく産生させることができる。EphB4のDNA配列を与えるにあたって、当業者であれば、非ヒト細胞内でそのcDNAを発現させることができる。このような細胞の溶解物は、他のヒト蛋白質を実質的に含まない蛋白質を与える。この溶解物は、例えば免疫沈降法又は親和性クロマトグラフィーによってさらに精製できる。

【0068】

本発明の抗体は、EphB4蛋白質と特異的に反応する。好ましくは、これらのものは、他の種からのEphB4とは交差反応しない。これらのものはポリクローナル又はモノクローナルであることができ、しかも天然EphB4又はEphB4融合蛋白質又は合成ペプチドに対するものとして得られ得る。該抗体は、他のヒト蛋白質上には存在しないEphB4エピトープと特異的に免疫反応する。随意に、いくつかの抗体は、ヒトEphB4にユニークで且つマウスホモログ上には存在しないエピトープと反応性がある。該抗体は、ウェスタンブロット分析、ELISA、免疫組織化学法及び蛋白質検出用の他の免疫アッセイ法のような従来分析に有用である。ポリクローナル抗体を作製及び精製するための技術は、モノクローナル抗体を調製するための技術と同様に、周知である。抗体の結合は、酵素標識二次抗体、ブドウ球菌蛋白質Aなどの使用のような、斯界に知られている方法によって決定できる。

【0069】

EphB4遺伝子に特異的なプローブ又はプライマーのような遺伝子のコピー数を決定するために必要な試薬並びに取扱説明書を収容したキットを提供する。この説明書は、決定された値と比較するための検量線を提供することができる。また、キットは、mRNA（例えば、プローブを含む）又はEphB4蛋白質（例えば、抗体を含む）の発現の上昇を決定するためにも提供される。説明書は、EphB4の発現レベルが上昇するかどうかを決定させることを可能にするであろう。また、反応容器及びクロモゲン、緩衝液及び酵素のような補助試薬もこのキットに含まれ得る。

【0070】

III. 治療剤

ある具体例では、本発明は、EphB4及び/又はエフリンB2の発現又は活性を妨げ

10

20

30

40

50

るための治療方法を提供する。この方法は、生体内、試験管内又は生体外で適用でき、しかも E p h B 4 活性の上昇の 1 以上の指標を有する癌に特に有用であろう。治療剤としては、核酸、ポリペプチド、抗体及び小分子化合物が挙げられる。これらの治療剤の例は、米国特許出願公開第 10 / 800,077 及び同 10 / 800,350 並びに国際公開第 U S 04 / 07491 号及び U S 04 / 07755 号パンフレットに記載されている。

【 0 0 7 1 】

例えば、本発明は、一本鎖、二重鎖又は多重鎖であることができる核酸治療剤を提供し、またこれは、修飾若しくは非修飾ヌクレオチド若しくは非ヌクレオチド又は様々な混合物及びそれらの組合せを含むことができる。核酸治療剤の例としては、アンチセンス核酸、d s R N A、s i R N A 及び酵素的核酸化合物（例えば、リボザイム又は D N A 酵素）が挙げられるが、これらに限定されない。随意に、この開示は、エフリン B 2 蛋白質をコードするエフリン B 2 遺伝子（例えば、Genbank Accession No. : NP_304084）又は E p h B 4 蛋白質をコードする E p h B 4 受容体遺伝子（例えば、Genbank Accession No. : NP_004435）の発現を独立に又は組み合わせて調節する 1 種以上の核酸治療剤を特徴とする。

10

【 0 0 7 2 】

特定の具体例では、代表的な E p h B 4 アンチセンス核酸を以下の表 1 に与えており、代表的な E p h B 4 s i R N A を以下の表 2 に与えている。別の特定の具体例では、代表的なエフリン B 2 アンチセンス核酸を以下の表 3 に与えており、代表的なエフリン B 2 s i R N A を以下の表 2 に与えている。

20

【 0 0 7 3 】

【表 1 - 1】

表 1. E p h B 4 アンチセンスプローブの例

名称	配列 5' → 3'	位置	E p h B 4 発現 の阻害	生存度の 減少率
Eph B4 169	TCA GTA CTG CGG GGC CGG TCC	(2944-2963)	++	36
Eph B4 168	TCC TGT CCC ACC CGG GGT TC	(2924-2943)	++	51
Eph B4 167	CCG GCT TGG CCT GGG ACT TC	(2904-2923)	+++	66
Eph B4 166	ATG TGC TGG ACA CTG GCC AA	(2884-2903)	++++	70

30

【 0 0 7 4 】

【表 1 - 2】

Eph B4 165	GAT TTT CTT CTG GTG TCC CG	(2864-2883)	++++	75
Eph B4 164	CCA GAG TGA CTC CGA TTC GG	(2844-2863)	++	40
Eph B4 163	AGC AGG TCC TCA GCA GAG AT	(2824-2843)	++++	66
Eph B4 162	CTG GCT GAC CAG CTC GAA GG	(2804-2823)		25
Eph B4 161	AGC CAA AGC CAG CGG CTG CG	(2784-2803)	+	33
Eph B4 160	AAA CTT TCT TCG TAT CTT CC	(2763-2783)	+	25
Eph B4 159	CAT TTT GAT GGC CCG AAG CC	(2743-2762)	++	40
Eph B4 158	ACT CGC CCA CAG AGC CAA AA	(2723-2742)		30
Eph B4 157	GCT GAG TAG TGA GGC TGC CG	(2703-2722)	+	25
Eph B4 156	CTG GTC CAG GAG AGG GTG TG	(2683-2702)	++	30
Eph B4 155	AGG CCC CGC CAT TCT CCC GG	(2663-2682)		25
Eph B4 154	GCC ACG ATT TTG AGG CTG GC	(2643-2662)	++	40
Eph B4 153	GGG GTT CCG GAT CAT CTT GT	(2623-2642)	++	35
Eph B4 152	CCA GGG CGC TGA CCA CCT GG	(2603-2622)	+	30
Eph B4 151	GGG AAG CGG GGC CGG GCA TT	(2583-2602)	+	25
Eph B4 150	CCG GTC TTT CTG CCA ACA GT	(2563-2582)	++	25
Eph B4 149	CCA GCA TGA GCT GGT GGA GG	(2543-2562)	++	20
Eph B4 148	GAG GTG GGA CAG TCT GGG GG	(2523-2542)	+	30
Eph B4 147	CGG GGG CAG CCG GTA GTC CT	(2503-2522)	++	40
Eph B4 146	GTT CAA TGG CAT TGA TCA CG	(2483-2502)	++++	70
Eph B4 145	TCC TGA TTG CTC ATG TCC CA	(2463-2482)	++++	80
Eph B4 144	GTA CGG CCT CTC CCC AAA TG	(2443-2462)	+++	60
Eph B4 143	ACA TCA CCT CCC ACA TCA CA	(2423-2442)	++++	80
Eph B4 142	ATC CCG TAA CTC CAG GCA TC	(2403-2422)	++	40
Eph B4 141	ACT GGC GGA AGT GAA CTT CC	(2383-2402)	+++	50
Eph B4 140	GGA AGG CAA TGG CCT CCG GG	(2363-2382)	++	45
Eph B4 139	GCA GTC CAT CGG ATG GGA AT	(2343-2362)	++++	70
Eph B4 138	CTT TCC TCC CAG GGA GCT CG	(2323-2342)	++++	70
Eph B4 137	TGT AGG TGG GAT CGG AAG AG	(2303-2322)	++	40
Eph B4 136	TTC TCC TCC AGG AAT CGG GA	(2283-2302)	++	35
Eph B4 135	AAG GCC AAA GTC AGA CAC TT	(2263-2282)	++++	60
Eph B4 134	GCA GAC GAG GTT GCT GTT GA	(2243-2262)	++	50
Eph B4 133	CTA GGA TGT TGC GAG CAG CC	(2223-2242)	++	40
Eph B4 132	AGG TCT CGG TGG ACG TAG CT	(2203-2222)	++	40
Eph B4 131	CAT CTC GGC AAG GTA CCG CA	(2183-2202)	+++	50
Eph B4 130	TGC CCG AGG CGA TGC CCC GC	(2163-2182)	++	50
Eph B4 129	AGC ATG CCC ACG AGC TGG AT	(2143-2162)	++	50
Eph B4 128	GAC TGT GAA CTG TCC GTC GT	(2123-2142)	++	50
Eph B4 127	TTA GCC GCA GGA AGG AGT CC	(2103-2122)	+++	60
Eph B4 126	AGG GCG CCG TTC TCC ATG AA	(2083-2102)	++	50
Eph B4 125	CTC TGT GAG AAT CAT GAC GG	(2063-2082)	++++	80
Eph B4 124	GCA TGC TGT TGG TGA CCA CG	(2043-2062)	++++	70
Eph B4 123	CCC TCC AGG CGG ATG ATA TT	(2023-2042)	++	50
Eph B4 122	GGG GTG CTC GAA CTG GCC CA	(2003-2022)	++++	80
Eph B4 121	TGA TGG AGG CCT CGC TCA GA	(1983-2002)	++	50
Eph B4 120	AAC TCA CGC CGC TGC CGC TC	(1963-1982)	++	40
Eph B4 119	CGT GTA GCC ACC CTT CAG GG	(1943-1962)	++++	75
Eph B4 118	TCT TGA TTG CCA CAC AGC TC	(1923-1942)	++++	80
Eph B4 117	TCC TTC TTC CCT GGG GCC TT	(1903-1922)	++++	70
Eph B4 116	GAG CCG CCC CCG GCA CAC CT	(1883-1902)	++	50
Eph B4 115	CGC CAA ACT CAC CTG CAC CA	(1863-1882)	++++	60
Eph B4 114	ATC ACC TCT TCA ATC TTG AC	(1843-1862)	++++	65
Eph B4 113	GTA GGA GAC ATC GAT CTC TT	(1823-1842)	++++	90
Eph B4 112	TTG CAA ATT CCC TCA CAG CC	(1803-1822)	++++	70
Eph B4 111	TCA TTA GGG TCT TCA TAA GT	(1783-1802)	++++	70
Eph B4 110	GAA GGG GTC GAT GTA GAC CT	(1763-1782)	++++	80
Eph B4 109	TAG TAC CAT GTC CGA TGA GA	(1743-1762)	++	50
Eph B4 108	TAC TGT CCG TGT TTG TCC GA	(1723-1742)	++	45

【 0 0 7 5 】

10

20

30

40

【表 1 - 3】

Eph B4 107	ATA TTC TGC TTC TCT CCC AT	(1703-1722)	++++	70
Eph B4 106	TGC TCT GCT TCC TGA GGC AG	(1683-1702)	++++	70
Eph B4 105	AGA ACT GCG ACC ACA ATG AC	(1663-1682)	++	40
Eph B4 104	CAC CAG GAC CAG GAC CAC AC	(1643-1662)	++++	70
Eph B4 103	CCA CGA CTG CCG TGC CCG CA	(1623-1642)	++	40
Eph B4 102	ATC AGG GCC AGC TGC TCC CG	(1603-1622)	+++	50
Eph B4 101	CCA GCC CTC GCT CTC ATC CA	(1583-1602)	++++	80
Eph B4 100	GTT GGG TCT GGC TGT GAT GT	(1563-1582)	++++	80
Eph B4 99	TCC TGG CCG AAG GGC CCG TA	(1543-1562)	++	35
Eph B4 98	GCC GGC CTC AGA GCG CGC CC	(1523-1542)	++	50
Eph B4 97	GTA CCT GCA CCA GGT AGC TG	(1503-1522)	++++	80
Eph B4 96	GCT CCC CGC TTC AGC CCC CG	(1483-1502)	++	50
Eph B4 95	CAG CTC TGC CCG GTT TTC TG	(1463-1482)	++	50
Eph B4 94	ACG TCT TCA GGA ACC GCA CG	(1443-1462)	++++	80
Eph B4 93	CTG CTG GGA CCC TCG GCG CC	(1423-1442)	++	40
Eph B4 92	CTT CTC ATG GTA TTT GAC CT	(1403-1422)	++++	80
Eph B4 91	CGT AGT CCA GCA CAG CCC CA	(1383-1402)	++++	85
Eph B4 90	CTG GGT GCC CCG GGA ACA GC	(1363-1382)	+++	50
Eph B4 89	CCA GGC CAG GCT CAA GCT GC	(1343-1462)	++++	70
Eph B4 88	TGG GTG AGG ACC GCG TCA CC	(1323-1342)	++	40
Eph B4 87	CGG ATG TCA GAC ACT GCA GG	(1303-1322)	++++	60
Eph B4 86	AGG TAC CTC TCG GTC AGT GG	(1283-1302)	++	50
Eph B4 85	TGA CAT TGA CAG GCT CAA AT	(1263-1282)	++++	80
Eph B4 84	GGG ACG GGC CCC GTG GCT AA	(1243-1262)	++	50
Eph B4 83	GGA GGA TAC CCC GTT CAA TG	(1223-1242)	+++	60
Eph B4 82	CAG TGA CCT CAA AGG TAT AG	(1203-1222)	++++	70
Eph B4 81	GTG AAG TCA GGA CGT AGC CC	(1183-1202)	+++	60
Eph B4 80	TCG AAC CAC CAC CCA GGG CT	(1163-1182)	+++	50
Eph B4 79	CCA CCA GGT CCC GGG GGC CG	(1143-1162)	++	40
Eph B4 78	GGG TCA AAA GTC AGG TCT CC	(1123-1142)	++++	70
Eph B4 77	CCC GCA GGG GGC ACA GGA GC	(1103-1122)	+++	60
Eph B4 76	CTC CGG GTC GGC ACT CCC GG	(1083-1102)	+++	60
Eph B4 75	CAG CGG AGG GCG TAG GTG AG	(1063-1082)	++	40
Eph B4 74	GTC CTC TCG GCC ACC AGA CT	(1043-1062)	++	50
Eph B4 73	CCA GGG GGG CAC TCC ATT CC	(1023-1042)	++	50
Eph B4 72	AGG TGC AGG GAG GAG CCG TT	(1003-1022)	++++	70
Eph B4 71	CAG GCG GGA AAC CAC GCT CC	(983-1002)	++	40
Eph B4 70	GCG GAG CCG AAG GAG GGG TG	(963-982)	+++	50
Eph B4 69	GTG CAG GGT GCA CCC CCG GG	(943-962)	+++	50
Eph B4 68	GTC TGT GCG TGC CCG GAA GT	(923-942)	++	40
Eph B4 67	ACC CGA CGC GGC ACT GGC AG	(903-922)	++	40
Eph B4 66	ACG GCT GAT CCA ATG GTG TT	(883-902)	++	50
Eph B4 65	AGA GTG GCT ATT GGC TGG GC	(863-882)	++++	60
Eph B4 64	ATG GCT GGC AGG ACC CTT CT	(843-862)	++++	80
Eph B4 63	CCT GAC AGG GGC TTG AAG GT	(823-842)	++++	80
Eph B4 62	GCC CTG GGC ACA GGC TCG GC	(803-822)	+++	70
Eph B4 61	ACT TGG TGT TCC CCT CAG CT	(783-802)	++++	80
Eph B4 60	GCC TCG AAC CCC GGA GCA CA	(763-782)	+++	50
Eph B4 59	GCT GCA GCC CGT GAC CCG CT	(743-762)	+++	50
Eph B4 58	GTT CGG CCC ACT GGC CAT CC	(723-742)	++	45
Eph B4 57	TCA CGG CAG TAG AGG CTG GG	(703-722)	+++	70
Eph B4 56	GCT GGG GCC AGG GGC GGG GA	(683-702)	++	50
Eph B4 55	CGG CAT CCA CCA CGC AGC TA	(663-682)	++	50
Eph B4 54	CCG GCC ACG GGC ACA ACC AG	(643-662)	++	50
Eph B4 53	CTC CCG AGG CAC AGT CTC CG	(623-642)	+++	50
Eph B4 52	GGA ATC GAG TCA GGT TCA CA	(603-622)	++++	90
Eph B4 51	GTC AGC TGG GCG CAC TTT TT	(583-602)	+++	70
Eph B4 50	GTA GAA GAG GTG CAG GGA TA	(563-582)	++++	80

10

20

30

40

【表 1 - 4】

Eph B4 49	GCA GGG CCA TGC AGG CAC CC	(543-562)	++++	80
Eph B4 48	TGG TCC TGG AAG GCC AGG TA	(523-542)	++++	90
Eph B4 47	GAA GCC AGC CTT GCT GAG CG	(503-522)	++++	80
Eph B4 46	GTC CCA GAC GCA GCG TCT TG	(483-502)	++	40
Eph B4 45	ACA TTC ACC TTC CCG GTG GC	(463-482)	+++	50
Eph B4 44	CTC GGC CCC AGG GCG CTT CC	(443-462)	++	50
Eph B4 43	GGG TGA GAT GCT CCG CGG CC	(423-442)	+++	60
Eph B4 42	ACC GTG TCC ACC TTG ATG TA	(403-422)	++++	80
Eph B4 41	GGG GTT CTC CAT CCA GGC TG	(383-402)	++++	80
Eph B4 40	GCG TGA GGG CCG TGG CCG TG	(363-382)	++	50
Eph B4 39	TCC GCA TCG CTC TCA TAG TA	(343-362)	+++	60
Eph B4 38	GAA GAC GGT GAA GGT CTC CT	(323-342)	++++	80
Eph B4 37	TGC AGG AGC GCC CAG CCC GA	(303-322)	+++	50
Eph B4 36	GGC AGG GAC AGG CAC TCG AG	(283-302)	+++	45
Eph B4 35	CAT GGT GAA GCG CAG CGT GG	(263-282)	++	50
Eph B4 34	CGT ACA CGT GGA CGG CGC CC	(243-262)	++	40
Eph B4 33	CGC CGT GGG ACC CAA CCT GT	(223-242)	+++	60
Eph B4 32	GCG AAG CCA GTG GGC CTG GC	(203-222)	++++	70
Eph B4 31	CCG GGG CAC GCT GCA CGT CA	(183-202)	+++	60
Eph B4 30	CAC ACT TCG TAG GTG CGC AC	(163-182)	+++	70
Eph B4 29	GCT GTG CTG TTC CTC ATC CA	(143-162)	++++	80
Eph B4 28	GGC CGC TCA GTT CCT CCC AC	(123-142)	++	40
Eph B4 27	TGC CCG TCC ACC TGA GGG AA	(103-122)	++	50
Eph B4 26	TGT CAC CCA CTT CAG ATC AG	(83-102)	++++	70
Eph B4 25	CAG TTT CCA ATT TTG TGT TC	(63-82)	++++	70
Eph B4 24	AGC AGG GTC TCT TCC AAA GC	(43-62)	++++	80
Eph B4 23	TGC GGC CAA CGA AGC CCA GC	(23-42)	++	50
Eph B4 22	AGA GCA GCA CCC GGA GCT CC	(3-22)	+++	50
Eph B4 21	AGC AGC ACC CGG AGC TCC AT	(1-20)	+++	50
明細書に記載された追加のアンチセンスプローブ				
EphB4 AS-1	GTG CAG GGA TAG CAG GCC CAT	(552-572)		
EphB4 AS-2	AAG GAG GGG TGG TGC ACG GTG	(952-972)		
EphB4 AS-3	TTC CAG GTG CAG GGA GGA GCC	(1007-1027)		
EphB4 AS-4	GTG GTG ACA TTG ACA GGC TCA	(1263-1285)		
EphB4 AS-5	TCT GGC TGT GAT GTT CCT GGC	(1555-1575)		
EphB4 AS-6	GCC GCT CAG TTC CTC CCA	(123-140)		
EphB4 AS-7	TGA AGG TCT CCT TGC AGG	(316-333)		
EphB4 AS-8	CGC GGC CAC CGT GTC CAC CTT	(408-428)		
EphB4 AS-9	CTT CAG GGT CTT GAT TGC CAC	(1929-1949)		
EphB4 AS-10	ATG GAG GCC TCG CTC AGA AA	(1980-1999)		
EphB4 AS-11	CAT GCC CAC GAG CTG GAT GAC	(2138-2158)		

10

20

30

【 0 0 7 7 】

【表 2 - 1】

表2 EphB4 RNAiプローブの例 (siRNA)

RNAi	EphB4 RNAi 配列	EphB4発現の 阻害	生存度の 減少率
1	446 aaattggaaactgctgatctg 466		
2	447 aattggaaactgctgatctga 467	+++	70
3	453 aaactgctgatctgaagtggg 473	++++	70
4	454 aactgctgatctgaagtgggt 474	+++	80
5	854 aatgtcaagacgctgcgtctg 874	+++	65
6	467 aagtgggtgacattccctcag 487	+	35

10

【 0 0 7 8 】

【表 2 - 2】

7	848	aaggtgaatgtcaagacgctg	868	++	50
8	698	aaggagaccttcacogtcttc	718	+++	75
9	959	aaaaagtgcgcccagctgact	979	+	40
10	1247	aatagccactctaaccaccatt	1267	++	50
11	1259	aacaccattggatcagccgctc	1279	++	50
12	1652	aatgtcaccactgaccgagag	1672	+	35
13	1784	aataccatgagaagggcgcc	1804	+++	65
14	1832	aagacgtcagaaaaccgggca	1852	+	30
15	1938	aacatcacagccagaccaac	19	++	50
16	2069	aagcagagcaatgggagagaa	2089	++++	75
17	2078	aatgggagagaagcagaatat	2098	+++	65
18	2088	aagcagaatattcggacaaac	2108	+++	70
19	2094	aatattcggacaaacacggac	2114	++	40
20	2105	aaacacggacagtatctcatc	2125	++	50
21	2106	aacacggacagtatctcatcg	2126	+	35
22	2197	aaaagagatcgatgtctccta	2217	+++	65
23	2174	aatgaggctgtgaggggaattt	2194	++	50
24	2166	aagaccctaatgaggctgtga	2186	++	50
25	2198	aaagagatcgatgtctcctac	2218	+++	55
26	2199	aagagatcgatgtctcctacg	2219	+++	70
27	2229	aagaggtgattgggtgcaggtg	2249	+	33
28	2222	aagattgaagaggtgattgggt	2242	+	30
29	2429	aacagcatgcccgtcatgatt	2449	++	40
30	2291	aagaaggagagctgtgtggca	2311	+++	50
31	2294	aaggagagctgtgtggcaatc	2314	+++	60
32	2311	aatcaagaccctgaaggggtgg	2331	+++	70
33	2497	aaacgacggacagttcacagt	2517	+	35
34	2498	aacgacggacagttcacagtc	2518	+	40
35	2609	aacatcctagtcaacagcaac	2629	++	50
36	2621	aacagcaacctcgtctgcaaa	2641	+	35
37	2678	aactcttccgatcccacctac	2698	++	50
38	2640	aagtgtctgactttggccttt	2660	+++	70
39	2627	aacctcgtctgcaaagtgctt	2647	++	50
40	2639	aaagtgtctgactttggcctt	2659	+	25
41	2852	aatcaggacgtgatcaatgcc	2872	+++	75
42	2716	aaagattcccatccgatggac	2736	++	50
43	2717	aagattcccatccgatggact	2737	++	60
44	2762	aagttcaacttccgccagtgat	2782	+++	70
45	3142	aagatacgaagaaagtttcgc	3162	++	50
46	3136	aatgggaagatacgaagaaag	3156	+++	66
47	2867	aatgccattgaacaggactac	2887		
48	3029	aaaatcgtggccccgggagaat	3049	+	33

10

20

30

40

【表 2 - 3】

49	3254	aaaatcttggccagtgtccag	3274	++	50
50	3255	aaatcttggccagtgtccagc	3275	+++	75
51	3150	aagaaagtttcgcagccgctg	3170	+++	80
52	3251	aagaaaatcttggccagtgtc	3271	++	50
53	3256	aatcttggccagtgtccagca	3276	++	50
明細書に記載した追加のRNA iプローブ					
Eph B4 50		gagaccugcugaacacaauu			
Eph B4 472		ggugaaugucaagacgcuguu			
Eph B4 1562		caucacagccagaccaacu			
siRNA 2303		cucuuccgaucccaccuacu			
Eph B4 2302		cucuuccgaucccaccuacu			

10

【 0 0 8 0 】

【表 3 - 1】

表 3. エフリン(Ephrin) B 2 アンチセンスプローブの例

	配列	コード領域	生存度の減少率	エフリンB2発現の阻害
Ephrin AS-51	TCA GAC CTT GTA GTA AAT GT	(983-1002)	35	++
Ephrin AS-50	TCG CCG GGC TCT GCG GGG GC	(963-982)	50	+++
Ephrin AS-49	ATC TCC TGG ACG ATG TAC AC	(943-962)	45	++
Ephrin AS-48	CGG GTG CCC GTA GTC CCC GC	(923-942)	35	++
Ephrin AS-47	TGA CCT TCT CGT AGT GAG GG	(903-922)	40	+++
Ephrin AS-46	CAG AAG ACG CTG TCC GCA GT	(883-902)	40	++
Ephrin AS-45	CCT TAG CGG GAT GAT AAT GT	(863-882)	35	++
Ephrin AS-44	CAC TGG GCT CTG AGC CGT TG	(843-862)	60	+++
Ephrin AS-43	TTG TTG CCG CTG CGC TTG GG	(823-842)	40	++
Ephrin AS-42	TGT GGC CAG TGT GCT GAG CG	(803-822)	40	++
Ephrin AS-41	ACA GCG TGG TCG TGT GCT GC	(783-802)	70	+++
Ephrin AS-40	GGC GAG TGC TTC CTG TGT CT	(763-782)	80	++++
Ephrin AS-39	CCT CCG GTA CTT CAG CAA GA	(743-762)	50	+++
Ephrin AS-38	GGA CCA CCA GCG TGA TGA TG	(723-742)	60	+++
Ephrin AS-37	ATG ACG ATG AAG ATG ATG CA	(703-722)	70	+++
Ephrin AS-36	TCC TGA AGC AAT CCC TGC AA	(683-702)	60	+++
Ephrin AS-35	ATA AGG CCA CTT CGG AAC CG	(663-682)	45	++
Ephrin AS-34	AGG ATG TTG TTC CCC GAA TG	(643-662)	50	+++
Ephrin AS-33	TCC GGC GCT GTT GCC GTC TG	(623-642)	75	+++
Ephrin AS-32	TGC TAG AAC CTG GAT TTG GT	(603-622)	60	+++
Ephrin AS-31	TTT ACA AAG GGA CTT GTT GT	(583-602)	66	+++

10

20

30

【 0 0 8 1 】

【表 3 - 2】

Ephrin AS-30	CGA ACT TCT TCC ATT TGT AC	(563-582)	50	++
Ephrin AS-29	CAG CTT CTA GTT CTG GAC GT	(543-562)	50	+++
Ephrin AS-28	CTT GTT GGA TCT TTA TTC CT	(523-542)	70	+++
Ephrin AS-27	GGT TGA TCC AGC AGA ACT TG	(503-522)	65	+++
Ephrin AS-26	CAT CTT GTC CAA CTT TCA TG	(483-502)	75	+++
Ephrin AS-25	AGG ATC TTC ATG GCT CTT GT	(463-482)	60	+++
Ephrin AS-24	CTG GCA CAC CCC TCC CTC CT	(443-462)	45	++
Ephrin AS-23	GGT TAT CCA GGC CCT CCA AA	(423-442)	50	+++
Ephrin AS-22	GAC CCA TTT GAT GTA GAT AT	(403-422)	50	+++
Ephrin AS-21	AAT GTA ATA ATC TTT GTT CT	(383-402)	60	+++
Ephrin AS-20	TCT GAA ATT CTA GAC CCC AG	(363-382)	60	+++
Ephrin AS-19	AGG TTA GGG CTG AAT TCT TG	(343-362)	75	+++
Ephrin AS-18	AAA CTT GAT GGT GAA TTT GA	(323-342)	60	+++
Ephrin AS-17	TAT CTT GGT CTG GTT TGG CA	(303-322)	50	++
Ephrin AS-16	CAG TTG AGG AGA GGG GTA TT	(283-302)	40	++
Ephrin AS-15	TTC CTT CTT AAT AGT GCA TC	(263-282)	66	+++
Ephrin AS-14	TGT CTG CTT GGT CTT TAT CA	(243-262)	70	++++
Ephrin AS-13	ACC ATA TAA ACT TTA TAA TA	(223-242)	50	+++
Ephrin AS-12	TTC ATA CTG GCC AAC AGT TT	(203-222)	50	+++
Ephrin AS-11	TAG AGT CCA CTT TGG GGC AA	(183-202)	70	++++
Ephrin AS-10	ATA ATA TCC AAT TTG TCT CC	(163-182)	70	++++
Ephrin AS-9	TAT CTG TGG GTA TAG TAC CA	(143-162)	80	++++
Ephrin AS-8	GTC CTT GTC CAG GTA GAA AT	(123-142)	60	+++
Ephrin AS-7	TTG GAG TTC GAG GAA TTC CA	(103-122)	80	++++
Ephrin AS-6	ATA GAT AGG CTC TAA AAC TA	(83-102)	70	+++
Ephrin AS-5	TCG ATT TGG AAA TCG CAG TT	(63-82)	50	+++
Ephrin AS-4	CTG CAT AAA ACC ATC AAA AC	(43-62)	80	++++
Ephrin AS-3	ACC CCA GCA GTA CTT CCA CA	(23-42)	85	++++
Ephrin AS-2	CGG AGT CCC TTC TCA CAG CC	(3-22)	70	+++
Ephrin AS-1	GAG TCC CTT CTC ACA GCC AT	(1-20)	80	++++

10

20

30

40

【表 4 - 1】

表 4. エフリンB2 RNA i プローブ (S i RNA) の例

RNA i 配列及び他のヒト遺伝子との相同性	生存度の減少率	エフリンB2発現の阻害	RNA i 番号
89 aactgcgatttccaaatcgat 109	80	++++	1
141 aactccaaatttctacctgga 161	70	++++	2
148 aatttctacctggacaaggac 168	75	+++	3
147 aaatttctacctggacaagga 167	60	+++	4
163 aaggactggtactatacccac 183	40	++	5
217 aagtggactctaaaactggtg 237	80	++++	6
229 aaactgttggccagtatgaat 249	50	+++	7
228 aaaactgttggccagtatgaa 248	80	++++	8
274 aagaccaagcagacagatgca 294	80	++++	11
273 aaagaccaagcagacagatgc 293	60	+++	12
363 aagtttcaagaattcagccct 383	66	+++	13
370 aagaattcagccctaacctct 390	50	+++	14
373 aattcagccctaacctctggg 393	50	+++	15
324 aactgtgccaaccagaccaa 344	90	++++	16
440 aaatgggtctttggaggccct 460	80	++++	17
501 aagatcctcatgaaagtggga 521	50	+++	18
513 aaagtggacaagatgcaagt 533	50	+++	19
491 aagagccatgaagatcctcat 511	50	+++	20
514 aagtggacaagatgcaagtt 534	66	+++	21
523 aagatgcaagttctgctggat 543	66	+++	22
530 aagttctgctggatcaaccag 550	50	+++	23
545 aaccaggaataaagatccaac 565	35	++	24
555 aaagatccaacaagacgtcca 575	40	++	25
556 aagatccaacaagacgtccag 576	60	+++	26
563 aacaagacgtccagaactaga 583	60	+++	27
566 aagacgtccagaactagaagc 586	70	+++	28
593 aaatggaagaagttcgacaac 613	75	++++	29
577 aactagaagctggtacaaatg 597	66	+++	30
594 aatggaagaagttcgacaaca 614	35	++	31
583 aagctggtacaaatggaagaa 603	50	+++	32
611 aacaagtcctttgtaaaacc 631	70	++++	33
599 aagaagttcgacaacaagtcc 619	70	++++	34
602 aagttcgacaacaagtccctt 622	80	++++	35
626 aaaaccaaaccaggttctag 646	50	+++	36
627 aaaccaaaccaggttctagc 647	25	+	37
628 aaccaaaccaggttctagca 648	30	++	38
632 aaatccaggttctagcacaga 652	60	+++	39
633 aatccaggttctagcacagac 653	40	++	40

10

20

30

40

【表 4 - 2】

678	aacaacatcctcgggttccgaa	698	30	++	41
681	aacatcctcgggttccgaagtg	701	20	+	42
697	aagtggccttatttgcagggga	717	30	++	43
明細書に記載した追加のエフリンB2RNAiプローブ					
	GCAGACAGAUGCACUAUUAUU				ephrin B2 264
	CUGCGAUUUCCAAAUCGAUUU				ephrin B2 63
	GGACUGGUACUAUACCCACUU				ephrin B2 137

10

【0084】

他の具体例では、本発明は、可溶性ポリペプチドと、抗体と、抗体の抗原結合部分とを含むポリペプチド治療剤を提供する。ある種の態様では、本発明は、EphB4蛋白質の細胞外ドメインのアミノ酸配列を含む可溶性EphB4ポリペプチドを提供する。該可溶性EphB4ポリペプチドは、エフリンB2ポリペプチドに特異的に結合する。用語「可溶性」は、単に、これらのペプチドが、該ポリペプチドの生理学的塩溶液への溶解性を損なうのに十分な膜貫通ドメイン又は膜貫通ドメインの一部を含有しないことを示すために使用するに過ぎない。好適なポリペプチドは、好ましくは、エフリンB2のようなりガンドへの結合についてEphB4と競合し且つEphB4の活性化によって生じるシグナル伝達を阻害する単量体として調製される。随意に、可溶性ポリペプチドは、多重結合の形態で、例えば、Fc融合蛋白質又は別の多重結合ドメインとの融合体として発現することによって調製できる。このような多重結合形態は、複合的な活性を有することができる。状況によってはアゴニスト又はアンタゴニスト効果を有することができる。所定の具体例では、可溶性EphB4ポリペプチドは、EphB4蛋白質の球状ドメインを含む。可溶性EphB4ポリペプチドは、図22で定義されるアミノ酸配列の1~522残基に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含むことができる。可溶性EphB4ポリペプチドは、図22で定義されるアミノ酸配列の1~412残基に少なくとも90%等しい配列を含むことができる。可溶性EphB4ポリペプチドは、図22で定義されるアミノ酸配列の1~312残基に少なくとも90%等しい配列を含むことができる。可溶性EphB4ポリペプチドは、球状(G)ドメインを含む配列(図22のアミノ酸29~197)と、随意に追加のドメイン、例えば、システインリッチドメイン(図22のアミノ酸239~321)、第1フィブロネクチン3型ドメイン(図22のアミノ酸324~429)及び第2フィブロネクチン3型ドメイン(図22のアミノ酸434~526)とを含むことができる。ここで説明し且つリガンド結合活性を有するものとして実証した好ましいポリペプチドとしては、図22に示したアミノ酸配列のそれぞれ1~537、1~427及び1~326に相当するポリペプチドが挙げられる。可溶性EphB4ポリペプチドは、図1又は2に示したような配列を含むことができる。斯界には周知であるように、このようなEphB4ポリペプチドが好適な細胞、例えばHEK293T細胞株内で発現すると、リーダーペプチドの開裂が生じるであろう。このような開裂は、単一部位では常に完全とは限らず又は完全に一貫するとは限らないものの、EphB4は、図22に示される配列の最初の15個のアミノ酸を除去するように開裂する傾向がある。従って、特定の例として、本発明は、エフリンB2に結合し且つ次の群(番号付けは図22の配列に関するものである): 1~197、29~197、1~312、29~132、1~321、29~321、1~326、29~326、1~412、29~412、1~427、29~427、1~429、29~429、1~526、29~526、1~537及び29

20

30

40

50

~ 537 から選択されるアミノ酸配列を含むプロセッシングを受けていない可溶性 E p h B 4 ポリペプチドを提供する。このようなポリペプチドは、プロセッシングを受けた形態で使用でき、このような形態は、次の群（番号付けは図 2 2 の配列に関するものである）： 16 ~ 197、16 ~ 312、16 ~ 321、16 ~ 326、16 ~ 412、16 ~ 427、16 ~ 429、16 ~ 526 及び 16 ~ 537 から選択される予想アミノ酸配列を有する。さらに、可溶性 E p h B 4 ポリペプチドは、先のアミノ酸配列のいずれかに対して少なくとも 90%、随意に 95% 又は 99% 等しいアミノ酸配列を含むと共に、エフリン B 2 結合活性を保持するものであることができる。好ましくは、図 2 1 に示した配列からのアミノ酸配列の任意の変異体は、特に表面ループ領域内でのわずか 1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸の保存的変換又は欠失である。ある具体例では、可溶性 E p h B 4 ポリペプチドは、エフリン B 2 と E p h B 4 との相互作用を阻害することができる。該可溶性 E p h B 4 ポリペプチドは、エフリン B 2 又は E p h B 4 のクラスター形成又は燐酸化を阻害することができる。エフリン B 2 又は E p h B 4 の燐酸化は、一般に、これらの蛋白質によって調節される細胞内シグナル伝達経路を誘発する際の初期の事象の一つであるとみなされている。上記のように、可溶性 E p h B 4 ポリペプチドは、単量体又は多重結合融合蛋白質として調製できる。該可溶性ポリペプチドは、1 種以上の修飾アミノ酸を含むことができる。このようなアミノ酸は、プロテアーゼ消化に対する抵抗性の増大のような所望の特性に寄与することができる。

10

【0085】

本発明は、血中半減期の増大を与えつつ、なおエフリン B 2 結合活性を保持する追加成分を有する可溶性 E p h B 4 ポリペプチドを提供する。所定の具体例では、可溶性 E p h B 4 ポリペプチドは、単量体であり、且つ、1 個以上のポリエチレングリコール (P E G) 基に共有結合する。この 1 個以上の P E G は、約 1 k D a ~ 約 1 0 0 k D a を範囲とする分子量を有し、好ましくは、約 1 0 ~ 約 6 0 k D a 又は約 2 0 ~ 約 4 0 k D a を範囲とする分子量を有するであろう。好ましい具体例では、この可溶性の単量体 E p h B 4 結合体は、好ましくは E p h B 4 リシンの - アミノ基又は N 末端アミノ基を介して、約 2 0 ~ 約 4 0 k D a の 1 個の P E G 基に共有結合した E p h B 4 ポリペプチド (モノ P E G 化 E p h B 4) を含む。最も好ましくは、E p h B 4 は、E p h B 4 リシンの - アミノ基及び N 末端アミノ基よりなる群とは別の 1 個のアミノ基でランダムに P E G 化される。驚くべきことに、本発明に従うモノ P E G 化 E p h B 4 は、非修飾可溶性 E p h B 4 ポリペプチド及びポリ P E G 化 E p h B 4 の治療適用性に関して優れた特性を有する。それでもなお、本発明は、1 カ所以上の位置に P E G を有するポリ P E G 化 E p h B 4 も提供する。このようなポリ P E G 化形態は、非修飾形態に対して改善された血中半減期を与える。ある具体例では、可溶性 E p h B 4 ポリペプチドは、エフリン B 2 結合を実質的に減ずることなく半減期の改善を与える第 2 の安定化ポリペプチドと安定して会合する。安定化ポリペプチドは、好ましくは、ヒト患者（又は患者。この場合には、獣医学的用途を意図する。）と免疫適合性があり、且つ、ほとんど又は全く有意な生物活性を有しないであろう。好ましい具体例では、安定化ポリペプチドは、ヒト血清アルブミン又はその部分である。ヒト血清アルブミンは、E p h B 4 ポリペプチドと安定して共有又は非共有結合できる。共有結合は、ヒト血清アルブミンとの同時翻訳融合体としての E p h B 4 ポリペプチドの発現によって達成できる。該アルブミン配列は、可溶性 E p h B 4 ポリペプチド内の N 末端、C 末端又は非破壊的内部位置で融合できる。E p h B 4 の露出したループがアルブミン配列の挿入のための好適な位置であろう。また、アルブミンは、例えば化学的架橋によって翻訳後に E p h B 4 ポリペプチドに結合することもできる。また、E p h B 4 ポリペプチドは、1 種以上のアルブミンポリペプチドとも安定して会合できる。

20

30

40

【0086】

可溶性 E p h B 4 ポリペプチドの例を以下の例で与える。ある種の態様では、本発明は、エフリン B 2 蛋白質の細胞外ドメインのアミノ酸配列を含む可溶性エフリン B 2 ポリペプチドを提供する。該可溶性エフリン B 2 ポリペプチドは、E p h B 4 ポリペプチドに特異的に結合する。用語「可溶性」は、単に、これらのポリペプチドが該ポリペプチドの生

50

理学的塩溶液への溶解性を損なうのに十分な膜貫通ドメイン又は膜貫通ドメインの一部を含まないことを示すために使用するに過ぎない。可溶性ポリペプチドは、好ましくは、E p h B 4 のようなリガンドへの結合についてエフリン B 2 と競合し且つエフリン B 2 活性によって生じるシグナル伝達を阻害する単量体として調製できる。随意に、可溶性ポリペプチドは、多重結合の形態で、例えば、Fc 融合蛋白質又は別の多重結合ドメインとの融合体として発現することによって調製できる。このような多重結合形態は複合的な活性を有することができ、状況によってはアゴニスト又はアンタゴニストの効果を有することができる。可溶性エフリン B 2 ポリペプチドは、図 22 で定義されるアミノ酸配列の 1 ~ 225 残基を含むことができる。可溶性エフリン B 2 ポリペプチドは、図 3 によって定義される配列を含むことができる。斯界には周知のように、このようなエフリン B 2 ペプチドが好適な細胞、例えば H E K 2 9 3 T 細胞株内で発現すると、リーダーペプチドの開裂が生じるであろう。このような開裂は、単一部位では常に完全とは限らず又は完全に一貫するわけではないが、エフリン B 2 は、図 22 に示される配列の最初の 26 個のアミノ酸を除去するように開裂する傾向にあることが分かっている。従って、特定の例として、本発明は、E p h B 4 に結合し且つ図 22 のアミノ酸 1 ~ 225 に相当するアミノ酸配列を含むプロセッシングを受けていない可溶性エフリン B 2 ポリペプチドを提供する。このようなポリペプチドは、プロセッシングを受けた形態で使用でき、このような形態は、次の群（番号付けは図 22 の配列に関するものである）：26 ~ 225 から選択される予想アミノ酸配列を有する。ある具体例では、該可溶性エフリン B 2 ポリペプチドは、エフリン B 2 と E p h B 4 との相互作用を阻害することができる。該可溶性エフリン B 2 ポリペプチドは、エフリン B 2 又は E p h B 4 のクラスター形成又は燐酸化を阻害することができる。上記のように、該可溶性エフリン B 2 ポリペプチドは、単量体又は多重結合融合蛋白質として調製できる。該可溶性ポリペプチドは、1 種以上の修飾アミノ酸を含むことができる。このようなアミノ酸は、プロテアーゼ消化に対する抵抗性の増大のような所望の特性に寄与することができる。

10

20

30

40

【0087】

別の特定の具体例では、本発明は、エフリン B 2 又は E p h B 4 に対する抗体を提供する。ここに記載するときに、用語「アンタゴニスト抗体」とは、エフリン B 2 又は E p h B 4 の機能を阻害する抗体をいう。好ましくは、該アンタゴニスト抗体は、エフリン B 2 又は E p h B 4 の細胞外ドメインに結合する。本発明の抗体は、ポリクローナル又はモノクローナル；そのままのもの又は短縮されたもの、例えば、F (a b ') 2、F a b、F v；異種、同種、同系又はそれらの修飾された形態、例えば、ヒト化、キメラなどであることができるものとする。これらの抗体の例としては、図 24 に示されるような E p h B 4 抗体番号 1、23、35、47、57、79、85 L、85 H、91、98、121、131 及び 138 が挙げられるが、これらに限定されない。

【0088】

抗体番号 23（アミノ酸 16 ~ 198 内のエピトープ）、抗体番号 91（キナーゼ活性化抗体；アミノ酸 324 ~ 429 内のエピトープ）、抗体番号 98（アミノ酸 430 ~ 537 内のエピトープ）、抗体番号 131（アミノ酸 324 ~ 429 内のエピトープ）及び抗体番号 138（アミノ酸 430 ~ 537 内のエピトープ）を産生するハイブリドーマをアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）、米国バージニア州マサチューセッツ 10801 University Boulevard, 20110-2209 に寄託した。ATCC 寄託番号は、抗体番号 23、91、98、131 及び 138 については、それぞれ、PTA - 6208、PTA - 6209、PTA - 6210、PTA - 6214 及び PTA - 6211 である。従って、本発明の所定の特定の態様は、PTA - 6208、PTA - 6209、PTA - 6210、PTA - 6214 及び PTA - 6211 よりなる群から選択される ATCC 寄託番号を有するハイブリドーマ細胞に関するものである。

【0089】

VI. 治療方法

50

ある具体例では、本発明は、腫瘍成長を阻害し又は低減させる方法及び癌に罹患した個体の治療方法を提供する。随意に、これらの治療方法の一つ以上は、遺伝子増幅（Eph B 4 又はエフリン B 2）を上記のような方法で検出した後に適用される。これらの方法は、該個体に、上記のような 1 種以上の治療剤若しくは以下に説明する慣用の抗腫瘍化合物又はその両方の治療上有効な量を投与することを伴う。これらの方法は、特に、動物、特にヒトの治療又は予防的治療を目的とする。

【0090】

ここに記載するときに、腫瘍には、所定の個体内部にある腫瘍、腫瘍異種移植片又は試験管内でクラスター形成した腫瘍が含まれる。特に、本発明の核酸治療剤は、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、中皮腫、前立腺癌、膀胱癌、肺癌、脳癌、胃癌、HNSCC、カボジ肉腫及び白血病（これらに限定されない）を含めた癌（腫瘍）を治療し又は予防するのに有用である。

10

【0091】

このような方法の所定の具体例では、1 種以上の治療剤を共に（同時に）又は異なる時点で（連続的に）投与できる。さらに、治療剤は、癌治療用の 2 タイプ以上の化合物と共に投与できる。例えば、本発明の治療剤は、従来の抗腫瘍治療手段の一つと併用できる。このような方法は、癌の予防、術後の癌の再発及び転移の予防に並びに従来の他の癌治療のアジュバントとして使用できる。本発明は、従来の癌療法（例えば、化学療法、放射線療法、光線療法、免疫療法及び外科手術）の有効性を主題の核酸治療剤の使用によって向上させることができるものであると認められる。

20

【0092】

多数の従来の化合物が抗腫瘍活性を有することが示されている。これらの化合物は、充実性腫瘍を縮小させ、転移及びさらなる成長を防ぎ又は白血病や悪性骨髄内における悪性細胞の数を減少させるための化学療法において医薬品として使用されてきた。化学療法は、様々なタイプの悪性腫瘍を治療する際に効果的であったが、多くの抗腫瘍性化合物は望ましくない副作用を誘発する。2 つ以上の異なる治療を組み合わせると、これらの治療は、相乗効果的に作用し、且つ、これらの治療のそれぞれの投与量を減少させ、それによってさらに高い投与量のそれぞれの化合物によってもたらされる有害な副作用を低減させることを可能にすることが示されている。他の場合には、難治性の悪性腫瘍は、2 種以上の異なる治療の併用療法に好ましい反応を示す。

30

【0093】

本発明の治療剤を別の慣用の抗癌（抗腫瘍又は化学療法）剤と共に付随的に又は連続的に投与するときに、このような治療剤は、抗腫瘍剤の治療効果を向上させることや、このような抗腫瘍剤に対する細胞耐性を克服することが示される。これは、抗腫瘍剤の投与量を減少させ、それによって望ましくない副作用を低減させ又は耐性細胞における抗癌剤の有効性を回復させることを可能にする。

【0094】

慣用の抗腫瘍化合物としては、単なる例示であるが、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アスパラギナーゼ、bcg、ピカルタミド、プレオマイシン、ブセレリン、ブスルファン、カンボテシン、カペシタピン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、クロドロネート、コルチシン、シクロホスファミド、シプロテロン、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドキシソルピシン、エピルピシン、エストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エキセメスタン、フィルグラスチム、フルダラビン、フルドロコルチソン、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、フルタミド、ゲムシタピン、ゲニステイン、ゴセレリン、ヒドロキシ尿素、イダルピシン、イホスファミド、イマチニブ、インターフェロン、イリノテカン、イロノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、レバミソール、ロムスチン、メクロレタミン、メドロキシプロゲステロン、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メトトレキセート、ミトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、ニル

40

50

タミド、ノコダゾール、オクトレオチド、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、ポルフィメル、プロカルバジン、ラルチトレキセド、リツキシマブ、ストレプトゾシン、スラミン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、テストステロン、チオグアニン、チオテパ、二塩化チタノセン、トポテカン、トラスツズマブ、トレチノイン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン及びビノレルピンが挙げられる。

【 0 0 9 5 】

これらの化学療法用抗腫瘍化合物は、それらの作用機序によって、例えば、次の群：抗代謝剤／抗癌剤、例えば、ピリミジンアナログ（5 - フルオロウラシル、フロキシウリジン、カペシタビン、ゲムシタビン及びシタラビン）及びプリンアナログ、葉酸アンタゴニスト並びに関連する阻害剤（メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン及び2 - クロロデオキシアデノシン（クラドリピン））；天然物質を含めた増殖抑制剤／有糸分裂阻害剤、例えばピンカルカロイド（ピンブラスチン、ピンクリスチン及びビノレルピン）、微小管破壊剤、例えばタキサン（パクリタキセル、ドセタキセル）、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ノコダゾール、エポチロン及びナベルピン、エビジポドフィルロトキシシン（エトポシド、テニポシド）、DNA 損傷剤（アクチノマイシン、アムサクリン、アントラシクリン、プレオマイシン、ブスルファン、カンプトテシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シトキサン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、ヘキサメチルメラミンオキサリプラチン、イホスファミド、メルファラン、メルクロレフタミン、ミトマイシン、ミトキサントロン、ニトロソ尿素、プリカマイシン、プロカルバジン、タキソール、タキソテレ、テニポシド、トリエチレンチオホスホラミド及びエトポシド（VP 16））；抗生物質、例えば、ダクチノマイシン（アクチノマイシンD）、ダウノルピシン、ドキシソルピシン（アドリアマイシン）、イダルピシン、アントラシクリン、ミトキサントロン、プレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）及びミトマイシン；酵素（L - アスパラギンを全身で代謝し、且つ、アスパラギンを合成する能力を有しない所定の細胞を奪うL - アスパラギナーゼ）；抗血小板剤；増殖抑制剤／抗有糸分裂アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード（メクロレタミン、シクロホスファミド及びアナログ、メルファラン、クロラムブシル）、エチレンイミン及びメチルメラミン（ヘキサメチルメラミン及びチオテパ）、アルキルスルホネート - ブスルファン、ニトロソ尿素（カルムスチン（BCNU）及びアナログ、ストレプトゾシン）、トラゼン - ダカルバジニン（DTIC）；増殖抑制剤／抗有糸分裂抗代謝剤、例えば、葉酸アナログ（メトトレキセート）；白金配位錯体（シスプラチン、カルボプラチン）、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、ミトタン、アミノグルテチミド；ホルモン、ホルモンアナログ（エストロゲン、タモキシフェン、ゴセレリン、ピカルタミド、ニルタミド）及びアロマターゼ阻害剤（レトロゾール、アナストロゾール）；抗凝血剤（ヘパリン、合成ヘパリン塩及びその他のトロンビン阻害剤）；線維素溶解剤（例えば、組織プラスミノゲン活性化剤、ストレプトキナーゼ及びウロキナーゼ）、アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ；抗転移剤；分泌抑制剤（プレベルジン）；免疫抑制剤（シクロスポリン、タクロリムス（FK - 506）、シロリムス（ラパマイシン）、アザチオプリン、ミコフェノレートモフェチル）；抗血管形成化合物（TNP - 470、ゲニステイン）及び成長因子阻害剤（血管内皮成長因子（VEGF）阻害剤、線維芽細胞成長因子（FGF）阻害剤）；アンジオテンシン受容体遮断剤；酸化窒素供与体；アンチセンスオリゴヌクレオチド；抗体（トラスツズマブ）；細胞周期阻害剤及び分化誘導剤（トレチノイン）；mTOR 阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤（ドキシソルピシン（アドリアマイシン）、アムサクリン、カンプトテシン、ダウノルピシン、ダクチノマイシン、エニポシド、エピルピシン、エトポシド、イダルピシン及びミトキサントロン、トポテカン、イリノテカン）、コルチコステロイド（コルチソン、デキサメタゾン、ヒドロコルチソン、メチルペドニソロン、プレドニソン及びプレニソロン）；成長因子シグナルトランスダクションキナーゼ阻害剤；ミトコンドリア機能障害誘導剤及びカスパーゼ活性化剤；並びにクロマチン破壊剤に分類できる。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 6 】

併用療法の性質によっては、治療剤の投与を続行すると同時に及び/又はその後、その他の治療を実施する。治療剤の投与は、単回投与又は複数回投与でなし得る。場合によっては、治療剤の投与は、慣用の治療の少なくとも数日前に実施される。他の場合には、投与は、慣用の治療の実施直前又は実施時に開始される。

【 0 0 9 7 】

VII 投与方法及び医薬組成物

ある具体例では、本発明の治療剤（化合物）は、薬学的に許容できるキャリアーと共に処方される。このような治療剤は、単独で又は医薬処方物（組成物）の成分として投与できる。これらの薬剤は、ヒトの薬又は動物薬に使用するための任意の便利な方法での投与のために処方できる。また、湿潤剤、乳化剤及び滑剤、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム及びステアリン酸マグネシウム、並びに着色剤、離型剤、被覆剤、甘味剤、香料及び香味剤、保存料及び酸化防止剤も該組成物に存在することができる。

10

【 0 0 9 8 】

この主題の薬剤の処方物としては、経口/経鼻、局所、非経口、直腸及び/又は腔内投与に好適なものが挙げられる。該処方物は、単位剤形で与えることが便利であり、また調剤分野に周知の任意の方法によって調製できる。キャリアー材料と組み合わせて単一剤形を生じさせることができる活性成分の量は、治療される宿主、特定の投与形式に応じて変化するであろう。キャリアー材料と組み合わせて単一剤形を生じさせることができる活性成分の量は、一般に、治療効果を生じさせる該化合物の量であろう。

20

【 0 0 9 9 】

ある具体例では、これらの処方物又は組成物を製造する方法は、別のタイプの抗腫瘍治療剤と、キャリアーと、随意に1種以上の副成分とを組み合わせることを含む。一般に、該処方物は、液体キャリアー若しくは微粉化された固体キャリアー又はその両方で製造でき、続いて、必要ならば、該製品を成形する。

【 0 1 0 0 】

経口投与用の処方物は、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、トローチ剤（香り付けされた基材、通常はスクロース及びアラビアガム又はトラガカントを使用する）、粉剤、顆粒剤の形態、又は水性若しくは非水性液体の溶液若しくは懸濁液の状態、又は水中油型若しくは油中水型液体エマルジョンの状態、又はエリキシル若しくはシロップの状態、又は口内錠（不活性基材、例えば、ゼラチンとグリセリン又はスクロースとアラビアガムを使用する）及び/又は洗口剤などの状態にあることができ、それぞれのものは、活性成分として所定量の主題治療剤を含有する。

30

【 0 1 0 1 】

経口投与用の固体剤形（カプセル剤、錠剤、丸剤、糖衣錠、粉剤、顆粒剤など）では、1種以上の治療剤と、クエン酸ナトリウム又は燐酸二カルシウムのような1種以上の薬学的に許容できるキャリアー及び/又は次のもののいずれか：（1）充填剤又増量剤、例えば、澱粉、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニット及び/又は珪酸；（2）例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース及び/又はアラビアガムのような結合剤；（3）グリセリンのような湿潤剤；（4）崩壊剤、例えば寒天-寒天、炭酸カルシウム、馬鈴薯澱粉又はタピオカ澱粉、アルギン酸、所定のシリケート及び炭酸ナトリウム；（5）溶液緩染剤、例えばパラフィン；（6）吸収促進剤、例えば第四アンモニウム化合物；（7）例えば、セチルアルコール及びグリセロールモノステアレートのような湿潤剤；（8）吸着剤、例えば、カオリン及びベントナイトクレー；（9）滑剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム及びそれらの混合物；並びに（10）着色剤とを混合させることができる。カプセル剤、錠剤及び丸剤の場合には、該医薬組成物は、緩衝剤を含むこともできる。また、類似するタイプの固体組成物を、ラクトース、すなわち乳糖並びに高分子量ポリエチレングリコールなどを使用して軟及び硬ゼラチンカプセル剤への充填剤として使用することもできる。

40

50

【0102】

経口投与用の液体剤形としては、薬学的に許容できるエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ及びエリキシルが挙げられる。該活性成分の他に、該液体剤形は、斯界で一般的に使用される不活性希釈剤、例えば、水その他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、オイル（特に、綿実油、ピーナッツ油、トウモロコシ油、胚種油、オリーブ油、ひまし油及びゴマ油）、グリセリン、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタン脂肪酸エステル並びにそれらの混合物を含有できる。不活性希釈剤のほかに、該経口組成物は、湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、甘味料、香味剤、着色料、香料及び保存料のようなアジュバントも含むことができる。

10

【0103】

懸濁液は、活性化合物のほかに、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビット及びソルビタンエステル、微結晶セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天-寒天及びトラガカント並びにそれらの混合物のような懸濁剤を含有することができる。

【0104】

特に、本発明の方法は、皮膚又は子宮頸部若しくは膈上にあるような粘膜のいずれかに局所的に投与できる。これは、副作用を誘発させる最も低い確率で、腫瘍への直接送達にとって最大の機会を与える。この局所処方物は、皮膚又は角質層浸透向上剤として有効であることが知られている様々な薬剤のうち1種以上をさらに含むことができる。これらの例は、2-ピロリドン、N-メチル-2-ピロリドン、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、ポリプロピレングリコール、メチル又はイソプロピルアルコール、ジメチルスルホキシド及びアゾンである。美容上許容できる処方物を作るために、追加の薬剤をさらに含めることができる。これらの例は、脂肪、ワックス、オイル、染料、フレグランス、防腐剤、安定剤及び界面活性剤である。また、斯界に知られているような角質溶解剤も含めることができる。例は、サリチル酸及び硫黄である。

20

【0105】

局所又は経皮投与用の剤形としては、粉剤、スプレー剤、軟膏、泥膏、乳剤性軟膏、ローション剤、ゲル剤、溶剤、パッチ及び吸入剤が挙げられる。主題の治療剤は、無菌条件下で薬剤として許容できるキャリアー及び必要かもしれない任意の防腐剤、緩衝剤又は推進剤と混合できる。軟膏、泥膏、乳剤性軟膏及びゲル剤は、主題の核酸分子のほかに、動物性及び植物性の脂肪、オイル、ワックス、パラフィン、澱粉、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、珪酸、タルク及び酸化亜鉛又はそれらの混合物のような賦形剤を含有することができる。

30

【0106】

粉剤及びスプレー剤は、治療剤のほかに、ラクトース、タルク、珪酸、水酸化アルミニウム、珪酸カルシウム及びポリアミド粉末又はこれらの物質の混合物のような賦形剤を含有することができる。スプレー剤は、クロルフルオル炭化水素及び揮発性非置換炭化水素、例えば、ブタン及びプロパンのような従来の促進剤をさらに含有することができる。

40

【0107】

非経口投与に好適な医薬組成物は、1種以上の治療剤を1種以上の薬学的に許容できる滅菌等張水溶液若しくは滅菌等張非水溶液、分散液、懸濁液若しくはエマルジョン又は使用直前に滅菌注射用溶液若しくは分散液に再構成できる滅菌粉末と共に含むことができ、ここで、これらのものは、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、対象とする賦形剤又は懸濁剤若しくは増粘剤の溶質であって該処方物を血液と等張にするものを含むことができる。本発明の医薬組成物に使用できる好適な水性及び非水性キャリアーの例としては、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）及びそれらの好適な混合物、オリーブ油のような植物性油及びオレイン酸エチルのような注射可能な有機エステルが挙げられる。例えば、レシチンのような被覆用物質を

50

使用すること、分散体の場合には必要な粒度を維持すること及び界面活性剤を使用することによって適切な流動性を維持することができる。

【0108】

また、これらの組成物は、防腐剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤のようなアジュバントも含有することができる。微生物の活動の防止は、様々な抗細菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロルブタノール、フェノールソルビン酸などの包含によって保証できる。また、糖質、塩化ナトリウムなどのような等張剤を組成物に包含させることが望ましいかもしれない。さらに、注射用製剤の持続的吸収を、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンのような吸収を遅延させる薬剤の包含によってもたらすことができる。

【0109】

注射用のデポー製剤は、ポリラクチド-ポリグルコリドのような生分解性重合体中に1種以上の治療剤の微小被包化マトリックスを形成させることによって作られる。薬剤対重合体の比率及び使用される特定の重合体の性質によって、薬物の放出速度が制御できる。他の生分解性重合体の例としては、ポリ(オルトエステル)及びポリ(無水物)が挙げられる。また、注射用デポー製剤は、生体組織と適合性のあるリポソーム又はマイクロエマルジョン中に薬剤を閉じ込めることによっても製造される。

【0110】

腔内又は直腸内投与用の処方物は、座薬として与えることができるが、これは、本発明の1種以上の化合物と、例えばココアバター、ポリエチレングリコール、座剤ワックス又はサリチレートを含む1種以上の好適な刺激性のない賦形剤又はキャリアーとを混合させることによって調製でき、しかもこのものは室温では固体である一方で体温では液体であるため、直腸又は腔内内で溶解、そして活性化化合物を放出するであろう。

【0111】

ある具体例では、1種以上の治療剤は、それらの望ましい活性にとって最も好適な身体部位内で該治療剤が効果的に分布することを可能にする薬学的に許容できる薬剤と共に処方される。このような薬学的に許容できる薬剤の例としては、PEG、リン脂質、ホスホロチオエート、薬剤が様々な組織に入るのを向上させ得るP-糖蛋白質阻害剤(例えば、Pluronic P85)、移植後の徐放性送達用の生体分解性重合体、例えばポリ(DL-ラクチド-コグリコリド)微小球(Emerich, DF外, 1999, Cell Transplant, 8, 47-58)及び血液脳関門を横切って薬剤を送達することができ且つニューロンへの取り込み機構を変化させることができる、ポリブチルシアノアクリレートから作られるもののような充填ナノ粒子(Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999)が挙げられるが、これらに限定されない。

【実施例】

【0112】

本発明を一般的に説明してきたが、本発明は、次の実施例を参照することによってさらに容易に理解されるであろう。この実施例は、単に本発明のある種の態様及び具体例を例示する目的のために含めており、本発明を限定することを意図するものではない。

【0113】

例1. EphB4は、頭部及び頸部扁平上皮細胞癌(HNSCC)内で発現する
A. HNSCC腫瘍はEphB4を発現する

本発明者は、ヒト腫瘍組織内でのEphB4の発現を免疫組織化学、in situ ハイブリダイゼーション及びウェスタンブロットで検討した。IRBの認可に従って予め採取しておいた20個の腫瘍組織を、EphB及びEphAファミリーの他のものとは反応しない特定のEphB4モノクローナル抗体で評価した。全てのケースにおいて、EphB4発現が様々な染色強度で観察される。図7A(左上)は、代表的なケースを例示するものであり、これは、EphB4がH&E腫瘍構造によって明らかのように腫瘍領域のみで発現することを示している(図7A左下)。間質ではEphB4についての染色が存在しないことに注意されたい。次に、リンパ節内の転移腫瘍部位は、陽性の染色を示しているが、該リンパ節の残りは陰性である(図7A右上)。

10

20

30

40

50

in situ ハイブリダイゼーションを実施して腫瘍組織内での E p h B 4 転写産物の存在及び位置を決定した。E p h B 4 特異的アンチセンスプローブに対する強いシグナルが検出されたが、これは転写物の存在を示している(図7B左上)。腫瘍構造を示すためのH & E染色との比較(図7B左下)から、該シグナルは該腫瘍細胞に局在した一方で、間質領域には存在しなかったことが明らかになる。また、エフリンB2転写物は、腫瘍試料でも検出され、またE p h B 4と同様に、該シグナルは腫瘍細胞に局在していた(図7B右上)。E p h B 4又はエフリンB2センスプローブのいずれも該切片にはハイブリダイズしなかったが、これは該シグナルの特異性を証明するものである。

【0114】

B. HNSCCの原発部位及び転移部位内でのE p h B 4発現と遺伝子コピー数の増加

原発腫瘍、リンパ節転移及び関与しない組織からの組織のウェスタンブロットを実施してこれらの部位におけるE p h B 4発現の相対的レベルを決定した。腫瘍及び正常の隣接組織を20ケース集めると共に、腫瘍に対して陽性のリンパ節をこれら20ケースのうち9ケースで採取した。代表的なケースを図7Cに示す。E p h B 4発現が該腫瘍試料のそれぞれで観察される。同様に、腫瘍陽性リンパ節の全てが、原発腫瘍に等しいか又はそれよりも大きいE p h B 4発現を示している。正常の隣接組織では、発現は全く又はほとんど観察されない。さらに、高いE p h B 4発現は、HNSCCの一次組織及び転移組織における遺伝子のコピー数の増加と相関関係があった(図7D)が、これは、E p h B 4遺伝子の増幅を腫瘍状態(特に、腫瘍転移)のための診断用マーカーとして使用することができることを示唆するものである。

【0115】

C. HNSCC細胞株におけるE p h B 4の発現と遺伝子コピー数の増加

腫瘍細胞に限定してE p h B 4の発現を実証したが、次に、本発明者は、HNSCCにおけるE p h B 4発現の試験管内モデルが存在するかどうかを決定することを試みた。6種のHNSCC細胞株について、E p h B 4蛋白質発現をウェスタンブロットで調査した(図8A)。これらの大部分が強いE p h B 4発現を示したため、その後の研究の基礎とした。また、高いE p h B 4発現とE p h B 4遺伝子のコピー数の増加との間の強い相関関係がHNSCC細胞株で見いだされた(図8B)。この結果は、E p h B 4遺伝子の増幅を腫瘍状態(特に、腫瘍転移)のための診断用マーカーとして使用することができることをさらに裏付けるものである。

【0116】

例2. E p h B 4は前立腺癌において上方調節され且つグロース・アドバンテージを与える

A. 前立腺癌細胞株におけるE p h B 4の発現

まず、本発明者は、様々な前立腺癌細胞株におけるE p h B 4発現蛋白質をウェスタンブロットで試験した。本発明者は、前立腺癌細胞株が120kDのE p h B 4の存在量の著しい変化を示すことを見いだした。このレベルは、PC3では比較的高く、しかもPC3の転移クローンであるPC3Mではさらに高かったが、正常の前立腺由来細胞株(MLC)は、低いE p h B 4発現を示すか又はその発現を全く示さなかった(図9A)。次に、本発明者は、PC3細胞におけるE p h B 4の活性化状態を燐酸化研究によってチェックした。本発明者は、正常の培養条件下であっても、E p h B 4が燐酸化されることを見出したが、これは、そのリガンドであるエフリンB2によってさらに誘導され得ると考えられる(図9B)。

【0117】

B. 臨床前立腺癌試料におけるE p h B 4の発現

E p h B 4が臨床前立腺試料で発現するかどうかを決定するために、前立腺癌外科的試料からの腫瘍組織及び隣接する正常組織を試験した。該前立腺試料におけるE p h B 4の組織学的分布を免疫組織化学によって決定した。明らかに、E p h B 4発現は腫瘍性上皮組織に限られ(図10左上)、しかも間質と正常の前立腺上皮組織には存在していない(図10右上)。前立腺組織系列では、試験した32種の前立腺癌のうち24種が陽性であ

10

20

30

40

50

った。本発明者は、定量的 R T - P C R によって、E p h B 4 の m R N A が臨床試料の正常組織及び腫瘍組織の両方で発現することを見いだした。しかしながら、この場合において、腫瘍 E p h B 4 m R N A レベルは、正常のものよりも少なくとも 3 倍高かった（図 10 右下）。

【0118】

例 3 . 中皮腫における E p h B 4 の発現

A . E p h B 4 及びエフリン B 2 は中皮腫細胞株で発現する

悪性中皮腫細胞内でのエフリン B 2 及び E p h B 4 の発現を様々な方法によって R N A 及び蛋白質レベルで決定した。R T - P C R から、4 種の細胞株の全てがエフリン B 2 及び E p h B 4 を発現することが示された（図 11 A）。これらの細胞株において、蛋白質発現をウェスタンブロットで決定した。E p h B 4 に特異的なバンドが 120 k D で見られた。さらに、エフリン B 2 は、試験した全ての細胞株において、ウェスタンブロット上で 37 k D のバンドとして検出された（図 11 B）。エフリン B 2 に非特異的なバンドが、ネガティブコントロールとして包含された 293 個のヒト胚腎臓細胞で観察された。

中皮腫細胞内に E p h B 4 転写産物が存在することを確認するために、in situ ハイブリダイゼーションを、チャンパースライド上で培養した N C 1 H 2 8 細胞株で実施した。E p h B 4 に特異的なシグナルを、アンチセンスプローブを使用して検出し、また、エフリン B 2 転写物も同一の細胞株で検出された。E p h B 4 及びエフリン B 2 についてのセンスプローブはネガティブコントロールとしての役割を果たし、しかも該細胞にはハイブリダイズしなかった（図 12）。E p h B 4 及びエフリン B 2 蛋白質の発現を該細胞株内で免疫蛍光分析によって確認した（図 13）。3 種の細胞株が強い E p h B 4 の発現を示すと共に、エフリン B 2 の発現が H 2 8 と H 2 0 5 2 に存在し且つ H 2 3 7 3 では弱く検出できた。

【0119】

B . 臨床試料における E p h B 4 及びエフリン B 2 の発現の根拠

胸膜悪性中皮腫と診断された患者の胸水から培養された腫瘍細胞が単離され、そしてこれは、第 1 継代で E p h B 4 及びエフリン B 2 の両方に対して陽性の染色を示した（図 13 下列）。これらの結果は、中皮腫細胞株内での E p h B 4 とエフリン B 2 との同時発現を確認するものである。腫瘍細胞株で見られるこれらの結果が病状の発現を実際に反映しているのかどうかを判断するために、腫瘍生検試料を E p h B 4 及びエフリン B 2 に対して免疫組織化学染色法に付した。両方の蛋白質に対する抗体は、染色腫瘍細胞内で陽性染色であることが明らかになった。代表的なデータを図 14 に示す。

【0120】

例 4 . カポジ肉腫（K S）内でのエフリン B 2 の発現はヒトヘルペスウイルス 8 型によって誘導される

A . K S 腫瘍はエフリン B 2 を発現するが、E p h B 4 を発現しない

K S 障害の高度に脈管性の性質及びこれらの腫瘍細胞の推定される内皮細胞起源は、それぞれ静脈内皮細胞及び動脈内皮細胞についてのマーカである E p h B 4 及びエフリン B 2 の発現の調査のきっかけになった。エフリン B 2（E p h B 4 ではない）の転写産物を K S 生検の腫瘍細胞で in situ ハイブリダイゼーションによって検出した（図 15 A）。H & E 染色によって示されるようなエフリン B 2 アンチセンスプローブ及び腫瘍細胞による陽性シグナルの比較から、エフリン B 2 の発現は、腫瘍細胞を含む生検材料の領域に限定されることが示される。E p h B 4 アンチセンスプローブによる K S でのシグナルの欠落は、該プローブの欠陥によるものではない（扁平上皮癌で転写物が検出されたからである。本発明者は、この蛋白質を発現することを示した。）。K S 腫瘍組織でのエフリン B 2 の発現についてのさらなる根拠は、F I T C 結合抗ヒト F c 抗体によって検出された、腫瘍細胞に対する E p h B 4 / F c シグナルの局在によって与えられる。エフリン B 2 は、E p h B 4 に対する唯一のリガンドであるため、この試薬は、エフリン B 2 の発現に特異的である（図 15 B 左）。この二次試薬のみで処理された隣接切片は、特異的なシグナルを全く示さない。2 色共焦点顕微鏡法によって、エフリン B 2 陽性細胞内に H H V -

8 潜伏蛋白質 LANA 1 が存在することが実証された (図 15 C 左) が、これはこのものが腫瘍細胞であり、この動脈マーカーを発現している腫瘍血管ではないことを示している。PECAM-1 抗体による腫瘍生検材料の染色によって、この腫瘍の高度に脈管性の性質が明らかになった (図 15 C 右)。KS 生検材料についてこのエフリン B 2 及び Eph B 4 発現パターンが一般的かどうかに関する試験的研究を RT-PCR 分析によって実行した。6 個の試料の全てがエフリン B 2 に対して陽性であったが、2 個のみが Eph B 4 に対してわずかに陽性であった (データは示さない)。

【0121】

B. HHV-8 vGPCR は、エフリン B 2 発現を誘導する

個々のウイルス蛋白質が全ウイルスで見られるエフリン B 2 の発現を誘導できたかどうかを試験するために、KS-SLK 細胞に HHV-8 LANA 又は LANA 440 又は vGPCR を安定にトランスフェクトした。安定なクローンのウェスタンブロットから、vGPCR をトランスフェクトした KS-SLK 内では、SLK-LANA 又は SLK-LANA 440 と比較して、エフリン B 2 を 5 倍誘導したことが明らかになった (図 16 A)。ベクター単独 (pCEFL) をトランスフェクトした SLK をコントロールとして使用した。また、SLK-vGPCR 細胞及び SLK-pCEFL 細胞も、エフリン B 2 及び Eph B 4 の発現について、一時的にトランスフェクトした KS-SLK 細胞内の免疫蛍光によって試験した。図 16 B は、SLK-pCEFL と比較して、SLK-vGPCR 細胞内でエフリン B 2 がさらに高発現していることを示している。Eph B 4 の変化は、SLK-pCEFL と比較して SLK-vGPCR では全く観察されなかった。これは、SLK-vGPCR 細胞が SLK-pCEFL 細胞と比較して高レベルのエフリン B 2 を発現したこと実証していることは明らかである。これは、HHV-8 の vGPCR が KS におけるエフリン B 2 の発現及び動脈表現型の変換の誘導に直接関与していることを示唆するものである。本発明者は、HHV-8 が HUVEC でのエフリン B 2 の発現を誘導したことを示したため、続いて、本発明者は、これが転写効果によって仲介できたかどうかを試験した。エフリン B 2 の 5'-フランキング DNA-ルシフェラーゼレポータープラスミドを構築し、そしてこれを HUVEC に一時的にトランスフェクトした。エフリン B 2 の 5'-フランキング DNA 配列 - 2491 / - 11 は、HUVEC 細胞内で最小の活性を有する (図 16 C)。これは、動脈 (静脈ではない) マーカーであるエフリン B 2 と一致する。しかしながら、本発明者は、培養状態の HUVEC が RNA レベルでいくつかのエフリン B 2 を発現することに気づいた。HHV-8 vGPCR の同時トランスフェクションによって、コントロールの発現ベクター pCEFL と比較して約 10 倍のエフリン B 2 転写が誘導される。おおむね等しい誘導がエフリン B 2 配列 - 2491 / - 11、- 1242 / - 11 又は - 577 / - 11 で見られたが、これは - 577 から - 11 の間の要素が vGPCR に対する応答を仲介するのに十分であることを示すものの、最大の活性は - 1242 / - 11 ルシフェラーゼ構築物で見られる。

【0122】

例 5 . 膀胱癌における Eph B 4 の発現

図 17 は、膀胱癌細胞株での Eph B 4 の発現 (A) 及び EGF R シグナル伝達経路による Eph B 4 発現の調節 (B) を示している。

【0123】

例 6 . 可溶性 Eph B 4 ポリペプチドの作製

(1) エフリン B 2 及び Eph B 4 の組換え可溶性誘導体産生用の哺乳動物発現ベクター 全長 ORF を有するヒト Eph B 4 (hB4) cDNA を含むベクターを PCR によってプライマー: GGATCCgccATGGAGCTCCGGGTGCTGCT (5 Bam-hB4) 及び GCGGCCGCTCAGTACTGCGGGCCCGGT (3 NotI-B4) で増幅させ、そして BamHI-NotI で切断した pRK5 ベクターにクローン化した。

hB4 の全長 ORF を有する BamHI-NotI-1 断片の配列

ggatccgcatggagctccgggtgctgctcctgctgggcttcgttggccgcagctttggaagagacctgctgaacacaa
atggaaactgctgatcgaagtgggtgacatccctcaggtggacgggcagtgaggaggaactgagcggcctggatgagg

10

20

30

40

50

aacagcacagcgtgcgaccctacgaagtgtgtgaagtgcagcgtgccccgggccaggcccactggcttcgcacaggttgg
 gtcccacggcggggcgccgtccacgtgtacgccacgctgcgcttcaccatgctcgagtgcctgtccctgcctcgggctgg
 gcgctcctgcaaggagaccttcaccgtcttctactatgagagcgtgcggaacagggccacggccctcacgccagcctgga
 tggagaacccctacatcaaggtggacacgggtggccgcggagcatctcaccgggaagcgccccggggccgaggccaccggg
 aaggtgaaagtcaagacgctgcgtctgggaccgctcagcaaggtggcttctacctggccttccaggaccagggtgcctg
 catggccctgctatccctgcaccctctctacaaaaagtgcgcccagctgactgtgaacctgactcgattcccgagactg
 tgctcgggagctgggtgtgcccgtggccggtagctgcgtgggtggatgccgtccccgccccggccccagccccagcctc
 tactgccgtgaggaaggccagtgggccgaacagccggtcacgggctgcagctgtgctccgggggttcgaggcagctgaggg
 gaacaccaagtgccgagcctgtgcccagggcaccctcaagccccgtcaggagaagggctcctgccagccatgccagcca
 atagccactcacaacacatggatcagccgtctgccagtgccgctcgggtacttccgggcacgcacagacccccggggt
 gcaccctgcaccacccctccttcggctccgcggagcgtgggttccccgctgaacggctcctccctgcacctggaatggag
 tggccccctggagctgggtggccgagaggacctcacctacgccctccgctgccgggagtgccgaccggaggctcctgtg
 cgccccgcgggggagacctgactttgacccccggccccgggacctgggtggagccccgggtgggtgttcgagggctacgt
 ccggacttcacctatacctttgaggctcactgcatgaacggggtatcctccttagccacggggccccgtcccatttgagcc
 tgtcaatgtcaccactgaccgagaggctacctcctgcagctgtctgacatccgggtgacgcggtcctcaccagcagcttga
 gccggcctgggctgttccccgggcacccagtggggctggctggactacgaggtcaaatacatgagaagggcgccgag
 ggtcccagcagcgtgcggttccgaagacgtcagaaaaccgggcagagctgcgggggctgaagcggggagccagctacct
 ggtgcaggtacgggcgcgctctgaggccggctacgggccccctcgccaggaacatcacagccagacccaactggatgaga
 gcgagggctggcgggagcagctggccccgatgcgggcagggcagctcgtgggtgtggctcctggctcctgggtcatgtg
 gtcgcagttctctgctcaggaagcagagcaatgggagagaagcagaatatcggaacaaacacggacagtatctcatcgg
 acatggtactaaggtctacatcgaccccttcacttatgaagaccctaatgaggctgtgagggaaatttgaaaagagatcg
 atgtctcctacgtcaagatggaagaggatgggtgcaggtgagtttggcgagggtgtgccggggggcggtcaaggcccca
 ggaagaaggagagctgtgtggcaatcaagacccctgaaggggtggctacacggagcggcagcggcgtgagttctgagcga
 ggctccatcatggccagctcgagacccccaatatcatccgctggagggcgtgggtcaccaacagcatgccgctcatga
 tctcacagagttcatggagaacggcgccccggactccttccctgcggctaaacgcagggacagttcacagttatccagctc
 gtgggcatgctgcggggcatcgccctcgggcatgcggtaccttgccgagatgagctacgtccaccgagacctggctgctcg
 caacatccttagtcaacagcaacctcgctctgcaaaagtgtctgactttggccttccccgatcctggaggagaactcttccg
 atcccacttacacgagctcccgggagaaagattcccatccgatggactgccccggaggccattgccttccggaagttc
 acttccgccagtgatgctggagttacgggattgtgatgtgggaggtgatgtcatttggggagaggccgtactgggacat
 gagcaatcaggacgtgatcaatgccatgaacagggactaccggctgcccccgccccagactgtcccacctccctccacc
 agtcatgctggactgttggcagaaagaccggaaatgccccggccccgcttccccagggtggtcagcgcctggacaagatg
 atccggaacccccgccagcctcaaaaatcggtggccccgggagaaatggcggggcctcacaccttccctggaccagcggcagcc
 tctactacagcttttggctctgtggcgagtggtctcgggccatcaaaaatgggaagatcgaagaaagtttgcagccg
 ctggctttggctccttcgagctgggtcagccagatctctgctgaggacctgctccgaatcggagtcactctggcgggacac
 cagaagaaaaatcttggccaggtgtccagcacaagaagctccagggccaagccgggaacccccgggtgggacaggaggaccggc
 cccgcagttactgagcggccgc。

【0124】

また、BamHI - NotI 全長 (FL) ヒト EphB4 の別バージョンもクローン化
 した。相違点は、クローニングのために使用した 3' - 末端 PCR オリゴプライマー：

- 3 Not1 - B4 GCGGCCGCTCAGTACTGCGGGGCCGGT
- 3 Not2 - B4 GCGGCCGAGTTCCTGCAGGTCAAGTACT

である。

【0125】

エフリン B2 及び EphB4 の組換え可溶性誘導体発現用のプラスミドベクターは、p
 EF6/V5 - His - TOPOベクター (インビトロジェン社)、pIG (ノバジェン
 社) 又は pRK5 を基礎とする。pEF6/V5 - His - TOPO は、ヒト伸長因子 1
 エンハンサー/プロモーターとプラスチジン耐性マーカーを含む。pIGベクター
 は、CMVプロモーター調節下でヒト IgG1 のFc部分との蛋白質融合を高レベルで発
 現させるためにデザインされており、pRK5 は、多目的 CMVプロモーター含有ほ乳類
 発現ベクターである。プラスミド構築物 pEF6 - B4 EC - NT を作製するために、ヒ

10
 20
 30
 40
 50

ト E p h B 4 の c D N A 断片を、P C R によってオリゴプライマー 5' - GGATCCGCC ATGGA GCTC CGGGTGTCTGCT - 3' 及び 5' - TGGATCCCT GCTCCCGC CAGCCCTCG CTCTCATCCA - 3' を使用して増幅させ、そして p E F 6 / V 5 - H i s - T O P O ベクターに T O P O クローニングした。p E F 6 - h B 4 E C v 3 を、p E F 6 - B 4 E C N T から、該プラスミド D N A を E c o R V 及び B s t B I で消化し、それらの末端をクレノウ酵素でフィルインし、そして該ベクターに再度連結することによって得た。p E F 6 - B 4 E C - N T によってコードされる組換え E p h B 4 誘導体は、エピトープタグ又は精製タグを含まないが、p E F 6 - h B 4 E C v 3 によってコードされる類似の B 4 E C v 3 蛋白質は、状態調整された培地からの精製を容易にするためにその C 末端上に V 5 エピトープタグ及び 6 x H i s タグを含む。プラスミド構築物 p E F 6 - h B 2 E C を、オリゴプライマー 5' - TGGAT CCAC CATGGCTGT GAGAAGGGAC - 3' と共に 5' - ATTAATGGTGATGGT GAT GATGACTAC CCACTTCGG AACCGAGGAT GTTGTTTC - 3' を使用したエフリン B 2 c D N A の P C R 増幅及び p E F 6 / V 5 - H i s - T O P O ベクターへの T O P O クローニングによって作製した。プラスミド構築物 p I G - h B 2 E C - F C を、オリゴプライマー 5' - TAAAGCTTCCGCCATGG CTGTG AGAAGGGAC - 3' 及び 5' - TAGGATCCACTTCGGA ACCGAGGATGTTGTT CCC - 3' を使用してエフリン B 2 c D N A を P C R 増幅し、続いて T O P O クローニングし、そして得られた P C R 断片の配列を決定し、その後 B a m H I 及び H i n d I I I で切断した p I G h l g G l F c 融合体発現ベクターにサブクローニングすることによって作製した。同様に、p I G - h B 2 E C 及び p I G - h B 4 E C v 3 を、オリゴプライマー 5' - ATAAGCTTCC GCCATG GAGC TCCGGGTGCTG - 3' と共に 5' - TTGGATCCTGCTCCCG CCAGCCCTCGC TCTCATC - 3' を使用して E p h B 4 E C D c D N A の部分を P C R 増幅し、その後 B a m H I 及び H i n d I I I で切断した p I G h l g G l F c 融合体発現ベクターにサブクローニングすることによって作製した。これらのベクターによってコードされる蛋白質の予想配列は上記した。

【 0 1 2 6 】

球状 (G) ドメイン及びシステイン - リッチドメイン (C) を有する短縮ヒト E p h B 4 ポリペプチド (「 G C 」 ポリペプチド) をコードする構築物を、オリゴヌクレオチド :

5 S p e B 4 TACTAGTCCGCCATGGAGCTCCGGGTGCTGCT

3 N o t B 4 G C gcgccgcttaatggtgatggtgatgagCCGAAGGAGGGGTGGTGCA

を使用した P C R 増幅によって調製した。

増幅した部分を p E F 6 への T A クローニングによってクローン化した。該クローン化断片 (S p e 1 - N o t 1 断片) の配列は次の通りである :

actagtcggccATGGAGCTCCGGGTGCTGCTCTGCTGGGCTTCGTTGGCCGACGCTTTGGAAGAGACCCTGCTGAACACA
AAATTGAAACTGCTGATCTGAAGTGGGTGACATTCCTCAGGTGGACGGGCAGTGGGAGGAACTGAGCGGCCCTGGATGA
GGAACAGCACAGCGTGCGCACCTACGAAGTGTGTGAAGTGCAGCGTGCCCCGGGCCAGGCCACTGGCTTCGCACAGGTT
GGTCCCACGGCGGGGCGCCGTCCACGTGTACGCCACGCTGCGCTTACCATGCTCGAGTGCCTGTCCCTGCCTCGGGCT
GGCGCTCCTGCAAGGAGACCTTACCGTCTTCTACTATGAGAGCGATGCGGACACGGCCACGGCCCTCACGCCAGCCTG
GATGGAGAACCCTACATCAAGGTGGACACGGTGGCCGCGGAGCATCTCACCCGGAAGCGCCCTGGGGCCGAGGCCACCG
GGAAGGTGAATGTCAAGACGCTGCGTCTGGGACCGCTCAGCAAGGCTGGCTTCTACCTGGCCTTCCAGGACCAGGGTGC
TGCATGGCCCTGCTATCCCTGCACCTTCTACAAAAAGTGCGCCAGCTGACTGTGAACCTGACTCGATTCCCGGAGAC
TGTGCCTCGGGAGCTGGTTGTGCCCGTGGCCGGTAGCTGCGTGGTGGATGCCGTCCCCGCCCTGGCCCCAGCCCCAGCC
TCTACTGCCGTGAGGATGGCCAGTGGGCCGAACAGCCGGTACGGGCTGCAGCTGTGCTCCGGGGTTCGAGGCAGCTGAG
GGAAACACCAAGTGCCGAGCCTGTGCCAGGGCACCTTCAAGCCCCTGTGAGGAGAAGGGTCTGCCAGCCATGCCAGC
CAATAGCCACTCTAACACCATTGGATCAGCCGTCTGCCAGTGCCGCGTCCGGTACTTCCGGGCACGCACAGACCCCGG
GTGCACCCTGCACCACCCCTCCTTCGGCTcatcatcaccatcaccattaagcggccgc.

【 0 1 2 7 】

球状ドメイン + システインリッチドメイン (B 4 E C - G C) 前駆体蛋白質の配列は次の通りである :

MELRVLLCWASLAAALEETLLNNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSLGDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRGTGWVPR
RGAVHVYATLRFMTLECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGEATGKVN

VKTLRLGPLSKAGFYLAHQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVVPVAGSCVVDVAVPAPGSPSPSLYCR
EDGQWAEQPVGTGSCAPGFEEAEGNTKCRACAQGTFFKPLSGEGSCQPCPANSHTSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPC
TTPPSAHHHHHHH。

【 0 1 2 8 】

治療用途を含めた多くの用途のためには、リーダー配列（最初の15アミノ酸、しかし
てプロセシングを受けた形態はLeu-Glu-Glu...から始まる）及びC末端ヘキサ
サヒスチジンタグを除去し又は省略することができる。

【 0 1 2 9 】

GC蛋白質用のプラスミドは次の配列を有する：

AATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATA
GGGGTCCGCGCACATTTCCCGGAAAAGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCTATGGTCGACT
CTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTG
CGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTG
CGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGGCTTTTTGCAAAAAGCTTTTGCAAGA
TGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGCCTCGTGAGGCTCC
GGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGC
CTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC
CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCGAAACACAGGTAAGTGCCGTGTGT
GGTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTAATTCACCTGGCTGCAGTACGTGAT
TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCGCTCGTGCTT
GAGTTGAGGCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGAT
AAGTCTCTAGCCATTTAAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCA
AGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGA
GGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCTGCTCTGGTGCCTGGCCTC
GCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGTGGCACACAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCT
TCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGA
AAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTC
TCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTTCCACACTGAGTGGGTGGA
GACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTTCTCTTGGAAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTC
TCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAAGTGTGCTGAGGAATTAGCTTGGTACTAATACGACTC
ACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGGTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTGCCCTT
t a c t a g t c c g c c a t g g a g c t c c g g g t g c t g c t c t g g g c t t c g t t g g c c g a g c t t t g g a a g a g a c c c t g c t g a a c a c
AAAATTGAAAAGTCTGATCTGAAGTGGGTGACATTCCTCAGGTGGACGGCAGTGGGAGGAACTGAGCGGCCTGGATG
AGGAACAGCACAGCGTGCACCTACGAAAGTGTGTGACGTGCAGCGTGCCTCCGGCCAGGCCACTGGCTTCGCACAGGT
TGGGTCCCACGGCGGGGCGCCGTCCACGTGTACGCCACGCTGCGCTTACCATGCTCGAGTGCCTGTCCCTGCCTCGGGC
TGGGCGCTCCTGCAAGGAGACCTTACCGTCTTCTACTATGAGAGCGATGCGGACACGGCCACGGCCCTCAGCCAGCCT
GGATGGAGAACCCTACATCAAGGTGGACACGGTGGCCGCGGAGCATCTCACCCGGAAGCGCCCTGGGGCCGAGGCCACC
GGGAAGGTGAATGTCAAGACGCTGCGTCTGGGACCGCTCAGCAAGGCTGGCTTCTACCTGGCCTTCCAGGACCAGGGTGC
CTGCATGGCCCTGCTATCCCTGCACCTCTTCTACAAAAAGTGCGCCAGCTGACTGTGAACCTGACTCGATTCCCGGAGA
CTGTGCCTCGGGAGCTGGTTGTGCCCGTGGCCGGTAGCTGCGTGGTGGATGCCGTCCCCGCCCTGGCCCCAGCCCCAGC
CTCTACTGCCGTGAGGATGGCCAGTGGGCCGAACAGCCGGTACAGGGCTGCAGCTGTGCTCCGGGGTTGAGGCAGCTGA
GGGGAACACCAAGTGCCGAGCCTGTGCCAGGGCACCTTCAAGCCCTGTGAGGAGAAGGGTCCCTGCCAGCCATGCCAG
CCAATAGCCACTTAACACCATTGGATCAGCCGTCTGCCAGTCCGCGTGGGTACTTCCGGGCACGCACAGACCCCCGG
GGTGCACCTGCACCACCCCTCCTTCGGCTc a t c a t c a c c a t c a c c a t t a a g c g g c c g c A A G G G C A A T T C T G C A G A T A T C
CAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGGGTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCCTCGGTCTCGA
TTCTACGCGTACCGGTTCATCATCACCATCACCATTTAGTTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCC
AGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCCTTCCCTTACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCCTTTCTAATAAAAAT
GAGGAAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGA
TTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTA
GGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTT

10
20
30
40
50

GCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCT
 AAATCGGGGCATCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTATGGTT
 CACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTG
 TTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTTCGGCTATTG
 GTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTTCTGTGGAATGTGTGTGTCAGTTAGGGTGTGAAAGTC
 CCCAGGCTCCCCAGGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGC
 TCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCC
 GCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCG
 CCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCT
 TGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGAC 10
 AAGGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAGCCTTTGTCTCAAGAAGAATCCACCCTCATTGAAAAGCAACGGCTACAATCAA
 CAGCATCCCCATCTCTGAAGACTACAGCGTCGCCAGCGCAGCTCTCTCTAGCGACGGCCGCATCTTCACTGGTGTCAATG
 TATATCATTTTACTGGGGGACCTTGTGCAGAACTCGTGGTGCTGGGCACTGCTGCTGCTGCGGCAGCTGGCAACCTGACT
 TGTATCGTCGCGATCGGAAATGAGAACAGGGGCATCTTGAGCCCTGCGGACGGTGTGACAGGTGCTTCTCGATCTGCA
 TCCTGGGATCAAAGCGATAGTGAAGGACAGTGATGGACAGCCGACGGCAGTTGGGATTCGTGAATTGCTGCCCTCTGGTT
 ATGTGTGGGAGGGCTAAGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTGCTACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTT
 CTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGT
 TCTTCGCCACCCCAACTTGTATTGACGCTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAAATAAA
 GCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATAACCGTCGACCTC
 TAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATAC 20
 GAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC
 CGTTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGGTTTTCGTATTG
 GCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAG
 GCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAA
 CCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCGCTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTC
 AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCG
 ACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTA
 TCTCAGTTCGGTGTAGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAGAACCCCCCGTTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTAT
 CCGGTAACATCGCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC
 AGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGG 30
 TATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTA
 GCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG
 GGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGAT
 CCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA
 TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACG
 ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGC
 AATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTT
 GCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCA
 CGCTCGTCGTTTTGGTATGGCTTCATTACAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAA
 AAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGCCCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAG 40
 CACTGCATAATTTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTG
 AGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAA
 AAGTGTATCATTTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCGATGTAA
 CCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAA
 TGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTC。

【 0 1 3 0 】

球状ドメインと、Cysリッチドメインと、第1FNIIIドメイン(GCF)とを有する短縮ヒトEphB4蛋白質をコードする核酸を、次のオリゴヌクレオチド：

5 S p e B 4 TACTAGTCCGCCATGGAGCTCCGGGTGCTGCT

3 N o t B 4 G C F 1 AGCGGCCGCTTAATGGTGTATGGTGTATGATGGACATTGACAGGCTCAAATGGGA

を使用して P C R で調製した。

【 0 1 3 1 】

p E F 6 に T A クローニングした。このクローン化断片 (S p e I - N o t I 断片) の配列は次の通りである :

```
tactagttccgccATGGAGCTCCGGGTGCTGCTCTGCTGGGCTTCGTTGGCCGACGCTTTGGAAGAGACCCTGCTGAACAC
AAAATTGGAACTGCTGATCTGAAGTGGGTGACATTCCCTCAGGTGGACGGCAGTGGGAGGAACTGAGCGGCCTGGATG
AGGAACAGCACAGCGTGCGCACCTACGAAGTGTGTGAAGTGCAGCGTGCCCCGGGCCAGGCCACTGGCTTCGCACAGGT
TGGGTCCACAGGCGGGGCGCCGTCCACGTGTACGCCACGCTGCGCTTCACCATGCTCGAGTGCCTGTCCCTGCCTCGGGC
TGGGCGCTCCTGCAAGGAGACCTTCACCGTCTTCTACTATGAGAGCGATGCGGACACGGCCACGGCCCTCACGCCAGCCT
GGATGGAGAACCCTACATCAAGGTGGACACGGTGGCCGCGGAGCATCTCACCCGGAAGCGCCCTGGGGCCGAGGCCACC
GGGAAGTGAATGTCAAGACGCTGCGTCTGGGACCGCTCAGCAAGGCTGGCTTCTACCTGGCCTTCCAGGACCAGGGTGC
CTGCATGGCCCTGCTATCCCTGCACCTCTTCTACAAAAAGTGCGCCAGCTGACTGTGAACCTGACTCGATTCCCGGAGA
CTGTGCCCTCGGGAGCTGGTTGTGCCGTGGCCGGTAGCTGCGTGGTGGATGCCGTCCCCGCCCTGGCCCCAGCCCCAGC
CTCTACTGCCGTGAGGATGGCCAGTGGGCCGAACAGCCGGTACAGGGCTGCAGCTGTGCTCCGGGGTTTCGAGGCAGCTGA
GGGAACACCAAGTGCCGAGCCTGTGCCAGGGCACCTTCAAGCCCTGTCAGGAGAAGGGTCTGCCAGCCATGCCAG
CCAATAGCCACTCTAACACCATTGGATCAGCGTCTGCCAGTGCCGCTCGGGTACTTCCGGGCACGCACAGACCCCCGG
GGTGCACCCTGCACCACCCTCCTTCGGCTCCGCGGAGCGTGGTTTCCCGCCTGAACGGCTCCTCCCTGCACCTGGAATG
GAGTGCCCCCTGGAGTCTGGTGGCCGAGAGGACCTCACCTACGCCCTCCGCTGCCGGGAGTGCCGACCCGGAGGCTCCT
GTGCGCCCTGCGGGGAGACCTGACTTTTTGACCCCGCCCCGGGACCTGGTGGAGCCCTGGGTGGTGGTTTCGAGGGCTA
CGTCCGGACTTCACCTATACCTTTGAGGTCACTGCATTGAACGGGGTATCCTCCTTAGCCACGGGGCCCGTCCATTTGA
GCCTGTCAATGTCCATCATCACCATCACCATTAAGcggccgct。
```

【 0 1 3 2 】

G C F 前駆体蛋白質の配列は次の通りである :

```
MELRVLLCWASLAAALEETLLNKTLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRGTGWVPR
RGAVHVYATLRFMTLECLSLPRAGRSKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGEATGKVN
VKTLRLGPLSKAGFYLAHQDQACMALLSLHLFYKKAQLTVNLTRFPETVPRELVVPVAGSCVVDVAVPAPGSPSPSLYCR
EDGQWAEQPVGTGCSCAPGFAEGNTKCRACAQGTFFKPLSGEGSCQPCPANSNSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTT
PPSAPRSVVSRLNGSSSLHLEWSAPLES GGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGDLTFDPGPRDLVEPWWVRGLRPDFTYT
FEVTALNGVSSLATGPVPEPNNVHHHHHHH。
```

【 0 1 3 3 】

治療用途を含めて多くの用途のためには、リーダー配列 (最初の 1 5 アミノ酸、しかしプロセッシングを受けた形態は L e u - G l u - G l u ... から始まる。) 及び C 末端へキサヒスチジンタグを除去し又は省略することができる。

【 0 1 3 4 】

プラスミド D N A 配列は次の通りである :

```
AATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATA
GGGGTTCGCGCACATTTCCCGGAAAAGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCTATGGTCGACT
CTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTG
CGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTG
CGCTGCTTCGCGATGTACGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGCCTTTTGC AAAAAGCTTTTGC AAAGA
TGGATAAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGCCTCGTGAGGCTCC
GGTGCCCGTCACTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCCGGTGC
CTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC
CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGT
GGTTCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTAATTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT
TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCTCGTGCTT
GAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGAT
AAGTCTCTAGCCATTTAAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCA
AGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGA
GGCGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTC
```

GCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGTCCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCT
 TCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGA
 AAAGGCCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTC
 TCGAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCACACTGAGTGGGTGGA
 GACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTTCTCTTGGAAATTTGCCCTTTTGGAGTTTGGATCTTGGTTCATTC
 TCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAGGAATTAGCTTGGTACTAATACGACTC
 ACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGGTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTGCCCTT
 tactagtcgcccATGGAGCTCCGGGTGCTGCTCTGCTGGGCTTCGTTGGCCGACGCTTTGGAAGAGACCTGCTGAACAC
 AAAATTGAAAAGTCTGATCTGAAGTGGGTGACATTTCCCTCAGGTGGACGGGCAGTGGGAGGAACTGAGCGGCCTGGATG
 AGGAACAGCACAGCGTGCACCTACGAAAGTGTGTGACGTGCAGCGTGCCCCGGGCCAGGCCACTGGCTTCGCACAGGT
 TGGGTCCCACGGCGGGGCGCCGTCCACGTGTACGCCACGCTGCGCTTACCATGCTCGAGTGCCTGTCCCTGCCTCGGGC
 TGGGCGCTCCTGCAAGGAGACCTTACCCTTCTACTATGAGAGCGATGCGGACACGGCCACGGCCCTCACGCCAGCCT
 GGATGGAGAACCCTACATCAAGGTGGACACGGTGGCCGCGGAGCATCTCACCCGGAAGCGCCCTGGGGCCGAGGCCACC
 GGGAAAGTGAATGTCAAGACGCTGCGCCTGGGACCGCTCAGCAAGGCTGGCTTCTACCTGGCCCTTCCAGGACCAGGGTGC
 CTGCATGGCCCTGCTATCCCTGCACCTTCTACAAAAAGTGCGCCAGCTGACTGTGAACCTGACTCGATTCCCGGAGA
 CTGTGCCTCGGGAGCTGGTTGTGCCGTGGCCGGTAGCTGCGTGGTGGATGCCGTCCCCGCCCTGGCCCCAGCCCCAGC
 CTCTACTGCCGTGAGGATGGCCAGTGGGCCAACAGCCGGTACGGGCTGCAGCTGTGCTCCGGGGTTGAGGCAGCTGA
 GGGAAACACCAAGTGCCGAGCCTGTGCCAGGGCACCTTCAAGCCCTGTGAGGAGAAGGGTCCCTGCCAGCCATGCCAG
 CCAATAGCCACTTAACACCAATTGGATCAGCCGTCTGCCAGTGCCGCGTCCGGTACTTCCGGGCACGCACAGACCCCCGG
 GGTGCACCCTGCACCACCCTCCTTCGGCTCCGCGGAGCGTGGTTTTCCCGCCTGAACGGCTCCTCCCTGCACCTGGAATG
 GAGTGGCCCCCTGGAGTCTGGTGGCCGAGAGGACCTCACCTACGCCCTCCGCTGCCGGGAGTGTGACCCGGAGGCTCCT
 GTGCGCCCTGCGGGGAGACCTGACTTTTTGACCCCGGCCCCGGGACCTGGTGGAGCCCTGGGTGGTGGTTGAGGGGCTA
 CGTCTGACTTACCTATACCTTTGAGGTCACTGCATTGAACGGGGTATCCTCCTTAGCCACGGGGCCCCGTCCCATTTGA
 GCCTGTCAATGTCCATCATACCATCACCATTAAGcgggcgcgc tAAGGGCAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCC
 GCTCGAGTCTAGAGGGCCCCGCGTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGT
 CATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTG
 CCCCTCCCCGTGCCCTTCTTACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTCATCGC
 ATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC
 AGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCAG
 CGCCCTGTAGCGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCG
 CCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCATCCC
 TTTAGGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAGTGGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCAT
 CGCCCTGATAGACGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAAGTGAACA
 ACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTATTATAAGGGATTTTGGGGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCT
 GATTTAACAAAAATTAACGCGAATTAATTTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGG
 CAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGA
 AGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCCGCCCTAACTCCGCC
 CAGTTCCGCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGC
 TATTCAGAAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGATATCCATTTTC
 GGATCTGATCAGCACGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAA
 ACCATGGCCAAGCCTTTGTCTCAAGAAAGTCCACCCTCATTGAAAGAGCAACGGCTACAATCAACAGCATCCCCATCTC
 TGAAGACTACAGCGTCGCCAGCGCAGCTCTCTAGCGACGGCCGCATCTTCACTGGTGTCAATGTATATCATTTTTACTG
 GGGGACCTTGTGCAGAACTCGTGGTGTGGGCACTGCTGCTGCTGCGG CAGCTGGCAACCTGACTTGTATCGTCGGAT
 CGGAAATGAGAACAGGGGCATCTTGGCCCTGCGGACGGTGTGACAGGTGCTTCTCGATCTGCATCCTGGGATCAAAG
 CGATAGTGAAGGACAGTGTGACAGCCGACGGCAGTTGGGATTCGTGAATTGCTGCCCTCTGGTTATGTGTGGGAGGGC
 TAAGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTGCTACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGG
 GCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCC
 AACTTGTATTATGACGCTTATAATGGTTACAAAATAAGCAATAGCATCACAATTTACAAAATAAAGCATTTTTTTCACT
 GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGG
 CGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATA

10
20
30
40
50

AAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCGGG
 AACCTGTGCGTCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTT
 CCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAAAAGCGGTAATACGGTTA
 TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCG
 GTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
 CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACC
 GGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTA
 GGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTC
 TTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA
 GCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT
 GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTT
 TTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAG
 TGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA
 ATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA
 TCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATCCATAGTTGCCTGACTCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTA
 CCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGC
 CGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAG
 TAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGT
 ATGGCTTCAATCAGTCCGGTTCACACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTC
 CTTGCGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTC
 TTAAGTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGG
 CGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTAAAAAGTGTCTCATCATTGG
 AAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCA
 ACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAGGGA
 ATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCCTTTTTTC.

10

20

30

40

50

【 0 1 3 5 】

球状ドメインと、Cysリッチドメインと、C末端タグGCF2(v.3)を有する2
 個のFNIIIドメインとを有する短縮ヒトEphB4蛋白質をコードするベクターを、p
 EF6-FL-hB4ECから、EcoRV及びBstBIで消化し、クレノウで処理
 し、そして再度連結反応させることによって得た。

【 0 1 3 6 】

コードFL-hB4EC前駆体(Hisタグ付き)のアミノ酸配列は次の通りである：
 MELRVLLCWASLAAALEETLLNKTLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDE EQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRGWP
 RRGAVHVYATLRFMTLECLSLPRAG RSKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGEATGK
 VNVKTLRLGPLSKAGFYLAHQDQGACMALLSLHLFYKKAQLTVNLTRFPETVPRELVVPVAGSCVVDVAVPAPGSPSLY
 CREDGQWAEQPVTCSCAPGFEEAEGNTKCRACAQGTFKPLSGEGSCQPCPANSHTSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGA
 PCTTPPSAPRSVVSRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGDGLTFDPGPRDLVEPWWRGLRPD
 FTYTFEVTALNGVSSLATGPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAPSGAWLDYEVKYHEKGAEGP
 SSVRFLKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHSQTQLDESEGWREQGSKRALQIEGKIPNPLLGLD
 STRTGHHHHHH。

【 0 1 3 7 】

治療用を含めて多くの用途のためには、リーダー配列(最初の15アミノ酸、しかして
 プロセッシングを受けた形態は、Leu-Glu-Glu...から開始する。)及びC末端
 ヘキサヒスチジンタグを除去し又は省略することができる。

【 0 1 3 8 】

プラスミドDNA配列は次の通りである：
 aatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaata
 ggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatcgggagatctcccgatccccatggctgact
 ctcagtaacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatctgctccctgctgtgtgttggaggctcgctgagtagt
 cgcgagcaaaaatttaagctacaacaaggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggtaggcgtttt

gcgctgcttcgcgatgtacgggcccagataacgcgttgacattgattatgactaggcttttgcaaaaagctttgcaaaag
atggaataaagttttaaacagagaggaatctttgcagcfaatggaccttctaggctttgaaaggagtgcctcgtgaggctc
cggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtcggcgagaagtggggggaggggtcggaattgaaccgggtg
cctagagaagggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgacctttttcccagagggtgggggagaa
ccgtataaagtgcagtagtcgcccgaacgttcttttcgcaacgggtttgcccgcagaacacaggtaagtgccgtgtg
tggttcccgcgggctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtga
ttcttgaatcccagacttcgggttggaaagtggtgggagagtgcaggaccttgcgcttaaggagcccccttcgacctcgtgct
tgagttagggctggcctgggcccggggccgctgcgaaatcgggtggcaccttcgcccctgtctcgtgctttcga
taagtccttagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgcttttttctggcaagatagctctgtaaatgcccggcc
aagatctgcacactggatctcgggttttggggccgcccggggcggcagggggccccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcg
aggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaaatcgacgggggtagctcgaagctggccggcctgctctggtgcctggcct
cgcgcccggctgtatcgccccggcctgggcccgaaggctggcccggctcggcaccagtgcgtgagcggaaagatggccgc
ttcccggcccctgctgcagggagctcaaaaaggaggacgcggcgtcgggagagcgggcccgtgagtcacccacacaaagg
aaaaggcccttccgctccagccgtcgtctcatgtgactccacggagtagccggcgccgtccaggcacctcgattagtt
ctcgagcttttggagtagctcgtctttagggtggggggaggggttttatgcatggagtttccccacactgagtggtgg
agactgaagttaggccagctggcacttgatgtaattctccttggaaattgccccctttttgagtttggatcttggttcatt
ctcaagcctcagacagtggttcaaaagtttttcttccatttcagggtgctgtaggaaatagcttggactaataacgact
cactataggagaccgaagctggctaggtaagcttggtagccagctcggatccactagctccagtggttggaaatgcccc
tATAAGCTTCCGCCATGGAGCTCCGGGTGCTGCTCTGCTGGGCTTCGTTGGCCGACGCTTTGGAAGAGACCCTGCTGAAC
ACAAAATTGAAAAGTGTGATCTGAAGTGGGTGACATTCCCTCAGGTGGACGGGCAGTGGGAGGAACTGAGCGCCTGG
ATGAGGAACAGCACAGCGTGGCACCTACGAAGTGTGTGAAGTGCAGCGTGCCCCGGGCCAGGCCACTGGCTTCGCACA
GGTTGGTCCCACGGCGGGGCGCCGTCCACGTGTACGCCACGCTGCGCTTACCATGCTCGAGTGCCTGTCCCTGCCTCG
GGCTGGGCGCTCCTGCAAGGAGACCTTACCCTTCTACTATGAGAGCGATGCGGACACGGCCACGGCCCTCACGCCAG
CCTGGATGGAGAACCCTACATCAAGGTGGACACGGTGGCCGCGGAGCATCTACCCGGAAGCGCCCTGGGGCCGAGGCC
ACCGGGAAGGTGAATGTCAAGACGCTGCGTCTGGGACCGCTCAGCAAGGCTGGCTTCTACCTGGCCTTCCAGGACCAGGG
TGCCTGCATGGCCCTGCTATCCCTGCACCTTCTACAAAAAGTGCGCCAGCTGACTGTGAACCTGACTCGATTCCCGG
AGACTGTGCCTCGGGAGCTGGTTGTGCCCGTGGCCGGTAGCTGCGTGGTGGATGCCGTCCCCGCCCTGGCCCCAGCCCC
AGCCTCTACTGCCGTGAGGATGGCCAGTGGCCGAACAGCCGGTACAGGGCTGCAGCTGTGCTCCGGGGTTCGAGGCAGC
TGAGGGGAACACCAAGTGCCGAGCCTGTGCCAGGGCACCTTCAAGCCCCTGTGAGGAGAAGGGTCTGCCAGCCATGCC
CAGCCAATAGCCACTCTAACACCATTGGATCAGCCGTCTGCCAGTGCCGCGTCCGGTACTTCCGGGCACGCACAGACCCC
CGGGG TGCACCCTGCACCACCCCTCCTTCGGCTCCGCGGAGCGTGGTTTCCCGCCTGAACGGCTCCTCCCTGCACCTGG
AATGGAGTGCCCCCTGGAGTCTGGTGGCCGAGAGGACCTCACCTACGCCCTCCGCTGCCGGGAGTGCCGACCCGGAGGC
TCCTGTGCGCCCTGCGGGGAGACCTGACTTTTGACCCCGCCCCGGGACCTGGTGGAGCCCTGGGTGGTGGTTTCGAGG
GCTACGTCCGACTTACCTATACCTTTGAGGTCACTGCATTGAACGGGGTATCCTCCTTAGCCACGGGGCCCGTCCCAT
TTGAGCCTGTCAATGTCAACACTGACCGAGAGGTACCTCCTGCAGTGTCTGACATCCGGGTGACGCGGTCTCACCCAGC
AGCTTGAGCCTGGCCTGGGCTGTTCCCCGGGCACCCAGTGGGGCGTGGCTGGACTACGAGGTCAAATACCATGAGAAGGG
CGCCGAGGGTCCCAGCAGCGTGCGGTTCCTGAAGACGTGAGAAAACCGGGCAGAGCTGCGGGGGCTGAAGCGGGGAGCCA
GCTACCTGGTGCAGGTACGGGCGGCTCTGAGGCCGCTACGGCCCTTCGGCCAGGAACATCACAGCCAGACCCAACTG
GATGAGAGCGAGGGCTGGCGGGAGCAGGGATCCAAaagggcaattctgcagatcgaaggtaagccatcccataaccctct
cctcggctcgaattctacgcgtaccggtcatcatcaccatcaccattgagtttaaacccgctgatcagcctcgactgtgc
cttctagttgccagccaatctgtgtttgcccccccccgctgccttcttgacctggaagggtgccactcccactgtcctt
tcttaataaaatgaggaaatgcatcgcatgtctgagtaggtgtcatctatctgggggggtgggggtggggcaggacag
caaggggggaggaatgggaagacaatagcaggcatgctggggatgctgggtgggctctatggctctgaggcggaaagaacca
gctggggctctagggggtatccccacgcgcccgttagcggcgcattaaagcgcggcgggtgtgggtgttacgcgcagcgtg
accgctacacttgccagcgccttagcggccgctcctttcgtttcttcccttcttctcgccacgttcgcccggctttcc
ccgtcaagctctaaatcggggcaatccccttaggggttccgattagtgctttacggcaccctcgacccccaaaaaacttgatt
agggtgaggttcacgtagtgggccatcgcccgtatagacgggtttttcgcccccttgacgttggagttccacgttctttaat
agtgggactctgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggctctatcttttgattataagggattttggggat
ttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatftaacgcgaaataatctgtggaaatgtgtgtcagtagg
gtgtggaaagtcccaggctcccaggcaggcagaagtatgcaagcatgcatctcaattagtcagcaaccagggtgtgga

10

20

30

40

50

3 N o t B 4 G C F 2 - GCGGCCGCCCTGCTCCCGCCAGCCCTCGCT

(第2フィブロネクチン反復配列の後にあるC末端B4ECFL配列の後にNotI部位を付加してpEF6内でV5及びHisタグへのフレーム単位の融合を可能する) 。 pEF6にTAクローニングし、次いでNotIで消化し、ゲル精製し、そして自己連結させた。

【 0 1 4 0 】

該クローン化断片 (SpeI - NotI断片) の配列は次の通りである :

tactagtccgccATGGAGCTCCGGGTGCTGCTCTGCTGGGCTTCGTTGGCCGACGCTTTGGAAGAGACCCCTGCTGAACAC
AAAATTGAAAACCTCAGCTGACTGTGAACCTGACTCGATTCCCGGAGACTGTGCCTCGGGAGCTGGTTGTGCCCCGTGGCCG
GTAGCTGCGTGGTGGATGCCGTCCCGCCCTGGCCCCAGCCCCAGCCTCTACTGCCGTGAGGATGGCCAGTGGGCCGAA 10
CAGCCGGTCACGGGCTGCAGCTGTGCTCCGGGGTTCGAGGCAGCTGAGGGGAACACCAAGTGCCGAGCCTGTGCCAGGG
CACCTTCAAGCCCCTGTCAGGAGAAGGGTCTGCCAGCCATGCCAGCCAATAGCCACTCTAACACCATTGGATCAGCCG
TCTGCCAGTGCCGCGTCGGTACTTCCGGGCACGCACAGACCCCCGGGTGCACCCTGCACCACCCCTCCTTCGGCTCCG
CGGAGCGTGGTTTCCCGCCTGAACGGCTCCTCCCTGCACCTGGAATGGAGTGCCCCCCTGGAGTCTGGTGGCCGAGAGGA
CCTCACCTACGCCCTCCGTGCCGGGAGTGCCGACCCGAGGCTCCTGTGCGCCCTGCGGGGAGACCTGACTTTTGACC
CCGGCCCCCGGGACCTGGTGGAGCCCTGGGTGGTGGTTCGAGGGCTACGTCCGGACTTCACCTATACCTTTGAGGTCAT
GCATTGAACGGGGTATCCTCCTTAGCCACGGGGCCCGTCCCATTTGAGCCTGTCAATGTCACCACTGACCGAGAGGTACC
TCCTGCAGTGTCTGACATCCGGGTGACGCGGTCTCACCCAGCAGCTTGAGCCTGGCCTGGGCTGTTCCCCGGGCACCCA
GTGGGGCGTGGCTGGACTACGAGGTCAAATACCATGAGAAGGGCGCCGAGGGTCCAGCAGCGTGCGGTTCCTGAAGACG 20
TCAGAAAACCGGGCAGAGCTGCGGGGGCTGAAGCGGGGAGCCAGCTACCTGGTGCAGGTACGGGCGCGCTCTGAGGCCGG
CTACGGGCCCTTCGGCCAGGAACATCACAGCCAGACCCAACTGGATGAGAGCGAGGGCTGGCGGGAGCAGGgcgccgc

【 0 1 4 1 】

C F 2 前駆体は次の通りである :

MELRVLLCWASLAAALEETLLNKTLETQLTVNLTRFPETVPRELVVPVAGSCWDAVPAPGPSPLSLYCREDGQWAEQPVGT
CSCAPGFEEAEGNTKCRACAQGTFKPLSGEGSCQPCPANSHTNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPRSWSR
LNGSSLHLEWSAPLESGGREDLYALRCRECRPGGSCAPCGDLTFDPGPRDLVEPWVWRGLRDPFTYTFEVTALNGVSS
LATGPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAPSGAWLDYEVKYHEKGAEGPSSVRFLKTSENRAEL
RGLKRGASYLVQVRARSEAGYGFPGQEHSQTQLDESEGWREQGRSSLEGPRFEGKIPNPLLGLDSTRTGHHHHHHH. 30

【 0 1 4 2 】

プラスミドDNA配列は次の通りである :

AATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATA
GGGGTCCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACT
CTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTG
CGCGAGCAAAATTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTG
CGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGA
TGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGCCTCGTGAGGCTCC
GGTGCCCGTACGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGC
CTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC
CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGT 40
GGTCCC CGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGACCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT
TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTT
GAGTTGAGGCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGAT
AAGTCTTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCA
AGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGA
GGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTC
GCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGTGCACACAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCT
TCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAAATGGAGGACGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAATCACCCACACAAAGGA
AAAGGCCCTTTCGCTCCTCAGCCGTGCTTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTC
TCGAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGA 50

GACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGATCTTGGTTCATTC
 TCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAGGAATTAGCTTGGTACTAATACGACTC
 ACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGGTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTTGCCCTT
 t a c t a g t c c g c c A T G G A G C T C C G G G T G C T G C T G C T G G G C T T C G T T G G C C G C A G C T T T T G G A A G A G A C C C T G C T G A A C A C
 AAAATTGAAAACCTCAGCTGACTGTGAACCTGACTCGATTCCCGGAGACTGTGCCTCGGGAGCTGGTTGTGCCCGTGGCCG
 GTAGCTGCGTGGTGGATGCCGTCCCCGCCCTGGCCCCAGCCCCAGCCTCTACTGCCGTGAGGATGGCCAGTGGGCCGAA
 CAGCCGGTACGGGCTGCAGCTGTGCTCCGGGGTTCGAGGCAGCTGAGGGGAACACCAAGTGCCGAGCCTGTGCCAGGG
 CACCTTCAAGCCCCTGTCAGGAGAAAGGTCTGCCAGCCATGCCAGCCAATAGCCACTCTAACACCATTGGATCAGCCG
 TCTGCCAGTGCCGCGTCCGGTACTTCCGGGCACGCACAGACCCCCGGGTGCACCCTGCACCACCCCTCCTTCGGCTCCG
 CGGAGCGTGGTTTTCCCGCTGAACGGCTCCTCCCTGCACCTGGAATGGAGTGCCCCCTGGAGTCTGGTGGCCGAGAGGA 10
 CCTCACCTACGCCCTCCGCTGCCGGGAGTGTGACCCGGAGGCTCCTGTGCGCCCTGCGGGGGAGACCTGACTTTTGACC
 CCGGCCCGGGACCTGGTGGAGCCCTGGTGGTGGTTCGAGGGCTACGTCCTGACTTCACCTATACCTTTGAGGTCACT
 GCATTGAACGGGGTATCCTCCTTAGCCACGGGGCCCGTCCCATTTGAGCCTGTCAATGTCACCACTGACCGAGAGGTACC
 TCCTGCAGTGTCTGACATCCGGGTGACGCGTCTCACCCAGCAGCTTGAGCCTGGCCTGGGCTGTTCCCCGGGCACCCA
 GTGGGGCTGTGCTGGACTACGAGGTCAAATACCATGAGAAGGGCGCCGAGGGTCCAGCAGCGTGCGGTTCCTGAAGACG
 TCAGAAAACCGGGCAGAGCTGCGGGGGCTGAAGCGGGGAGCCAGCTACCTGGTGCAGGTACGGGCGCGCTCTGAGCCGG
 CTACGGGCCCTTCGGCCAGGAACATCACAGCCAGACCCAACTGGATGAGAGCGAGGGCTGGCGGGAGCAGGg c g g c c g c T
 CGAGTCTAGAGGGCCCGCGTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCA
 CATCACCATCACCATAGTGTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC
 CTCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATT 20
 GTCTGAGTAGGTGCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGG
 CATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGAAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCC
 CTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCC
 CTCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGGCTTTCCCCGTCGAAGCTCTAAATCGGGGCATCCCTTTA
 GGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCC
 CTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAACAC
 TCAACCCATATCTCGGTCTATTCTTTTATTATAAGGGATTTTGGGGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATT
 TAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGGCAGG
 CAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA
 TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCCGCCCTAACTCCGCCCAGT 30
 TCCGCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATT
 CCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGATATCCATTTTTCGGAT
 CTGATCAGCACGTGTTGACAAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAACCA
 TGGCCAAGCCTTTGTCTCAAGAAGAATCCACCCTCATTGAAAAGAGCAACGGCTACAATCAACAGCATCCCCATCTCTGAA
 GACTACAGCGTCGCCAGCGCAGCTCTCTCTAGCGACGGCCGCATCTTCACTGGTGTCAATGTATATCATTTTACTGGGGG
 ACCTTGTGCAGAACTCGTGGTGTGGGCACTGCTGCTGCTGCGGCAGCTGGCAACCTGACTTGTATCGTCGCGATCGGAA
 ATGAGAACAGGGGCATCTTGAGCCCCCTGCGGACGGTGTGCACAGGTGCTTCTCGATCTGCATCCTGGGATCAAAGCGATA
 GTGAAGGACAGTGATGGACAGCCGACGGCAGTTGGGATTCTGTAATTGCTGCCCTCTGGTTATGTGTGGGAGGGCTAAGC
 ACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTGCTACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAAGTTGGGCTTC
 GGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCAACTT 40
 GTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATT
 CTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAA
 TCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAAATTGTTATCCGCTCACAATTTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG
 TAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACC
 TGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCG
 CTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCAC
 AGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGC
 TGCGTTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACA
 GGAATAAAGATAACAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATA
 CCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCG 50

TTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAG
 TCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG
 TGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC
 CAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGC
 AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAA
 CGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAAGGATCTTACACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAA
 GTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCA
 GCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATC
 TGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAA
 GGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGT 10
 AGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGC
 TTCATTAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCCG
 GTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAAGTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACT
 GTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGCGACC
 GAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTAAAAGTGTCTCATATTGGAAAAC
 GTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGA
 TCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAG
 GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTC。

【 0 1 4 3 】

ヘキサヒスチジンタグのような任意の C 末端タグを欠失した好ましい G C F 2 短縮蛋白 20
 質をコードするベクターを、p E F 6 - B 4 E C v 3 - V 5 - H i s から、B 4 E C v 3
 の 3' (C 末端) 部分を再増幅して V 5 及び H i s タグを除去し、そして再度 p E F 6 -
 B 4 E C v 3 - V 5 - H i s にサブクローニングすることによって得た。
 使用した P C R プライマー：I n t B 4 - 3 : CATTGGATCAGCCGCTGCC 及び
 B 4 E C v 3 F I N (t g t t t a a a c T T A C T G C T C C C G C C A G C C C T C G C T C T C A T C C A G T T) 。

【 0 1 4 4 】

B 4 E C v 3 の正確な N 末端部分を有する断片を p E F 6 - B 4 E C v 3 - V 5 - H i 30
 s から切り出し、そして K p n I 切断した p E F 6 - I n t 3 - B 4 E C v 3 F I N 中間
 構築物にサブクローニングした。

全 H i n d I I I - P m e I 断片の配列は次の通りである :

AAGCTTCCGCCATGGAGCTCCGGGTGCTGCTCTGCTGGGCTTCGTTGGCCGACGCTTTGGAAGAGACCCCTGCTGAACACA
 AAATTGGAAACTGCTGATCTGAAGTGGGTGACATTCCCTCAGGTGGACGGGCAGTGGGAGGAACTGAGCGGCCCTGGATGA
 GGAACAGCACAGCGTGCGCACCTACGAAGTGTGTGAAGTGCAGCGTGCCCCGGCCAGGCCACTGGCTTCGCACAGGTT
 GGGTCCCACGGCGGGGCGCCGTCCACGTGTACGCCACGCTGCGCTTACCATGCTCGAGTGCCTGTCCCTGCCTCGGGCT
 GGGCGCTCCTGCAAGGAGACCTTACCAGTCTTCTACTATGAGAGCGATGCGGACACGGCCACGGCCCTCACGCCAGCCTG
 GATGGAGAACCCTACATCAAGGTGGACACGGTGGCCGCGGAGCATCTACCCGGAAGCGCCCTGGGGCCGAGGCCACCG
 GGAAGGTGAATGTCAAGACGCTGCGTCTGGGACCGCTCAGCAAGGCTGGCTTCTACCTGGCCTTCCAGGACCAGGGTGCC
 TGCATGGCCCTGCTATCCCTGCACCTCTTCTACAAAAAGTGCGCCAGCTGACTGTGAACCTGACTCGATTCCCGGAGAC
 TGTGCCCTCGGGAGCTGGTTGTGCCCGTGGCCGGTAGCTGCGTGGTGGATGCCGTCCCCGCCCTGGCCCCAGCCCCAGCC
 TCTACTGCCGTGAGGATGGCCAGTGGCCGAACAGCCGTCACGGGCTGCAGCTGTGCTCCGGGGTTGAGGCAGCTGAG 40
 GGGAACACCAAGTGGCAGCCTGTGCCAGGGCACCTTCAAGCCCCTGTGAGGAGAAGGGTCTGCCAGCCATGCCAGC
 CAATAGCCACTCTAACACCATTGGATCAGCCGCTGCCAGTGCCGCGTCGGGTACTTCCGGGCACGCACAGACCCCGGG
 GTGCACCCTGCACCACCCCTCCTTCGGCTCCGCGGAGCGTGGTTTTCCCGCTGAACGGCTCCTCCTGCACCTGGAATGG
 AGTGGCCCCCTGGAGTCTGGTGGCCGAGAGGACCTCACCTACGCCCTCCGCTGCCGGGAGTGGCAGCCCGGAGGCTCCTG
 TGCGCCCTGCGGGGAGACCTGACTTTTTGACCCCGGCCCGGGACCTGGTGGAGCCCTGGGTGGTGGTTGAGGGCTAC
 GTCCGGACTTACCTATACCTTTGAGGTCACTGCATTGAACGGGTATCCTCCTTAGCCACGGGGCCCGTCCCATTTGAG
 CCTGTCAATGTCAACACTGACCGAGAGGTACCTCCTGCAGTGTCTGACATCCGGGTGACGCGGTCTCACCCAGCAGCTT
 GAGCCTGGCCTGGGTGTTCCCCGGGCACCCAGTGGGGCGTGGCTGGACTACGAGGTCAAATACCATGAGAAGGGCGCCG
 AGGGTCCCAGCAGCGTGCAGTTCCTGAAGACGTGAGAAAACGGGCAGAGCTGCGGGGGTGAAGCGGGGAGCCAGCTAC
 CTGGTGCAGGTACGGGCGCGCTCTGAGGCCGGCTACGGGCCCTTCGGCCAGGAACATCACAGCCAGACCCAACTGGATGA 50

GAGCGAGGGCTGGCGGGAGCAGTAAgtttaaac。

【 0 1 4 5 】

好ましい G C F 2 蛋白質（ここでは、G C F 2 F ともいう）の前駆体配列は次の通りである：

MELRVLLCWASLAAALEETLLNNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGWVPR
RGAVHVYATLRFMTLECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGAEATGKVN
VKTLRLGPLSKAGFYLAHQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELWVPVAGSCWDAVPAPGSPSPSLYCRE
DGQWAEQPVGTGSCAPGFEEAAEGNTKCRACAQGTFKPLSGEGSCQPCPANSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCT
TPPSAPRSVVSRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGDGLTFDPGPRDLVEPWVWGLRPDFTY
TFEVTALNGVSSLATGPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAPSGAWLDYEVKYHEKGAEGPSSV
RFLKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHHSTQLDESEGWREQ。

10

【 0 1 4 6 】

プロセッシングを受けた配列は次の通りである：

LEETLLNNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVYATLRFMTL
ECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGAEATGKVNKTLRLGPLSKAGFY
LAFHQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELWVPVAGSCWDAVPAPGSPSPSLYCREDGQWAEQPVGTGSCA
PGFEEAAEGNTKCRACAQGTFKPLSGEGSCQPCPANSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPRSVVSRLNG
SSLHLEWSAPLES GGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGDGLTFDPGPRDLVEPWVWRGLRPDFTYTFEVTALNGVSSLAT
GPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAPSGAWLDYEVKYHEKGAEGPSSVRFLKTSENRAELRGL
KRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHHSTQLDESEGWREQ。

20

【 0 1 4 7 】

(2) ほ乳類細胞培養及びトランスフェクション

HEK 2 9 3 T (ヒト胚腎臓系統) 細胞を、10% 透析ウシ胎仔血清及び1% ペニシリン / ストレプトマイシン / ネオマイシン抗生物質を有する D M E M 中で保持した。細胞を 5% C O₂ / 95% 空気の加湿雰囲気中で 37 °C に保持した。トランスフェクションを、リポフェクタミン 2 0 0 0 試薬 (インビトロジェン社) を使用して、製造業者のプロトコールに従って実行した。トランスフェクションの 1 日前に、2 9 3 T 細胞をトランスフェクション時に 80% の集合に達するように高密度で接種した。1 : 3 の比のプラスミド D N A 及びリポフェクタミン試薬を血清使用量低減培地 (インビトロジェン社) で 5 分間にわたって希釈し、そして互いに混合して D N A : リポフェクタミン複合体を形成させた。それぞれ 10 c m の培養皿に対して、10 μ g のプラスミド D N A を使用した。20 分後に、上記複合体を培養液中の細胞に直接添加した。トランスフェクションの 16 時間後に、培地を吸引し、血清フリーの D M E M で 1 回洗浄し、そして血清フリーの D M E M と交換した。分泌された蛋白質を、条件培地を集めることによって 48 時間後に採取した。条件培地を 100000 g で 20 分間にわたる遠心分離によって浄化し、0.2 μ m フィルターでろ過し、そして精製のために使用した。

30

【 0 1 4 8 】

(3) 安定な細胞株の作製

E p h B 4 E C v 3 及び E p h B 4 E C n t を産生する安定な細胞株を作製するために、HEK 2 9 3 又は HEK 2 9 3 T 細胞に上記のような p E F 6 - B 4 E C v 3 又は p E F 6 - B 4 E C - N T プラスミド構築物をトランスフェクトし、そして抗生物質のプラストサイジンを使用して選択した。トランスフェクションの 24 時間後に、細胞を低密度で接種した。翌日、細胞を 10 μ g / m L のプラストサイジンで処理した。薬剤選択の 2 週間後に、生存細胞をプールし、単細胞クローン増殖に対してさらに選択した。安定な細胞株を確立した後に、これらのものを 4 μ g / m L のプラストサイジンで保持した。培養上清を試験してそれぞれの組換え蛋白質の発現と分泌を確認した。発現の特異性を、抗 B 4 モノクローナル又はポリクローナル抗体によるウェスタンブロットと、B 2 E C - A P 試薬結合アッセイ及び競合アッセイによって確認した。

40

【 0 1 4 9 】

(4) 蛋白質精製

50

H E K 2 9 3 細胞に E p h B 4 外部ドメイン (B 4 E C v 3) の分泌型をコードするプラスミドを一過性導入した。条件培地を集め、そして 1 0 m M のイミダゾール、0 . 3 M の N a C l を加え、2 0 , 0 0 0 g で 3 0 分間遠心分離して細胞片及び不溶性粒子を除去した。得られた上澄み液の 8 0 m L を 1 m L の N i - N T アガロース (Q i a g e n 社) で予備平衡化されたカラム上に 1 0 m L / 時間の流量でアプライした。該カラムを 1 0 m L の 5 0 m M T r i s - H C l , 0 . 3 M N a C l 及び 1 0 m M イミダゾール、p H 8 で洗浄し、残りの蛋白質を 3 m L の 0 . 2 5 M イミダゾールで溶出させた。溶出した蛋白質を 2 0 m M の T r i s - H C l , 0 . 1 5 M の N a C l , p H 8 に対して一晚透析した。B 4 E C v 3 の精製と同定を P A G E / クマシー G - 2 5 0 及び抗 E p h B 4 抗体によるウェスタンブロットによって確認した。最後に、B 4 E C v 3 の濃度を測定し、そして蛋白質を分取し、- 7 0 で保存した。

10

【 0 1 5 0 】

B 4 E C - F C 蛋白質及び B 2 E C - F C 蛋白質を同様に精製した。

【 0 1 5 1 】

E p h B 4 - 血清アルブミン融合蛋白質の作製 :

X b a I - N o t I としてのヒト血清アルブミン断片を、G C F 2 との融合体を作製して G C F 2 半減期を延長させるために P C R を行い、そして p E F 6 に T A クローニングした。次の段階で、得られたベクターを X b a I で切断し (部分消化)、そして H S A 断片 (1 . 8 k b) を p E F 6 - G C F 2 - X b a の X b a I 部位にクローニングして融合体発現ベクターを作製した。得られたベクターは、成熟蛋白質の 4 位で T h r から I l e への置換に至る C から T への点突然変異を有していた。これを p E F 6 - G C F 2 - H S A m u t と呼んだ。次のクローニング段階で、この突然変異を、該変異体を p E F 6 - G C F 2 - I F からの野生型 K p n I 断片 (ベクターの断片及び G C F 2 の N 末端を含有する) で置換することによって除去し、この最終的なベクターを p E F 6 - G C F 2 と呼んだ。N 末端の接合部位は、この新たな K p n 断片が異なる G C F 2 発現ベクターに由来するため、結果として変更された。p E F 6 - G C F 2 の D N A 配列を確認した。

20

【 0 1 5 2 】

H S A - E p h B 4 前駆体蛋白質のアミノ酸は次の通りである :

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDEEQHSVRTYEVCVQVRAPGQAHWLRGTGWVPR
 RGAVHVYATLRFMTMLECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGAEATGKVN
 VKTLRLGPLSKAGFYLAFAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVVPVAGSCWDVAVPAPGSPSPSLYCRE
 DGQWAEQPVGTGCSAPGFEAAEGNTKCRACAQGTGFKPLSGEGSCQPCPANSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCT
 TPPSAPRSVVSRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTIALRCRECRPGGSCAPCGGDLTFDPGPRDLVEPWVWRGLRPDFT
 YTFEVTALNGVSSLATGVPVPEPVNVTDDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAPSGAVLDYEVKYHEKGAEGPSS
 VRFLKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHHSQTQLDESEGWREQSRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
 VLIAFAQYLQQCFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF
 LQHKDDNPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKL
 DELRDEGKASSAKQRLKCASLQKGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK
 YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVNDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYS
 VVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELFQKLGGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPT
 LVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
 NAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLV AASQAALGL

30

40

【 0 1 5 3 】

H S A - E p h B 4 蛋白質の成熟型は次の通りである :

LEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDEEQHSVRTYEVCVQVRAPGQAHWLRGTGWVPRRGAVHVYATLRFMTL
 ECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGAEATGKVNVKTLRLGPLSKAGFY
 LAFAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVVPVAGSCWDVAVPAPGSPSPSLYCRE DGQWAEQPVGTGCS
 APGFEAAEGNTKCRACAQGTGFKPLSGEGSCQPCPANSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPRSVVSRLN
 GSSLHLEWSAPLES GGREDLTIALRCRECRPGGSCAPCGGDLTFDPGPRDLVEPWVWRGLRPDFTYTFEVTALNGVSSLA

50

TGPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDI RVTRSSPSSLSLAWAVPRAPSGAVLDYEVKYHEKGAEGPSSVRFLKTSENRAELRG
 LKRGASYLVQVRARSEAGYGFPGQEHSQTQLDESEGWREQSRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFE
 DHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQKQEPERNECFLQHKDDNPMLPRLVR
 PEVDVMCTAFHDNEETFLLKLYE IARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFECCQAADKAAACLLPKLDELREDEGKASSAKQR
 LKASLQKQGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDS I SSKLKE
 CCEKPLLEKSHC IAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVFGLMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTL
 EKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL I KQNCLEFKQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKC
 CKHPEAKRMPCAEDYLSWLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSE
 KERQ I KKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEAEEGKKLVAASQAALGL.

【 0 1 5 4 】

10

p E F 6 - G C F 2 の D N A 配列は次の通りである :

aatatattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaata
 ggggttccgcgcacattccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatcgggagatctcccgatccccatggtcgact
 ctcagtacaaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatctgctccctgcttggtgtgtggaggctcgctgagtgtg
 cgcgagcaaaatttaagctacaacaaggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggtagggcttttg
 cgctgcttcgcgatgtacgggacagataacgcgttgacattgattattgactaggcttttgcaaaaagctttgcaaaaga
 tggataaagttttaaacagagaggaaatctttgcagctaattggaccttctaggctctgaaaggagtgacctcgtagggctcc
 ggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttggggggaggggtcggcaattgaaccggctgc
 cttagagaaggtagcgcggggtaaacgggaaagtgtgctgctgactggctccgctttttcccgagggtgggggagaac
 cgtatataaagtgcagtagtcgcccgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgcctgtgt
 gggtcccgcgggctggcctctttacgggttatggccttgcgtgacctgaattacttccacctggctgcagtagctgat
 tcttgcagcctcgggttgggaagtgggtgggagagtgcaggccttgcgcttaaggagcccccttgcctcgctgctt
 gagttgaggcctggcctgggctgctgggcccgcgctgcaaatctggtagcacttgcgacctgtctcgctgctttcgat
 aagctcttagcatttaaaatftttagtagacctgctgagccttttttctggcaagatagctctgtaaatgcgggcca
 agatctgcacactggattttcggtttttggggccgcccggcgagcggggcccgctgcgtcccagcgcacatgttcggcga
 ggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaaatcggaacggggtagcttcaagctggccggcctgctctggtagcctggcctc
 gcgcccggctgtatcgccccggcctgggcccgaaggctggcccggctcgccaccagttgcgtgagcggaaagatggccgct
 tcccggcccctgcaggggagctcaaaatggaggacgcggcctcgggagagcgggcccgggtgagtcacccacacaaagga
 aaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacgggtagccgggcccgtccaggcaccctcgattagttc
 tcgagcttttgagtagctcgctctttaggttgggggaggggttttatg cgatggagtttccccacactgagtggtgg
 agactgaagttaggccagcttggcactgatgtaattctccttggaaattggcctttttgagtttggatcttggttcatt
 ctcaagcctcagacagtggttcaaaatttttcttccatttcagggtgctgtaggaaattagcttggtagtaatacagact
 cactatagggagaccaagctggctaggtaagcttggtagcagctcggatccactagtcagtggtggaattgcccct
 tCAAGCTTGCCGCCACCATGGAGCTCCGGGTGCTGCTGCTGCTGGGCTTCGTTGGCCGCAGCTTTGGAAGAGACCTGCTG
 AACACAAAATTGGAACTGCTGATCTGAAGTGGGTGACATTCCCTCAGGTGGACGGGCAGTGGGAGGAACTGAGCGGCCCT
 GGATGAGGAACAGCACAGCGTGCACACTACGAAGTGTGTGACGTGCAGCGTGCCCCGGGCCAGGCCCACTGGCTTCGCA
 CAGTTGGGTTCCACGGCGGGGCGCCGTCCACGTGTACGCCACGCTGCGCTTACCATGCTCGAGTGCTTCCCTGCTT
 CGGGCTGGGCGCTCCTGCAAGGAGACCTTACCCTTCTACTATGAGAGCGATGCGGACACGGCCACGGCCCTCACGCC
 AGCCTGGATGGAGAACCCTACATCAAGGTGGACACGGTGGCCGCGGAGCATCTACCCGGAAGCGCCCTGGGGCCGAGG
 CCACCGGAAGGTGAATGTCAAGACGCTGCGCCTGGGACCGCTCAGCAAGGCTGGCTTCTACCTGGCCTTCCAGGACCAG
 GGTGCCTGCATGGCCCTGCTATCCCTGCACCTCTTCTACAAAAAGTGCGCCAGCTGACTGTGAACCTGACTCGATTCCC
 GGAGACTGTGCCTCGGGAGCTGGTTGTGCCCGTGGCCGGTAGCTGCGTGGTGGATGCCGTCCCCGCCCTGGCCCCAGCC
 CCAGCCTCTACTGCCGTGAGGATGGCCAGTGGGCCGAACAGCCGTCACGGGCTGCAGCTGTGCTCCGGGGTTCGAGGCA
 GCTGAG GGGAAACACCAAGTGCCGAGCCTGTGCCAGGGCACCTTCAAGCCCTGTGAGGAGAAGGGTCTGCCAGCCAT
 GCCAGCCAATAGCCACTCTAACACCATTTGATCAGCCGTCTGCCAGTGCCCGTCCGGTACTTCCGGGCACGCACAGAC
 CCCCAGGGTGCACCCTGCACCACCCTCCTTCGGCTCCGCGGAGCGTGGTTTCCCGCCTGAACGGCTCCTCCCTGCACCT
 GGAATGGAGTGCCCCCTGGAGTCTGGTGGCCGAGAGGACCTCACCTACGCCCTCCGCTGCCGGGAGTGTGACCCGGAG
 GCTCCTGTGCGCCCTGCGGGGAGACCTGACTTTTTGACCCCGCCCCGGGACCTGGTGGAGCCCTGGGTGGTGGTTCGA
 GGGCTACGCTCCTGACTTACCTATACCTTTGAGGTCACTGCATTGAACGGGGTATCCTCCTTAGCCACGGGGCCCCGCTCC
 ATTTGAGCCTGTCAATGTCAACACTGACCGAGAGGTACCTCCTGCAGTGTCTGACATCCGGGTGACGCGGTCTCACCCA

20

30

40

50

GCAGCTTGAGCCTGGCCTGGGCTGTTCCCGGGCACCCAGTGGGGCTGTGCTGGACTACGAGGTCAAATACCATGAGAAG
GGCGCCGAGGGTCCCAGCAGCGTGC GGTTCCCTGAAGACGT CAGAAAACCGGGCAGAGCTGCGGGGGCTGAAGCGGGGAGC
CAGCTACCTGGTGCAAGTACGGGCGCGCTCTGAGGCCGGCTACGGGCCCTTCGGCCAGGAACATCACAGCCAGACCCAAC
TGGATGAGAGCGAGGGCTGGCGGGAGCAG t c t a g a GATGCACACAAGAGTGAGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGA
GAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGTCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGAAGATCATGTAAAATT
AGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTAGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAAATCACTTCATACCC
TTTTTGGAGACAAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAAACAAGAA
CCTGAGAGAAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAAGATGACAACCCAAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGT
GATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTTAAAAAATACTTATATGAAATTTGCCAGAAGACATCCTTACT
TTTATGCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCT
GCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAATGTGCCAG
TCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTGGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTG
CAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGAT
GACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAAATCAGGATTCGATCTCCAGTAAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAAC
CTCTGTTGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGAT
TTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCTGGGCATGTTTTTTGTATGAATATGC
AAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGT
GCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAAT
CAAACA AACTGTGAGCTTTTTAAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTCAGAATGCGCTATTAGTTGTTACACCAAGAAA
GTACCCCAAGTGCAACTCCAACCTTGTAGAGGTCTCAAGAAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCC
TGAAGCAA AAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACG
CCAGTAAAGTGACAGAGTCACAAAATGCTGCACAGAGTCCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTACAGCTCTGGAAGTCGA
TGAACATAC GTTCCCAAAGAGTTAATGCTGAAACATTCACCTTCATGCAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAG
AGACAAAATCAAGAAAACAACTGCACTTGTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGT
TATGGATGATTT CGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAAGGAGACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAA
AACTTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGGCTTATAA t a g c g g c c g c t t a a g g g c a a t t c t g c a g a t a t c c a g c a c a g
t g g c g g c c g c t c g a g t c t a g a g g g c c c g c g g t t c g a a g g t a a g c c t a t c c c t a a c c c t c t c c t c g g t c t c g a t t c t a c g c
g t a c c g g t c a t c a t c a c c a t c a c c a t t g a g t t t a a a c c c g c t g a t c a g c c t c g a c t g t g c c t t c t a g t t g c c a g c c a t c t
g t g t t t g c c c c t c c c c g t g c c t t c c t t g a c c c t g g a a g g t g c c a c t c c c a c t g t c c t t t c c t a a t a a a a t g a g g a a t
t g c a t c g c a t t g t c t g a g t a g g t g t c a t t c t a t t c t g g g g g t g g g g t g g g g c a g g a c a g c a a g g g g g a g g a t t g g g a a g
a c a a t a g c a g g c a t g c t g g g g a t g c g g t g g g c t c a t g g c t t c t g a g g c g g a a g a a c c a g c t g g g g c t c t a g g g g t a t
c c c c a c g c g c c c t g t a g c g g c g c a t t a a g c g c g g c g g g t g t g g t g t a c g c g c a g c g t g a c c g c t a c a c t t g c c a g c g c
c c t a g c g c c c g c t c c t t t c g c t t t c t t c c c t t c c t t t c t c g c c a c g t t c g c c g c t t t c c c c g t c a a g c t c t a a a t c g g g
g c a t c c c t t t a g g g t t c c g a t t t a g t g c t t t a c g g c a c c t c g a c c c c a a a a a a c t t g a t t a g g g t g a t g g t t c a c g t a g t
g g g c a t c g c c c t g a t a g a c g g t t t t t c g c c c t t t g a c g t t g g a g t c c a c g t t c t t t a a t a g t g g a c t c t t g t t c c a a a c
t g g a c a a c a c t c a a c c c t a t c t c g g t c t a t t c t t t g a t t t a t a a g g g a t t t t g g g g a t t t c g g c c a t t g g t t a a a a a
a t g a g c t g a t t t a a c a a a a a t t t a a c g c g a a t t a a t t c t g t g g a a t g t g t g t c a g t t a g g g t g t g g a a a g t c c c c a g g c t
c c c c a g g c a g g c a g a a g t a t g c a a a g c a t g c a t c t c a a t t a g t c a g c a a c c a g g t g t g g a a a g t c c c c a g g c t c c c c a g c
a g g c a g a a g t a t g c a a a g c a t g c a t c t c a a t t a g t c a g c a a c c a t a g t c c c g c c c t a a c t c c g c c c a t c c c g c c c t a a
c t c c g c c c a g t t c c g c c c a t t c t c c g c c c a t g g c t g a c t a a t t t t t t a t t a t t a t g c a g a g g c c g a g g c c g c c t c t g c c
t c t g a g c t a t t c c a g a a g t a g t g a g g a g g c t t t t t g g a g g c c t a g g c t t t g c a a a a a g c t c c c g g g a g c t g t a t a t c
c a t t t t c g g a t c t g a t c a g c a c g t g t t g a c a a t t a a t c a t c g g c a t a g t a t a t c g g c a t a g t a t a a t a c g a c a a g g t g a g
g a a c t a a a c c a t g g c c a a g c c t t t g t c t c a a g a a g a a t c c a c c c t c a t t g a a a g a g c a a c g g c t a c a a t c a a c a g c a t c c
c c a t c t c t g a a g a c t a c a g c g t c g c c a g c g c a g c t c t c t c t a g c g a c g g c c g c a t c t t c a c t g g t g t c a a t g t a t a t c a t
t t t a c t g g g g g a c c t t g t g c a g a a c t c g t g g t g c t g g g c a c t g c t g c t g c t g c g g c a g c t g g c a a c c t g a c t t g t a t c g t
c g c g a t c g g a a a t g a g a a c a g g g g c a t c t t g a g c c c c t g c g g a c g g t g t c g a c a g g t g c t t c t c g a t c t g c a t c c t g g g a
t c a a a g c g a t a g t g a a g g a c a g t g a t g g a c a g c c g a c g g c a g t t g g g a t t c g t g a a t t g c t g c c c t c t g g t t a t g t g t g g
g a g g g c t a a g c a c t t c g t g g c g a g g a g c a g g a c t g a c a c g t g c t a c g a g a t t t c g a t t c c a c c g c c g c c t t c t a t g a a a
g g t t g g g c t t c g g a a t c g t t t t c c g g g a c g c c g g c t g g a t g a t c c t c c a g c g c g g g g a t c t c a t g c t g g a g t t c t t c g c c
c a c c c a a c t t g t t t a t t g c a g c t t a a a t g g t t a c a a a t a a a g c a a t a g c a t c a c a a a t t t c a c a a a t a a a g c a t t t t t

10

20

30

40

50

ttcactgcatttctagttgtgggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctgtataccgtcgacctctagctaga
gcttggcgtaatcatggtcatagctgtttccctgtgtgaaatgttatccgctcacaattccacacaacatcgagccgga
agcataaaagtgtaaagcctgggggtcccaatgagtgagctaacctacatcaatgtcgcttgcgctcactgcccgtttcca
gtcgggaaacctgtcgtgccagctgcatcaatgaaatcgcccaacgcgcggggagagggcgggtttgcgctatgggctcctt
ccgcttccctcgtcactgactcgtcgcctcggctcgttccgctgcccgcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaata
cggttatccacagaatcaggggataaacgcaggaaaga acatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaacctgaaaa
aggccgcttgcgtggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagttagaggtgg
cgaaaccggacaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgtcgcctctcctgttccgacctgccc
gcttaccggatacctgtccgctttctcccttcgggaagcgtggcgttttctcaatgctcagcgtgtagggtatctcagtt
cgggtgtaggtcgttgcctccaagctgggctgtgtgcaacgaaccccccttcagcccagaccgctgccccttatccggtaac
tatcgtcttgagtcacaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcggag
gtagtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtagcctaacctacggctacactagaaggacagttatgggtatctgcg
ctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagcgggtgg
ttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcgaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctga
cgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaa
attaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtataatagagtaaacctgggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgag
gcacctatctcagcgtatctgtctatctcgttcatccatagttgctgactccccgtcgtgtagataactacgatccggga
gggcttaccatctggcccagtgctgcaatgataaccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaacc
agccagccggaagggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgctccatccagctctatcaatgttggcgggaa
gctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccatgtctacaggcatcgtgggtgacgctcgtc
gtttggtagcctcattcagctccggttcccaacgatcaaggcaggttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcgg
ttagctccttcggctcctccgatcgttgtcagaagtaagtggccgcaggttatcactcatgggtatggcagcactgcat
aatctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgagctcaaccaagtcattctgagaatagtg
tatgcccgcagcaggtgctcttgcggcgtcaatacgggataataaccgcgccatagcagaactttaaaagtgtcaca
tcatggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgt
gcaccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaaatgccgcaaa
aaagggaaataagggcgacacggaaaatgttgaatactcatactcttccctttttc。

【 0 1 5 5 】

A . 細胞培養及びトランスフェクション :

ヒト胚腎臓細胞株 (2 9 3 T 細胞) を、 1 0 % 透析ウシ胎仔血清及び 1 % ペニシリン /
ストレプトマイシン / ネオマイシン 抗生物質を有する D M E M 中で保持した。細胞を 5 %
C O ₂ / 9 5 % 空気の加湿雰囲気中で 3 7 °C に保持した。

【 0 1 5 6 】

E p h B 4 外部ドメイン、それらの断片及び E p h B 4 - H S A 融合体をコードするプ
ラスミドのトランスフェクションを、リポフェクタミン 2 0 0 0 試薬 (インビトロジェン
社) を使用して示唆されたプロトコールに従って実行した。トランスフェクションの 1 日前
に、 2 9 3 T 細胞をトランスフェクション時に 8 0 % の集合に達するように高密度で接種
した。 1 : 3 の比のプラスミド D N A 及びリポフェクタミン試薬を血清使用量低減培地 (イン
ビトロジェン社) で 5 分間にわたって希釈し、そして互いに混合して D N A - リポフェ
クタミン複合体を形成させた。それぞれ 1 0 c m の培養皿に対して、 1 0 μ g のプラス
ミド D N A を使用した。 2 0 分後に、上記複合体を培養液中の細胞に直接添加した。ト
ランスフェクションの 1 6 時間後に、培地を吸引し、血清フリーの D M E M で 1 回洗浄し、
そして血清フリーの D M E M と交換した。分泌された蛋白質を、条件培地を集めること
によって 4 8 時間後に採取した。条件培地を 1 0 0 0 0 0 g で 2 0 分間にわたる遠心分離
によって浄化し、 0 . 2 μ m フィルターで濾過し、そして精製のために使用した。

【 0 1 5 7 】

B . E p h B 4 外部ドメインと E p h B 4 外部ドメイン - H S A 融合蛋白質とのクロマト
グラフィーによる分離

H S A に融合した E p h B 4 外部ドメインを次の通りに精製した : 7 0 0 m L の培地を
血清フリーの培地中で成長した一過性導入 2 9 3 細胞から採取し、そして 1 2 0 m L の最

10

20

30

40

50

終容量にまで濃縮した。膜：（オメガ社、76mm）、50kDa C/O。濃縮後に、該試料のpHを、6mLのIM NaAc, pH5.5を添加することによって調整した。次いで、試料を出発緩衝液（SB）：20mMのNaAc, 20mMのNaCl, pH5.5に対してO/Nにわたり透析した。5mLのSP-セファロースをSBで平衡化し、そして試料を充填した。洗浄：100mLのSB。NaClによる溶出：12mL/画分及び20mMの増分。エフリンB2結合活性のほとんどが100mM及び120mM画分で溶出した。

【0158】

エフリンB2結合アッセイ法で活性な画分（SPクロマトグラフィーの画分番号100-120mMを参照）をQカラムでの精製の第2段階で使用した。採取した画分を出発緩衝液第2（SB2）：20mMのTris-HCl, 20mMのNaCl, pH8に対してO/Nにわたり透析し、そして2mLのQ-セファロース上に充填した。20mLのSB2で洗浄後に、吸着した蛋白質をNaCl：3mL/画分によって25mMの濃度増分で溶出させた。得られた画分をPAGE及びエフリン-B2結合アッセイ法で分析した。200mM及び225mMの画分が大部分の蛋白質及び大部分のB2結合活性を含んでいたことが分かった。

10

【0159】

可溶性EphB4外部ドメイン蛋白質を次の通りに精製した：300mLの条件培地（細胞培養及びトランスフェクション参照）を、30kDaC/Oの限外ろ過膜を使用して、100mLの最終容量にまで濃縮した。濃縮後に、該試料のpHを、5mLの1M酢酸ナトリウム, pH5.5を添加することによって調整した。次いで、試料を、出発緩衝液（StB）：20mMの酢酸ナトリウム, 20mMのNaCl, pH5.5に対してO/Nにわたり透析した。5mLのSP-セファロースをStBで平衡化し、試料を充填した。このカラムを20mLのStBで洗浄した後、吸着した蛋白質をNaClの直線勾配で溶出させた（20~250mM及び20カラムの容量の全溶出容量）。蛋白質の純度をPAGEで分析した。

20

【0160】

参照による援用

本明細書において言及した全ての文献及び特許文献は、あたかもそれぞれ個々の文献又は特許文献が具体的かつ個別的に参照によって援用されていることが示されるように、それらの全体における参照によって援用するものとする。

30

【0161】

主題の発明の特定の具体例を議論してきたが、上記の明細書は例示であって限定ではない。当業者であれば、本明細書及び特許請求の範囲の再検討に基づき、本発明の多くの変形例が明らかになるであろう。本発明の全範囲は、特許請求の範囲をそれらの均等の全範囲とともに、及び本明細書をこのような変形例と共に参照することによって決定すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0162】

【図1】B4ECv3蛋白質のアミノ酸配列を示す（非開裂EphB4リーダーペプチドを含む前駆体の予想される配列を示す）図である。

40

【図2】B4ECv3NT蛋白質のアミノ酸配列を示す（非開裂EphB4リーダーペプチドを含む前駆体の予想される配列を示す）図である。

【図3】B2EC蛋白質のアミノ酸配列を示す（非開裂エフリンB2リーダーペプチドを含む前駆体の予想される配列を示す）図である。

【図4】B4ECv3-FC蛋白質のアミノ酸配列を示す（非開裂EphB4リーダーペプチドを含む前駆体の予想される配列を示す）図である。

【図5】B2EC-FC蛋白質のアミノ酸配列を示す（非開裂エフリンB2リーダーペプチドを含む前駆体の予想される配列を示す）図である。

【図6】可溶性EphB4EC組換え蛋白質のドメイン構造を示す図である。

50

【図7A】HNSCC一次組織及び転移組織におけるEphB4発現と遺伝子増幅を示す図である。

【図7B】HNSCC一次組織及び転移組織におけるEphB4発現と遺伝子増幅を示す図である。

【図7C】HNSCC一次組織及び転移組織におけるEphB4発現と遺伝子増幅を示す図である。

【図7D】HNSCC一次組織及び転移組織におけるEphB4発現と遺伝子増幅を示す図である。

【図8】HNSCC細胞株におけるEphB4発現及び遺伝子増幅を示す図である。

【図9】前立腺細胞株におけるEphB4の発現を示す図である。

【図10】前立腺癌組織でのEphB4の発現を示す図である。

【図11】RT-PCR(A)及びウェスタンブロット(B)によって示されるようにEphB4及びエフリンB2が中皮腫細胞内で発現していることを示す図である。

【図12】エフリンB2及びEphB4の発現を中皮腫細胞内でのin situ ハイブリダイゼーションによって示す図である。

【図13】中皮腫培養液中でのEphB4及びエフリンB2の細胞発現を示す図である。

【図14】中皮腫におけるエフリンB2及びEphB4の発現を示す図である。

【図15A】エフリンB2(EphB4ではない)がKS生検組織内で発現することを示す図である。

【図15B】エフリンB2(EphB4ではない)がKS生検組織内で発現することを示す図である。

【図15C】エフリンB2(EphB4ではない)がKS生検組織内で発現することを示す図である。

【図16】HHV-8がカポジ肉腫細胞内で動脈マーカーの発現を誘導することを示す図である。

【図17】膀胱癌細胞株内でのEphB4の発現(A)及びEGFRシグナル伝達経路によるEphB4発現の調節(B)を示す図である。

【図18A】ヒトEphB4のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図18B】ヒトEphB4のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図18C】ヒトEphB4のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図18D】ヒトEphB4のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図18E】ヒトEphB4のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図18F】ヒトEphB4のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図18G】ヒトEphB4のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図18H】ヒトEphB4のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図18I】ヒトEphB4のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図18J】ヒトEphB4のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図19】ヒトEphB4のcDNAヌクレオチド配列を示す図である。

【図20A】ヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図20B】ヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図20C】ヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図20D】ヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図20E】ヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図20F】ヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図20G】ヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図20H】ヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図20I】ヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図20J】ヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図20K】ヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

【図20L】ヒトエフリンB2のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。

10

20

30

40

50

- 【図 20M】 ヒトエフリン B 2 のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。
 【図 20N】 ヒトエフリン B 2 のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。
 【図 20O】 ヒトエフリン B 2 のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。
 【図 20P】 ヒトエフリン B 2 のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。
 【図 20Q】 ヒトエフリン B 2 のゲノムヌクレオチド配列を示す図である。
 【図 21】 ヒトエフリン B 2 の cDNA ヌクレオチド配列を示す図である。
 【図 22】 ヒト Eph B 4 のアミノ酸配列を示す図である。
 【図 23】 ヒトエフリン B 2 のアミノ酸配列を示す図である。
 【図 24】 Eph B 4 抗体の例及びこれらの抗体のエピトープマッピングを示す図である。

【図 1】

B4ECv3 蛋白質のアミノ酸配列

```
MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWHEELSG
LDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVVYATLRFMT
LECLSLPRAGRSCKETFTVFFYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTV
AAEHLTRKRPGAEATGKVNKTLRLGPLSKAGFYLAQDQGACMALL
SLHLFYKKCAQLTVNLTFRFPETVPRELVVPVAGSCVVDVAVPAGPSP
SLYCREDGQWAEQPVVTCSCAPGFEEAEGNTKCRACAQGTFFKPLSGE
GSCQPCPANSNHSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPRS
VVSRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGGD
LTFDGPGRDLVEPWWVVRGLRDPDFTYTFEVTALNGVSSLATGPPVFE
PVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLAWAVPRAPSGAWLDYEVK
YHEKGAEGPSSVRFLKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGP
FGQEHHSQTQLDESEGWREQGSKRAILQIEGKPIPNLLGLDSTRTG
HHHHHH
```

【図 2】

B4ECv3 NT 蛋白質のアミノ酸配列

```
MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWHEELSG
LDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVVYATLRFMTLE
CLSLPRAGRSCKETFTVFFYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAE
HLTRKRPGAEATGKVNKTLRLGPLSKAGFYLAQDQGACMALLSLHL
FYKKCAQLTVNLTFRFPETVPRELVVPVAGSCVVDVAVPAGPSPSLYCR
EDGQWAEQPVVTCSCAPGFEEAEGNTKCRACAQGTFFKPLSGEGSCQPC
PANSNHSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPRSVVSRLNG
SSLHLEWSAPLES GGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGGDLTDFDGPGR
DLVEPWWVVRGLRDPDFTYTFEVTALNGVSSLATGPPVFPVNVTTDRE
VPPAVSDIRVTRSSPSSLAWAVPRAPSGAWLDYEVK YHEKGAEGPSS
SVRFLKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHHSQTQL
DESEGWREQGSKRAILQISSTVAAARV
```

【図 3】

B2EC 蛋白質のアミノ酸配列

```
MAVRRDSVWKYCWGLMVLCRTAISKSIIVLEPIYWNSSNSKFLPGQGL
VLYPQIGDKLDIICPKVDSKTVGQYEFYKVMVDKQADRCTIKKENT
PLLNCAKPDQDIKFTIKFQEFSPNLWGLEFQKNDYIISTNGSLEG
LDNQEGGVCQTRAMKILMKVQDASSAGSTRNKDPTRRPELEAGTNGR
SSTTSPFVKPNPSSDTGNSAGHSGNLLGSEVGVSHHHHH
```

【図 4】

B4ECv3-Fc 蛋白質のアミノ酸配列

```
MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWHEEL
SGLDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVVYATL
RFTMLECLSLPRAGRSCKETFTVFFYESDADTATALTPAWMENPY
IKVDTVAEHLTRKRPGAEATGKVNKTLRLGPLSKAGFYLAQD
QGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTFRFPETVPRELVVPVAGSCV
DAVPAGPSPSLYCREDGQWAEQPVVTCSCAPGFEEAEGNTKCR
ACAQGTFFKPLSGEGSCQPCPANSNHSNTIGSAVCQCRVGYFRARTD
PRGAPCTTPPSAPRSVVSRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTYALR
CRECRPGGSCAPCGGDLTDFDGPGRDLVEPWWVVRGLRDPDFTYTFE
VTALNGVSSLATGPPVFPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSL
SLAWAVPRAPSGAWLDYEVK YHEKGAEGPSSVRFLKTSENRAELR
GLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHHSQTQLDESEGWREQDPE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSDGSPFLYKSLTVDKSRWQQGNVFSQVMSHEALHNNHYTQKSL
SLSPGK
```

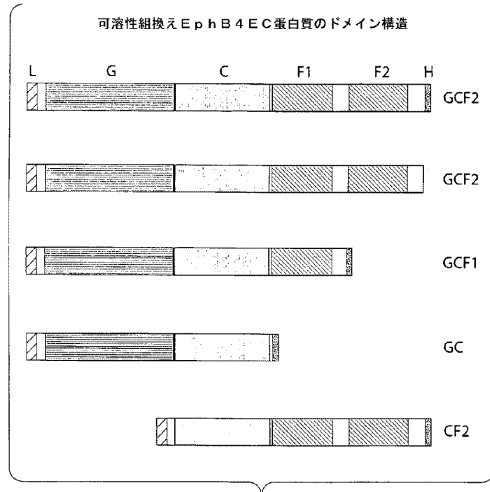
【 図 5 】

B2EC-Fc蛋白質のアミノ酸配列

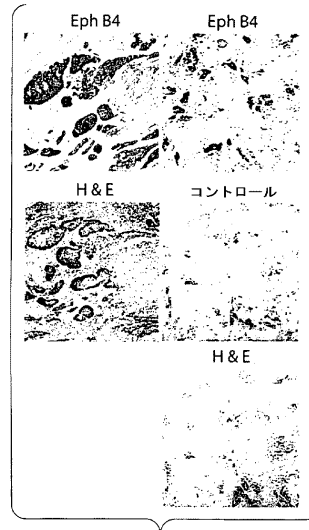
```

MAVRRDSVWKYCWGVLMLVLCRTAISKSIVLEPIYWNSNSKFLPGQ
GLVLYPQIGDKLDIICPKVDSKTVGQYFYKVMVDKQADRCTIK
KENTPLLNCAPDQDIKFTIKFQEFSPNLWGLEFQKNKDYIIST
NGSLEGLDNQEGGVCQTRAMKILMKVGQDASSAGSTRNKDPTRRPE
LEAGTNGRSSTSPFVKPNPGSSTDGNSAGHSGNNILGSEVDPEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTKSKAGQPREFQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
    
```

【 図 6 】



【 図 7 A 】



【 図 7 B 】

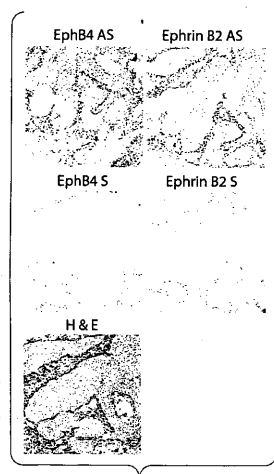
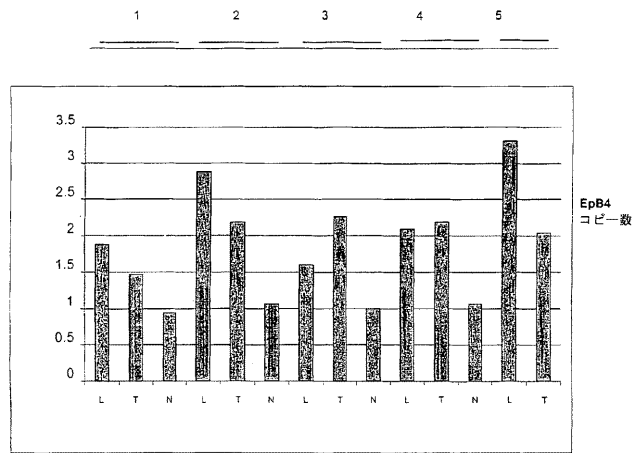
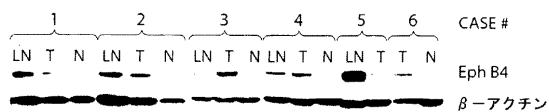


Fig. 7B

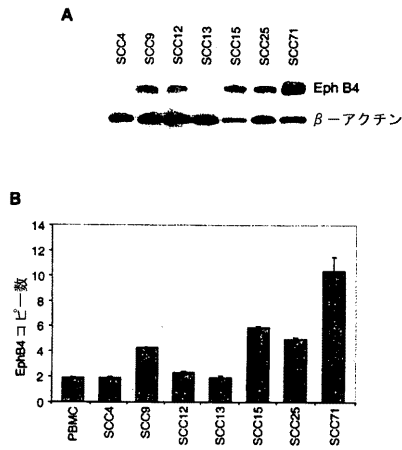
【 図 7 D 】



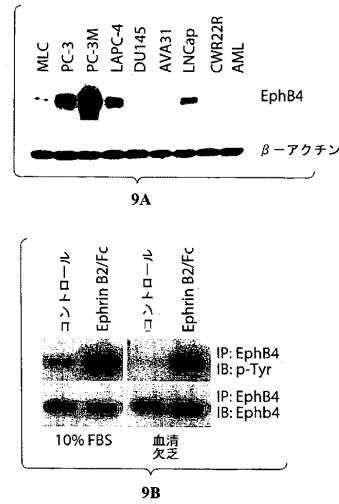
【 図 7 C 】



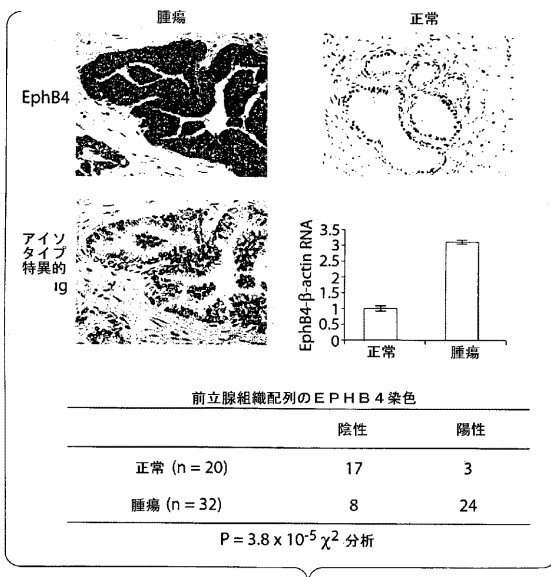
【 図 8 】



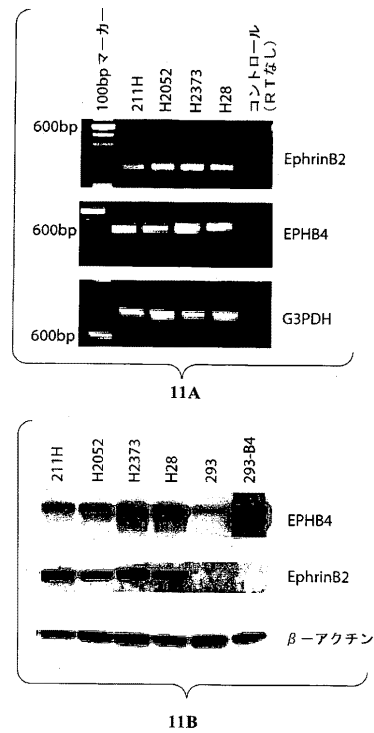
【 図 9 】



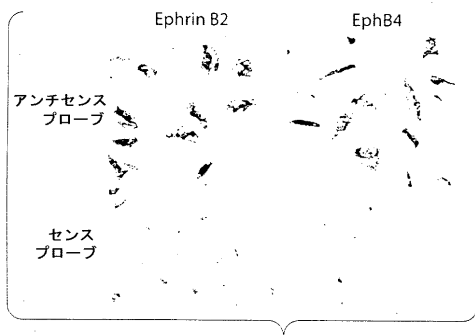
【 図 10 】



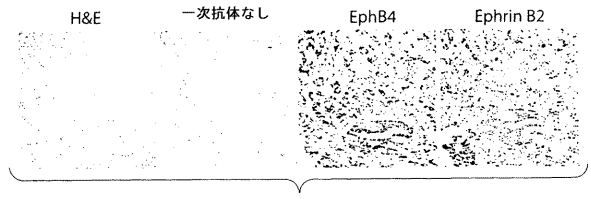
【 図 11 】



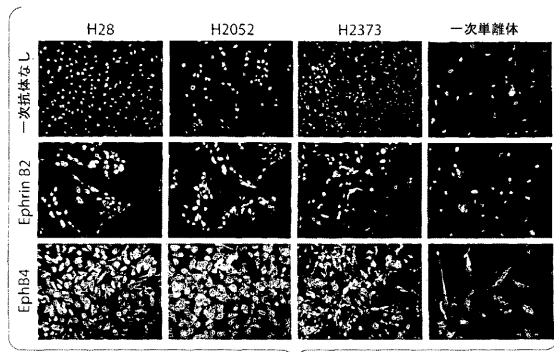
【 図 1 2 】



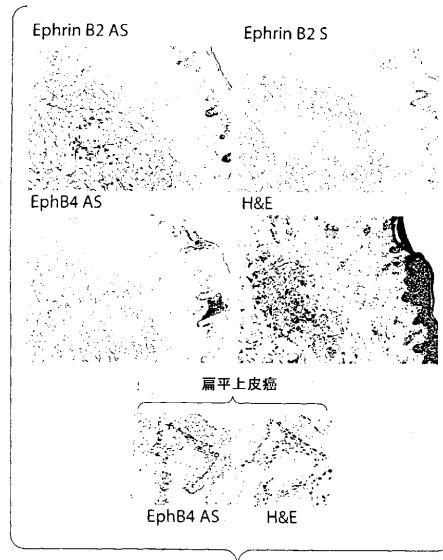
【 図 1 4 】



【 図 1 3 】



【 図 1 5 A 】



【 図 1 5 B 】

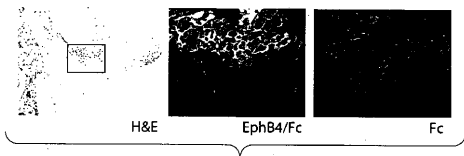
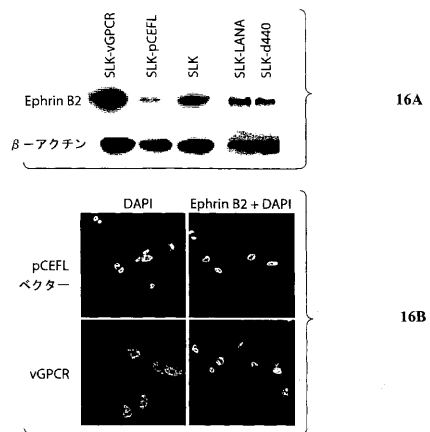


Fig. 15B

【 図 1 6 】



【 図 1 5 C 】

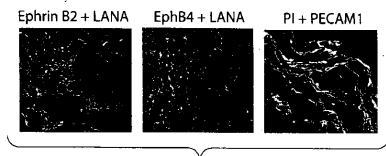
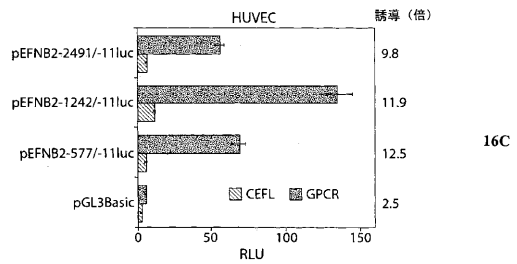
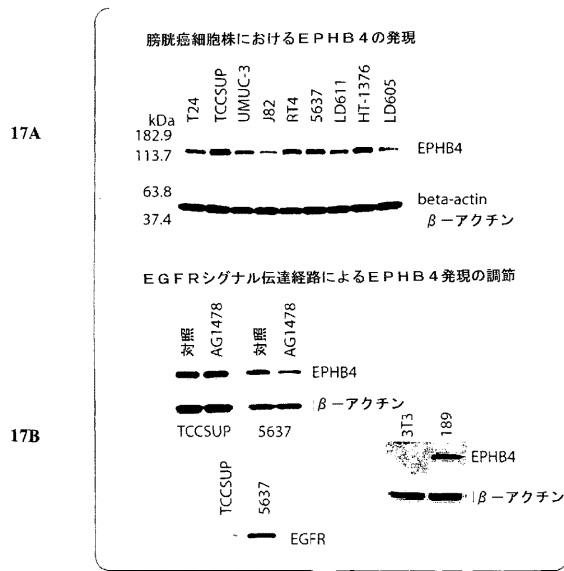


Fig. 15C



【 図 1 7 】



【 図 1 8 A 】

EphB4 遺伝子

```

1 ggggtttcat catgttgcc aggcgtgct tgaactcctg acctcaaat atccgcctgc
61 ctctgcctcc caaaatgct ggactacagg cgtgagccac cgcgcccgcc acacccacct
121 tttcttacc gttgtttcct cgatttttct ctactcceta ggcagctta gtgcgcct
181 ctcttgaca ttttcaggg cttgtgtgag cgcacagtag gtccccaaca ctgaatggtt
241 atggggtgac tgtgtgaa cttcgtgcaa ggtctacaaa actgggatgt ctctctgag
301 cccccgggc ggccgtcaat tctccaagg tctactccc ttttccctcc ttttccccca
361 aaacgcagtc cctgcgcca ctgaggggtg gtggcgcat ccaagagcgg catctagagt
421 ccgacaaag gtcagagcgg gcttctggtt cgggtgaac atttaoctgc acgctctggc
481 ggccctcctg tttctgctg ggtgtgtgt ttctctctgc cctgtgtgca gccgggttgc
541 ggccctgccc ggggttccc gggccccacc cccgactgce cctgtctctg acagcgcgca
601 ccgcccaggc gcaactctgg ggcgtcccgg ggttctctac ccgcccgcc tcccctctct
661 ccaacttttc tctcaacttc cagacctgct ccaactcgtg cctctctcgc ctctctctat
721 gaattattoa gtacgctgag ctccaactag cgcgcccggt gctcaactgc gggccccgg
781 cgttgggaga gctgccccgc ccccccgccc cccctctccc cccgccccgc cccgccccgc
841 gccactctcc agcgcagctc agccccctgc cggccccgcc cgcgccgctc cgcgccgctc
901 tctctctccc tcccctctgc tccccctgct ggctcccacc atccccgcc gggagggag
961 cactcgcccc ggcggcgaga cagagccacc tccagggagg gggggagacc ggcagcgccc
1021 ggctctagcc cgcaccaacc gggcgggacc cggagggccc ggagggacc caactccacc
1081 cactgtttgc tgcgcgccc cccggcgccc ccaactgccc cagctctcgc gcccctcacc
1141 cgcgcgccc gcaacagcgc gggcgccacc ttggcgccc cgcgcggctc cccgcaactc
1201 cgcctggccc cgcctgagg gcccccagca gggactccgc gggagtgatc cctctccacc
1261 cgcgccagga gactcagacc tggggggggc agggcccccc aaactcagtt cggatcctac
1321 ccgagtgagg cgcgcgcatg gactcggggc tgcctctctg ctgggtcttg ttggccgagc
1381 ctttgaagg tgaatttctc tgcggggggc ggcgcacccc gctactctct cctctccccc
1441 ccaactctct gggcctcggg gtgggggggc cggcctctga ctacccctac cgggcaactg
1501 cagtcceaaa cactctggac cgatagctgt ggaacgggag gggggcgggc ccttctcggc
1561 cgaaggtagg tggagtttct tttgtttggc gaaagagatg gactctggtt acgaccgggg
1621 acattcccct gccgggctc cccgaactct cactgctgat tacaatagcc cctggctctc
1681 tttctcttcc tccctacccc actattcaaa actatctgca aagtttctgt cccagctccc
1741 cctcccgcgc tacatagagg aagttttctg gagaagcaac agcagacaa gcaactcttt
1801 tctgtctagg ccttaaaag acccccagcg ccaattcctt agcagtcaca ccttgatccc
1861 ccagtctcac actcctgcaa caggatggcc tctcttgcat tcaacagca aacccccaaa
1921 cctgctctcc gccactgct cctgccccgt gtabaggggt gctcctgtgt ccttctaggc
1981 tgacccccct cctttaaat ggggtctaga cccccccc aggtgagtc cgggtctccc
2041 ttgagacctt ggagcgggta gaaactgacc tacacagccc ccaggtgaaa actgactctac
2101 acagccccca catgcacct actaacccc tctatctccc acctcctggt cctcccaagc
2161 atttcttggc cactgagctg ctgtcccctc tggctcccct aagggggagc caagcctctt
2221 agaaactctc ctgtgtccc aatgtcttct cagtgtgctt ccaacacccc ccttctcctc
2281 tctgtgatga aagttgttat gggcggttag gctatgagg actcccaag ggaaggtatc
2341 agcgggctta gaaaaacct cctcccctgg cttggcagga ctgcccctgg cttgggatca
2401 aagctaggtg tgggggttgg gactgagggg aggtctggcc agctcagaga accgggaagg
2461 agagcaaaaa accatgaacg aggggaagag gaaggccaaa ggggtgaaa aaccacagct
2521 acaggtgtgt gtgagaagga aagcgcgcaa gaggaaaagt tgatgtgac accatctacc
2581 tgagtgtttc caagcaccag gctgtgtgct agcgccttcc aaatattaat ttcaccatc

```

18A

【 図 1 8 B 】

```

2641 cagcaacgct aagggtgggt ctattatgac ccccatttt ccagtaggga ggcctgggct
2701 tagttaaggt taagtatggt atccaagccc ctgtgcgcgg aggaacagcg agaagtggag
2761 gcccaaggtg aaggagagat agtgaactgc agaaagagaa accgaggtgg acagagagtc
2821 gggagagat aggtgagaga catggaact gacagatcaa agcgtggctg cagctgagct
2881 gggagagat aggtgagaga catggaact gacagatcaa agcgtggctg cagctgagct
2941 ggtgtaaat ggagacaga aaacactctc ccggctgaaa caatggaggc tggagacagc
3001 agctctctc caacccttc ccagaaaccg ggcactctgt cccagctctc ccaatctgac
3061 tcttgccac catggggacc tgcgctctc caactcaggg tggctggctt ccaatctgac
3121 cctagctgtg agacactcct ttgcttccc ggaagagctt gctctacccc cctctctctc
3181 ctctctctc gactctccc ggggtgggga gccagctggt ctgctctccc tctccacctc
3241 tcccagccc caatgccc ccactctgccc gcccccagg gnatctctg acctctctc
3301 ctccactctc cactgcccag gctgtgcaag ttttctcaa tcccccccct tctctcagtg
3361 cctgtcccct ccccagctga cctctccgac ctccagctgt tcacccctc ccaactcacc
3421 gccccccag aatctctcc cctctgccc ccaaaacca aatcccagat tggagctctg
3481 gggggagctt gggaaacctc gactccgac ctccagctgt cctgtctgac ggaactctg
3541 gggggagggt tactggggtt gggccagagg ctatgcccga gccacggagc gctctcttca
3601 agggaggag gacgggggtt ttgtctgaaa acatgtggaa cactgtggag aggaatgaa
3661 atgtgggtt agagagcgtt atctctggac ttaggggagg aaactgtgag gctgagacaa
3721 gaggttcccc tcccacaca cagcctctct ctctgggggg taaggacagc gggcagctc
3781 tcaatttacc ccttctgag ctgcgcccc tctcccctg acatttgat ctccctctct
3841 cctccaggga ggcctagatc tggggtatcc caaggggacc ccaatgctac ccaatgttgg
3901 ggggtggggt ggcacttacc agaaaggccc agaaatcagg cgggtcagga gggcagggct
3961 tgcctcccct ctggcccacc caactctctc gctcagagct aagagatcc acctgctctg
4021 gctcccaggg atctgtctt ctgactccc ctccccccc ccaggcaact actctgtctc
4081 tctgtctctc tccagagccc tctgtaaac aaaaatggaa actgtctgac tgaagtgggt
4141 gacattctct caggtggagc ggcaggtgac agctgacccc agagatggga gctctggagg
4201 gaaactgagg gaggagggc gcctgtgccc cagctgtctt tctgtgccc tctctctccc
4261 tctccccca gatcagaca gcccccagag tctgtctgca gccctctctc gaggcgcctc
4321 cctcagata ccagagccc ccccttctca gctctctca ctttatgga tcaaccctac
4381 gcaagcctct cctgtggccc tcccacccc cctctgtgac ctctctctct gcaagatgg
4441 aggaactgag cggctgatc gaggaaaccg acagctgccc caactacgaa gtgtgtgag
4501 tgcagctgac cccggcccag gcccactgac ctgcacagc ttggctccca cggcggggc
4561 cctctcagc gtaagcccag ctgcccctca ccaactctga gtcctgtccc ctgcctggg
4621 ctgggcccct ctgcaaggag acctcaacc ccttctacta tgagagcagc gggacacgg
4681 caagcccct caagcagcc tggatggaga accctcaact caagttact ggggtcccc
4741 agggctcagc cacagccaa gttggatccc agccagcag cccgtgccc gggagcagc
4801 cgtatggtt ggcagcccct ctggcccgcg cctcagagc ggcagggca ggttaggtc
4861 tggggaggga agggggtgat cttgtgggc gaggagcaga atatacccgg gctgctggc
4921 cggcccaca gggagccca aggttaggct ttctctctca gtaactcaaa caaccctacc
4981 ccaactgctc ccagcccacc tgaattctct ccactcccgt actgacccc cctctctctc
5041 agctcagac ttgcccggc tgaattctct acctgggggc ctctctctc ctcaaccacc
5101 tactgtctt cggatctca gttcccaga tctgtctgt gccacctgg ctgactctct
5161 actcctaac atctgctca cctgtctca cctgcccctc tggcactca tttacttba
5221 tttatttttc ttttatctc atatttttaa agggggctc tctactgac ccagggtgct

```

Fig. 18B

【 図 1 8 C 】

```

5281 ctctaactcc tgggctcagg agattctccc caacctggcc tectaaaggt ctgggattat
5341 agactgagc caactagccc ggcctctagg taacttataa ctccccaggt attactctac
5401 cgtgtctctc tgaactctga ggtcaagccc tggactggga gctgtctgag taagtgtttg
5461 tagaacaggt gaataaaaag gggagaggtt cagggccaga tccgggcat attcggagg
5521 ctttgcaagg ctgaatggac agtctggggc cctgcagaaa gtcgctcccgt ggaaggttg
5581 aggaagatct ctgacagagg agtaaggagg gttccggagg gtagctctgg aagaacacaa
5641 cactgctctg gttctctagg agtaaggagg gttccggagg gtagctctgg aagaacacaa
5701 gttgacaggt tggcccggga gactctacc cggagcggc ctgcccagca gggcccaggg
5761 aggtgagatc tcaagagctt ggtcttggga cctgtctgga cctgtctgga cctctctgct
5821 tccagagacc aggtgctctg cctgcccctg ctatcccctg cctgctctca caaaagggc
5881 gccagctga ctgtgaacct gactgctctc cctgagactg tgcctctctg tctgtctg
5941 cctgtggccc gtagctgctt gttgagctc gttcccggca cttggcccag cccagctctc
6001 tactgcccgt aggatggcca gtagccgaaa cagcccggca gtagctctg ctgtctctg
6061 ggttctgagg cagctgaggc gaacacaaag tggcaggtt agagctggag ctctcccctg
6121 gactgtctct cctccggggc agactctgca actcactgca ggaacctatt ctaagtctc
6181 cactttgtat agttagatg tgaatggag gctgtctctg tcccagccg tgaagtctag
6241 tggcaacact tctgtctaac tgaacctttt gctcccggc tccctgtca acttaatttc
6301 ctgctcagc ctgtgtgata gctgggacta caggcagacc ccaaccagcc cggctatgtt
6361 ttgtatttca gtagagagg ggtttggcca tgttggagca gctgtctctg caactctgac
6421 ctgaagtgat ttgcccctc cggctcccga aagctgtctg atcaacaggt tgccttca
6481 caccagctgt gaaaaaaa agactttatt tccactgaaa atctaatat ttccactgac
6541 aatcccaact gactgttagc caggactgca cactgtggcc cagctgaaat caaggtatt
6601 gctgacaca gttgtctat cccatagctc cagactctg agtagccag gttggggat
6661 cacttgagcc caggagttcg agatagctt ggtgtagaca gcaaccgcc gttcttaaaa
6721 aaaaattttt ttttttttc aagacagat ctgtctctg tcccagctt cttgtattt
6781 ggtgagatct cgtctcactg caagctccc cctccagtt saacacctc tctgtctca
6841 gctcccagag tagctgggac taagagccc gccaccagc cccgcaatt tctgtattt
6901 ttatagata tggagtcca aagctgtgag gattacaggt gtagccccc acaccagat
6961 tctgcccctc tggctccc aagctgtgag gattacaggt gtagccccc acaccagat
7021 tacaanaact tttagataa ttatctggc gactgctg ccaacagat gaaacctg
7081 tcttactaaa aaatacaaaa tttagccagc atgtgtgccc atcactgag tccagctca
7141 ttggggagct gaggcaggag aatcatttga accaggaag cagaggtggt ggttaagcca
7201 gatcagcca ctgcaactcg gttggggagt gcaactccaa agagaggtt gctgctgag
7261 tggcccaggg tggagttagt ggtgggagt tccagctacc gaaacctca cctcccgggt
7321 tcaaggatct cctctgctc agctcccga gggatggct ggatatagg tatgcatgt
7381 caaccagcc taactttgta ttttttagt gcccctctt caccatggt gggcagctg
7441 gctttgact caagtgact agtgactcc gctctctt gtttagaag agacacaa ttgtctgag
7501 aggtatttac aggcactcc gctctctt tttctgca tttagctta atgtctctc tctgtctg
7561 tcaagatgt tagagactt gctctctt tttctgca tttagctta atgtctctc tctgtctg
7621 ccaaccttct tctctctt tttctgca tttagctta atgtctctc tctgtctg
7681 tatgtattt gttgagctt ttttaataa taagtggag tgaagttcc ctggtctct
7741 tcaaccagct gccagatca ggttgaac aggtgagac cctctctct gaggagctt
7801 ctttctctct cttagagaa aggttttag actttttgt cactttcca ctttagact
7861 tcaagcctc taaaagagc tggattttt tttttttt ttggagatg gatctcgata

```

Fig. 18C

【 18 D 】

7921 tgttccagc gctgttttg aaccctctg ctaaccagat cctccagct cagcctccca
7981 aagtctggg atccgagga tgaagcaac gcccctctg gcaagtgat gttttttgtg
8041 atgcttttg tgaatgctt ctctctctc agcctgtcc agggcaact caaagccctg
8101 tcaaggaga ggtctctca cggatctca gcaatagcc actctaacn cattggtaca
8161 gctgtctgc agtgcctcg cggctactc cgggcaaga cagaccocg ggggtgacc
8221 tgaaccagta tcatgacgc acccaagct agtctaact ggaagggta cagactctc
8281 agtggagcc tgaatggcc accctctcc ctggctctc tccctttgtc ctgctgatg
8341 ttttccctg cccggagaa catgtttgg ccaactgtc caaggcaaa gtoacoga
8401 gctgtgttg cctccctca cctctccca cccaccaga ccaagtcgc ctctgctga
8461 ctccctgtc tctctgacc cctctctgg cctccggag cgtgtttcc cctctgacc
8521 gctcctctc gcaactgaa tggatggcc cctctggat tgggtccga gaggaccta
8581 ctaaccctc cctctgacc gactgacc cccaggtct ctgtctccc tccggggag
8641 aactgactt tgaaccocg cccgggacc tgggtgacc cctggctgt gttcagggc
8701 taactctga ctaaccact accttgagg tcaactgat gaacgggta tccctctga
8761 ccaagggcc cgtccctat gactgacc cccaccaga ccaagtcgc ctctgctga
8821 gggggctgg cgggtctgt gctctggg agatagctc ctgaggctc gaaggggaa
8881 gggagggct gtaagttg tgaaccoga agtctgagg gctaaggct tggggcaag
8941 agcgagaag agggcaatg ctggggcag tggctcaag cgtataacc agcacttca
9001 gaggctgaga caggcgatc acttgagcc acagagaga gggctgacc ggtatacatg
9061 gaagctctc atcaaaaaa taaaatatt agccagga ggtgtgcat gctgtgttc
9121 ccagctact aagagctga gcaagaga tigtctgag cccaggtctc ggggtgacg
9181 tgaactaga tgcacactc gactgacc ctgggtgca gactgctg agtctctca
9241 tcaaaaata tgaatagct agaggggtg agagaggtg aaagctggc tggagatba
9301 agtacagaa gcccaccat gggactggg ccagagaga tcaagagaa tctctgaac
9361 agccagggg cgtatgaca ggtcaggat ccaagctgt ggtgggacc tgtatgacc
9421 ccaatgcta ccaaaaata aaaaatagc cagcagggc cgtctgca taagtga
9481 tggagaga ccaaaaata cgtctgac cccagggct ggggtgca taagtga
9601 ctgctgacc gactctgac cgtctgac cccagggct ggggtgca taagtga
9661 ttttttaag taaggagcc agtctgac ccaagggct cgtctgca taagtga
9721 agtctctcc tgaactgac gactctgac ccaagggct cgtctgca taagtga
9781 tggctggcc gctctgacc gactctgac ccaagggct cgtctgca taagtga
9841 atgagaggt agggactc ccaagggct ggggtgca taagtga
9901 gctgggaga agggactc ccaagggct ggggtgca taagtga
9961 tccctggc agcttgggt agggactc ccaagggct ggggtgca taagtga
10021 aaaaatgta ctgataagc taaccagc tggacaggt gggcaaggt ggggtgca
10081 gctcagctc gtaatacga gacttggg agactggc gggcaaggt ggggtgca
10141 ggggttgg accagctg gcaactgtt gaaactgtt cctataaaa aactataaa
10201 gggcgggct cgtgacta cgtctgac ccaagggct ggggtgca taagtga
10261 atcaacagc cagatgac ccaagggct ggggtgca taagtga
10321 aaaaataca aaaaatgct agggcgggt ggggtgca taagtga
10381 ggggtgca ggaatggc tgaaccag ccaagggct ggggtgca taagtga
10441 gcaactgac tccggctg tgaaccag ccaagggct ggggtgca taagtga
10501 aaaaaaacg caaaaatg taaaatgca aaaaatgca cttgggacg tggctatgc

Fig. 18D

【 18 E 】

10561 ctgtaatcc ggcactttg gaggccagg tgggtgacc accctgggtg aagagtoga
10621 gaccagctg gcaacaagg tgaatccc gctctcta caaatgaca aatcagctg
10681 ggtgttggc gggccctgt aatccagct actcagata cgtgacagc gaatacgtg
10741 gaaccoagt gattctcag ttgagctga ggtctgag agtctgatt gcoactctg
10801 atccagctc gagaagtga gacttctt taataaaag taagctgag agtctgatt
10861 cacatgctt gactgctaa gttctccaa agggctcacc agtctgag cagctgatt
10921 atggagttg agggcaggg agggagcag caagagcacc aggaactg gttccoggt
10981 gacggccac ccaactccc tccggagac gggcggcag gtcocagag cgtcoggtc
11041 ctgaaagct cagaanaac ggaagctgt cggggctga agcggggag cagctactg
11101 gctgagctc gggcggctc tgaagcggc taccggctc tggccagga caatcagc
11161 cagaccocac tgaatgta cctgggaaa ggggggtgag gttgggtg gaaagacc
11221 caaagtctt ggaagacc caggtctca agtcccatc atctttttt tttttttt
11281 tttttgat gtagttctg tctgtctcc aggtctgag gtagtggac actctctg
11341 cactgacc tccgctccc gtagtaagc actctctg cctcagctc cagctactg
11401 ggaattacg gctctgca cccgctgct cagttttt gattttttg tagagaggg
11461 gctcaccg gttggcagg cgtctctga actctgac tbtgtattc cccctctg
11521 cctccagc gttgggatt acaggatga gcaactgac cgtctactc tctctctc
11581 atgctctt tctgtgat cactggcat gcaactaga gtagagaac taagtattc
11641 aacccaac caacagctg tttttgaa gctctgctc gtagagagc ctaactctg
11701 cggagcga gttgtgat caagctcag tgaacgca ggcagctg ctaactctg
11761 aacccaac ccttgggag cgaagcag agtagctc gtagagagc ctaactctg
11821 agtctgca cgttgaac cagctctc taataaat atagaatga cgtgagctg
11881 tgggtgca cgttgaac cagctctc taataaat atagaatga cgtgagctg
11941 tggaggtg agtctgag gactctgag gtagagagc ctaactctg
12001 agcagctc tgtctaaa aacccaac ccaactctg ctaactctg
12061 gacccctg gctccactc ccaactctg ctaactctg ctaactctg
12121 ggggttgg gattggag aagagctc tttttttt tttttttt gctctctg
12181 ttttttcc attttttt ttgagcag gtagagagc ctaactctg
12241 gttgggag ctaactctc cgaagctc aactctctg ctaactctg
12301 atccaccg cctgctctc cgaagctg gtagagagc ctaactctg
12361 ctaactctc ctaactctc agagagagc tttttttt ccaactctg
12421 ggaaccatc tagctctg cagctctc ctaactctg ctaactctg
12481 gctcccaag tagctctg ctaactctg ctaactctg ctaactctg
12541 tttttttt agactctc ctaactctg ctaactctg ctaactctg
12601 caactctc gactctg ccaactctg tggatttca gtagagagc gcaactctg
12661 gactctg agtctctc taactctg aactctctg aactctctg ctaactctg
12721 gttctctg ctaactctc gctctca agtctctc ctagagagc ctagagagc
12781 acagaatg gtagctca ccaactctg tttttttt tttttttt ctaactctg
12841 gactctg ctaactctc ccaactctg ctaactctg ctaactctg
12901 caactctc ccaactctc gctctg aactctctg ctaactctg ctaactctg
12961 cagagagc gttctca gttatgat ttagtata tctctctg tttttttt
13021 tttttttt tttttttt tttttttt aggtctctg tctctctg aggtctctg
13081 gactctg aactctc cactctg ctaactctc aggtctctg gactctctg
13141 ctaactctc ccaactctg gtagagagc gtagagagc ctaactctg ctaactctg

Fig. 18E

【 18 F 】

13201 tgggtttt ttttaaac agggtttcc catgtttcc aggtctgtc cgaactctg
13261 agtctgaga atcccaac ctaactctc caaagtgtg tgaatacag catgagcag
13321 tgaactgca cgttttttt gaaacaaga ttttctgtt caaccagc
13381 tgaatgta tggctgac atagctctc gcaactca aactctctg caagcagat
13441 ctctactc agctctgca gtaatgga ccaacagct caaccactc gttgctaa
13501 tttttttt tttttttt agcagggc tttttttt tccaggctg cttctgaa
13561 cctgctcga caaactctc atctctctg atctctctg cttctgaa caggctag
13621 cactgctc tggcaaat tttttttt tttttttt ctaactctc caaactctc
13681 aatagctg tttttttt tttttttt tttttttt ctaactctc aggtctag
13741 tggataaaa acbtgaaat gtttctctc tgaactctc caaactctc
13801 gttgactgt gttttttt tttttttt tttttttt caaactctc
13861 aggtctgt gactctgac tttctctc gttgaaagc gttgaaagc
13921 aatagctg agctctgca taactctc taactctc taactctc
13981 gagaactc gaaactctc gggagagc gaactctc caaactctc
14041 cagctctg cagagctg gactctctc caaactctc caaactctc
14101 gtaagaaa atttgaaac tttctctc gctctctc actctagag agctctg
14161 cctctggg agatgtgaa accactctc tttctctc cttctctc tttctctc
14221 tctctctc tttctctc atctctctc tttctctc agatctagc tttctctc
14281 agcctctc tggggctc taagcaaca taactctc ctgactctc tttctctc
14341 cagagagc cagagctg cagagctg tttctctc tttctctc cagagctg
14401 gttgtgtc gttctctc gtaactctc tttctctc ctgactctc taagctctc
14461 gaaactctc gctctctc agctctctc tttctctc ctgactctc gtaactctc
14521 agctctct gctctctc agctctctc tttctctc ctgactctc cttctctc
14581 tctctctg tttctctc ataatgctg gtaactctc tttctctc tttctctc
14641 atcgtctc gaaagctg caatgggaa gaaactctc atctctc caactctc
14701 tctctctg gactctg gttctctc tttctctc atctctc gggggctg
14761 gttgtgtc ctactctc tttctctc tttctctc tttctctc gggggctg
14821 gttctctc cagagctg cttctctc atctctc tttctctc tttctctc
14881 atcgtctc cagagctg gttctctc tttctctc gtaactctc cttctctc
14941 gaaactctc tttctctc gaaactctc atctctc gaaactctc cttctctc
15001 cttctctc ggggtctc caactctc atctctc tttctctc tttctctc
15061 caactctc cagagctg gttctctc gaaactctc atctctc tttctctc
15121 gttctctc cagagctg gttctctc gaaactctc atctctc tttctctc
15181 cttctctc gaaactctc atctctc gaaactctc atctctc tttctctc
15241 cttctctc gaaactctc atctctc gaaactctc atctctc tttctctc
15301 gaaactctc gaaactctc atctctc gaaactctc atctctc tttctctc
15361 cttctctc gaaactctc atctctc gaaactctc atctctc tttctctc
15421 gaaactctc gaaactctc atctctc gaaactctc atctctc tttctctc
15481 gaaactctc gaaactctc atctctc gaaactctc atctctc tttctctc
15541 cttctctc gaaactctc atctctc gaaactctc atctctc tttctctc
15601 cttctctc gaaactctc atctctc gaaactctc atctctc tttctctc
15661 cttctctc gaaactctc atctctc gaaactctc atctctc tttctctc
15721 cttctctc gaaactctc atctctc gaaactctc atctctc tttctctc
15781 gaaactctc gaaactctc atctctc gaaactctc atctctc tttctctc

Fig. 18F

【 18 G 】

15841 tttctctc tttctctc aagctctc cttctctc tttctctc agctctctc
15901 atctctc ccaactctc gactctc tttctctc tttctctc gttctctc
15961 atctctc ggtctctc aactctc cttctctc tttctctc tttctctc
16021 aagctctc tttctctc gttctctc agctctc cttctctc tttctctc
16081 cttctctc aagctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
16141 gttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
16201 ggtctctc tttctctc cagctctc gttctctc tttctctc tttctctc
16261 cttctctc cagctctc gttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
16321 ggtctctc ccaactctc aactctc tttctctc tttctctc tttctctc
16381 gttctctc cttctctc actctctc cttctctc tttctctc tttctctc
16441 agtctctc tttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
16501 gaaactctc cttctctc tttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
16561 gttctctc cttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
16621 cttctctc ccaactctc gttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
16681 tttctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
16741 cagactctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
16801 aatctctc gttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
16861 caactctc aactctc tttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
16921 tttctctc gaaactctc gttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
16981 gaaactctc caactctc cttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
17041 aatctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
17101 gttctctc tttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
17161 gttctctc ccaactctc gttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
17221 cttctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
17281 gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
17341 ccaactctc gttctctc aagctctc gttctctc gttctctc tttctctc
17401 gttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
17461 cagactctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
17521 gttctctc gttctctc cttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
17581 gttctctc gttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
17641 cttctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
17701 gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
17761 ccaactctc gttctctc aactctc aactctc gttctctc gttctctc
17821 cttctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
17881 gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
17941 gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
18001 tttctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
18061 tttctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
18121 gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
18181 cttctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
18241 gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
18301 atctctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc
18361 cagactctc gttctctc gttctctc gttctctc gttctctc tttctctc

Fig. 18G

【 図 18 H 】

18421 gagacagggc ttgoccatgt tggocagcgt gatctgaaac cccctggccc aagccatcca
18481 cccctcttgg cctccaaaag tggctgggat aaacgcgtga gccaccgtgc cttgttggag
18481 agacagaagc gctcttaag gttccatgat acacaccgtt atccocagca ctttgggaag
18601 ctgaggtctg tgatcaactc gaggccagga gtttagagatc accctgggca adatgggtaa
18661 accocctctc tacacaaaat acaaaatgtc gcagagcatg atgttgata ttgttagtgc
18721 caactactcg gggagctgag ccttggagat cacttaagcc tggtagatcg aggtctgtgt
18781 gaggccatca tgcaactact gcttccagcc cttggcgtcc catctcttaa aaagagagag
18841 agatgggaaq accagcacag gtaaacatgt tgaacagagc agatagtgta gatgtctgat
18901 tgggagctgt gaegggaacc cgttggaggg ctttggcagc agatagttt aagagatccc
18961 caegtgggca cagtggctca cacttggat cccagcaott ggggagcccg gggocaggtg
19021 atcaotttag gtcaggagtt cagacaccag tctgcaacca tgggtaaac ctgtctgtac
19081 taaaaataca aaaaocagcc aggcattggt gtcgccccct gtaatcccag ctactcagga
19141 gactaaagca ggagaatcgc ttgaactcag gaggcagagc ttgcaatgag ccaagatccc
19201 gccactttac tccagcctgq gcagttagag gagactccat ctaaaaaaaa taataaata
19261 aaaaagacct ttgctggggt gtcaggagcc aagcaagaaa cctggggagag gcttgcagca
19321 gaagcctgtt gccagcatcc aggcctgtgg gtaagggaaa ggttttggat ttgggacatg
19381 tottggagcc atcaccatcc agctgtggg atctgcaaca agtggotgtt gagggagaaa
19441 agggggctaa aggaacacta gaggctctata cccctgacct ctggcaagt gttgttggat
19501 caaaaactga cggggagctc gggcaggtgc aggtcagagc ttgcaatgag cttgagctgg
19561 ttggagctct atgtccctgt ttctgtagg ctgcaatgag tctgcaaat cttagoggaa
19621 ccaggaatac gggatttggc tactgtctgt tctgcaatca cacagactga gctggaacgc
19681 totttaaagg taaagttggc gcttcagacc ttgtttttg caccgatcat tggtaactc
19741 goagttctcc actcttctct tctgtctgtc taccaactca gctgaacaga gctggaacgc
19801 ttgtgggttg gatcagcacc aatgtatctc caactgtaga cgggtgtctc aggtgactca
19861 tgctgtaat ccagcagctc ttggagctca agtgggaaq atgtcttag gccagaggtt
19921 ggagacaagc ctgggaaaca cagttagacc ccatctctac caaaaaaac cctttgtttt
19981 aattagccag ttgcaatgct gtcaccatgt cgtgtgaac atgatctgq cactgcaact
20041 agatcatttt gaagcagga gttbaactc cgtgtgaac atgatctgq cactgcaact
20101 caacctgggg gaagcaaga gactctgtct ctbaaaaaa taataaacag aagaccattt
20161 gttggatttt tccctgggat aaagcagtgt accaggttaa atgaaagaa aagtgtgaat
20221 aatttttcaa ctaataactc gatctggaga gatctggaga ttaccattga agcaggaaa
20281 atgttaagca atgtgtttgt atactgtago aagatgtagc aaaaacttgg aaagagaaa
20341 gggagaaagg tccactgtgt gagtgggttc gggcagggag cttggtaagg tgaactcaaa
20401 tctggaaagt acagatgagc tttagagatt gggcagggag cttggtaagg tgaactcaaa
20461 tctgtaabcc cagtgctttg gggagaccg gctgaagatc agcttcaata aaaaataccg
20521 agaccagcct gggcaacata ttgtggagc atctctacta aaaaataaaa aatattccag
20581 geataatgag actgctgat ttgtccacct atctgcaact cttccatgca cccagggatc
20641 ttgagctgga taagaaatag atgcccactc gtaactccag cttggcagag ccaagcaaac
20701 cctgtctctca taagaaatag atgcccactc gtaactccag cttggcagag ccaagcaaac
20761 ccagccccca ccaaaatagc ttgtggagc atctgatact ttgtggagc atctgatact
20821 gttggagctc tggggagcct agcctgggca atggctgacc ttgocagatc caaagtgttc
20881 cccagcagcc ttgctgtctg gttgctgtcg aaactcttcc atcccaacta cagagctccc
20941 gactttggcc ttcccgatgt cctggagagc aactcttcc atcccaacta cagagctccc
21001 ctggtaatgc tgggggtaat actgggtgtg agctttctag gcccaggtgg ccaggccagg

Fig. 18H

【 図 18 I 】

21061 ttggaaaggt gggagctga gggttggca gccctgtccc agggagagga taagagagca
21121 ggtctgggtt gggggagcag tccgctccag gaagccgact tccagatgct taggaaataa
21181 acagttggat aaocctggca acatagcaag accocactct tacaaaaaaa taaagagtt
21241 agccagggcc agtgctcagc accctgtatc ccagctactt gggaggttga gggcagagca
21301 ttcttaagc ccaggagtg gaggctgac tgagotatga atgttgatg gactctcaga
21361 ctggggcaca gagaacaacc ctgtctcaa agaacagtg ccaggtgtg ttgctcagc
21421 ctgtaabccc agcacttgg gaggctgag cttgctgag catctcttaa aaagagagag
21481 gaccagcctc gccacaatgt gaaaacccgt tgcctactaa aaatacaaaa ttatgctagg
21541 gttgtgtao acgcctgtaa tccagctac tccaggagct gaggtagag accagcttga
21601 acccggggag cggagtttca gtagccaag atgcacacc tgcaactcaa cctggcmeta
21661 cagagtggga gtagtagagg cttgggctgt gactccctca gtagctcccc cagctcaact
21721 gggactgggg ggcagtgctc tgggtctgt gactccctca gtagctcccc cagctcaact
21781 ttctctctt tctctctc ccagagtg agaaagatt cccactccca gtagctcccc cagctcaact
21841 gocttcoga agtctcagc ccagagtgat gactccctca gtagctcccc cagctcaact
21901 gtagtatac ttggggagag gctcagctg cactccctca gtagctcccc cagctcaact
21961 tggctotanc asgcttctc agagtgtct agactccca gtagctcccc cagctcaact
22021 tccagagagc tcatcactc tgggttctg agactccca gtagctcccc cagctcaact
22081 atctttgat caaagagtg agatacagg ccaggctag ttgctcaag ctagtactc
22141 agcacttgg gggccagag ttggcagatc actaagatt aggatttcaa gccagctagg
22201 gccacaatg tgaacaacc tcttcaaaa aatacaaaa atatgcccga actcagctgg
22261 ggggtgctgt aatccagct actcaggagc ctgagagagc ataatgctt gaaccocaga
22321 acagaggttg cagttagctc agatcagcc atgtctccc agocctggca actcagctgg
22381 actctgtctc aataaaaa taaagagtt ggttcaagca tatttggctc gcagagattg
22441 gcagagatgg agggcaggtg tgagagtaa ctatctgta tcatagcca agactctgtt
22501 gggccttagc ccacagagc ctcaactcc ggtcagagg atctctgat ctgtttatt
22561 ttgggggctc gttgctcta tctcaactc tccaactcc ccattcttc caggtgtata
22621 catcttctt tctctggac agctcaacc agactccca cccctcttc caggtgtata
22681 atgcattga acagactac ccgctgccc ccgcccaga ctgtcccacc tccactccc
22741 agctcatgtc ggcctgttg cagaagacc ggaatgccc gcccccttc cccagggtg
22801 tccagcctc ggaacagatg atccggacc cccctctccc ctctctccc cactctctc
22861 atggcgggtg agactccag gttgtggat gggagggcct ctctctccc cactctctc
22921 cccagagtg tccgttcat tccctccc gactgggccc tggactccag catctctcc
22981 gggctccacc tccctccc gactgggccc gggagggccc gaggactcc gactctctc
23041 cccagggccc tccaccctc tctgggccc ccactcaaat ggaagaattc tgcagccc
23101 gttggggcag tggctgccc ccactcaaat ggaagaattc tgcagccc
23161 tggcttggc tctctggcc tggctgccc gatctctct gactcaagc ttggcagctc
23221 tggagttggc ctgggagagc gggcagctc gactcaagc ttggcagctc
23281 ttggggtagc cttgggtgct caatgctgc tttctctc ccgctctg cactctctc
23341 agggcccag agagcagtc acagcccact gggctagg acccaagagc ttgtctagg
23401 cagctgccc gctcaactc cctctgcat cacagccc gggcctgct cctctctc
23461 tcaactctag ctattttgt gactctatc gactctcag ccgctctc actctctc
23521 ttgttaactc cggttctct ttttcaacc aaaaagagc aagatgggc taggtttgg
23581 agactctctc cagttctctc ttgaaaggt ttatagctc ctctctccc aaaggcttc
23641 tatcccactc tggcctttg ctgactctc cctctctc ctctctccc ctctcccag
23701 atctctctc acccaggtt gaataaca aatagaaga taagaaatc gaagccggg
23761 catggtgctc catgctgta atgcagacc tttggggagc ccagggtggc agatcactgt

Fig. 18I

【 図 18 J 】

23821 aggttagagc ttagagacca ttgtggaaa cttgtgaaa cttatgtct actaaaaata
23881 caaaatag ctggccatgg ttgtgtgtgc ctgtaatac agotactagc gaggctgag
23941 caggagaatc gctgaaacc gggagtgga gtttgcagt agccagatc gccaccctgc
24001 actccagcct ggttagacc gttgaaatc atctcaaaa aaaaaaaa aaaaaaaag
24061 aaatgtgaq gccaggtgag gctcaagcc tgaatactc gcaacttgg agctcaggt
24121 ggaacatbt cttagccc gaatttagc agcactggt ccaaaatagc aaaaaccatc
24181 cctcaaaa caaanaca aaatttagc agcactggt ccaaaatagc aaaaaccatc
24241 ctactcaga ggttagacc agaggttctc agcactggt ccaaaatagc aaaaaccatc
24301 gggcaatcc ctccaaatc ctccaagcc ttctccagc ccaagggccc tccctctcc
24361 ttttctccc tctctccc tccaagcc agcaactcc tctctccc ccaagggccc
24421 tctctccc cctctccc ttttctctc acaactctc tctctccc ccaagggccc
24481 cagctctcc ccaagggccc ttttctctc acaactctc tctctccc ccaagggccc
24541 ccaagggccc aggcctgctc ttgtgtggc agcactccc cctctctgg ttgcaagaa
24601 ggaatgctc ccaagggccc gtttctctc acaactctc tctctccc ccaagggccc
24661 cccctgctc ttttctctc gtttctctc acaactctc tctctccc ccaagggccc
24721 gaggagagc gccacagga cctagggctc tccaagctc cctctctcc ttgcaagaa
24781 cctctccc atggatgctc gtttctctc acaactctc tctctccc ccaagggccc
24841 gcaatgagc tccaagggc agccgggacc cccgggtggc acagagagc agcccccga
24901 gtaactgact gcaggaacc ccaagggacc agccgggacc aaaaatggc ccaagggccc
24961 gttggagctc acagagccc ccaagggacc agccgggacc atgcaatt ttgcaagaa
25021 gttgagagc ttgcaatgtc gaggacagc atttgggtt ttgcaatt ttgcaagaa
25081 aatcaccacc ccaagggacc aaaaagagc gcaagggacc ttgcaatt ttgcaagaa
25141 ggaatgggtg tgacagagc aaaaagagc gcaagggacc ttgcaatt ttgcaagaa
25201 cccctaacct gttgagggc gttcccagc accaagaga gttgactcc cttgcaagc
25261 ccagagtggt gggctgtgct cttcccagc accaagaga gttgactcc cttgcaagc
25321 atgggggtt gtagtccca ctgtgctc tccaacaaa actcaatcat ttttctctc
25381 tgaataatgc cctcccagc ctgtgctc catatggtc caatggtc aagttgaa
25441 gcttaattt tctcccagc tccctttt ttttctctc caatggtc aagttgaa
25501 tcaatactt gttgtgagc gaaactgtt caatggtc caatggtc aagttgaa
25561 aggggccc catcagctc gttccagaa cagtccctg gtaactccc atcccggac
25621 cccctgggtg accccaagc gttcccagc accaagaga gttgactcc cttgcaagc
25681 ggggtgtg gttgtgagc ccagaaagc agccgggacc ttgcaatt ttgcaagaa
25741 tattaaaa agtaacttt ttgataaaa aagaaatgg ggaactgtcc cagctccag
25801 gttgagggc gttgagctc agattctta ggaagtggt gctggtagc gagggtttg
25861 ttgctgagc agaggttca gaggctga ggtgagagc ctgtagggc ttgaaactgg
25921 ttatagccc caggttatg ttgaggtg ggggtgggg ccagcagga tgaactatc
25981 gcaactgctc ctactgctc

Fig. 18J

【 図 19 A 】

EphB4 mRNA
1 ctggggccc gggcggcagc agaccactc agggggggg ggggaccgc gagggcccg
61 ctacggccc gccaccggg gggggccc actggccc agggcccga actcagcca
121 cgtctgtgct gggcggcc cggggggcc actggccc agggcccga actcagcca
181 cggcggggc acagagggc ggcacactt ggcggccc ggggtgccc cggcggccc
241 ca'ggggccc cgttagggc ccagagagg agtcccggc ggaatgccc gatcagccc
301 cccagggagc gctgaccty ggggggggg gggcccggc actcagctc gatcagccc
361 ggttggggc gggcagggc gttcccggc gggcccggc actcagctc gatcagccc
421 ttggaagagc cctgctgaa caaaaatgt gaaactgtt actcagctc gatcagccc
481 cctcaggtg acgggagtg ggaagactc agcggctgg atggaagtc ggtgacttc
541 gcaacttacc agttgtgta cgtgcagct gcccggggc gaaactgtt actcagctc
601 gttgggttc caggggggg cggctccac gttgagcca cctgctctc caactgttc
661 ggtgctgt cctgctgct ggtgggggc tctgagccc agcctctac ggtgacttc
721 tatgagagc atggcagac ggcacggcc ctcagccc actgagtg gggcagccc
781 atcaagtg acaggtggc cggggagctc ctcagccc agcctctac gggcagccc
841 accgggagc tgaattcaa gactgctc ctggggccc tccagccc tggctctac
901 ctggcttc agggagccc gctgctgct gctcagct cctcagctc attctaaa
961 aagtggccc agctgactg gaactgact cgtctccc agctgccc gggcagccc
1021 gttgtccc tggcggtag ctgctggtg gatccctc gcccggctc cggcagccc
1081 agccttact cggctgaga ttggcaggtc gcccagacc ggtcagctc ctgagctg
1141 gctccgggtc tggagcagc ttgggggaa accaagctc ctgctgccc gggcagccc
1201 tccaagccc tgcaggaga aggtctgct cagcagccc cagcagccc caactaaa
1261 accattgag cagcctgtc cagtgccc gctgagctc ctgagctc cagcagccc
1321 cggggtgaa cctgcaacc cctcctctc gctcggga cgtgtttc cggctgccc
1381 ggcctccc tgaactgga atgagtgcc cctgtgag ctgctgccc agagagccc
1441 actcagccc tccgctgag gaggctgca cccggagct ctgctgccc ctgagggga
1501 gactgact ttgaccggc cccggggagc ctggtgagc ctggtggcc gggcagccc
1561 ctactgctc actcaacta taactttag gtaactgag tgaaggggt atctctca
1621 gccaggggc cgttccatt tgagctgtc aatgtaaca atgaggggt gtaactctc
1681 cagtgctgt acatccggt gacgggtcc tcaaccaga cgtgagctc ggtgagctc
1741 gttcccggc caocagtg ggtgtgctg gactcagctc tcaaacca tgagaaggg
1801 ccggaggtc ccagagctc ggtgtctct aagactgag aaaaagggc agactgccc
1861 gggctgaaac gggagccag ctactggtc caggtgagc gctgctgag gggcagccc
1921 gggcctctc gccagaca tcaagccc acccaactg atgagagca gggctggcc
1981 gggcagctc cctgattgc gggcagcca gctgtggg ttgctgggt cttgtgctc
2041 atgtgtgtc cagtctctc cctcagagc cagagcaat gtagagagc agaatctc
2101 gcaaaaagc gaactatct catggagct cctcagagc gactctgag gggcagccc
2161 tatgagacc ctactgagc ttgagggaa ttgcaaaa agatcagct cctcagctc
2221 agatgtaa aggtatgtg tgcagtgag ttggggag ttgcccggc gggctcagc
2281 gcccccagg agagagagc ctgtgagca atcaagccc tgaaggggt ctacagagc
2341 gggcagggc gtagctctc gaggagggc tcaatagg agactgccc cagactgag
2401 atactccc ttgaggggt gttcaacc agactgccc tcaatagg agactgccc
2461 atggagagc gggcctgag ctctctctc gggcagggc gggcagggc cagactgag
2521 cagrtgctg gactgctg gggactgag ttggagggc gggcagggc cagactgag
2581 taagtccac gagactgag tctgcaac atctatgca accaagact cgtctgcaa

Fig. 19A

【 図 19 B 】

2641 gttgtgact ttggccttc cegattctg gaggagaact cttccgaccc caoctacag
2701 agtccctgg gaggaaagt tccatccga tgaactgcc cggagccat tgcctccgg
2761 aagttcaact ccgcacatga tgcctgagt taaggatgg tgatgtgga ggtgatgca
2821 ttgggggga ggccctact ggacatgag aatcagagc tgatcaatg cattgaacag
2881 gactacogc tgccccgcc ccacagatg ccaactccc tccaccagt catgctggac
2941 tttgtggca aagaccggaa cagctccccc cgttccccc agtggctag cgcctggac
3001 aagatgacc ggaaccocgc tgccctcaaa atctggcccc gggagaatg cggggcctca
3061 caoctctcc tggaccagc gacatccac taactagct ttgctctgt gggcgagtg
3121 cttcgggca tcaaaatgg aagatagaa gaaatcttc cagcctggt cttgtgctc
3181 ttcagctgg tccagcagt cttctgtag gaactgccc gaactggat caactggcg
3241 ggaacocga agaaaatct ggccagtgc cagcaatga agtcccagg caagccggga
3301 accccgggt ggacagagg accgcccc cagtactgc ctgcaggac tcccaccoc
3361 aggaacocg cctcccact ttccgggca gagtgggac taacagagg cccaccgct
3421 gtcggcctt gattgcaat ttgagccct ggggtgaga gttgcaatt tggagagca
3481 gatttgggt gttctgact atagaggag gaaaatccc cccaccgac ctgggggaa
3541 tccagacaa ggttgaggc gctttccct caggactgg tgtgacaga ggaagaagaa
3601 gtcoccaaa tctccagcc tcccagggt ccccctcac ctgatgggt gogttccgc
3661 agaccaaga gattgtgac ccttgtagc ctccagagt ggggggtgt cccaggggg
3721 aagaaggggt gtcaggccc agtgcacaa tcatggggt ttgtatccc aactgtctg
3781 tgcaccacc aaactcaat attttttcc cttgtaag cccctcccc agctgtccc
3841 tcatattga agttttttt gtttttttt ttgtttaa ttttctccc agtcccttt
3901 tttttttt ttgtttttt ctacgctct tgcataact ttgttttga ggaactcgt
3961 tcatattg cctctctgt cccactggc accagttga atcatcatg ctgttcccg
4021 aacagtctc tttctatcc acatcccgg acccggctg ggaacoccaa gctgtctct
4081 atgaaggggt gttgggtgg gtagtgaaa gggcgtagt tgggttga acccagaac
4141 ggaacgggt gttgggtgg cctttcaat tatattaaa aaagttaact ttgtataaa
4201 taaaagaaa tggagctgt cccagctga ggggt

Fig. 19B

【 図 20 A 】

EphrinB2 遺伝子
1 gggcctcggg gctgectgag gggcagccc gctctcccc cagctgccc cggagggatt
61 gggggtccc gctcctccc cgtcagccc tctctggcc gtagctggc gaggctggg
121 tggcttccc atgctgtgga gaagggaatc cgttgggaa gactgctgg ggttttggat
181 ggttttatge agaacctgga tttccaaatc gatagttta gacccatct atggaaatc
241 ctcgaactgc aagttaagtg cgtccggctg cccctatgt cccgccccg ggtcccgcc
301 cgcctccgg ggggaggag ggtgaagtc gggggccc gtagctgtt tctggaact
361 cggttcccc tcccaccoc ccaaccoccc cccatttca ctaggtagg actctctct
421 cggcttcca acccgagccc cgtgggaag gaeggtctc cgccttccc tcccggaa
481 gctccaggc gtaaaagct actatgggt cgggtgta gtcgggag gttccagat
541 ggtatactg accctctct gtttccagg acgaaggaa gtcaccact ctaggctgg
601 cggcaogcg ggaactgtg gctctggga gaggcggga tctgctatc gggggagg
661 cggggggct ggtccgggg ccgcccggg ggcaccggg tggcaagag ctggcagca
721 agcgtctct ggagagggga cccctggatc gctacgtgc ccgagagcc ctggagcgg
781 gggcctctg caccgccc cccagccc ggtgcccgg gactgctct gcttccagt
841 agaacctgg cgtcagccc tctcccgc ggtcgggga cgggcttag gctctccc
901 gggggccc cgcactgg cctcccgtt cgtctaaa cggctagcc cggagtatc
961 ggtctgatg gccgactga tttgtaaga ctctctaaa aagcttagg cctgcccag
1021 tgcacactc tctgaagcc tctcccctg ggcctggg cccagctgg tctctagat
1081 cagatttct cttaccggc tctaccggc gggcggacc aggccttct gtagtaact
1141 ttcagtttg gdcaccagg tgcattcga atttagaaa tcccctcat ccttaactc
1201 gctgtgcat aactcgtat catctgggt tctcagtaa aagcttagg cctgcccag
1261 ccagccaaa acatattta agaatcttg gaattgtat ctgggaaac tttgagaga
1321 gctatgaga ctagctgg tttcggga aacgittga gatcagaa aactcaatg
1381 gctaaatga agttgagca gttggcctg gttttagg aagaagatg ggggattgt
1441 ttagaaatc cgtctaaag gattgtctc atctcttaa aagctcaaa tctcaaatc
1501 actaactgt taacaagaa tccctctgt aacggctgt tcaaatctg tcaaatctg
1561 ttaaaacaa tctctgatg atctagaag gcacttca caccgctat aggagagat
1621 taacttctg tgcctcttc catgtatct cctctgcat ggttatatt ttaagttaa
1681 atgttctat tgcctgatg agtactggc gggcactct tgcctgatg cggctcggg
1741 agggccagg tggctcggg aggagcggg ctaggacc cgcagcagc gggctccgg
1801 gtcggggga gggggggg cggggggg ggtcgggg agcccccgc gctctgccc
1861 cggcgtgct tccagagtc actctctcc cgggaatgc gggggccc gctcggccc
1921 tcccaccgc cgcctctcc agccactct gaccctct gaccctct gaccctct
1981 gttttttt tctctatag gatctaat tctgttaa atctagttg aagcaatcc
2041 tttgactct taagcttta gttctgtg tctatctta tcttctct atataacta
2101 ttagttctg tctatcctt aggaataa gaaactcta gttgggaa aagaagatg
2161 aagaacatg tttttcaac ctaagttta cagtttaa actctcttt ttaagtgtc
2221 gagtgggg gtcctgggg gaggtagc gactcaca cccccccc caattctgt
2281 gatagatg actctgctt tccagctat tccagactg cggggccc cgtttctctg
2341 aagcctccc tttggcggg tgggttctg gctgctct tgcctccc agcagatct
2401 ctttaaaat tctctgata accgctgct tggatgct gataatgt ttaagttaa
2461 ggtctctct cagctgact gctagctca gatcagaa agatctct cttatgggg
2521 cataggaa agtctctct aagtttga gactgata aaccctga tgcaggggg
2581 tctctctct tggggaagt ttaattttt taccagaga aagttgact cggtaaat

20A

【 図 20 B 】

2641 gatgtggag gaagtatc aatgcttg agtttcca taagtctca tgaactggy
2701 acaatttat ttttaaga cagccocca gbaactgat ttttcaat cagagtgag
2761 ctttttagc agtgttga ccaggggca gtcagagc gtttggata caggtccag
2821 aaaaacttt gaaatccg cgtctcga actactttaa tcaacttgc gctctcccg
2881 tccctgact tatgataa tggaaagt tccgtctga tgaacatga gtcctctg
2941 taggtatcc aactgctt gatagctct ggtgagttg gttcctgtt agcactttg
3001 gttttttaa gttttttt tttttttt tttttttt tccagcagc aagactaag
3061 cctagctcc ttttttaact taactctca gtagaact tttctccag agggagatt
3121 tggcttaag taagtatg gctctttt aaaaaaat taatttaact ttaagttag
3181 caaatctga ttgtatgt gttctgcat gactctact gactttgaa attctgagta
3241 caatgctt agtctggg ttaactct cttgtaata caactactg agtcaacta
3301 gaatttct tttccatgt attttttcc ctatataa ctgactctt gatactaat
3361 gactgtac aagaatg agtctgta tccagaaad gatacaaa tggctctac
3421 caactccg cttgataa atadagct gtcagact gataaata actcaatgt
3481 atgtgctt taaccact cactcaaa catataag ccagctgct tccactgtg
3541 tttgaactc tttttttt agttaaag agactctt agactgatt gatacctcc
3601 tgaactgt cccaccgt tggtttgg taactctt cgttttaat atagagaga
3661 aaaaactaa agccaggg gttgaatgt taactctt acatcaat tctcaactc
3721 tttcagat gataactgt agttaaag cctgtctt tctcagag aactgagca
3781 ggcagagca aagaactag ctaagact aactcaac atgtttgta gctttctt
3841 cagtagaga tttatttg atcaactgt ctaggctgt caactctaa cctcaactg
3901 tcaactca agccocaga accagctgt gaggtaaga tgaattgta agccctgtg
3961 totaactt tcaaaaga taagctgt agctgttcc tgcagaga aagcaatga
4021 gatgctca acattccc aggtctgta cttaagta agtgttgg ccgtgaant
4081 cactaggg cttggaca gctgtgta aactatgt ttgaatgt cctccaga
4141 gactgctg aagcaact agtgatta tattaaac tttgtctg aaactatg
4201 agtctgct tctgtgtt gtaactgt gataatgoc ttaagatga cttgcaact
4261 gggcacta aactctgt gttctctc cctctgaa cttccagta gctccaga
4321 gctcagat gacocaaat cctgggccc tttttaggt ggttcaact aatggaaac
4381 tctcagat cccagctga ctgataact gctctagat aatggaggt cgggggaaa
4441 agaaataa gatttaga ctaataaa aattttgg aagatatt tcttcaact
4501 ttttagaa cttctctt aaactata atgtcaat agcaaatg aagttctt
4561 ctaagagag tgaataact gttctcta tgaactaa cctctgct cttgctgt
4621 gactaaag cctgtttt cagctcct atatacct caactagat tctttagg
4681 cctccctt gtttaggg gtagcctt aaaggag gctcaact tcaaatatt
4741 ttttaaaa ttttagaa ccaagact atactctt ttgaatgt cctccaga
4801 aggaacag tccccttc ttttaagg ggaataga aggtctgg gggagata
4861 taagacag aagagaga gtagcaaa tggactgt tccagagc tgggaana
4921 tctgtgct ttttctc taaagcna agactaaa agactaag aactagoc
4981 tctccact atggagat gttttaggt gttttaggt ggttcaact ctttattt
5041 cttcttaa atccagca atactagc ttttagct gaagattct ttagtaact
5101 attttagt tcaactaa aaaaactg aaggtgtt acactatg ctttattt
5161 tgggaaat aactgctc atgttaaa agggatca aactagat agttttaa
5221 agatgtat taactcag gtagatga aagaacta tccctttg tgaatata

Fig. 20B

【 図 20 C 】

5281 gtaaaagg atagaana tggcagct aactgatt tttgcaaa aaccactc
5341 tttctgct taagataa ataatggt aactcctg agttcaag atgcaatgc
5401 agataagg tgaactgt gaaactata gatgctgt atgtctga tgaactgt
5461 ctgaaagg cggggaga agccctgc cccagctg tgggata tggagaa
5521 acagactt gaaactgt atagagat atgaactc atgtgtt ggtgtgga
5581 tggagatg aagaagct gctactgt tctcactg tttgtgaa tgggaaa
5641 gatattca tgaactgt ttttataa tggagatg ggtgtgaa aactcagat
5701 cactgact gttagact gggagatt ctttttaa tctgcta acagcagc
5761 cgttctga gtaactgt cactctg. tctgctgt aactatgt gttcctga
5821 aggaactg tgggaga agagaocag agggatag tgggctgg gttctgaa
5881 agaaactg agactttt attcagaa ttttcca cccagccc tctctggt
5941 cttggaga gaaagta acagaca tttctctt cctccaga cagctctt
6001 cttgactt ttttttcc acccggaa aagataaa ataatatt taaagggt
6061 gggagact ttttttat taactgt actataaa tctccaaa gactggct
6121 ctactgat gtaattta tgaactgt gactttaa cttgactg atggggc
6181 gctgttag gttgtgaa ttaagact ataaaagt tagtctgc cagctcaat
6241 gtaaaaca gaaactct tttgtgtt agtctccg cctctccc tgaacact
6301 tgaatag ctgacttt gttttgct tcaacttt cacttccc catnaaca
6361 aaaaactt gaaacagc atggctcc atgagctg aactccaa tgggtcag
6421 ccagagaa atactgct gattcccc tttttgat taagaaag tctccact
6481 tgggaagt atgactct agactgta aatgcaaa ggtgcaac accctgtc
6541 tttctgag gactgact tttgtttt tcaaaagg aactcagtc aactcttt
6601 tttgtgtt tttttttt ttttaagg cagatagg cctctccc ctttggat
6661 ctgtctga caaaatgt cttaaga gaaactat aattagac cttctgct
6721 tttgtctg aactctaa ctttaggt atctgtgt ggtgtgaa taactgoc
6781 tttgtctg tttttctg tttttgga atactgag cactatct gtagttca
6841 tgaactaa aactttta agtattgt atgtctg cactcact gcttctct
6901 tcaactct ttttaact atgagcag tctgataa cagactca tcaattct
6961 agctctca gtagagct cccctgat tcaagctg ctcaacta agcactgt
7021 atctcaact tgaactgt tgaatgag cactcaact aagatatt ctgtttaa
7081 ggaacaga atgataat tccagagc atgtgctc cctcactg ctcaagca
7141 gattgtga tttatgag agcaaatg caaaagaa agtgaact cccctgct
7201 cagcttca taagaacag gtttaagt attaagca tcaactaa agccctgc
7261 gttgttca taactca ccaactta gcttctgt ctactgta gaaatct
7321 caagactt agatagg agggagat tgaacaca ggaagag tagtgaca
7381 gtaataat gttctctg caatgact gaaagag ctaattct tttctagc
7441 agaaactg aggtctct agtatata atatttcc tttctgtt aacttaaa
7501 atgactct atccaaag atctgtgc tggtagcc atactgct gtaactaa
7561 aaaaacta gaaagaaa gctcaata acagttgt tctcctca gtaactct
7621 aaaaacta gaaagaaa gttcagta gttgagat aatagat ttttctct
7681 ctcaagca gtagata agtctcaa ctactctg gttgctat attagagc
7741 ctgtaaga aactctgt tctgcaaa cttaacta taactat attttct
7801 tttgtgtt tttgact atataata tttattata taactat attttca
7861 ttaactct gttcacta attttata cagttttg atctcact caactg

Fig. 20C

【 20 H 】

18481 ttgggggaaa aaatgtgtt tocoaatgt ggaattataa ttgaatgtg tgcagtoaaa
 18541 actgaatgtg tgcagagaaa agggggctt toctgtcag ctoattggg acaggtgtgt
 18501 ctcoagatgt tctgtgtgt agtcoagtg gtoattgtga aatgaagaa atggatgtg
 18661 tgggggtttg gaagatgtg agtcoagtg aagtgctaaa aagcagctgt gttgtatga
 18721 ttatgtgtt ttgaggtggc tgcagatgtt gtoatttaag tagagagaaa ttgtaaga
 18781 ctgcoaatca ttgaacttt ttccagagtg gaaggtctag aaactgcat tgcagggctc
 18841 ttgtctctcc agaatgtgca gttgtgtgtg tctctctca gacttccat cagttctgtg
 18901 ctcoagatgt tctgtgtgt agtcoagtg tctctctca gacttccat cagttctgtg
 18961 ctcoagatgt agtgtatct aattgtgtg taattttgat aatgtatga tctgtgtgtg
 19021 toatttoat ttittgttca atbaaatct taktattga gacttctca tctgtgtgtg
 19081 cttgtgtgtt ttaattatga attagtaca ttgtgactt gactgtctcc aggggtgtg
 19141 actataaat cctatgtct agtgtgtctc acttttctg cactcaaat ctgtgtgca
 19201 actatgttca ctgtgtgtt tacccttca gtaactgtt ttgtgtctc gttgtttg
 19261 gaagtgtg agtctctctc aggcagctg aataatgag actacacga ttgaaacct
 19321 ggcagagaaa gctgtgtctc aggtctctc ctcaactga ctctgtctc ttgaaacct
 19381 taatttctc acttaattg actgtgtctc actgtgtctc atataatg ttaaaact
 19441 aaagtgtca caactcaaa ggaatgtggc cttgttact gattcaata aaggaacct
 19501 actgtttta ttgacttca gaaacata ctttgaaga gogagatc aaattctg
 19561 ctcoagatgt ggcagatgt gctctgaa gmatcaat gottttgaa tctcaagaa
 19621 tagtgaatt ttgtctgtt taattttctc aggtgtctc aatgtatga ttgaaactg
 19681 agctctca caactctc gttttttaa gactctctc gactctctc actgcaact
 19741 atagatttt caaactgtg gcaatgaa acttaata aattttctc caaggagct
 19801 ctgtgtgtt ttgtaataa attaaatga acttaata aattttctc caaggagct
 19861 ctgaaact ggcctcaaa acagagctc caaagcacc acgacctc gctctctg
 19921 tctgtact caoactga gactcaaga gactctctc ttgagagtg agtgaactg
 19981 gtaagagaa gtaactgtc tggctgtgaa gaaactctc ttgaaactg agtgaactg
 20041 gaaaaaaaa aatctctctc aagaaactg gactctctc gacttttga ttgaaactg
 20101 gctgtgtg caaactga gactgtgtg gtaactgtg aggttttga gattgtgaa
 20161 gactgtgca ttggggggg ttgtaataa ttgtcttca agactgtg gattgtgaa
 20221 gaaactgtt caactgtgt ttgtttgaa gaaactctc ttgagagtg gactgtgaa
 20281 ggtgtgtt ttgaaacta ttctctca ttgactga acttataa gttgtgtg
 20341 ttgagatca aaagagaa gactcaaga gaaactgtt ttgagagtg gaaactctc
 20401 aggaactg ttactctg ttgtttgaa acttaata gactctctc gttgaaact
 20461 ttgaaactg aaagagaa ttgtaataa gactcaaga acttaata gttgtgtg
 20521 ttgtactca ctgctgtc ttgtgtgca gtttttca ctcaagaa acttaata
 20581 actgtgtg ttgtgtgag ttgtgtgag acttaata gactctctc caaactctc
 20641 ttgtactca gtaactgtg gaaactgtg ttgtgtgag acttaata gactctctc
 20701 ttcaagaa caactgtc actcaagaa gactctctc caaactctc gactctctc
 20761 ttgtactca ttgtctaaa gttctgaa actctctc actcaagaa gactctctc
 20821 aatattctc ttgtctaaa actctctc gactctctc caaactctc gactctctc
 20881 ttgtactca ttgtctaaa gttctgaa actctctc actcaagaa gactctctc
 20941 ctctctctc ttgtctaaa gttctgaa actctctc actcaagaa gactctctc
 21001 ctctctctc ttgtctaaa gttctgaa actctctc actcaagaa gactctctc
 21061 ttgtactca ttgtctaaa gttctgaa actctctc actcaagaa gactctctc

Fig. 20H

【 20 I 】

21121 ataaactata aactatccc ttggtatgg ttgaaatgt ggggtacct atcaactgt
 21181 ctctctctc tagtgaata tgaactgta gtaactgta ctgtgtgtg tctctctctc
 21241 aagaagggg ttgatttga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 21301 taatgtact gactgtgtg ctgtctaga agcagctga actctctctc gttgtgtg
 21361 ttgtactc ttgaaaga ttctctag ttctctag gaactctctc ttggtgtg
 21421 tcoactataa gaagactat ttgaaactc gactcaaga aaagggaaa ggggtacct
 21481 aggtctctc ctcaagact ttgaaactc ttgaaactc gactcaaga gactcaaga
 21541 gactcaaga actatgta gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 21601 gaaagagag tagtctctc gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 21661 caactataa taktctgtt taktctctc gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 21721 taataaaaa cactctctc gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 21781 ttgtactc actctctctc taactata caaactcaaga gactcaaga gactcaaga
 21841 aactctctc gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 21901 caactataa gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 21961 gaaagagag actctctctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22021 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22081 ctgtctctc tttttctc aactctctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22141 aactcaaga cttttgaa actcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22201 gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22261 ctctctctc ttgtctctc gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22321 ttgaaacta actctctctc ttgtctctc aactctctc caaactcaaga gactcaaga
 22381 taactataa gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22441 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22501 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22561 ttgtactc gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22621 ttgtactc tttttctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22681 ttgaaacta gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22741 ctgtctctc gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22801 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22861 actctctctc gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22921 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 22981 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23041 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23101 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23161 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23221 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23281 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23341 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23401 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23461 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23521 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23581 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23641 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23701 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23761 caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga

Fig. 20I

【 20 J 】

23821 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23881 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 23941 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24001 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24061 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24121 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24181 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24241 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24301 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24361 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24421 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24481 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24541 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24601 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24661 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24721 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24781 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24841 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24901 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 24961 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25021 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25081 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25141 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25201 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25261 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25321 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25381 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25441 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25501 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25561 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25621 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25681 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25741 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25801 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25861 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25921 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 25981 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26041 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26101 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26161 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26221 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26281 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26341 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga

Fig. 20J

【 20 K 】

26401 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26461 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26521 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26581 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26641 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26701 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26761 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26821 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26881 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 26941 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27001 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27061 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27121 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27181 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27241 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27301 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27361 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27421 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27481 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27541 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27601 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27661 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27721 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27781 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27841 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27901 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 27961 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28021 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28081 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28141 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28201 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28261 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28321 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28381 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28441 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28501 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28561 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28621 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28681 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28741 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28801 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28861 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28921 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 28981 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga
 29041 gactgtctc caaactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga gactcaaga

Fig. 20K

【 20 L 】

29101 ggcctccggg tatagcggg tcaagcactg gggatgtctg tcccatatg ctcctgtgtt
29161 aagaagaana agotcctgg gaggagact cgttcaact taatgaact caoctaagc
29221 atcatgacag caagaattat ttgaagtct ctcgaataa aactgocct atatttcaat
29281 aaaaatgata ttggtatctt tagcaactta tttagtctt tttaaggtt caoctggatt
29341 taaaataat tggcaaatg tagcaactta tttagtctt tttaaggtt caoctggatt
29401 ttaataaact tttaaaact cctcaggag taataaactt aagcaaaa aaacacactg
29461 aaaaatgccc agtgcacag acagaaag caaatctac tttaacttt tttagtctt
29521 cttaaagccc aatgtctg cgtgaactt aaaaactct tttaacttt tttagtctt
29581 ggaagatgtt gttggcttca ctaactctt tttaacttt tttagtctt tttagtctt
29641 tagagcaat tttaactg ttgaactg gaaactgt tttagtctt tttagtctt
29701 cagtggcca taaaatgca gaaacaac taactcagc gctcgtgac ccttagcgc
29761 gctgttttag tttaaacag tgcctcctg ttcaaaact ctaagtgcac atgtagaact
29821 agtaagata gttatgtatg atactaaca caactgtaga gaacagag tatagatca
29881 caactgttgc atactatga acagagaga agctaatga atataagga tggactgtat
29941 gctgtatga gacttttgg taactgact ttgtctata ttgttgaag taaacacagc
30001 ttgcaatcat ctgcccocaa agtgaacta agaaactct acaggtact aggaagaa
30061 ggcacttggg aaaaagtgtt tatgtgga atgtttgac tcttatgat ttctttttt
30121 tttagtaca tacttcaat tcaactttt caactttt atactatct ggttttttt
30181 gttagcaagt aatttaagc cctcaatga agtgtctac atactatct gtttaaaat
30241 aaaaactct caaacaca agtagagtg gtagagact tcaactctt tttagcaagt
30301 caagtgagc cagtttgtt ggtgtgtgt cgtaatgaa ggtatgag ttgpcagac
30361 cctcaagtgt gagtgtat ttctcaata acagagagc aggtcgtgt agtgtgtgt
30421 tttagcaagt gttttttt agtgaaca agctcact ttgtctgt atgttaaca
30481 gggatgag gttattcttt atgtgaaca agctcact ttgtctgt atgttaaca
30541 atagcaact tccctgtgt gttcaactg ttgaactg gctcaact ttgtctgt
30601 cctatttggg gttactgt gttctgat ttgaactg gctcaact ttgtctgt
30661 ttgtgtgccc atataagca gttcactg ttgaactg gctcaact ttgtctgt
30721 ttgttatatt ctaaacctg agacactt aactgtgt ctggtgag cccacagcct
30781 agatgagc ctgctcctg atgtatgt tcaactct gctcaact ctgcaact
30841 ctggttaatt aatctact ctaactta gtaactg ttgaactg aggtgtgt
30901 gattgccc cctccaca tgaactttt actcctgccc ttccactg agccttttt
30961 gttacttggg aggtatct taactgtg gactgtgca atctcact cagccttttt
31021 atattgtgt gaaatatt cactcaaaa ctgctctc cagctgtg atatttttt
31081 tttagatba tcaactctt cctcctgga agttatct tttaaaat gatcttaag
31141 taactaat atagcaacta ggaatgact ttattatct agactctta cactttctt
31201 tttttaaa atactgtg taactgtg caactgtg taactgtg caactgtg
31261 aaaaactt tctctatct taactgtg taactgtg taactgtg taactgtg
31321 tttttttt caactgtg taactgtg taactgtg taactgtg taactgtg
31381 agtggagct ggtgtgaca gatbaact ttgctcct gactgtgct ggtcagaaa
31441 actgcaact ctgcaactg gttcactg ttgaactg atttcact aacacagcct
31501 agatgagc tcaactgt caactctt taactcaga acttagaac ctgactctt
31561 gtaagcaca ttgtcagc gattgccc gttcactg ttctcaata gaaagaaat
31621 gactcaca atgtgccc cctgactc ctgactgt acactatc aggtgtgtt
31681 aggtgctt cttatgtg agttatgt ttctbaac atgactct agttcaca
31741 tatataagt ttctgat. taactgtg. atagaaag gttcactaa tctactga

Fig. 20L

【 20 M 】

31801 agaaagctt ttttttttt ttgttttta ttgtaaat atgtaaat tttttotta
31861 actgagat tcaactgca taactgcca taactttta actgagat tttagctag
31921 aaggtgtt ttcttcaaa caaatttat taatacaa gacacagc tttaacag
31981 aatgtttg ggggataaa aatacaac tcaataa atattgtt gtttaacg
32041 tctatgaca acaacaaca caaaaagc ggggttgg ggggtgag ttattgca
32101 tctatgaca gttcttcca gaaaagc agtgaact cctcagct gactgtatg
32161 ttctgtat tacaacct atgtgaact ggtgtgac gcaacact gcaactgac
32221 acaactgac actcactc actctctgt cctcctgt ttcaactg agtgtgtt
32281 gcaagact ttcaagct gttatgca agtcaact gttcaact gttcaactg
32341 atgttatt ttcaactca agttttta agttttta agttttta agttttta
32401 taatattt cctgtctat atgtgtgt ttgtgttt ttgtgttt ttgtgttt
32461 tagattgac ttctcctca gttctcag cctcagac atgtgtgac ctgtaact
32521 agttctgt cctgtctac ttctctct caactgag caattatg atattgtt
32581 tcaaaact tttagtgc atacaaca caactcct caactcct caactcct
32641 tcaattta acactctt cctgactt ggtgtgag gttctatt ttgtctat
32701 gaatttga aataaaga ataaactt caactttt taagagat caactgtat
32761 ttgatacat cttcactt atttcaag tggcaagc ggggtgag ctaactgtg
32821 actaaactt agactact ttctcaat tattgttt agtgaaa actaatat
32881 agtgtgct agaaagca ctgaactca gactgact actcctat gactgatt
32941 ctgctcag ttctcaat caactcag caactcag caactcag caactcag
33001 taactatg aagatatt taagctgt taagctgt taagctgt taagctgt
33061 ttataact tttagctt gttcctgt gttcctgt gttcctgt gttcctgt
33121 ggaacact tcaactga ggggtgtt ttgtttta ttgtttta ttgtttta
33181 ttctctgt aaaaactt ctggtcgc cctcctgt cctcctgt cctcctgt
33241 ttggtgag ctggtgag gttcactg gttcactg gttcactg gttcactg
33301 ctgtgact cctgtctc taataaca aaaaactg ggtgtgtt ggtgtgtt
33361 ttgtgccc gactcctg aggtcctg aggtcctg aggtcctg aggtcctg
33421 ctgtgtga gcaactca caactcag cctcagct cctcagct cctcagct
33481 tcaaaaaa aaaaaaag aaaaactt cctcctgt ttctctgt caactgtg
33541 ctttgggg aagtaact ataaact ctcaacta agcaactt ggtattatg
33601 gattgagc ttgtgatt gaactgag gaaacttt taataata aactcaaca
33661 gaactgag gctcctgca agtctgct atctctt ttctctt tttaagca
33721 actgtaaa caataaag gaaagata gaaagata gaaagata gaaagata
33781 ctttggca ataaaga ttgtgtgt ttcaagat tttaata ataaaga
33841 caacttat ttatttgg atcactga cactatct tcaactta caactttt
33901 tcaagttg atctcaaa gataactg aaactcag actcaact caactttt
33961 agttcaga atgtatct ttgtctgac gtaactgt taactgtt taactgtt
34021 aatagata atattgct cctggtgt atctcag taattatt tttaagc
34081 ttctattt taactcag ttattttt ttgttttt gttcactg ttactgtt
34141 ttgtgaga gaaactga atactgt ttgtgttt gttgtgtt ttattttaa
34201 gtaactgt ttgtctct gttctact gattgat tttaata ctactgtt
34261 caagataa gttcactg atcagaat ctgtcag tttaagaa ctgtgtgt
34321 gaaagact ctaagact caactcag aaggtaga ttgtgaga ttgtgaaa
34381 gaaactgt atagatgt gtaactca gaaactgt atgtgtt ttgtgtt
34441 actgagta actgtgac agtgcagc ttgtgagc caactgtt atctgaga

Fig. 20M

【 20 N 】

34501 cctgtggt ttactgccc ttgactgta taactctt ctgtgact tctcaagc
34561 agtgcaca taactgtt tcaactgt atctgccc cctcctcc ctgcccac
34621 acaataagc taactttt aaaaatgca aactcctc atagtatt taattctgt
34681 tctctctt ttcccaag actgtgca caattatt gtaggttt ttgtgctt
34741 cctgtctc atctctgt cagtcagc caataatg ttcaacta gaattgtt
34801 ttctcact attagcacc ttgtgact gttgtgct aaaaagcc agatgtgt
34861 gttgagct agctctgt gactcagc gttttttt gaaactga ttgaaagt
34921 gactactt tctctctt ggggtgct taagaagc agcagaat atctgtgc
34981 tcaactgt ctttaact actcaact ttcttttt ttcaacta gatacact
35041 atactctt cagtcaca gactcaga taagtatg ttcaacta ttgcaactg
35101 cagatgag ctgtgctt taactgtg ttgcaact ttgactgt ttgcaactg
35161 gaaacttt gttgagct atctctcc caactgact ttgactgt ttgcaactg
35221 gttgactt ctactact ttcaactg gttgccc ttgcaact ttgcaactg
35281 aaggtgta aatgtctt gttattat taactcct ttcaactg atagcaat
35341 ttctgtta tttaaat ttgaaact attttttt ttgcaact gaaactga
35401 atctgtgca taaactgt tttaacta ttgttttt ttctctgt atgataat
35461 ttgtatca tttagtag aactatga ttgtgctg attagtca gttgactga
35521 agatacaag aaaaactg taactgaa taactatc ttctctct ttctctct
35581 taactcag cactcact aactgaca gaaactat ttgcaact ttctctct
35641 ttgaaatga tttttttt caactgag caactctg ttattttt aactgaca
35701 ctgaacttt cagactct ttgtgact ttgagaga atcagaat taactgtt
35761 gttttttt aggtctgt gcaagagc agtataat ggttagag actttttt
35821 tttagctg tcaactga aggggggg ttgcaact cactcaga atctctct
35881 gttgagtt tttagagc ggaagag ttgacttt ctggtgag actcactc
35941 atactgta aatgactg agttatct taactgct ttactgta agttcaact
36001 ctgacttt agttatcc actgtact atgtttaa actgtgat gcaactga
36061 taacttca cctatgca aactctcc ttggttaa gttactga tttaactg
36121 cctttata gcaactag atgtgact ttatttat attagtgt aattttag
36181 taactcag taactgct aactgact ttacttaa aggaagaa gaaactgt
36241 gaaataga gaaactgt ctgactag actgtcag caactttg tcccaactg
36301 gcaagcacc tcccaaac agcaactg ctgctcct agagaact caaagagc
36361 ctctgtga tttttttt tcaactga agactgat gttctctt tcccaactg
36421 tttttttt acaactga ataaactt ttctctct aaggtgaa agcacttt
36481 ttctctga caactgct cctcactg ttctatgt ttgtgttt aactatga
36541 tcaactga attttaac tttagagc ttcaactgt gttgagc actcactc
36601 gtaactgt ggggtgag caaaagca tttagtca gaaagcact ttcaactga
36661 ataaagaa aaaaactg ataaagca actgtgtg ctctcctt gaaagagc
36721 agtcaact cgtttctc cctgagca gactgtca atctatc caagtact
36781 ctcaactg ctgttttt ttctgact taacttaa ttgttttt ttgtgttt
36841 aatctgag ttgttttt taactgact taacttaa actctgtt tctcctct
36901 ttctctgt ctgctcct cactcact ttgtatct ttctgttt gttgaaat
36961 tttagcaca aagactgt taactcct ttgactga ctcaactg gttactgt
37021 agttgtgt ctactgt tttagtct tttagtct ttgactga aaaaactg
37081 gttcaact gattgaga acaactct tttaactt agcagta gactcagc
37141 cctcactt ctctctat gcaactat ctaacttt ttgaaact aatgaaa

Fig. 20N

【 20 O 】

37201 atctcaaa ataatgaa gattatgt ctgctgaa atgtcaga atagactt
37261 gctataga actatgct tgaagcct ggggaaag gactttta attagtca
37321 caatttga ggggaaa ggaagagc agaatgaa actcaaaa actcaacc
37381 ggggctgt gttggtgt gactgggg aggtatga ttgactga taactaat
37441 aatgagag ttcaactg cagcaca caactgca actatca tttaacta
37501 ctgactgt ttcaactg caactgca taactgca taactgca taactgca
37561 caactaat aactaaa attttttt ttcaacta gttcacta tttaactt
37621 tttttttt taactgt ttgactgt ttctactt ttcaacta tttaactt
37681 caactga ctgtgct ttcaactt ttcaacta ttcaacta tttaactt
37741 ttgactgt cctggaaa atttcaac agttcaga gattgagc caactgtg
37801 actgact tttagagc actcagca gcaactgt actatgca actcagca
37861 gttgttt ttgaaaag agtaacta agttacta agcaca actcaaaa
37921 taactgct taactgta gtaacta tttaggca agtaactt caactaaa
37981 ttcaacta actgtgtt ttcaactg ttgaaaac acaactca attagaga
38041 ttgtttgt atttttt caactgaa caactctt ttcaactt ttcaactt
38101 agtttcaa gcaactgt ttcaactg gtaactgt gtttaact gtaactgt
38161 atagaaa cttgtctt ttgcccct taactgag gaaactgt gttactgt
38221 tcaactct ttctctct ttgactgt actatgaa taactgt ttcaacta
38281 gtaactgt caactctt ttcaactg actatgag actatgag actatgag
38341 ttcaacta gcaactgt ttgtttta atagacta gttgtgaa aaaaactg
38401 gtaactgt taactgt ctgctctt ttcaactt caactgt ttgactgt
38461 taactgt ttcaacta gaaactgt gtaactgt gtaactgt gtaactgt
38521 gcaactgt caactgt ttgactgt gttgtgag cctcacta gcaactgt
38581 ttcaacta gaaactgt ttgactgt gttgtgag cctcacta gcaactgt
38641 gttactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt
38701 ttctgata cttaga atgactgt ttcaacta gcaactgt ttgactgt
38761 cctgctgt agttttaa gaaactgt gttactgt gttactgt gttactgt
38821 tttagaga gaaactgt agtgaga gaaactgt gaaactgt caactgt
38881 gaaactgt taactat ttgtctt ttgactgt caactgt taactgt
38941 tttagaga ttcaact ttatttat gactcact aactgaga ttgactgt
39001 gaaactgt ttcaacta taactgt taactgt taactgt taactgt
39061 taactct tttaact ttctctt ttctctt ttctctt ttctctt
39121 caactgt ttcaacta gaaactgt taactgt taactgt taactgt
39181 ttctgaaa ctgactgt taactgt taactgt taactgt taactgt
39241 ttatttaa taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt
39301 ttgactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt
39361 gaaactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt
39421 caactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt
39481 gaaactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt
39541 taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt
39601 taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt
39661 aaaaacta gaaactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt
39721 caactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt
39781 taactat ttcaacta aactgt taactgt taactgt taactgt taactgt
39841 aactgact taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt taactgt

Fig. 20O

【 20 P 】

39901 gctcaagctt ctaaacctct gaataacta gtataacat ttgttttaa aagaaaatt
39961 atattctgtt attocacagt aotttgata aagactotta tttcattgt tattcaatg
40021 tggtagaata tatatgcagc toctaagct agatattgt agtctctgt gcgtaatta
40081 atcatttgtt ttatcatag atgaagctc tctgtgata accaggaata aagatocaa
40141 aagactgtaa gaactagag ctgtacaaa tggaaagct tgacaacaa gtccottgt
40201 aaacccaat ccaggtataa cagatgac ttgtgtgat gggctctgt ggtaccact
40261 tcttagtagt atctaaag gttagggaga gctcaaaag tctaaocag tttaggatag
40321 ctggagttta cagtgatag aactcttgc tgcctatga tctattata ttactaata
40381 taagacaaa atactctct coalgaga tcatgattc aaaggttag agttatag
40441 ctgtagtgc agtattag aactactgt ttaggocaaa gtttcatgt gctgcaatt
40501 tacaagcty gttgtaact ccagttaaa gctgtgtta agtattatg aattatgtg
40561 ctatctctc atcaattat atcaagca cagaggttt aatgtatct ottotaatt
40621 ttaaatgta aatttttaa atctgata atagtatt ttccaggtgt tatogttatt
40681 ttgtttttaa ttctcattt aaagaaaat ataaacag tctctgcaa aagttagaa
40741 taacagata aatgtctgt cgttgaact ogtttttta aagctctgt aaaaatagt
40801 tctgtattt ttacactgt aatgaagct ttatagata gctgttagc agacatcag
40861 agttttgtt taggtattt gttgtctgc ttgtctgtg tgcasaatta tctgtctag
40921 caatattca tcccttcca agatcaag aggaagttg ttattttaa otttcaata
40981 caagattgt caaatctgt tgaacaact ataatggt aatataatg tgcagggag
41041 ttttttagt cttaacttt ggttggag tctgtctgt gtagagctt ctgcgctt
41101 ccaatattt tttaggtta atcaataa taacagag ttacagctg aactttctc
41161 caggccctt cactctctc gctgtcaga gctgtatgt tctgcagga ggcaggtct
41221 thttttaga ggcagcct tgaagttt gcatgaaat ccttttcca aggagggcg
41281 aagagcaata ccaataaac gctacact gactggaga attgccact tcccttttc
41341 tccctgctg ctgcccag ctggtgaca cgggttaga gatgaaga gatacaggg
41401 tggctgctc cagactctg tctctgtgt gataatagt aaaaagaa cctctggtc
41461 tggaggtta ggaagctc tctagatg actctcatt tccctttgt ttgagctct
41521 agcaggtta ttggcagc aagctcaga tctcttag taataagct ggttatttt
41581 tcaactttt aaggtcata aagcagct gctgctgct ggcagcagt aactatctt
41641 gactttttt gctctcgt ctgaggttc tagcacagc ggcacagc cggcaattc
41701 gggaaacaa atctctggt cagaggtgc attattgca gggattgct caggtgcat
41761 ctctctctc gctcctca tgaagctgt ggcctctg ctgagctc gggagaca
41821 caggagctc tgcctgca aacacaaa gctgtgctc agcactgt ccaacaaa
41881 ggcagggc acaacaaag gctcagcag cagtcaat atactcgc taagcactg
41941 ggcagctc tctgctca actagaga gctcagcag gactcagc acccgtgta
42001 ctctctcag agatgccc cgaagccc ggcacatt tactcaag tttagaggg
42061 acctctgct tctctgct tccacagc aactcaat tccagctc tcccttagg
42121 gttttagag cctgctctg gaaattgac tgaagcaag caccgggga ggggcaact
42181 cctctctga agcctctc gctctgca gcttactag tctttaga ttggcctg
42241 gtagaacaa agctctctg gaagctgaa cagctgca aagaocca ttggactg
42301 tctgctctc cctctctc ctctctgaa cctctgct cgtcctca gctctgca
42361 gaagcaag gaagcagct gttttagc gaagctct tgaactct ggcagctgc
42421 cagagctc agcctgaa ggcctgct ctgctgct tgcattct cctgctgca
42481 cagcactt gcaacgga ctctgctc gtaagctg caaagctt ctgagttta
42541 gctctctg tctctctg tctctctc agcctctg gcaactct ctgagctc

Fig. 20P

【 21 A 】

EphrinB2, mRNA
1 ggcggagct ggggtgct tgcctgca tggtagaag gactcctgt ggaagtact
61 ctgggtgtt ttgatgct tagcaaac tggattctc aaactgatg tttagagac
121 tctctctgt attctcga actcaaat tctactgga caagcagct caataacc
181 acagatgga gacaattg atattattg tcaaaagtg gactotaaa ctgttggca
241 gtagaata taaaagtt atattgttg taaaagcca cagacagat gcaatttaa
301 gaagaaaat accctctc tcaactgt caaacctga ttcaagata aactcactt
361 caagtctca gaattcagc ctactctgt ggttttaga ttcaagata acaagatta
421 ttactata tctacata atggttct ttgagctgt gataacag agggagggg
481 gtagcaga agcctcga agctctct gaaagtga caagctga caatggag
541 atcaacag aataagtc caacagcc tccagacta caagctgta caatggag
601 aagttgca acaagctt cttaaaac aaactcag tctagcagc agcgaacag
661 cgcgcagct tggggaaca acatctgt tcccaagtg gcttattg cagggattg
721 tttagatg atactctca tctctctc ctacagct ggttctct ttgttagta
781 cggcagga cacagagc actctcga ccaacagc acgctgtgc ttagcaact
841 ggcacaccc aagcagc gcaacaaa cggctcagc cccagtaca ttactctc
901 gtaagact ggcagagc tctctgccc tcaactagc aagctcagc ggcactagc
961 gcaacggct tacatgct aggactgc cccagcagc cccgcaaca ttactaca
1021 ggtctgag gaccctgt gtaactgt ctctcaga ggaactaa tgcctcag
1081 cctcctgga ggttttga gcccgtgc tggagaatt actgaagc agcaaggg
1141 gagaggaa cctctctc gaagcctg tccctcaga cagcttaact agtcttag
1201 cactgctct tggtagaac acaactcc ttgaagctg aagactgtc agagaccc
1261 cactgact gctgtgct caactcag tctctcga agcctcag ttagcctct
1321 cagcctctc cagaacaa ggaagacag tggttgtg acagagggc ttgtagcct
1381 ctggcaggt cccagctg caagcctg aagggcggc ctgctctg ggtgcaatt
1441 cccagctg cactcagc tctcagc gactcggc tagttaagt gtcgaaagt
1501 cttagagtt tagctctc tctctcag gctctgtc ttctctgt ggtgcaatt
1561 actgagac tcaactca atctcaga ctactgaa actactgt ggttctct
1621 cctcagcc ctggcaaca cagctcag caatggtaa tctctca gaaattgt
1681 ttgtaaca ggtgctct agccagct tagctctct ggaagaag cttaggctc
1741 atagaagga gtaggctg gaaagggc gctgcaat gcaactct gctgctct
1801 ctgaacaga aagtggaa gaaaaaga aaaaagca taggtgac agcactgtg
1861 tttgtctg atcgaagc cagtagag acacagct acacagct gattccagt
1921 cagggggc cactctgt tacaatag cagtgtcag gaagaagc cctctctc
1981 tccgggaa saagcggg atgttggg aagaaacag ctggaggga agggagaa
2041 taggcctg atgatatt cggcagac ttgtgtgta ctgcaata gatacagc
2101 tccagctg agagctg gctgcttt gatgatttt taagcact cagctgctt
2161 acttaaca ttatttaa cacaggaa gatttaga gaatgaga gacaaact
2221 gcaactaaa gtagaaag caaggtca attcactc atctctct cactctctt
2281 ataaagat cttatctt aaagctag tcaatctc cctccccc gttctctt
2341 cctcctga ttgacctc agactctg gtttatgct gctgtctg gtagcagc
2401 tggagctg tctctgct agctcagc gaagtaat atgatgca gggggagag
2461 tccagcag cttctagct cctcagc agactaaa ggaataaa gggggagag
2521 gaagtaga gttattca atagatat agacacag ggaataaa gaaagatt
2581 tctaatat atttttag gtagcaaa gtacacaa gaagatgaa aattcattg

Fig. 21A

【 20 Q 】

42601 cactcaact ctgcaactc catggaacc tcatgtctg agtccctcc tccagcctc
42661 ggaacaaca gctcagctc atggtaact cgttcatga aatgtgttt gatacaag
42721 tgcctttag ccagatgctc ggtctctgc gaagaagct agagttcat agaagggat
42781 gggctggtg aaaggtgctc ctgcaactc agtcaactc tctgctctc gaacagaa
42841 gttggaag aaaaagaa aagcaata ggtgacag cactttggt ttgctgagat
42901 cgaagggcc agtagggac agcaagcc acacagtg ttctgtgca tggggggca
42961 ctgctgta tcaatagag atgtagga agaaagcc ctctctctc cgggaaca
43021 agcaggtat tgttggaa ggaagctg tgggggag ggaagata gctgctgt
43081 gttatctg ggcagact tgtgttat gcaataga tacaagct cgtgtgtg
43141 gtagctgt ctgcttga tgttttta agcagctc gctctatc ttatctct
43201 ttataaaca cgggaaag atttgaga atagcaga gcaaatctc actaaagt
43261 tgaagaga aaggtcaac aggtgta tcaatca tctgttat taagaatc
43321 ttatctata aagtaggt agtccctc ccccccag tctctctc cctcagat
43381 gagcttag acactgtt ttatgctg ctgctgct gcaagctc caggtctg
43441 actgtagc gctgagcc cgtgctct gttcaggt gaagcaca cgcagactc
43501 cttagctc taaagcga agtaaat gatgtcag gggagaga agtagagc
43561 tattataat agttatag acaaggg atataaat aagattttt actatatt
43621 atttcaagt tgcacagt acaccca agctgtgaa tctctctg gaaatagt
43681 ggtccatg ctgagctt aaaaaca atggcagc tctctctg aaaaaca
43741 tctctcaa aagcaata agtagca atcaaat accaagct cctgagga
43801 tctcagaa cgttagca ggcagcga gcccacaa gcaagcag gctgtgct
43861 ctctatat ttaacatg caagcttc cggcttat ttctgctg gttttctc
43921 tctctctg gtagaggt tctctga

Fig. 20Q

【 21 B 】

2641 tggcaatta ggtgctcaa tctcagcc ttaaaaaa aattggca gctactctg
2701 gaaanaaa cacttcca aaagaaca taatggag aatggctaa ataaccag
2761 cctcagag cactcagc accgttag tagaagtc tagaagca gacagag
2821 cctgctgac tgcataat attcaaat gacagagt tccgctctt atctctgt
2881 tgggttttc ctgcttat ggtgtagt gttctata actcagag taactctg
2941 ggttcagc gacttagt ctgtgctc ctctctgt cctccccc accctctc
3001 tctgggaa caagaagt aacagaaa cctatttt atgtctg caaatgag
3061 actttaa taactgct actatgta cactttgt tctgattg aaggaaaa
3121 aatgtagc acagcttt aggttcca gactcact gactcact aaaaagt
3181 tctcagaa attagctc tctattct gaactgaa atgattgt tccagctc
3241 gttgtgta gttgtagg gctgctga tactgtga actatgta taatata
3301 ctacataa tattataa atctata ttttctgt gactttgt atgtaaca
3361 gcaacgac atagtatt cttctcca ccccaact gctctctg gactctag
3421 aaggttct tgaagcct cagaagta ttttaggt ggggaggg ggcagagc
3481 gaaaaagg aatagctc atttaaga aatcaatg atgtatct agttgctc
3541 gtttggct tctgtaac tgttaaat cagatgaa gataaag tccctgca
3601 caactgaa agtctctg gctctggt ttgtctgt gcaagatg aactctc
3661 actgctct ttgttagg ttgttagc ttggaaat tactgaa cctgctct
3721 tagctctc cctgctcc gactttag atttgca ttctgca tctgtaga
3781 gtaaatag ttagcttt actctatg gaaagggg cttctctc cctattc
3841 cttttaa aaaaaca tgaacaa agtaaggt gttctctc actattg
3901 tcaatagc aatgtggt tttataag tcaagcag atgtttga taaatctg
3961 atttgca gtattagt acagctgt taagcagc gtaactccc ttgcaact
4021 atgggaaa aatgata aagttgca aatgtctg atttctg ctgattctg
4081 taccatga atttatga aatgtctg tcaattgt aagtaaca gtaattgca
4141 tagttata atttttt cttctctg ttatttaa tctctgca tagtttaa
4201 actctgta gttcactc gacttagc ccaagaa aactcctga agctatc
4261 cactctgt tcaactaa ttgttcta aaaaaaaa atttttt cctatgaa
4321 aaaaaaaa aaaa

Fig. 21B

【 図 2 2 】

E p h B 4 前駆体蛋白質

```

1 melrvllcwa slaaaleetl lntkletadl kwvtfpqvdg qweelsglde eqhsvrtyev
61 cdvqrapgga hwrltgwvpr rgavhvyatl rftmleclsl pragrsccket ftvfyyesda
121 dtataltpaw menpyikvdt vaahltrkr pgaeatgkvn vktlrlgpls kagfyfafqd
181 ggacmallsl hlfykkcaql tvnltrfpet vprelvvpva gscvvdavpa pppsplycr
241 edgqwaepv tgscapgfe aaegntkcr aaggtfkpls gegscqpcpa nshantigsa
301 vcqcrvyfr artdprgacp tppsaprsv vsrlngsslh lewsaplesg gredltyalr
361 crecrpggsc apcggdltfd ppprdlvepv vvvrglrdpf tytfvltaln gvsslatgpv
421 pfepvnttd revppvavdi rvtrsspsl slawavrap sgavldyevk yhekgaepps
481 svrflktsen raelrglkrq asylvqvrar seagyppfgq ehhsqtgld eegwreqlal
541 iagtavgvv lvlvvivav lclrkqsngr eaeydkhgq ylighgtkvy idpftyedpn
601 eavrefakei dvsyvkiesv igagefgev rgrlkapggk escvaiktik ggyterqrre
661 fileasingq fehpniirle gvvtnsmpvm iltefmenga ldsflrindg qftviqlvgm
721 lrgiasgmyr laemeyvhrd laarnilvns nlvckvdfg lsrfleens dptytsslgg
781 kipirwtape aiafrkftsa sdawsgyvm wevmsfgerp ywdmsnqdv iaeqdyrlp
841 pppdcpstlh qlmldcwqkd rnarprfpqv vsaldkmirn paslkivare nggashpild
901 qrpghysafg svgewlraik mgryeesfaa agfgsfelvs qisaedllri gvtlaghqkk
961 ilasvqhmks qakpgtpggt ggpapgy

```

【 図 2 3 】

EphrinB2

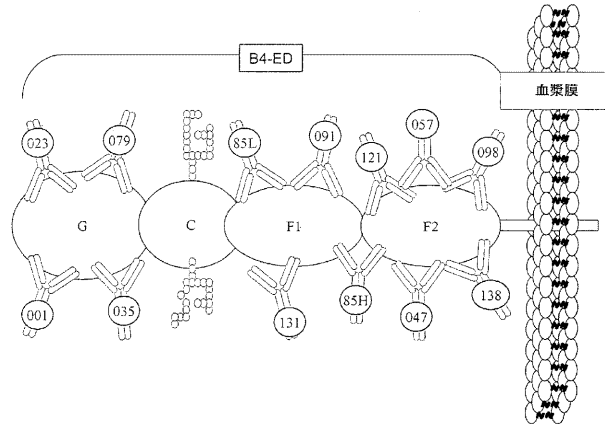
```

1 mavrrdsvk ycwgyimvlc rtaisksivl epiyvmsns kflpgqglvl ypqgdkldi
61 icpkvdaktv gqeyykvym vdkdqadrcr ikkentplln cakpdqdkf tikfgefepn
121 lwglefgknk dyyiisteng slqgdngqg gvcqtramki lakvgqdas agstrnkdp
181 rrpelagnt grestspfv kmpgostdg nsaghsnmi lgsevalfag iasgciiifv
241 iitlrvlll kyrrrhkhs pqhlttlls tlatpkregm nngsepsdii iplrtadsvf
301 ophyekvsd yghpyivqe mppqspaniy yk

```

Fig. 23

【 図 2 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/US2005/034179

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
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) C12Q		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, FSTA, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CROMER A ET AL: "Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis" ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, vol. 23, no. 14, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 2484-2498, XP002332018 ISSN: 0950-9232 abstract figure 3b	3,6,7, 9-12,22, 24, 26-29, 56,58,59
X	WO 2004/024773 A (THE QUEEN ELIZABETH HOSPITAL; STEPHENSON, SALLY-ANNE) 25 March 2004 (2004-03-25) examples 1-3 page 19, lines 3-7	1,2, 35-37,61
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
E earlier document but published on or after the international filing date		
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
Z document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 June 2006		Date of mailing of the international search report 03/07/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Leber, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/034179

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2004/080425 A (VASGENE THERAPEUTICS, INC; KRASNOPEPOV, VALERY; ZOZULYA, SERGEY; KERET) 23 September 2004 (2004-09-23) claim 60	61
A	SINHA U K ET AL: "EXPRESSION OF EPHB4 IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA" BAR, NOSE, AND THROAT JOURNAL, IGP, CLEVELAND, OH, US, vol. 82, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 866,869-870,887, XP008057978 ISSN: 0145-5613 the whole document	
A	SANTA CRUZ: "EphB4 (N-19): sc-7285" PRODUCT CATALOG OF SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, April 1999 (1999-04), XP002362439 the whole document	
A	BERCLAZ GILLES ET AL: "Loss of EphB4 receptor tyrosine kinase protein expression during carcinogenesis of the human breast." ONCOLOGY REPORTS. 2002 SEP-OCT, vol. 9, no. 5, September 2002 (2002-09), pages 985-989, XP009067428 ISSN: 1021-335X the whole document	
A	TAKAI N ET AL: "EXPRESSION OF RECEPTOR TYROSINE KINASE EPHB4 AND ITS LIGAND EPHRIN-B2 IS ASSOCIATED WITH MALIGNANT POTENTIAL IN ENDOMETRIAL CANCER" ONCOLOGY REPORTS, NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION, ATHENS, GR, vol. 8, no. 3, May 2001 (2001-05), pages 567-573, XP008057981 ISSN: 1021-335X the whole document	
A	YANG D C ET AL: "GENE TARGETS OF ANTISENSE THERAPIES IN BREAST CANCER" EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS, ASHLEY PUBLICATIONS, LONDON, GB, vol. 6, no. 3, 2002, pages 375-385, XP008054424 ISSN: 1472-8222 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/034179

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CAPLEN N J: "RNAI AS A GENE THERAPY APPROACH" EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, ASHLEY, LONDON, GB, vol. 3, no. 4, 2003, pages 575-586, XP008055014 ISSN: 1471-2598 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/034179

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-55 and 61 are comprise a method of treatment by surgery of the human/animal body, the search has been carried out on the method as such.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International application No

PCT/US2005/034179

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004024773 A	25-03-2004	BR 0314369 A	09-08-2005
		CA 2499130 A1	25-03-2004
		CN 1694902 A	09-11-2005
		EP 1546205 A1	29-06-2005
		MX PA05002894 A	05-10-2005
WO 2004080425 A	23-09-2004	AU 2004220459 A1	23-09-2004
		AU 2004220525 A1	23-09-2004
		CA 2518898 A1	23-09-2004
		CA 2518912 A1	23-09-2004
		EP 1606305 A2	21-12-2005
		EP 1605961 A2	21-12-2005
		WO 2004080418 A2	23-09-2004

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02		
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A	

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

(72) 発明者 パルカシュ ギル

アメリカ合衆国 9 1 3 0 1 カリフォルニア、アグーラヒルズ、クレストハーフェン セントラル 2 9 4 2 0

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA03 CA09 CA12 CA20 HA11 HA13 HA14 HA17
 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QQ43 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR35
 QR40 QR42 QR48 QR55 QR56 QR62 QR84 QS16 QS25 QS33
 QS34 QS36 QX01 QX02
 4C084 AA02 BA01 BA22 BA23 DC50 NA14 ZB261
 4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26

专利名称(译)	用于检测和治疗肿瘤的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2008514925A	公开(公告)日	2008-05-08
申请号	JP2007533654	申请日	2005-09-23
[标]申请(专利权)人(译)	瓦斯基因治疗公司		
申请(专利权)人(译)	Basujin Therapeutics公司		
[标]发明人	ラマチャンドラレディ パルカシュギル		
发明人	ラマチャンドラ レディ パルカシュ ギル		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61P35/00 A61K31/7088 G01N33/574 G01N37/00 C12Q1/02 C12Q1/68 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/57484 C12Q1/6886 C12Q2600/112		
FI分类号	G01N33/53.M A61K37/02.ZNA A61P35/00 A61K31/7088 G01N33/574.A G01N37/00.102 C12Q1/02 C12Q1/68.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA03 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR84 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26		
优先权	60/612861 2004-09-23 US		
其他公开文献	JP2008514925A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在某些方面，本发明提供了用于检测测试细胞中EphB4基因的组合物和方法。在某些方面，本发明提供用于评估患有或怀疑患有肿瘤的受试者的肿瘤（癌症）状态和预后的方法和组合物。

