

(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2013-530934

(P2013-530934A)

(43) 公表日 平成25年8月1日 (2013. 8. 1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/713 (2006. 01)	A 6 1 K 31/713	4 B 0 6 3
A 6 1 K 35/76 (2006. 01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-507865 (P2013-507865)
 (86) (22) 出願日 平成23年2月21日 (2011. 2. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年10月29日 (2012. 10. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2011/001125
 (87) 国際公開番号 W02011/136469
 (87) 国際公開日 平成23年11月3日 (2011. 11. 3)
 (31) 優先権主張番号 10-2010-0132775
 (32) 優先日 平成22年12月22日 (2010. 12. 22)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 61/328, 686
 (32) 優先日 平成22年4月28日 (2010. 4. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506376458
 ポステック アカデミー・インダストリー
 ファンデーション
 大韓民国, キュンサンブクド, ポハ
 ンシティ, ナムグ, ヒョジャード
 ン, サン 3 1
 (74) 代理人 100090033
 弁理士 荒船 博司
 (74) 代理人 100093045
 弁理士 荒船 良男
 (72) 発明者 リュウ, スン ホ
 大韓民国, ギョンサンブクド, 7 9 0 -
 7 5 1, ポハンシ, ナムグ, ジゴク
 ドン, 7 5 6, ギョス アパートメント,
 5 - 2 0 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結合組織成長因子を用いた薬学的組成物

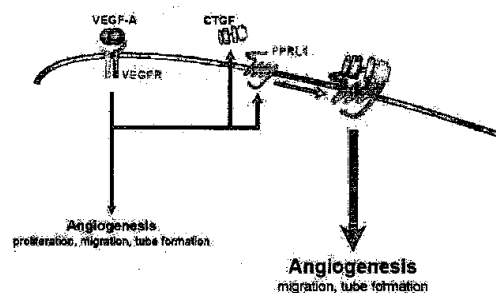
(57) 【要約】

【課題】本発明は、結合組織成長因子を用いた血管新生関連薬学的組成物に関し、前記結合組織成長因子を含有する血管新生促進または結合組織成長因子に結合するポリペプチド、抗体および化合物からなる群より選択されたものを含有する血管新生抑制用薬学的組成物に関する。

【解決手段】本発明で明らかにした結合組織成長因子蛋白質の断片は、F P R L 1 と結合する部位で、F P R L 1 に特異的な E R K リン酸化を効果的に誘導し、F P R L 1 を活性化して細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させ、最終的に血管生成を効果的に誘導する活性があり、これにより、結合組織成長因子蛋白質の断片は、血管新生促進用薬学的組成物に有用に使用でき、反面、前記結合組織成長因子蛋白質の断片と結合するポリペプチド、抗体または化合物は、血管新生抑制用薬学的組成物に有用に使用できる。

【選択図】図 2 9

【図 29】



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上のアミノ酸からなる結合組織成長因子蛋白質の断片またはこれを暗号化する遺伝子を有効成分として含有することを特徴とする、血管新生促進用組成物。

【請求項 2】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個～39 個のアミノ酸からなるものであることを特徴とする、請求項 1 に記載の血管新生促進用組成物。

【請求項 3】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 5 または配列番号 6 のアミノ酸配列で表示されるものであることを特徴とする、請求項 2 に記載の血管新生促進用組成物。

【請求項 4】

前記遺伝子は、配列番号 7 または配列番号 8 で表示される塩基配列を有するものであることを特徴とする、請求項 1 に記載の血管新生促進用組成物。

【請求項 5】

前記遺伝子は、ベクターに挿入されたものであることを特徴とする、請求項 1 に記載の血管新生促進用組成物。

【請求項 6】

配列番号 3 および配列番号 4 を含む F P R L 1 (f o r m y l p e p t i d e r e c e p t o r - l i k e 1) の小さい干渉 RNA (s i R N A) 。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の s i R N A を有効成分として含むことを特徴とする、血管新生促進用組成物。

【請求項 8】

請求項 1～5 および請求項 7 のいずれか 1 項に記載の血管新生促進用組成物を有効成分として含むことを特徴とする、狭心症、動脈硬化、脳卒中、脳血管性痴呆、慢性潰瘍、または創傷の予防または治療用組成物。

【請求項 9】

配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上のアミノ酸からなる結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するポリペプチド、抗体、および化合物からなる群より選択された 1 種以上；または

前記結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子の mRNA に相補的に結合するアンチセンスヌクレオチド、小さい干渉 RNA (s h o r t i n t e r f e r i n g R N A 、 s i R N A) 、および短いヘアピン RNA (s h o r t h a i r p i n R N A) から構成された群より選択された 1 種以上を含有することを特徴とする、血管新生抑制用組成物。

【請求項 10】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個～39 個のアミノ酸からなるものであることを特徴とする、請求項 9 に記載の血管新生抑制用組成物。

【請求項 11】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 5 または配列番号 6 のアミノ酸配列で表示されるものであることを特徴とする、請求項 10 に記載の血管新生抑制用組成物。

【請求項 12】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子は、配列番号 7 または配列番号 8 の塩基配列を有するものであり、前記アンチセンスヌクレオチド、小さい干渉 RNA (s h o r t i n t e r f e r i n g R N A 、 s i R N A) 、および短いヘアピン RNA (s h o r t h a i r p i n R N A) は、前記配列番号 7 または配列番号 8 に対する mRNA の連続する 15～30 個の塩基からなる塩基配列に相補的に結合するものであ

10

20

30

40

50

ることを特徴とする、請求項 9 に記載の血管新生抑制用組成物。

【請求項 13】

請求項 9 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の血管新生抑制用組成物を有効成分として含有することを特徴とする、癌の成長および転移、リウマチ関節炎、乾癬、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎臓病、高血圧、子宮内膜症、脂肪症、未熟児網膜症、角膜移植拒否、新生血管緑内障、増殖性網膜症、血友病性関節、ケロイド、傷顆粒化、血管接着、骨関節炎、クローン病、再発狭窄症、アテローム性動脈硬化、腸管接着、潰瘍、肝硬病症、糸球体腎炎、悪性腎硬化症、器官移植拒否、腎糸球体病症、糖尿病、または炎症の予防または治療用組成物。

【請求項 14】

(a) 配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上のアミノ酸からなる結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子を含む細胞に候補化合物を処理するステップと、(b) 前記遺伝子の発現程度を測定するステップとを含み、

前記候補化合物を処理した細胞の遺伝子の発現程度が候補化合物を処理していない細胞に比べて減少した場合、前記候補化合物を血管新生抑制剤として決定することを特徴とする、血管新生抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項 15】

前記 (b) ステップの遺伝子の発現程度は、免疫蛍光法、酵素免疫分析法 (ELISA)、ウェスタンブロット (Western Blotting) および RT-PCR からなる群より選択された方法で測定するものであることを特徴とする、請求項 14 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 16】

前記血管新生抑制剤は、癌の成長および転移、リウマチ関節炎、乾癬、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎臓病、高血圧、子宮内膜症、脂肪症、未熟児網膜症、角膜移植拒否、新生血管緑内障、増殖性網膜症、血友病性関節、ケロイド、傷顆粒化、血管接着、骨関節炎、クローン病、再発狭窄症、アテローム性動脈硬化、腸管接着、潰瘍、肝硬病症、糸球体腎炎、悪性腎硬化症、器官移植拒否、腎糸球体病症、糖尿病、または炎症の予防または治療に使用するためのものであることを特徴とする、請求項 14 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 17】

配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上のアミノ酸からなる結合組織成長因子蛋白質の断片またはこれを暗号化する遺伝子の血管新生促進のための用途。

【請求項 18】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個～39 個のアミノ酸からなるものであることを特徴とする、請求項 17 に記載の用途。

【請求項 19】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 5 または配列番号 6 のアミノ酸配列で表示されるものであることを特徴とする、請求項 18 に記載の用途。

【請求項 20】

前記遺伝子は、配列番号 7 または配列番号 8 で表示される塩基配列を有するものであることを特徴とする、請求項 17 に記載の用途。

【請求項 21】

前記遺伝子は、ベクターに挿入されたものであることを特徴とする、請求項 17 に記載の用途。

【請求項 22】

前記血管新生促進剤は、狭心症、動脈硬化、脳卒中、脳血管性痴呆、慢性潰瘍、または創傷の予防または治療に使用されるものであることを特徴とする、請求項 17 ～ 21 のいずれか 1 項に記載の用途。

10

20

30

40

50

【請求項 23】

配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上のアミノ酸からなる結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するポリペプチド、抗体、および化合物からなる群より選択された 1 種以上；または

前記結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子の mRNA に相補的に結合するアンチセンスヌクレオチド、小さい干渉 RNA (short interfering RNA、siRNA)、および短いヘアピン RNA (short hairpin RNA) から構成された群より選択された 1 種以上の血管新生抑制剤製造のための用途。

【請求項 24】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個～39 個のアミノ酸からなるものであることを特徴とする、請求項 23 に記載の用途。

10

【請求項 25】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 5 または配列番号 6 のアミノ酸配列で表示されるものであることを特徴とする、請求項 23 に記載の用途。

【請求項 26】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子は、配列番号 7 または配列番号 8 の塩基配列を有するものであり、前記アンチセンスヌクレオチド、小さい干渉 RNA (short interfering RNA、siRNA)、および短いヘアピン RNA (short hairpin RNA) は、前記配列番号 7 または配列番号 8 に対する mRNA の連続する 15～30 個の塩基からなる塩基配列に相補的に結合するものであることを特徴とする、請求項 24 に記載の用途。

20

【請求項 27】

前記血管新生抑制剤は、癌の成長および転移、リウマチ関節炎、乾癬、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎臓病、高血圧、子宮内膜症、脂肪症、未熟児網膜症、角膜移植拒否、新生血管緑内障、増殖性網膜症、血友病性関節、ケロイド、傷顆粒化、血管接着、骨関節炎、クローン病、再発狭窄症、アテローム性動脈硬化、腸管接着、潰瘍、肝硬病症、糸球体腎炎、悪性腎硬化症、器官移植拒否、腎糸球体病症、糖尿病、または炎症の予防または治療に使用されるものであることを特徴とする、請求項 23～26 のいずれか 1 項に記載の用途。

30

【請求項 28】

配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上のアミノ酸からなる結合組織成長因子蛋白質の断片またはこれを暗号化する遺伝子を、血管新生の促進を必要とする患者に投与するステップを含むことを特徴とする、血管新生促進方法。

【請求項 29】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個～39 個のアミノ酸からなるものであることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 5 または配列番号 6 のアミノ酸配列で表示されるものであることを特徴とする、請求項 29 に記載の方法。

40

【請求項 31】

前記遺伝子は、配列番号 7 または配列番号 8 で表示される塩基配列を有するものであることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 32】

前記遺伝子は、ベクターに挿入されたものであることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 33】

血管新生の促進を必要とする患者は、狭心症、動脈硬化、脳卒中、脳血管性痴呆、慢性

50

潰瘍、または創傷の予防または治療を必要とする患者であることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 34】

配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上のアミノ酸からなる結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するポリペプチド、抗体、および化合物からなる群より選択された 1 種以上；または

前記結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子の mRNA に相補的に結合するアンチセンスヌクレオチド、小さい干渉 RNA (short interfering RNA、siRNA)、および短いヘアピン RNA (short hairpin RNA) から構成された群より選択された 1 種以上を、血管新生の抑制を必要とする患者に投与するステップを含むことを特徴とする、血管新生抑制方法。

10

【請求項 35】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個～39 個のアミノ酸からなるものであることを特徴とする、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 5 または配列番号 6 のアミノ酸配列で表示されるものであることを特徴とする、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子は、配列番号 7 または配列番号 8 の塩基配列を有するものであり、前記アンチセンスヌクレオチド、小さい干渉 RNA (short interfering RNA、siRNA)、および短いヘアピン RNA (short hairpin RNA) は、前記配列番号 7 または配列番号 8 に対する mRNA の連続する 15～30 個の塩基からなる塩基配列に相補的に結合するものであることを特徴とする、請求項 34 に記載の方法。

20

【請求項 38】

血管新生の抑制を必要とする患者は、癌の成長および転移、リウマチ関節炎、乾癬、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎臓病、高血圧、子宮内膜症、脂肪症、未熟児網膜症、角膜移植拒否、新生血管緑内障、増殖性網膜症、血友病性関節、ケロイド、傷顆粒化、血管接着、骨関節炎、クローン病、再発狭窄症、アテローム性動脈硬化、腸管接着、潰瘍、肝硬病症、糸球体腎炎、悪性腎硬化症、器官移植拒否、腎糸球体病症、糖尿病、または炎症の予防または治療を必要とする患者であることを特徴とする、請求項 34 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、結合組織成長因子を用いた血管新生関連薬学的組成物に関し、前記結合組織成長因子を含有する血管新生促進または結合組織成長因子に結合するポリペプチド、抗体、および化合物からなる群より選択されたものを含有する血管新生抑制用薬学的組成物に関する。

【背景技術】

40

【0002】

血管新生 (angiogenesis) とは、既存の微細血管から新たな毛細血管が形成される過程であって、血管新生が正常に起こる場合は、胚発生 (embryonic development)、組織再生および傷治療、周期的な女性の生殖器系の変化である黄体が発達する時であり、この場合にも厳格に調節されて進行する (Folkman J et al., Int. Rev. Exp. Pathol., 16, pp 207-248, 1976)。

【0003】

成人の場合、血管内皮細胞は非常に遅く育ち、他の種類の細胞に比べて相対的によく分裂しない。血管新生が起こる過程は、一般的に、血管新生促進因子の刺激により、プロテ

50

アーゼによる血管基底膜の分解、血管内皮細胞の移動、増殖および血管内皮細胞の分化による管腔の形成で血管が再構成され、新たな毛細血管が生成されることによって行われる。

【0004】

血管新生が自律的に調節されずに病的に成長することによってもたらされる疾患がある。病理学的状態で現れる血管新生に関連する疾患には、血管腫、血管繊維腫、血管奇形および心血管疾患の動脈硬化、血管癒着、浮腫性硬化症があり、血管新生による眼科疾患には、角膜移植性血管新生、血管新生性緑内障、糖尿病性網膜症、新生血管による角膜疾患、斑点の変性、翼状片、網膜変性、後水晶体繊維増殖症、顆粒性結膜炎などがある。

【0005】

関節炎のような慢性炎症性疾患、乾癬、毛細管拡張症、化膿性肉芽腫、脂漏性皮膚炎、にきびのような皮膚科疾患、アルツハイマーおよび肥満も血管新生に関連性があり、癌の成長と転移は必ず血管新生に依存する(D'Amato RJ et al., Ophthalmology, 102(9), pp1261-1262, 1995; Arbiser JL, J. Am. Acad. Dermatol., 34(3), pp486-497, 1996; O'Brien KD et al. Circulation, 93(4), pp672-682, 1996; Hanahan D et al., Cell, 86, pp353-364, 1996)。

特に、癌の場合、血管新生は癌細胞の成長と転移に重要な役割を果たす。腫瘍は、新生血管を通して成長と増殖に必要な栄養と酸素の供給を受け、また、腫瘍まで浸透した新生血管は移転する癌細胞が血液循環系に入る通路を提供することにより、癌細胞が転移するようにする(Folkman and Tyler, Cancer Invasion and metastasis, Biologic mechanisms and Therapy (S.B. Day ed.) Raven press, New York, pp94-103, 1977; Polverini PJ, Crit. Rev. Oral Biol. Med., 6(3), pp230-247, 1995)。

【0006】

反面、過剰な血管形成は疾病悪化の主因になったりもするが、血管の未形成も深刻な疾病の原因となっている。血管新生は、傷治癒や組織再生に必須の現象といえるが、例えば、血管形成が未発達の胎盤は流産の重要な原因となり、血管の未形成による壊死、潰瘍および虚血の場合、組織や器官の機能異常を誘発したり、死亡の原因となり得る。また、動脈硬化症、心筋梗塞および狭心症のような疾病も円滑でない血液供給が原因となっている。したがって、血管の未形成による低酸素状態または低栄養状態の誘発による組織損傷を低減させ、円滑な組織再生のために新たな血管形成を誘導したり促進させようとする治療法の開発が必要になる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

そこで、本発明者らは、炎症性サイトカインの一種である血管内皮細胞成長因子-A (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) と FPR L1 (formyl peptide receptor-like 1) が関与する血管新生において、結合組織成長因子(connective tissue growth factor, CTGF) が FPR L1 と結合することによって血管新生が誘導されることと、特に、CTGF が FPR L1 と結合する部位を明らかにし、前記部位を通して血管新生が誘導されることを確認することによって本発明に至った。

【0008】

したがって、本発明の一例は、CTGF 内の FPR L1 との結合部位に相当する蛋白質断片および/またはこれを暗号化する遺伝子を含む血管新生促進用薬学的組成物; CTGF 内の FPR L1 との結合部位に相当する蛋白質断片および/またはこれを暗号化する遺伝子の血管新生促進および/または血管新生促進剤製造のための用途; および/また

10

20

30

40

50

はCTGF内のFPR L 1との結合部位に相当する蛋白質断片および／またはこれを暗号化する遺伝子を、血管新生の促進を必要とする患者に投与するステップを含む血管新生促進方法を提供することを目的とする。

【0009】

他の例は、CTGF内のFPR L 1との結合部位に相当する蛋白質断片および／またはこれを暗号化する遺伝子の抑制剤を含有する血管新生抑制用薬学的組成物；CTGF内のFPR L 1との結合部位に相当する蛋白質断片および／またはこれを暗号化する遺伝子の抑制剤の血管新生抑制および／または血管新生抑制剤製造のための用途；および／またはCTGF内のFPR L 1との結合部位に相当する蛋白質断片および／またはこれを暗号化する遺伝子の抑制剤を、血管新生の抑制を必要とする患者に投与するステップを含む血管新生抑制方法を提供することを目的とする。

10

【0010】

さらに他の例は、CTGF内のFPR L 1との結合部位をターゲットとして用い、血管新生抑制剤をスクリーニングする方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

上記の目的のために、本発明の一例は、配列番号9のアミノ酸配列内の、164番目のアミノ酸から201番目のアミノ酸までの部位である配列番号5(WVCDEPKDQT VVGPA LAAYRLEDTFGPDPTMIRANCLV)のアミノ酸配列を含む連続する38個以上、例えば、連続する38個～140個(例えば、103番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、連続する38個～100個(例えば、103番目から202番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、または連続する38個～80個(例えば、163番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、好ましくは、連続する38個～39個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片を含有する血管新生促進用薬学的組成物；前記結合組織成長因子蛋白質の断片の血管新生促進および／または血管新生促進剤製造のための用途；および前記結合組織成長因子蛋白質の断片を、血管新生の促進を必要とする患者に投与するステップを含む血管新生促進方法を提供する。

20

【0012】

他の例は、配列番号9のアミノ酸配列の中において、配列番号5のアミノ酸配列を含む連続する38個以上、例えば、連続する38個～140個(例えば、103番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、連続する38個～100個(例えば、103番目から202番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、または連続する38個～80個(例えば、163番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、好ましくは、連続する38個～39個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子を含有する血管新生促進用薬学的組成物；前記結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子の血管新生促進および／または血管新生促進剤製造のための用途；および前記結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子を、血管新生の促進を必要とする患者に投与するステップを含む血管新生促進方法を提供する。

30

【0013】

前記血管新生促進方法は、前記投与ステップの前に、血管新生の促進を必要とする患者を確認するステップを追加的に含むことができ、この時、血管新生の促進を必要とする患者は、狭心症、動脈硬化、脳卒中、脳血管性痴呆、慢性潰瘍、または創傷の予防または治療を必要とする患者であり得る。前記患者は、哺乳類、好ましくは、人間であり得る。

40

【0014】

さらに他の例は、配列番号9のアミノ酸配列の中において、配列番号5のアミノ酸配列を含む連続する38個以上、例えば、連続する38個～140個(例えば、103番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、連続する38個～100個(例えば、103番目から202番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、または連続する38個～80個(例えば、163番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、

50

好ましくは、連続する 38 個～39 個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するポリペプチド、抗体および化合物からなる群より選択された 1 種以上を含有する血管新生抑制用薬学的組成物；前記結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するポリペプチド、抗体および化合物の血管新生抑制および／または血管新生抑制剤製造のための用途；および前記結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するポリペプチド、抗体および化合物を、血管新生の抑制を必要とする患者に投与するステップを含む血管新生抑制方法を提供する。

【0015】

さらに他の例は、配列番号 9 のアミノ酸配列の中において、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上、例えば、連続する 38 個～140 個（例えば、103 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、連続する 38 個～100 個（例えば、103 番目から 202 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、または連続する 38 個～80 個（例えば、163 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、好ましくは、連続する 38 個～39 個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片の発現抑制剤を有効成分として含む血管新生抑制用薬学的組成物；結合組織成長因子蛋白質の断片の発現抑制剤の血管新生抑制および／または血管新生抑制剤製造のための用途；および結合組織成長因子蛋白質の断片の発現抑制剤を、血管新生の抑制を必要とする患者に投与するステップを含む血管新生抑制方法を提供する。例えば、前記発現抑制剤は、配列番号 5 のアミノ酸配列を暗号化する遺伝子の塩基配列（配列番号 7）またはその mRNA、例えば、前記 mRNA のうち連続する 15～30 個、好ましくは、連続する 20～25 個の塩基からなる塩基配列に相補的に結合するアンチセンスヌクレオチド、小さい干渉 RNA (short interfering RNA)、および短いヘアピン RNA (short hairpin RNA) から構成された群より選択された 1 種以上であり得る。

10

20

【0016】

前記血管新生抑制方法は、投与ステップの前に、血管新生の抑制を必要とする患者を確認するステップを追加的に含むことができ、この時、血管新生の抑制を必要とする患者は、癌の成長および転移、リウマチ関節炎、乾癬、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎臓病、高血圧、子宮内膜症、脂肪症、未熟児網膜症、角膜移植拒否、新生血管緑内障、増殖性網膜症、血友病性関節、ケロイド、傷顆粒化、血管接着、骨関節炎、クローン病、再発狭窄症、アテローム性動脈硬化、腸管接着、潰瘍、肝硬病症、糸球体腎炎、悪性腎硬化症、器官移植拒否、腎糸球体病症、糖尿病、または炎症の予防または治療を必要とする患者であり得る。前記患者は、哺乳類、好ましくは、人間であり得る。

30

【0017】

さらに他の例は、(a) 配列番号 9 のアミノ酸配列の中において、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上、例えば、連続する 38 個～140 個（例えば、103 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、連続する 38 個～100 個（例えば、103 番目から 202 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、または連続する 38 個～80 個（例えば、163 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、好ましくは、連続する 38 個～39 個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子を含む細胞に候補化合物を処理するステップと、(b) 前記遺伝子の発現程度を測定するステップとを含み、前記候補化合物を処理した細胞での前記遺伝子の発現程度が候補物質を処理していない細胞に比べて減少した場合、前記候補化合物を血管新生抑制剤として決定することの特徴とする、血管新生抑制剤のスクリーニング方法を提供する。

40

【0018】

以下、本発明をより詳細に説明する。

本発明の血管新生促進用組成物は、配列番号 9 のアミノ酸配列の中において、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上、例えば、連続する 38 個～140 個（例えば、103 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、連続する 38 個～

50

100個（例えば、103番目から202番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、または連続する38個～80個（例えば、163番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、好ましくは、連続する38個～39個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片を含有することを特徴とする。

【0019】

前記結合組織成長因子蛋白質（connective tissue growth factor、CTGF）の全長アミノ酸配列は、ヒト由来のもの（例えば、accession no. CAG46559.1）であり得、配列番号9で表示され得る。従来の炎症性サイトカインの一種である血管内皮細胞成長因子-A（vascular endothelial growth factor-A、VEGF-A）とFPR L1（formyl peptide receptor-like 1）が関与する血管新生において、前記結合組織成長因子蛋白質がFPR L1と結合することによって血管新生が誘導できる。具体的には、前記結合組織成長因子は、FPR L1に特異的なERKリン酸化を誘導する活性があり（実験結果2参照）、VEGF-Aによって発現が誘導される蛋白質であって（実験結果3参照）、FPR L1と結合することによって血管新生が誘導される（実験結果11参照）。

10

【0020】

特に、前記結合組織成長因子蛋白質がFPR L1と結合する部位は、結合組織成長因子蛋白質の全長アミノ酸配列である配列番号9の164番目のアミノ酸から201番目のアミノ酸までの部位で、配列番号5のアミノ酸配列で表示できる（実験結果4参照）。

20

したがって、本発明の血管新生促進用薬学的組成物の有効成分である結合組織成長因子蛋白質の断片は、前記結合組織成長因子蛋白質の全長配列である配列番号9のアミノ酸配列の中において、前記配列番号9の164番目のアミノ酸から201番目のアミノ酸までの部位である配列番号5のアミノ酸配列を含む連続する38個以上、例えば、連続する38個～140個（例えば、103番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、連続する38個～100個（例えば、103番目から202番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、または連続する38個～80個（例えば、163番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、好ましくは、連続する38個～39個のアミノ酸を含むものであり得る。前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、これに限定されないが、より好ましくは、配列番号6のアミノ酸配列（EWVCD E P K D Q T V V G P A L A A Y R L E D T F G P D P T M I R A N C L V）で表示されたものであり得る。

30

【0021】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、FPR L1と結合する部位で（実験結果5参照）、FPR L1に特異的なERKリン酸化を効果的に誘導し（実験結果6参照）、FPR L1を活性化して細胞内のCa²⁺濃度を上昇させ（実験結果7参照）、最終的に血管生成を効果的に誘導する活性がある（実験結果9参照）。

【0022】

また、本発明の血管新生促進用薬学的組成物は、配列番号9のアミノ酸配列の中において、配列番号5のアミノ酸配列を含み、連続する38個以上、例えば、連続する38個～140個（例えば、103番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、連続する38個～100個（例えば、103番目から202番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、または連続する38個～80個（例えば、163番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、好ましくは、連続する38個～39個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子含有するものであり得る。前記遺伝子は、これに限定されないが、好ましくは、結合組織成長因子蛋白質の全長アミノ酸配列において、164～201番目の部位である配列番号5のアミノ酸配列を暗号化するものであるか、前記配列番号5のアミノ酸配列が含まれている配列番号6のアミノ酸配列を暗号化するものであり得る。前記遺伝子は、より好ましくは、前記配列番号5のアミノ酸配列を暗号化する配列番号7の塩基配列（164 - T G G G T G T G T G A C G A G C C C A A G G A C C A A A C C G T G G T T G G G C C T G C

40

50

C C T C G C G G C T T A C C G A C T G G A A G A C A C G T T
 T G G C C C A G A C C C A A C T A T G A T T A G A G C C A A
 C T G C C T G G T C - 2 0 1) で表示され得、前記配列番号 6 のアミノ酸配列を
 暗号化する配列番号 8 で表示される塩基配列 (1 6 3 - G A G T G G G T G T G T
 G A C G A G C C C A A G G A C C A A A C C G T G G T T G G G
 C C T G C C C T C G C G G C T T A C C G A C T G G A A G A C
 A C G T T T G G C C C A G A C C C A A C T A T G A T T A G A
 G C C A A C T G C C T G G T C - 2 0 1) であり得る。

【 0 0 2 3 】

前記遺伝子は、これに限定されないが、ベクター、好ましくは、組み換え発現ベクターに挿入されたものであり得、前記組み換え発現ベクターは、前記遺伝子およびこれと作動可能に連結されたプロモーターなどの発現調節因子を含むものであり得る。例えば、前記組み換え発現ベクターは、例えば、E c o R I - I N S E R T - X b a I i n p A B - b e e ^{T M} - F H v e c t o r (i n c l u d i n g s i g n a l p e p t i d e & f l a g t a g) であり得るが、これに限定されるものではない。

具体的には、前記ベクターは、1つの細胞から他の細胞にDNA切片を伝達する核酸分子に対して使用されるもので、これに限定されないが、プラスミド、バクテリオファージ、および植物または動物ウイルスからなる群より選択されたものに由来できる。

【 0 0 2 4 】

前記発現ベクターは、目的とする暗号化配列および特定の宿主有機体で作動的に連結された、暗号化配列の発現に必要な適した核酸配列を含む組み換えDNAを言及し、原核細胞での発現に必要な核酸配列は、一般的に、他の配列と共に、プロモーター、オペレーター（任意）、およびリボソーム結合部位を含むことができ、真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、および終結およびポリアデニル化シグナルを用いるものであり得、これに対する事項は当業界において公知である。

【 0 0 2 5 】

前記組み換え発現ベクターは、適当な宿主細胞で目的蛋白質、本発明では、結合組織成長因子の断片を製造できる前記遺伝子が発現するように作動可能に連結された必須の調節要素を含む遺伝子構造体であり得る。

【 0 0 2 6 】

前記「作動可能に連結された (o p e r a b l y l i n k e d) 」とは、一般的な機能を果たすように核酸発現調節配列と目的とする蛋白質を暗号化する核酸配列が機能的に連結されていることをいう。例えば、プロモーターと蛋白質またはRNAを暗号化する核酸配列が作動可能に連結され、暗号化配列の発現に影響を与えることができる。組み換えベクターとの作動的連結は、当該技術分野においてよく知られた遺伝子組み換え技術を利用して製造することができ、部位 - 特異的DNAの切断および連結は、当該技術分野において一般的に知られた酵素などを使用する。

【 0 0 2 7 】

好適な発現ベクターは、プロモーター、開始コドン、終結コドン、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーのような発現調節エレメントなどを含み、目的に応じて多様に製造できる。開始コドンおよび終結コドンは、遺伝子作製物が投与された時、個体で必ず作用を示さなければならず、暗号化配列とインフレーム (i n f r a m e) になければならない。

【 0 0 2 8 】

前記血管新生促進用薬学的組成物は、これに限定されないが、血管新生が抑制されて発生する疾患、または血管新生が促進されることによって治療可能な疾患の治療用として使用でき、例えば、狭心症、動脈硬化、虚血性脳卒中、脳血管性痴呆、慢性潰瘍、または創傷の治療用として使用できる。したがって、本発明の他の例は、前記血管新生促進用薬学的組成物を有効成分として含む狭心症、動脈硬化、虚血性脳卒中、脳血管性痴呆、慢性潰瘍、または創傷の予防および / または治療用組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

一方、本発明の血管新生抑制用薬学的組成物は、配列番号 9 のアミノ酸配列の中において、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上、例えば、連続する 38 個 ~ 140 個（例えば、103 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、連続する 38 個 ~ 100 個（例えば、103 番目から 202 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、または連続する 38 個 ~ 80 個（例えば、163 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、好ましくは、連続する 38 個 ~ 39 個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するポリペプチド、抗体、および化合物からなる群より選択された 1 種以上を含有することを特徴とする。

【 0 0 3 0 】

前記記載の通り、結合組織成長因子の全長蛋白質のアミノ酸配列である配列番号 9 において、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上、例えば、連続する 38 個 ~ 140 個（例えば、103 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、連続する 38 個 ~ 100 個（例えば、103 番目から 202 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、または連続する 38 個 ~ 80 個（例えば、163 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、好ましくは、連続する 38 個 ~ 39 個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片は、F P R L 1 と結合することによって血管新生を誘導する活性があるため、前記結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するポリペプチド、抗体および化合物からなる群より選択されたものは、血管新生を効果的に抑制する活性がある。

【 0 0 3 1 】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、前記結合組織成長因子蛋白質の全長配列である配列番号 9 のアミノ酸配列の中において、164 ~ 201 番目の部位である配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上、例えば、連続する 38 個 ~ 140 個（例えば、103 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、連続する 38 個 ~ 100 個（例えば、103 番目から 202 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、または連続する 38 個 ~ 80 個（例えば、163 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、好ましくは、連続する 38 個 ~ 39 個のアミノ酸を含むものであり得、より好ましくは、前記配列番号 5 のアミノ酸配列が含まれている配列番号 6 のアミノ酸配列で表示されたものであり得る。

【 0 0 3 2 】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片が F P R L 1 と結合する部位を含むため、前記結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するポリペプチド、抗体または化合物は、前記結合組織成長因子蛋白質が F P R L 1 と結合することを遮断し、血管新生を効果的に抑制することができる。

【 0 0 3 3 】

前記ポリペプチド、抗体または化合物は、前記結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するものであれば、これに限定されないが、好ましくは、配列番号 6、または配列番号 5 のアミノ酸配列と結合するものであり得、結合対象である結合組織成長因子蛋白質の断片のアミノ酸配列に従って当業者が容易に製造することができる。

【 0 0 3 4 】

また、本発明の血管新生抑制用薬学的組成物は、配列番号 9 のアミノ酸配列の中において、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上、例えば、連続する 38 個 ~ 140 個（例えば、103 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、連続する 38 個 ~ 100 個（例えば、103 番目から 202 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、または連続する 38 個 ~ 80 個（例えば、163 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、好ましくは、連続する 38 個 ~ 39 個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子またはその mRNA、例えば、前記 mRNA のうち連続する 15 ~ 30 個、好ましくは、連続する 20 ~ 25 個の塩基からなる塩基配列に相補的に結合するアンチセンスヌクレオチド、小さい干渉 RNA (short interfering RNA) および短いヘアピン RNA (short hair p

10

20

30

40

50

in RNA) から構成された群より選択されたものを含有することを特徴とする。

【0035】

前記 siRNA は、センス RNA 鎖と相補的なアンチセンス RNA 鎖を含み、これら 2 つの鎖は、標準ワトソン - クリック塩基対の相互作用によって互いに結合 (annealing) し、前記センス鎖は、標的 mRNA 内の標的配列に同一の核酸配列を含む。siRNA の標的配列を選択可能な技術は、例えば、文献 (Tuschl T 等、「The siRNA User Guide」revised Oct. 11, 2002) に記述されている。

【0036】

前記 siRNA のセンスおよびアンチセンス鎖は、2 つの相補的かつ単一鎖 (single-stranded) の RNA 分子を含むか、2 つの相補的な部分が塩基対を形成し、単一鎖の「ヘアピン (hairpin)」領域によって共有結合された単一分子を含むことができる。前記後者の場合を shRNA (short hairpin RNA) と呼び、前記 shRNA は単一鎖で、インビボ (in vivo) 上でステム - ループ (stem-loop) 構造をなしている。前記 shRNA は、一般的に、インビボ上でポリメラーゼ III プロモーター (Pol III promoter) から相補的な DNA シークエンス (DNA sequence) の転写によって合成される。Pol-III で誘導された転写は、明確な開始部位 (well-defined start site) から始まって、4 個以上のチミジン (thymidine) からなる線上 (-TTT T-) の二番目残基 (second residue) で終結し、ノン - ポリ (A) 転写産物 (non-poly (A) transcript) を生成する。ポリメラーゼ III プロモーターは、全ての細胞で活性となり、shRNA の発現が可能である。転写後、shRNA は、Dicer によってループが切断され、siRNA のように RISC (RNA-induced silencing complex) と作用する (参照、Tuschl, T. (2002), Cell 110 (5): 563 - 74)。

【0037】

前記 siRNA は、本発明の属する分野において通常の知識を有する者に知られた多くの技術を利用して取得できる。例えば、siRNA は、本発明の属する分野において知られた方法を用いて化学的に合成されたり組み換え方法によって生産できる。好ましくは、前記 siRNA は、適切に保護されたりボスホロヌクレオシドホスホラミダイト (ribonucleoside phosphoramidites) と従来の DNA/RNA 合成器を用いて化学的に合成できる。siRNA は、相補的かつ分離された 2 つの RNA 分子または 2 つの相補的な領域を有する 1 つの RNA 分子として合成できる。他の方法として、siRNA はまた、適切なプロモーターを用いて組み換え DNA プラスミドから発現できる。プラスミドから前記 siRNA を発現させるのに適切なプロモーターは、例えば、U6 または H1 RNA pol III プロモーター配列および巨大細胞ウイルスプロモーターを含む。また、前記組み換えプラスミドは、特定の組織または特定の細胞内環境で siRNA を発現させるために、誘導性または調節可能なプロモーターを含むことができる。

【0038】

前記 siRNA は、組み換えプラスミドから相補的かつ分離された 2 つの RNA 分子または 2 つの相補的な領域を有する 1 つの RNA 分子として発現できる。本発明の siRNA を発現させるのに適切なプラスミドの選択、siRNA を発現させるための核酸配列をプラスミド内に挿入する方法、および組み換えプラスミドを目的とする細胞に伝達する方法は、本発明の属する分野における技術範囲内にある。例えば、文献 [Tuschl, T. (2002), Nat. Biotechnol., 20: 446 - 448]; [Brummelkamp TR 等 (2002), Science 296: 550 - 553]; [Miyagishi M 等 (2002), Nat. Biotechnol., 20: 497 - 500]; [Paddison PJ 等 (2002), Genes Dev., 16: 948 - 958]; [Lee NS 等 (2002), Nat. Biotechnol., 20: 50

10

20

30

40

50

0 - 505] ; および [Paul CP 等 (2002) , Nat . Biotechnol . 20 : 505 - 508] を参考にすればよく、前記文献は、本発明において参考文献として記載されている。

【0039】

例えば、本発明の一実現例においては、F P R L 1 の s i R N A としてターゲット部位を A A U U C A C A U C G U G G U G G A C A U (配列番号 10) とする二重鎖 R N A 分子 (例えば、Sense : U U C A C A U C G U G G U G G A C A U d T d T (配列番号 3) および Anti - sense : A U G U C C A C C A C G A U G U G A A d T d T (配列番号 4)) を使用することができる。

【0040】

本発明の血管新生抑制用薬学的組成物は、血管新生に関連する疾病の予防および / または治療に使用できる。前記血管新生に関連する疾病は、例えば、癌の成長および転移、リウマチ関節炎、乾癬、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎臓病、高血圧、子宮内膜症、脂肪症、未熟児網膜症、角膜移植拒否、新生血管緑内障、増殖性網膜症、血友病性関節、ケロイド、傷顆粒化、血管接着、骨関節炎、クローン病、再発狭窄症、アテローム性動脈硬化、腸管接着、潰瘍、肝硬病症、糸球体腎炎、悪性腎硬化症、器官移植拒否、腎糸球体病症、糖尿病、炎症などからなる群より選択された疾患または症状であり得る。したがって、本発明の一例は、前記血管新生抑制用薬学的組成物を有効成分として含有する、癌の成長および転移、リウマチ関節炎、乾癬、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎臓病、高血圧、子宮内膜症、脂肪症、未熟児網膜症、角膜移植拒否、新生血管緑内障、増殖性網膜症、血友病性関節、ケロイド、傷顆粒化、血管接着、骨関節炎、クローン病、再発狭窄症、アテローム性動脈硬化、腸管接着、潰瘍、肝硬病症、糸球体腎炎、悪性腎硬化症、器官移植拒否、腎糸球体病症、糖尿病、炎症などからなる群より選択された疾患または症状の予防または治療用組成物を提供する。

【0041】

本発明の血管新生促進用薬学的組成物または血管新生抑制用薬学的組成物は、投与のために、前記記載した有効成分のほか、追加的に薬剤学的に許容可能な担体を 1 種以上含んで製造することができる。薬剤学的に許容可能な担体は、食塩水、滅菌水、リンゲル液、緩衝食塩水、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノール、リポソームおよびこれら成分のうちの 1 成分以上を混合して用いることができ、必要に応じて、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤など、他の通常の添加剤を添加することができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤および潤滑剤を付加的に添加し、水溶液、懸濁液、乳濁液などのような注射用剤形、丸薬、カプセル、顆粒または錠剤に製剤化することができ、標的器官に特異的に作用できるように標的器官特異的抗体またはその他リガンドを前記担体と結合させて使用することができる。ひいては、当該技術分野における適正な方法により、またはレミントンの文献 (Remington ' s Pharmaceutical Science (最新版) , Mack Publishing Company , Easton PA) に開示されている方法を用い、各疾患に応じてまたは成分に応じて好ましく製剤化することができる。

【0042】

本発明の血管新生促進用薬学的組成物または血管新生抑制用薬学的組成物は、経口、局所、非経口、鼻内、静脈内、筋肉内、皮下、眼内、経皮などの投与を目的として製造できる。好ましくは、注射可能な形態で使用できる。

これにより、特に処理される領域には、直接的な注入のために、注射可能な組成物のための任意の薬学的に許容される媒体と混合できる。本発明の組成物は、特に、等張滅菌溶液または滅菌水または適切な生理食塩水の添加によって注射可能な溶液の組成を可能にする凍結乾燥組成物を含むことができる。患者の腫瘍への直接的な注入は、治療効率を感染した組織に集中させるようにするため有利である。使用される投与量は、多様なパラメータ、特に、遺伝子、ベクター、使用される投与方式、問題視される疾病または代案的に要求される治療期間によって調節できる。また、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食

10

20

30

40

50

餌、投与時間、投与方法、排泄率および疾患の重症度などによってその範囲が多様である。1日投与量は、約0.0001～10mg/kgであり、好ましくは0.001～1mg/kgであり、1日1回～数回に分けて投与することが好ましい。

【0043】

一方、本発明の血管新生抑制剤のスクリーニング方法は、(a)配列番号9のアミノ酸配列の中において、配列番号5のアミノ酸配列を含む連続する38個以上、例えば、連続する38個～140個(例えば、103番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、連続する38個～100個(例えば、103番目から202番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、または連続する38個～80個(例えば、163番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、好ましくは、連続する38個～39個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子を含む細胞に候補化合物を処理するステップと、(b)前記遺伝子の発現程度を測定するステップとを含み、前記候補化合物を処理した細胞での前記遺伝子の発現程度が候補物質を処理していない細胞に比べて減少した場合、前記候補化合物を血管新生抑制剤として決定することの特徴とする。

10

【0044】

前記(a)ステップにおいて、結合組織成長因子蛋白質の断片は、例えば、配列番号5または配列番号6のアミノ酸配列で表示され得る。前記候補化合物は、これに限定されないが、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出物、植物抽出物、または動物組織抽出物であり得、新規な物質のみならず、広く知られたものであってもよい。前記(a)ステップにおける細胞は、前記遺伝子を含む組み換え発現ベクターで形質転換された細胞であり得、このような形質転換方法は、当業界において幅広く公知されている。

20

【0045】

前記(b)ステップにおいて、遺伝子の発現程度は、免疫蛍光法、酵素免疫分析法(ELISA)、ウェスタンブロット(Western Blotting)およびRT-PCRから構成された群より選択されたいずれか1つで測定することが好ましいが、これに限定されない。前記遺伝子の発現程度は、これに限定されないが、好ましくは、前記発現に伴う蛋白質の量を確認する方法として抗体を用いる場合には、標的蛋白質に特異的かつ検出可能な標識に連結された第2抗体を添加することができ、検出はまた、第2抗体を添加した後、第2抗体に対する結合親和度を有し、検出可能な標識に連結された第3抗体を添加することもできる。第2抗体または第3抗体に検出可能な標識は、適切な発色性基質と培養時に発色を示す酵素が使用できる。検出可能な部分は、分光学的、酵素的、光化学的、生化学的、生体電子工学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段で検出可能な組成物を含むことができ、例えば、蛍光マーカーおよび染料、磁性標識、連結された酵素、質量分光タグ、スピン標識、電子伝達供与者および受容者などがあるが、これに限定されるものではない。

30

【0046】

前記候補化合物を処理した細胞での前記遺伝子の発現程度が候補化合物を処理していない対照群に比べて減少した場合、前記候補化合物は、血管新生抑制剤として選別できる。前記血管新生抑制剤は、リウマチ関節炎、乾癬、糖尿病性膜網症、糖尿病性腎臓病、高血圧、子宮内膜症、脂肪症、癌、未熟児網膜症、角膜移植拒否、新生血管緑内障、増殖性網膜症、血友病性関節、ケロイド、傷顆粒化、血管接着、骨関節炎、クローン病、再発狭窄症、アテローム性動脈硬化、腸管接着、潰瘍、肝硬病症、糸球体腎炎、悪性腎硬化症、器官移植拒否、腎糸球体病症、糖尿病、炎症などからなる群より選択された疾患の予防または治療に使用されるものであり得るが、これに限定されない。

40

【0047】

前記本発明のスクリーニング方法を用いる場合、短時間に前記メカニズムに関与する治療剤を選別し、これを立証する実験を通し、血管新生による疾患の予防および/または治療を必要とする患者に有用な予防剤および/または治療剤を提供することができる。

50

本発明で明らかにした結合組織成長因子蛋白質の断片は、F P R L 1 と結合する部位で、F P R L 1 に特異的な E R K リン酸化を効果的に誘導し、F P R L 1 を活性化して細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させ、最終的に血管生成を効果的に誘導する活性があり、これにより、結合組織成長因子蛋白質の断片は、血管新生促進用薬学的組成物に有用に使用でき、反面、前記結合組織成長因子蛋白質の断片と結合するポリペプチド、抗体または化合物は、血管新生抑制用薬学的組成物に有用に使用できる。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】VEGF-Aを処理して得られたH U V E C s の条件培地が、F P R L 1 が過発現したF P R L 1 / R B L 細胞でE R K リン酸化を誘導するか否かを確認するために、免疫ブロットを行った結果である。

10

【図2】条件培地、VEGF-Aおよび陽性対照群(W K Y M V m)がF P R L 1 を過発現するF P R L 1 / R B L 細胞でのみE R K リン酸化が誘導されることを確認した実験結果である。

【図3】条件培地のH P L C 分画物をF P R L 1 / R B L 細胞に処理し、E R K リン酸化の有無を確認した結果である。

【図4】条件培地のB 1 2 分画物に対してM S / M S 分析を実施した結果である。

【図5】VEGF-Aが処理されたH U V E C s において細胞溶解物または条件培地でのC T G F の発現程度をVEGF-Aの処理時間に応じて分析した結果である。

【図6】VEGF-Aが処理されたH U V E C s において細胞溶解物または条件培地でのC T G F の発現程度をVEGF-Aの処理量に応じて分析した結果である。

20

【図7】VEGF-A受容体に対する抗体を投与した場合、C T G F の発現が顕著に減少することを確認した結果である。

【図8】F P R L 1 に対するC T G F 結合部位を決定するための方法を示す概略図である。

【図9】全長C T G F 蛋白質またはその一部の欠失蛋白質がF P R L 1 / R B L 細胞でE R K リン酸化を誘導するか否かを確認した結果である。

【図10】配列番号6のC T G F リンカーポリペプチドがF P R L 1 / R B L 細胞でのみ結合するか否かを確認した結果である。

【図11】配列番号6のC T G F リンカーポリペプチドがr h C T G F に似た水準でE R K リン酸化を誘導し、これはF P R L 1 拮抗剤(W R W 4)によって減少することを確認した結果である。

30

【図12】配列番号6のC T G F リンカーポリペプチドが処理されたF P R L 1 / R B L 細胞で Ca^{2+} 濃度が上昇するか否かを確認した結果である。

【図13】H U V E C s 細胞で配列番号6のC T G F リンカーポリペプチドがF P R L 1 に結合するか否かを確認した結果である。

【図14】配列番号6のC T G F リンカーポリペプチドをH U V E C s に処理した場合、E R K リン酸化が効果的に誘導されることを確認した結果である。

【図15】配列番号6のC T G F リンカーポリペプチドをH U V E C s に処理した場合、濃度依存的に細胞内の Ca^{2+} 濃度が増加することを確認した結果である。

40

【図16】配列番号6のC T G F リンカーポリペプチドがH U V E C s の増殖には大きく影響しないことを確認した結果である。

【図17】配列番号6のC T G F リンカーポリペプチドが濃度依存的にH U V E C s の移動を誘導することを確認した結果である。

【図18】配列番号6のC T G F リンカーポリペプチドが濃度依存的にH U V E C s の管構造の形成を誘導することを確認した結果である。

【図19】配列番号6のC T G F リンカーポリペプチドがインビボで濃度依存的に血管生成を誘導することを確認した結果である。

【図20】VEGF-AがH U V E C s 細胞でF P R L 1 の発現を誘導するか否かを培養時間に応じてR T - P C R またはフローサイトメトリー分析を行って確認した結果である

50

。

【図 2 1】VEGF - A が HUVEC s 細胞で F P R L 1 の発現を誘導するか否かを処理量に応じて R T - P C R またはフローサイトメトリー分析を行って確認した結果である。

【図 2 2】VEGF - A によって誘導された HUVEC s の増殖が F P R L 1 拮抗剤 (W R W 4) によって大きく減少しないことを確認した実験結果である。

【図 2 3】VEGF - A によって誘導された HUVEC s の移動が F P R L 1 拮抗剤 (W R W 4) によって大きく減少することを確認した実験結果である。

【図 2 4】VEGF - A によって誘導された HUVEC s の管形態構造の形成が F P R L 1 拮抗剤 (W R W 4) によって大きく減少することを確認した実験結果である。

【図 2 5】F P R L 1 s i R N A を HUVEC s に処理した結果、F P R L 1 の発現が抑制されることを確認した結果である。

【図 2 6】F P R L 1 s i R N A を HUVEC s に処理した場合、VEGF - A によって誘導された細胞の移動が抑制されることを確認した結果である。

【図 2 7】F P R L 1 s i R N A を HUVEC s に処理した場合、VEGF - A によって誘導された管形態構造の形成が抑制されることを確認した結果である。

【図 2 8】F P R L 1 拮抗剤 (W R W 4) が VEGF - A による血管生成を抑制することを確認した結果である。

【図 2 9】VEGF - A によって発現した C T G F と F P R L 1 が互いに結合して誘導する血管新生機序を示す模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0049】

以下、本発明を実施例によって詳細に説明する。

但し、下記の実施例は、本発明を例示するものであって、本発明の内容が下記の実施例に限定されるものではない。

下記の実施例において、全てのデータは、平均 ± 標準偏差で表現し、Student's t test により統計比較し、 $p < 0.05$ の場合、統計的に有意なものと考慮した。

【0050】

< 実験方法 >

1. 実験材料

Phospho - ERK 1 / 2 (Thr ²⁰² / Tyr ²⁰⁴) および ERK 1 / 2 抗体を Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) 社から購入し、Human CTGF 抗体および抗フラッグ (anti - Flag) 抗体をそれぞれ Abcam (Cambridge, MA, USA) および Sigma (St. Louis, MO, USA) 社から購入した。組み換え human CTGF を BioVendor Laboratory Medicine Inc. (Brno, Czech Republic) 社から購入した。組み換え human VEGF - A 165、anti - VEGF - A mAb、anti - VEGFR - 1 mAb、および anti - VEGFR - 2 mAb は R & D Systems (Minneapolis, MN, USA) 社から入手した。

F P R L 1 に対する s i R N A (sense : U U C A C A U C G U G G U G G A C A U d T d T (配列番号 3)、anti - sense : A U G U C C A C C A C G A U G U G A A d T d T (配列番号 4)) およびルシフェラーゼ (luciferase) に対する s i R N A (sense : C G U A C G C G G A A U A C U U C G A d T d T (配列番号 11)、anti - sense : U C G A A G U A U U C C G C G U A C G d T d T (配列番号 12)) を Dharmacon Research, Inc. (Chicago, IL) 社で合成した。また、WKY MVm (配列番号 1)、WRWWWW (配列番号 2、WRW4)、および biotinylated WKY MVm は A & P E P Inc (Seoul, Korea) で合成し、純度が 95 % を超えた。human CTGF リンク部位のアミノ酸配列が含まれているリンカーポリペプチド (E W V C D E P K D Q T V

10

20

30

40

50

VGPALAAAYRLEDTFGPDPTMIRANCLV (配列番号6) - NH₂) は Anygen Co. Ltd. (Gwangjoo, Korea) で合成し、純度が99.1%程度であった。

【0051】

2. 細胞培養

ヒトの臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) を従来公知の方法 (Ferrero, E. et al. Transendothelial migration leads to protection from starvation-induced apoptosis in CD34+CD14+ circulating precursors: evidence for PECAM-1 involvement through Akt/PKB activation. Blood 101, 186-193, 2003) によってコラーゲン分解酵素 (collagenase) (Sigma, St. Louis, MO, USA) を処理し、臍帯 (umbilical cord) (ST. MARY'S Hospital, Seoul, Korea) から分離した。前記分離されたHUVECsを、Medium199 (Sigma, St. Louis, MO, USA) (1% (w/v) ペニシリン/ストレプトマイシンおよび20% (v/v) の熱で非活性化されたウシ胎仔血清が含有されている) を用い、0.2% (w/v) ゼラチンがコーティングされたディッシュ (dish) で培養した。

本実験のために、各細胞は飽和 (subconfluence) 状態に達するように培養し、3継代 (passages) ~ 5継代のものを使用した。FPRL1を発現する rat basophil leukemia (RBL) - 2H3 (FPRL1/RBL) 細胞、FPRを発現するRBL - 2H3 (FPR/RBL) 細胞、およびRBL - 2H3 (vector/RBL) 細胞 (FPRL1またはFPR receptorがoverexpressionしない細胞) (以上、ATCC, Manassas, VA, USA) を、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、20% (v/v) の熱で非活性化されたウシ胎仔血清およびG418 (Geneticin) (500ug/ml) が追加された高濃度のブドウ糖が含まれているDMEM培地 (Sigma, St. Louis, MO, USA) に維持させた。前記細胞を、37 にて、5%CO₂で培養した。

【0052】

3. 条件培地 (Conditioned medium)

ウシ胎仔血清 (FBS) が含まれていないMedium199で培養されたHUVECs (3継代~5継代) から条件培地 (Conditioned Media) を収得した。前記条件培地を遠心分離して残存細胞を除去し、使用時まで-80 にて保管した。

【0053】

4. ウェスタンブロット分析 (Western blot analysis)

Vector/RBL細胞、FPR/RBL細胞、FPRL1/RBL細胞、およびHUVECsを飽和するまで培養し、血清を枯渇 (serum-starved) させた。前記刺激された細胞 (1×10^5 cells) をPBSで2回水洗し、サンプルバッファー (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 1μg/ml アプロチニン、1μg/ml ペプスタチン、および1μg/ml ロイペプチン (leupeptin)) 1ml に溶かし、95 にて30秒間加熱した後、SDS-PAGEで分離してから、ニトロセルロース膜に移した。Anti-ホスホ-ERK (extracellular signal regulated kinase) 1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)、anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)、anti-CTGF (Abcam, Cambridge, MA, USA)、anti-Actin (Sigma, St. Louis, MO, USA)、またはanti-Flag (Sigma, St. Louis, M

O、USA)抗体で免疫プロットを行った後、前記膜を化学発光(chemiluminescence substrate、Amersham Pharmacia)基質で視角化した。

【0054】

5.FPRL1(formyl peptide receptor-like1)活性化蛋白質の同定

HUVECから取得した条件培地(CM)をHLBカートリッジ(waters)にローディングし、逆相カラム(reverse phase(RP)C18column)を用いて分離した。RPC18HPLCカラム(218TP5215;2.1mm×150mm、Vydac)を、水(water)/0.1%(w/v)TFAで均一化(equilibrated)した。ACN/0.1%(w/v)TFAを、0%(w/v)から100%(w/v)まで濃度勾配をおいて150ulの分画物を取得した。前記得られた活成分画物にトリプシンを処理し、37 にて一晚中培養した。

【0055】

前記活成分画物のMSおよびMS/MSデータを取得するために、ナノESIソース(nano-ESI source)が用意されたUltimate HPLCシステム(LC Packings)およびa QSTAR PULSAR I hybrid Q-TOF MS/MSシステム(Applied Biosystems/PE SCIE X)から構成されたナノ(nano)-LC MSを使用した。前記QSTARを、24時間、一定の質量で、8000~10000の解像度で作動させた。スプレーチップ(spray tip)を、電圧を2300Vに設定し、QSTARによって感知された全ての質量数値は、Applied Biosystems(AB)社から提供されたAnalyst QSソフトウェアを用いて測定した。MS/MS分析のために、質量数値スペクトル(common mass values spectra)を、MASCOT検索エンジン(MASCOT search engine、version1.7、in-house)を用い、非冗長(non-redundant)データベースを通して分析して配列情報を取得した。前記のように取得したMASCOT結果は、ランダムマッチ(random match)によって指示されたものより高いMOWSE数値を有するようにした($p < 0.05$)。

【0056】

6. プラスミドの製造、形質感染および蛋白質の精製

Ala41までのコーディン信号ペプチド(chordin signal peptide)以降に、フラッグタグ(flag-tag)配列が含まれているpCS²⁺発現ベクターに挿入されたジェノパス(Xenopus)CTGFの全長および欠失変異体を、E.M.De Robertis(University of California、Los Angeles、CA)から提供された(EcoRI-Chordin signal peptide-20N-terminal AAs of chordin-FLAG epitope(DYKDDDDK)-Xho I-INSERT-Xba I in pCS²⁺)(Abreu, J.G., Ketpura, N.I., Reversade, B. & De Robertis, E.M. Connective-tissue growth factor(CTGF)modulates cell signaling by BMP and TGF- β . Nat Cell Biol 4, 599-604, 2002)。前記欠失変異体は、CTGF/I-II-L、CTGF/II-L、CTGF/II、CTGF/L、CTGF/L-III-IV、およびCTGF/I-L-III-IVと命名し、その具体的な欠失内容は図8に示した(欠失した部位は点線で表示する)。

【0057】

前記フラッグタグ(flag-tag)された分泌蛋白質は、製造会社の指示に従って、リポフェクトアミン(Invitrogen、Carlsbad、CA)を用い、HEK293T細胞(ATCC、Manassas、VA、USA)を核酸伝達感染(tra

nsient transfection) させることによって収得した。HEK293T細胞から全長および欠失変異体Flag-CTGFを、抗フラッグM2アフィニティ(anti-Flag M2 affinity)ゲルカラムを用いて親和精製し、製造会社の指示に従ってFlagペプチドを溶離した。前記蛋白質の純度は、Silver Stain Plusキット(Bio-Rad)を用い、銀染色によって決定した。

【0058】

7. ビオチン化およびフローサイトメトリー分析

human CTGFのリンク部位に対応してリンカーポリペプチドの結合程度を評価するために、製造会社の指示に従って、EZ-リンクマイクロスルホ-NHS-LC-ビオチン化キット(Pierce Chemical Co.、Rockford、IL、USA)を用い、リンカーポリペプチドを標識した。リンカーポリペプチドは、常温にて1時間、PBSに9mMスルホ-NHS-LC-ビオチン(Pierce Chemical Co.、Rockford、IL、USA)と共に培養した。ビオチン化する間、vector/RBL cells、FPR/RBL cells、FPR L1/RBL cells、またはHUVECsをトリプシン処理し、収集した後、常温にて30分間、ウサギ血清を処理した。氷で30分間ビオチン化したリンカーポリペプチドを培養した後、前記細胞をice-cold PBSに氷で短く水洗し、antihuman fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)-conjugated ストレプトアビジン(Pierce Chemical Co.)で培養した後、ice-cold PBSで水洗し、1%ホルムアルデヒド溶液で固定した。以降、従来知られた方法によってCell QuestおよびWinMDI 2.9ソフトウェアでFACS Caliberシステム(BD Biosciences、San Jose、CA)を用いて分析した。(He, R., Sang, H. & Ye, R. D. Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPR L1/LXA4 R. Blood 101, 1572-1581, 2003)

【0059】

8. Ca^{2+} 測定

FPR L1/RBL、vector/RBLまたはFPR/RBL細胞を、37℃にて1時間、0.03% (w/v) pluronik F-127が含有されているfluo-3-AM working solution (Molecular Probes)で培養した。この時、fluo-3-AMの最終濃度は20μM/Lとなるようにした。前記培養後、細胞でfluo-3-AM蛍光がhigh-power Ar⁺レーザによって488nmで発し、放出バンドをphotomultiplierによって530nmで測定した。蛍光信号をニコンE-600エクリプス顕微鏡(Nikon E-600 Eclipse microscope)が備えられた共焦点顕微鏡(confocal laser scanning system、LSM510Meta; Carl Zeiss、Jena、Germany)を用いて感知した。蛍光強度は、CTGFの追加前(F_0)および追加後(F)の両方とも特定した。細胞内の Ca^{2+} 濃度 $[Ca^{2+}]_i$ の変化は F/F_0 比率で表現した。各細胞から50~120個のイメージをスキャンした。

【0060】

9. 血管生成分析(in vitro angiogenesis assay)

増殖度分析(proliferation assay)のために、HUVECsを、ゼラチンでコーティングされた24ウェル培養ディッシュに 2×10^4 細胞/ウェルで平板培養し、一晩中接着されるようにした。血清が枯渇した4時間後に、前記細胞に多様なマイトジェン(CTGFリンカーポリペプチド、CTGF)を48時間処理した。 $[^3H]$ -チミジン(1μCi、Amersham International)を、培養最後の6時間前に各ウェルに添加した。挿入された $[^3H]$ -チミジンを、37℃にて1時間、0.2M NaOHおよび0.1% SDS溶液から抽出した。液体閃光計数器(li

quid scintillation counter、Beckmann Instruments)を用いて放射能を測定し、その結果を3回繰り返して1分あたり平均±標準偏差で表現した。

HUVECsの傷移動(wounding migration)およびチューブ形成活性を下記のように確認した。

【0061】

具体的には、60-mm培養ディッシュ上に飽和状態(confluence)で接種されたHUVECsをピペットの端で傷付け、1%血清と1mM チミジンが追加されたMedium199で、これにリンカーポリペプチド($10^{-1} \sim 10^2$ nM)または組み換えCTGF(recombinant human CTGF、rhCTGF; BioVendor R&D、NC、USA)(10^1 または 10^2 nM)を処理した。16時間培養した後、参照線(reference line)を越えて移動した細胞を数えて移動度を定量化し、前記細胞を50倍に拡大して撮影した。

10

【0062】

一方、チューブ形成分析のために、従来重合されたMatrigel(BD Biosciences)層に、HUVECsを一定量のリンカーポリペプチド、rhCTGFまたはVEGF-A₁₆₅と共に接種した。18時間培養後、細胞形態を位相差顕微鏡(phase-contrast microscopy)を通して観察し、40倍に拡大して撮影した。image-Pro Plus v4.5(Media Cybernetics、Silver Spring、MD)を用い、各ウェルで5回ランダムに選択されたLPF(low-power fields)でチューブの長さを測定することにより、チューブの形成度を定量化した。

20

【0063】

10. CAM(chorioallantoic membrane)分析

インビボでのCAM分析は、従来公知の方法によって行った(Lee, M.-S. et al. Angiogenic Activity of Pyruvic Acid in vivo and in Vitro Angiogenesis Models. Cancer Res 61, 3290-3293, 2001)。

受精した卵を、37℃にて一定の湿度に設定されたエッグブリーダー(egg breeder)で培養した。培養後3日目に、皮で発現したCAMを切り離すために、18ゲージの皮下針で約2mlの卵アルブミンを抽出した。6日間追加培養した後、サンプルの入ったthermanox coverslips(Nunc)を空气中で乾燥させ、これをリンカーポリペプチドまたはrhCTGFによる新生血管形成活性を試験するために、CAMの表面に適用した。3日後、1-2mlの10%(w/v)脂肪乳剤(Intralipose)を漿尿膜(chorioallantois)に注入し、顕微鏡でこれを観察した。

30

【0064】

11. FPRL1の転写に対するsiRNAの製造および形質感染

siRNAを用いてhuman FPRL1の転写を抑制するために、FPRL1に対するsiRNA(sense: UUCACAUCGUGGUGGACA UdTdT(配列番号3)、anti-sense: AUGUCCACCA CGAUGUGAA dTdT(配列番号4))を使用した。前記siRNA配列をBLAST searchした結果、データベース上のいかなる他の配列とも有意な類似性がないことを確認した。前記オリゴヌクレオチドは、類似の結果を示した。HUVECsをsiRNA形質感染過程に使用した。前記細胞を最終濃度20nM FPRL1 siRNA(配列番号3および配列番号4)または対照群としてルシフェラーゼ(luciferase) siRNA(配列番号11および配列番号12)で形質感染した。この時、製造会社の指示に従って、リポフェクタミン試薬(Lipofectamine reagent、Invitrogen Life Technologies)を使用した。前記細胞を無血清培地で水洗し、20%(v/v) FBSを含有する培地が追加された形質感染混合物で4.5時間培養した

40

50

。前記細胞を培養して24時間および48時間後に収集し、F P R L 1の発現程度をR T - P C R分析によって確認した。

【0065】

12. R T - P C R分析

製造会社の指示に従って、商業的に利用可能なT R I試薬(M o l e c u l a r R e s e a r c h C e n t e r)を用い、前記形質感染したH U V E C sで全てのR N Aを分離した。3 u gの各D N A - f r e e t o t a l R N A試料およびo l i g o (d T)₁₅とM o l o n e y m u r i n e l e u k e m i a v i r u s逆転写酵素(P r o m e g a、W I、U S A)を用い、製造会社の指示に従ってf i r s t - s t r a n d c D N Aを合成した。以降、1 x P C Rバッファー、200 u M d N T P s、100 u Mの各特異的プライマ - (s F P R L 1 : 5' - G A C C T T G G A T T C T T G C T C T A G T C - 3' (配列番号13)、a s F P R L 1 : 5' - G G A T C A G T C T C T C T C G G A A G T C - 3' (配列番号14)、s C T G F : 5' - T T C C A G A G C A G C T G C A A G T A C C A - 3' (配列番号15)、a s C T G F : 5' - T T G T C A T T G G T A A C C C G G G T G G A - 3' (配列番号16))、および1.25 u n i t s T a q D N A重合酵素(P e r k i n - E l m e r)が含有されている50 u lの反応溶液で同量のc D N Aを増幅した。増幅産物を1.5%アガロースゲル上で電気泳動し、E t B r (e t h i d i u m b r o m i d e)で染色して赤外線透視で現像化した。

10

20

【0066】

< 実験結果 >

1. V E G F - Aが処理されたH U V E C sの条件培地によるE R Kリン酸化の誘導活性

炎症性サイトカインの一種である血管内皮細胞成長因子 - A (v a s c u l a r e n d o t h e l i a l g r o w t h f a c t o r - A、V E G F - A)は、血管新生(a n g i o g e n e s i s)の調節において、G - 蛋白質連結受容体(G - p r o t e i n - c o u p l e d r e c e p t o r)であるF P R L 1 (f o r m y l p e p t i d e r e c e p t o r - l i k e 1)と多くの細胞機能を共有する。しかし、V E G F - AとF P R L 1が具体的にどのように相互作用するかについては知られていない。

30

【0067】

本発明者らは、これを確認するために、V E G F - Aが処理されたヒトの臍帯静脈内皮細胞(H U V E C)から条件培地(C M)を収得し、これをF P R L 1 - 過発現する細胞のF P R L 1 / R B Lに10 n g / m lまたは50 n g / m lで8時間処理した。この時、陽性対照群としてF P R L 1の作用ペプチド(a g o n i s t i c p e p t i d e)のW K Y M V m (T r p - L y s - T y r - M e t - V a l - D - M e t、配列番号1)を10 n Mで処理した。

【0068】

前記処理後、a n t i - p h o s p h o E R K (e x t r a c e l l u l a r s i g n a l r e g u l a t e d k i n a s e) 1 / 2およびa n t i - E R K 1 / 2抗体(C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y、B e v e r l y、M A、U S A)でニトロセルロース膜に移された細胞溶解物に対して免疫プロットを行った後、前記膜を化学発光(c h e m i l u m i n e s c e n c e s u b s t r a t e、A m e r s h a m P h a r m a c i a)基質で視角化した結果を図1に記載した。

40

前記図1に記載したように、V E G F - Aが処理されたH U V E C sから収得した条件培地は、濃度依存的にE R Kリン酸化を増加させることが分かる。

【0069】

一方、前記条件培地またはV E G F - Aを、前記記載したv e c t o r / R B L、F P R / R B L、またはF P R L 1 / R B L細胞に10 n g / m lで8時間それぞれ処理し、また、陽性対照群として作用ペプチド(a g o n i s t i c p e p t i d e)のW K Y M V m (配列番号1)を10 n M処理した。以降、前記と同様の方法で免疫プロットを行

50

い、その結果を図 2 に記載した。

前記図 2 に記載したように、条件培地、VEGF-A および陽性対照群は、いずれも F P R L 1 を過発現させる F P R L 1 / R B L 細胞でのみ E R K リン酸化を増加させることが分かる。したがって、前記条件培地による E R K リン酸化は、F P R L 1 に特異的であることが分かる。

【0070】

2. 条件培地で E R K リン酸化誘導活性がある蛋白質の同定

前記<実験方法 5>に記載したように、前記条件培地の H P L C 分画物 40 u g を F P R L 1 / R B L 細胞に 5 分処理し、前記<実験結果 1>のように E R K リン酸化の有無を確認した結果を図 3 に記載した。

前記図 3 に記載したように、B 1 2 ~ C 4 が含まれている分画物が F P R L 1 / R B L 細胞で E R K リン酸化を誘導することが分かり、B 1 1 から C 4 までの各分画物の活性ピークを調べた結果、B 1 2、C 3 分画物でのみピークが観察されることが分かる。

【0071】

前記結果から、F P R L 1 / R B L 細胞で E R K リン酸化を誘導できる活性のある蛋白質は B 1 2 に含有されていると仮定し、前記 B 1 2 分画物に対して前記<実験方法 5>に記載された M S / M S 分析を実施し、その結果を図 4 に記載した。

前記図 4 に記載したように、ヒトの結合組織成長因子 (c o n n e c t i v e - t i s s u e g r o w t h f a c t o r、C T G F) のアミノ酸配列と一致する 5 個のポリペプチド配列 (図 4 の下線部分) が検出された。

したがって、F P R L 1 / R B L 細胞で E R K リン酸化を誘導できる活性のある蛋白質は、C T G F であることが分かる。

【0072】

3. V E G F - A による C T G F の発現誘導

前記<実験結果 2>を通し、本発明者らは、VEGF-A が処理された H U V E C s から分泌した条件培地で C T G F が F P R L 1 と結合し、F P R L 1 / R B L 細胞で E R K リン酸化を誘導できる活性があるものと考えた。

【0073】

これを確認するために、本発明者らは、前記実験方法に記載した R T - P C R およびウェスタンブロット分析を実施した。具体的には、VEGF-A が処理された H U V E C s において細胞溶解物または条件培地での C T G F の発現程度を V E G F - A の処理時間に応じて分析した結果、または V E G F - A の処理量に応じて分析した結果を、それぞれ図 5 および図 6 に記載した。

【0074】

前記図 5 に記載したように、R T - P C R 分析結果、VEGF-A を H U V E C s に処理して 0.5 時間が経過した時から C T G F m R N A が増加することが分かり、ウェスタンブロット分析結果、細胞溶解物では 2 時間経過した時から C T G F 数値が増加し、さらに、条件培地では 4 時間経過した時から C T G F 数値が増加することが分かる。

また、図 6 に記載したように、R T - P C R およびウェスタンブロット分析結果、VEGF-A の処理量に比例して C T G F 数値が増加することが分かる。

【0075】

一方、本発明者らは、VEGF-A 受容体が C T G F の合成に関与するか否かを追加的に確認した。具体的には、VEGF-A (R & D S y s t e m s、M i n n e a p o l i s、M N、U S A)、VEGF r e c e p t o r - 1 (V E G F R - 1) (R & D S y s t e m s、M i n n e a p o l i s、M N、U S A)、VEGF r e c e p t o r - 2 (V E G F R - 2) (R & D S y s t e m s、M i n n e a p o l i s、M N、U S A) の中和抗体、そして、対照群として I g G 抗体を H U V E C s に 5 u g / m l で 30 分間処理し、VEGF-A を 20 n g / m l 処理した。2 時間経過後、細胞溶解物を収得し、抗 - h u m a n C T G F 抗体で免疫ブロットを行い、その結果を図 7 に記載した。

10

20

30

40

50

前記図7に記載したように、VEGF-A受容体に対する抗体を投与した場合、CTGFの発現が顕著に減少することが分かる。したがって、前記結果に基づき、VEGF-AによるCTGFの発現誘導は、受容体カップリングによって調節されることが分かる。

【0076】

4. FPR L 1に対するCTGF結合部位の決定

本発明者らは、FPR L 1に対するCTGF結合部位を決定するために、前記<実験方法6>に記載した方法で、図8に記載したように、全長CTGF蛋白質またはその一部の欠失蛋白質を暗号化する遺伝子が、CTGF/I-I-I-L、CTGF/I-I-L、CTGF/I-I、CTGF/L、CTGF/L-I-I-I-IV、およびCTGF/I-L-I-I-I-IVが挿入されたプラスミドを製造し、これをHEK293T細胞(ATCC、M

10

anassas、VA、USA)に形質感染し、これによって各蛋白質を精製した。
前記精製された蛋白質がFPR L 1/RBL細胞でERKリン酸化を誘導するか否かを、前記<実験結果1>のように免疫プロットを行い、その結果を図9に記載した。

【0077】

前記図9に記載したように、CTGF/I-Iを除いては、全てERKリン酸化を誘導することが分かる。前記結果に基づき、CTGF/I-Iを除いた欠失蛋白質の共通部位を導き出すことにより、全長CTGF蛋白質(MTAASMG PVRVAFVVL LALCS
RPAVGQNC SGPCRC PDEPA PRCPAGVSLVLDGCGCCRVCA
KQLGELCTERDPCDP HKGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGA
PCIFGGTVYRSGESFQSSCKYQCTCLDGAVGCMPLCSMDV
RLPS PDCPFPRRVKLPGKCC EEWVCDEPKDQTVVGPALAA
YRLEDTFGPDP TMIRANCLVQTTEWSACSKTCTCGMGI STRV
TNDNASCRLEKQSR LCMVRPCEADLEENIKKGGKKCIRTPK
ISKPIKFELSGCTSMKTYRAKFCGVCTDGRCC TPHRTTTL
PVEFKCPDGEVMKKNM MF IKTCA CHYNCPGDNDIFESLYY
RKMYGDMA)の164~201番目の部位(太い文字で表示、配列番号5)がFPR L 1に対するCTGF結合部位であることが分かる。

20

【0078】

5. CTGFリンカーポリペプチドのFPR L 1の結合の有無確認

本発明者らは、前記<実験結果4>で確認したCTGF結合部位が含まれているリンカーポリペプチド(配列番号6、EWVCDEPKDQTVVGPALAA YRLEDTF
GPDP TMIRANCLV、配列番号5のN末端側のアミノ酸1個(E)を追加的に含む)10nMを、<実験方法7>のようにビオチン化し、これをFPR L 1/RBL、v
ector/RBLまたはFPR/RBL細胞と共に培養した後、フローサイトメトリー
分析を実施し、その結果を図10に記載した。

30

【0079】

前記図10に記載したように、前記CTGFリンカーポリペプチドは、FPR L 1/RBL細胞にのみ結合することが分かる。また、図1に記載したように、FPR L 1拮抗剤のWRW4(配列番号2)10uMを、FPR L 1/RBL、v
ector/RBLまたはFPR/RBL細胞に処理し、30分間培養した場合、FPR/RBL細胞で前記リン
カーポリペプチドの結合が阻害されることが分かる。

40

したがって、前記結果に基づき、CTGFリンカーポリペプチドがFPR L 1に特異的に結合することが分かり、これにより、前記リンカーポリペプチドがFPR L 1によるERKのリン酸化やCa²⁺濃度を上昇できることが分かる。

【0080】

6. CTGFリンカーポリペプチドによるERKリン酸化の促進

CTGFリンカーポリペプチドがERKリン酸化を効果的に誘導するか否かを組み換えCTGF(recombinant human CTGF、rhCTGF)と比較した。具体的には、FPR L 1/RBL細胞にCTGFリンカーポリペプチドとrhCTGFを5分間多様な濃度で処理してERKリン酸化の有無を測定し、その結果を図11に記載

50

した。

前記図 1 1 に記載したように、CTGF リンカーポリペプチドが rhCTGF に似た水準で ERK リン酸化を誘導することが分かる。

また、前記 CTGF リンカーポリペプチドまたは rhCTGF 10 nM を FPR L 1 / RBL 細胞に添加する時、WRW 4 を 10 uM 添加するか添加しない場合、ERK リン酸化程度を比較して図 1 1 に記載した。

前記図 1 1 に記載したように、CTGF リンカーポリペプチド (LK と表示) は、rhCTGF (CTGF と表示) に似た水準で ERK リン酸化を誘導することが分かり、特に、FPR L 1 拮抗剤の WRW 4 を処理した場合、ERK リン酸化が抑制されることが分かる。

10

【0081】

7. CTGF リンカーポリペプチドによる Ca^{2+} 濃度の上昇

FPR L 1 が活性化されると、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇するため、本発明者らは、CTGF リンカーポリペプチドによって FPR L 1 が活性化され、最終的に細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇するか否かを <実験方法 8> を通して確認し、その結果を図 1 2 に記載した。

【0082】

前記図 1 2 に記載したように、共焦点顕微鏡で調べた結果、CTGF リンカーポリペプチドが処理された FPR L 1 / RBL 細胞でのみ Ca^{2+} 濃度が上昇することが分かる。さらに、実際に FPR L 1 / RBL 細胞内の Ca^{2+} 濃度を測定した結果、CTGF リンカーポリペプチドに濃度依存的に増加することが分かり、このような活性は、rhCTGF より効果的で陽性対照群である FPR L 1 の作用剤の WKY M V m (Wm と表示) と類似することが分かる。また、FPR L 1 の拮抗剤である WRW 4 を 10 uM を投与した結果、CTGF リンカーポリペプチドによる細胞内の Ca^{2+} 濃度の増加程度が減少することが分かる。

20

前記結果に基づき、CTGF は、前記リンカー部位を通して FPR L 1 と直接結合し、これによって FPR L 1 を活性化させることが分かる。

【0083】

8. HUVEC s で CTGF リンカーポリペプチドの FPR L 1 結合および活性化の確認

30

本発明者らは、ヒトの臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC s) で FPR L 1 を多量発現するため、VEGF - A が処理された HUVEC s から CTGF を分泌するか否かを確認し、これによって血管新生の有無を調べた。

【0084】

HUVEC s 細胞で前記 CTGF リンカーポリペプチドが FPR L 1 に結合するか否かを前記 <実験方法 7> のように調べ、その結果を図 1 3 に記載した。具体的には、HUVEC s 細胞に前記 CTGF リンカーポリペプチドを 10 nM で処理し、30 分間培養した後、前記 <実験方法 7> のようにフローサイトメトリー分析を実施した。この時、10 uM の WRW 4 を共に処理した。

前記図 1 3 に記載したように、HUVEC s に前記 CTGF リンカーポリペプチドを処理した場合、処理しなかった場合 (vehicle のみを処理した場合) に比べて、平均数値が右側に移動することが分かる。しかし、FPR L 1 拮抗剤である WRW 4 を処理した場合、このような移動は観察されなかった。

40

【0085】

一方、前記 CTGF リンカーポリペプチドまたは rhCTGF を多様な濃度で HUVEC s に 5 分間処理し、細胞溶解物を収得した後、前記記載したように、抗 - phospho ERK 1 / 2 抗体で免疫プロットを行い、その結果を図 1 4 に記載した。

前記図 1 4 に記載したように、CTGF リンカーポリペプチドを HUVEC s に処理した場合にも、ERK リン酸化が効果的に誘導され、FPR L 1 の拮抗剤の WRW 4 (10 uM) を処理すると、ERK リン酸化が抑制されることが分かる。

50

【0086】

また、前記CTGFリンカーポリペプチドまたはrhCTGFを多様な濃度でHUV ECsに1時間処理し、前記記載したように、細胞内の Ca^{2+} 濃度が増加するか否かを確認し、その結果を図15に記載した。

前記図15に記載したように、CTGFリンカーポリペプチドは、濃度依存的に細胞内の Ca^{2+} 濃度を増加させるが、FPR L1の拮抗剤であるWRW4(10 μ M)を処理した場合、そうでないことが分かる。

【0087】

前記結果から、CTGFは、リンカー部位を通してHUV ECsでもFPR L1と特異的に結合し、これによってHUV ECsを活性化させることが分かる。

10

【0088】

9. CTGFリンカーポリペプチドの血管生成誘導効果

血管生成(ang i o g e n e s i s)が進行すると、内皮細胞の増殖、既存血管の発芽に伴う移動および管形態の構造が形成されるため(C a r m e l i e t , P . & J a i n , R . K . A n g i o g e n e s i s i n c a n c e r a n d o t h e r d i s e a s e s . N a t u r e 4 0 7 , 2 4 9 - 2 5 7 , 2 0 0 0)、本発明者らは、CTGFリンカーポリペプチドが前記のような血管生成を誘導するか否かを<実験方法9>を通して確認し、その結果を図16～図18に記載した。

【0089】

前記図16に記載したように、CTGFリンカーポリペプチドが濃度依存的にHUV ECsの増殖を誘導するが、その程度が統計学的には意味があるわけではなかった。

20

また、前記図17に記載したように、CTGFリンカーポリペプチドは、濃度依存的にHUV ECsの移動を組み換えCTGFより効果的に誘導することが分かり、さらに、FPR L1の拮抗剤であるWRW4(10 μ M)を処理した場合、このような細胞の移動を誘導しないことが分かる。

なお、前記図18に記載したように、CTGFリンカーポリペプチドは、HUV ECsの管形態構造の形成を組み換えCTGFより効果的に誘導することが分かり、さらに、FPR L1の拮抗剤であるWRW4(10 μ M)を処理した場合、このような管形態構造の形成を誘導しないことが分かる。

このような結果を通し、CTGFリンカーポリペプチドが細胞の増殖よりは移動および管形態の構造を全長CTGFより効果的に誘導するため、血管生成を促進することが分かる。

30

【0090】

そこで、本発明者らは、このような結果に基づき、インビボで血管生成活性があるか否かを<実験方法10>を通して確認し、その結果を図19に記載した。

前記図19に記載したように、CTGFリンカーポリペプチドは、インビボでも濃度依存的に血管生成を非常に強く誘導することが分かり、その結果として、いわゆる車輪状形態の血管が形成されることが分かる。しかし、FPR L1の拮抗剤であるWRW4(10 μ M)を処理した場合、このような血管形成が誘導されないことが分かる。

したがって、CTGFは、リンカー部位を通してFPR L1に結合し、これによって i n v i t r o およびインビボで血管生成を誘導することが分かる。

40

【0091】

10. VEGF-AのFPR L1の発現促進効果

本発明者らは、前記のような結果に基づき、血管生成過程でCTGF/FPR L1結合体がVEGF-Aの活性を仲裁できるものと考えた。

そこで、VEGF-AがHUV ECs細胞でFPR L1の発現を誘導するか否かを確認した。具体的には、HUV ECsに20ng/ml VEGF-Aを処理し、多様な時間培養した後、前記<実験方法12>によってRT-PCRを行ってFPR L1の発現程度を測定し、その結果を図20に記載した。また、<実験方法7>によってフローサイトメトリー分析を行い、その結果を図20に記載した。

50

さらに、H U V E C s に多様な濃度でV E G F - A を処理し、培養した後、前記<実験方法 1 2 > によってR T - P C R を行ってF P R L 1 の発現程度を測定し、その結果を図 2 1 に記載した。また、<実験方法 7 > によってフローサイトメトリー分析を行い、その結果を図 2 1 に記載した。

前記図 2 0 および図 2 1 に記載したように、V E G F - A がH U V E C s で濃度依存的にF P R L 1 の発現を誘導することが分かる。

【 0 0 9 2 】

1 1 . V E G F - A の C T G F / F P R L 1 結合体を通した血管生成誘導効果

本発明者らは、F P R L 1 拮抗剤のW R W 4 によってV E G F - A による血管生成が抑制されるか否かを追加的に確認した。これにより、V E G F - A による血管形成にF P R L 1 の活性化が関与することが分かった。

まず、H U V E C s にV E G F - A を 2 0 n g / m l で投与し、前記<実験方法 9 > を通し、細胞の増殖程度、細胞の移動、または管形態構造の形成の有無を確認し、その結果を図 2 2 ~ 図 2 4 に記載した。この時、F P R L 1 拮抗剤であるW R W 4 を追加的に添加した。

前記図 2 2 に記載したように、V E G F - A がH U V E C s の増殖を誘導することが分かるが、V E G F - A によるH U V E C s の増殖にF P R L 1 の拮抗剤であるW R W 4 が統計学的な意味を有するほどの抑制能を示していなかった。

【 0 0 9 3 】

また、前記図 2 3 に記載したように、V E G F - A は、H U V E C s の移動を誘導することが分かり、さらに、F P R L 1 の拮抗剤であるW R W 4 (1 0 u M) を処理した場合、このような細胞の移動を誘導しないことが分かる。

【 0 0 9 4 】

なお、前記図 2 4 に記載したように、V E G F - A は、H U V E C s の管形態構造の形成を誘導することが分かり、さらに、F P R L 1 の拮抗剤であるW R W 4 (1 0 u M) を処理した場合、このような管形態構造の形成を誘導しないことが分かる。

【 0 0 9 5 】

一方、前記<実験方法 1 1 > に記載したように、F P R L 1 s i R N A を用いてF P R L 1 の発現を抑制し、前記<実験方法 1 2 > によってR T - P C R を行ってF P R L 1 の発現程度を測定し、その結果を図 2 5 に記載した。

前記図 2 5 に記載したように、F P R L 1 s i R N A をH U V E C s に処理した結果、F P R L 1 の発現が抑制されることが分かり、対照群としてルシフェラーゼ (L u c i f e r a s e) s i R N A を処理した場合は、そうでないことが分かる。

【 0 0 9 6 】

これにより、前記F P R L 1 s i R N A をH U V E C s に処理した場合、V E G F - A による細胞の移動や管形態構造の形成が抑制されるか否かを確認し、その結果を図 2 6 および図 2 7 に記載した。

前記図 2 6 および図 2 7 に記載したように、前記F P R L 1 s i R N A をH U V E C s に処理した場合、対照群のルシフェラーゼ (L u c i f e r a s e) s i R N A を処理した場合に比べて、V E G F - A による細胞の移動や管形態構造の形成が抑制されることが分かる。

【 0 0 9 7 】

また、インビボでF P R L 1 拮抗剤 (1 0 u g / C A M) を処理した場合、V E G F - A (2 5 n g / C A M) による血管生成活性が抑制されるか否かを<実験方法 1 0 > を通して確認し、その結果を図 2 8 に記載した。

前記図 2 8 に記載したように、F P R L 1 拮抗剤は、V E G F - A による血管生成を非常に抑制することが分かる。

【 0 0 9 8 】

前記結果を通し、F P R L 1 がV E G F - A による血管生成に重要な因子であることが分かり、F P R L 1 の活性化を誘導するためには、C T G F が重要な因子であることが分

10

20

30

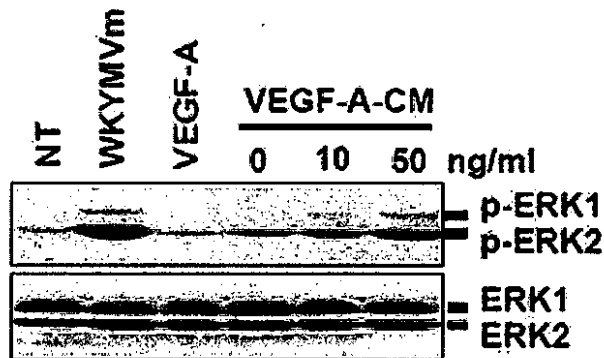
40

50

かる。つまり、VEGF-Aによって誘導されたCTGFとFPR1は、これらの間の結合によって血管内皮細胞の移動と管構造の形成を促進することにより、VEGF-Aによる新生血管形成に関与することが分かる。

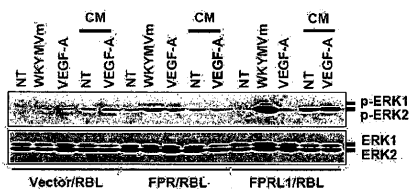
【図1】

【図1】



【図2】

【図2】



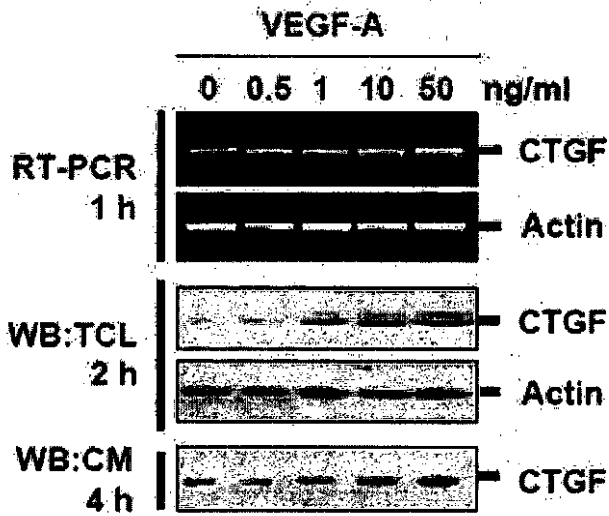
【図4】

【図4】

MTAASMGPVRVAFVLLALCSRPAVG
 QNCSGPCRCPCDEPAPRCPAGVSLVLD
 GCGCCRVCAKQLGELCTERDPCDPH
 KGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPCI
 FGDTVYRSGESFQSSCKYQCTCLDGA
 VGCMPPLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKL
 PGKCCEEWVCDEPKDQTVVGPALAAAY
 RLEDTFGPDPTMIRANCLVQTTEWSA
 CSKTCGMGISTRVTNDNASCRLEKQS
 RLCMVRPCEADLEENIKKGKKCI RTPK
 ISKPIKFELSGCTSMKTYRAKFCGVCT
 DGRCCTPHRTTTLPVEFKCPDGEVMK
 KNMMFIKTCACHYNC PGDNDIFESLYY
 RKMYGDMA

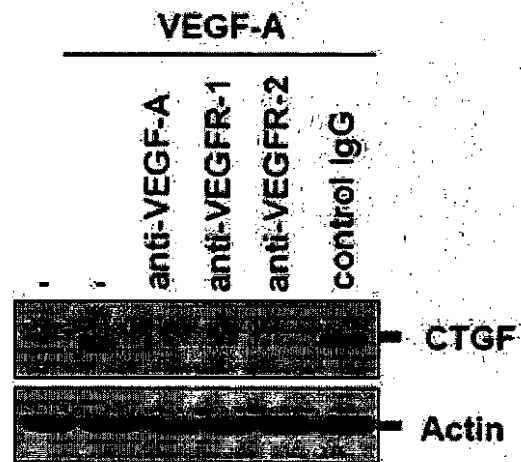
【 図 6 】

【도 6】



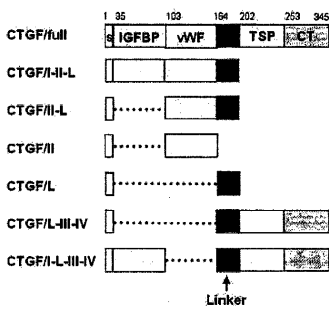
【 図 7 】

【도 7】



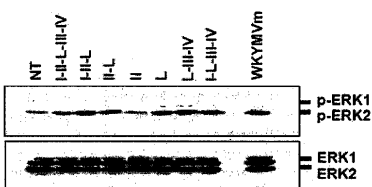
【 図 8 】

【도 8】



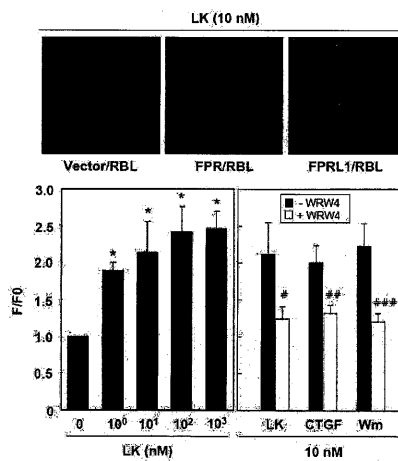
【 図 9 】

【도 9】



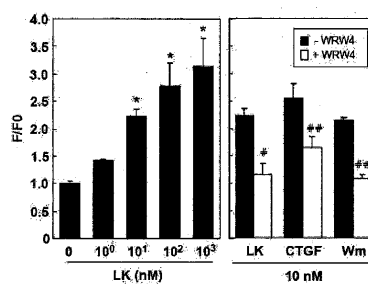
【 図 1 2 】

【도 12】

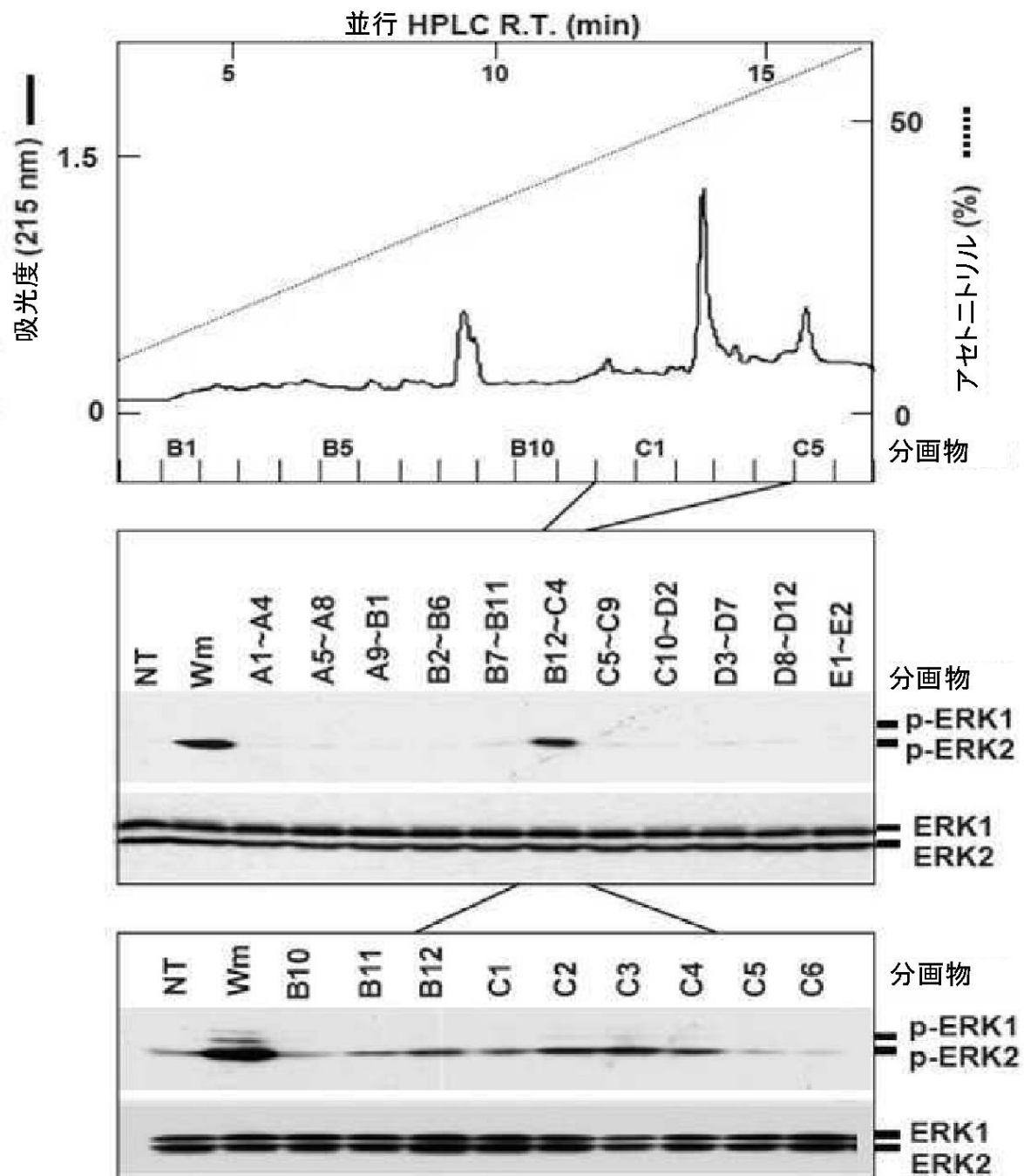


【 図 1 5 】

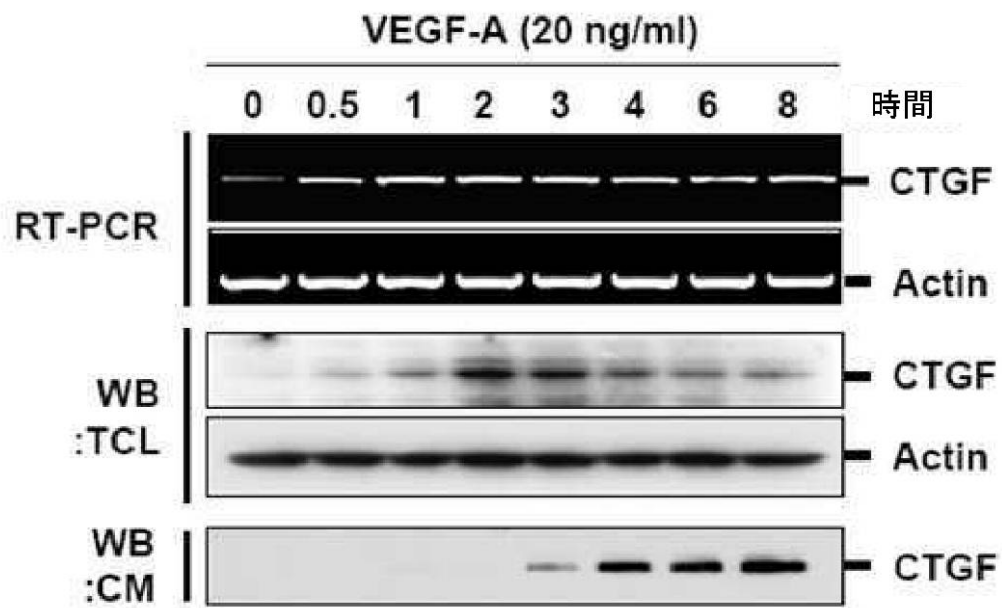
【도 15】



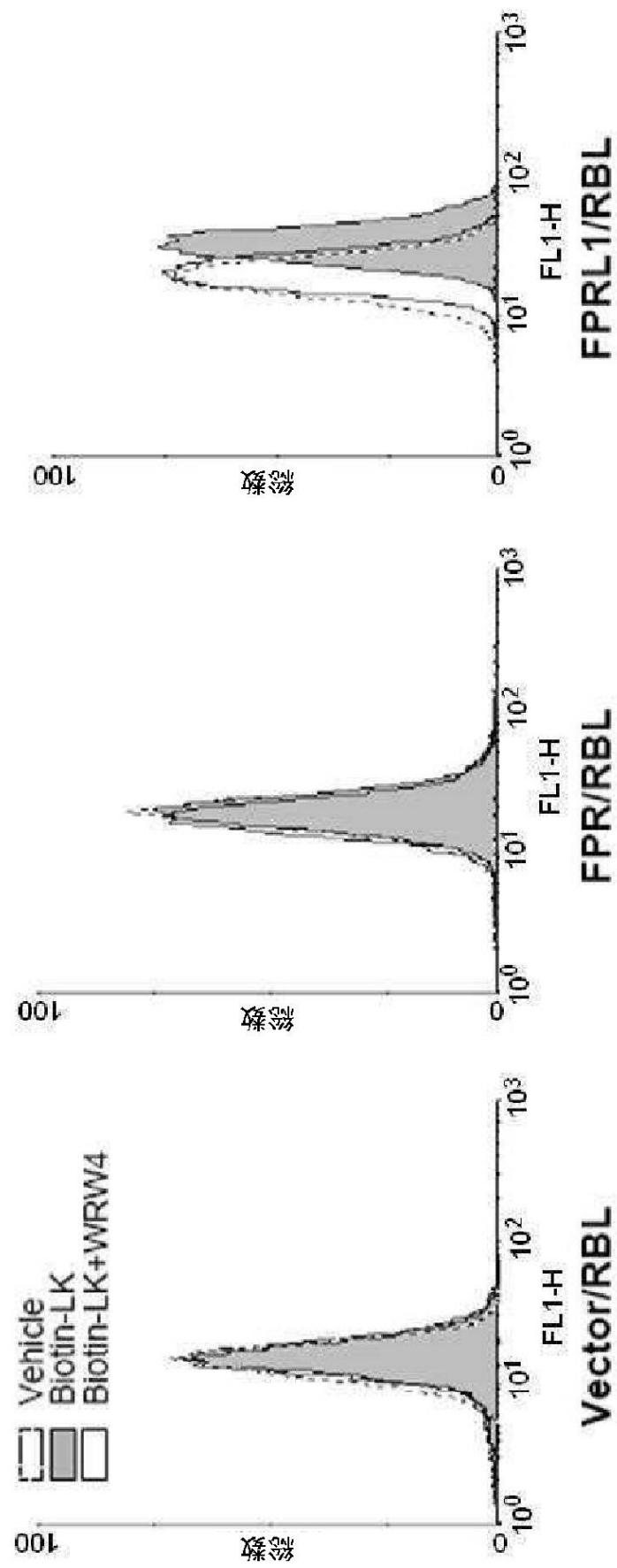
【 図 3 】



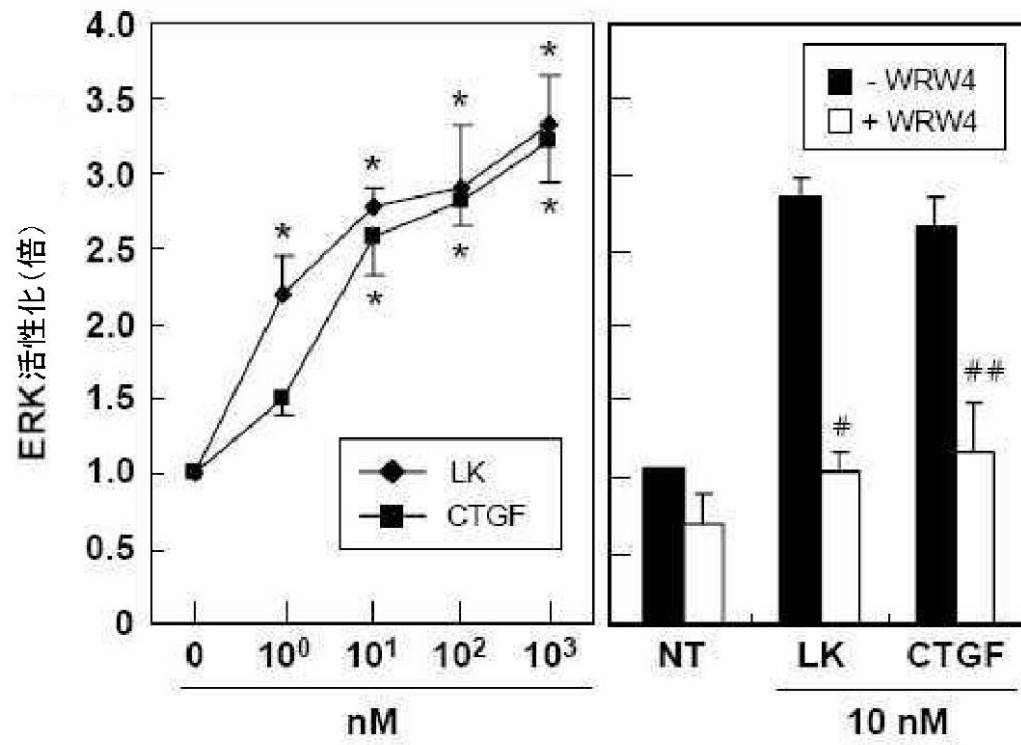
【 図 5 】



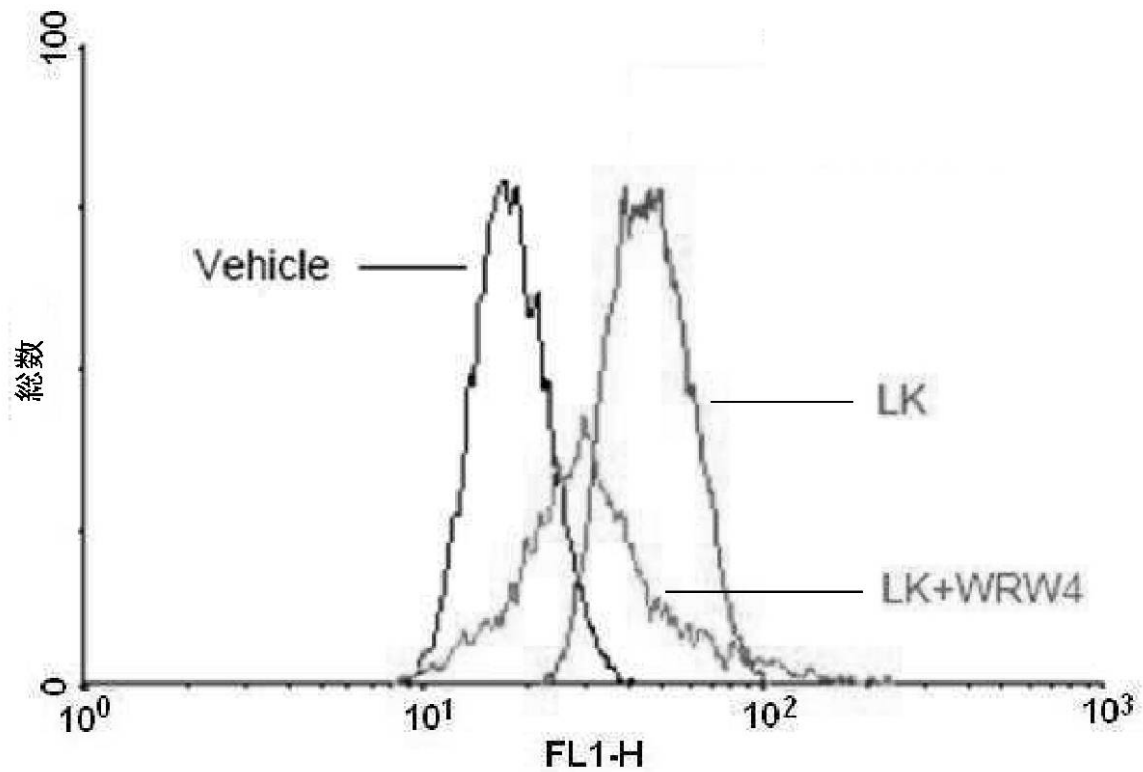
【図 10】



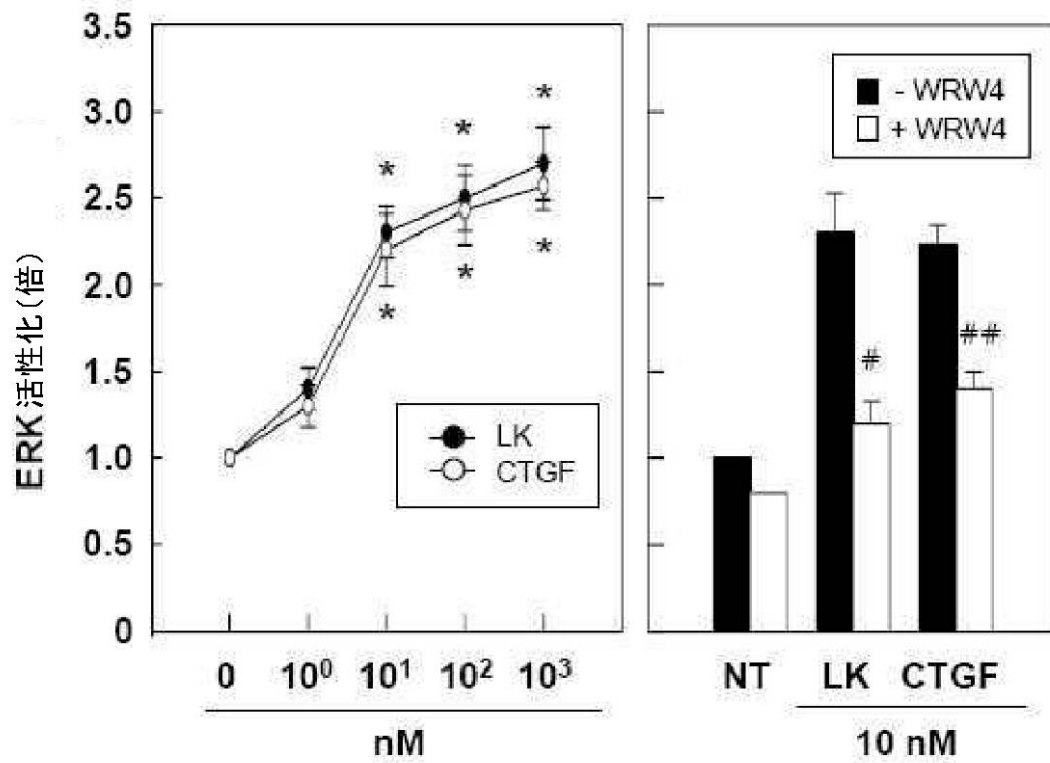
【図 1 1】



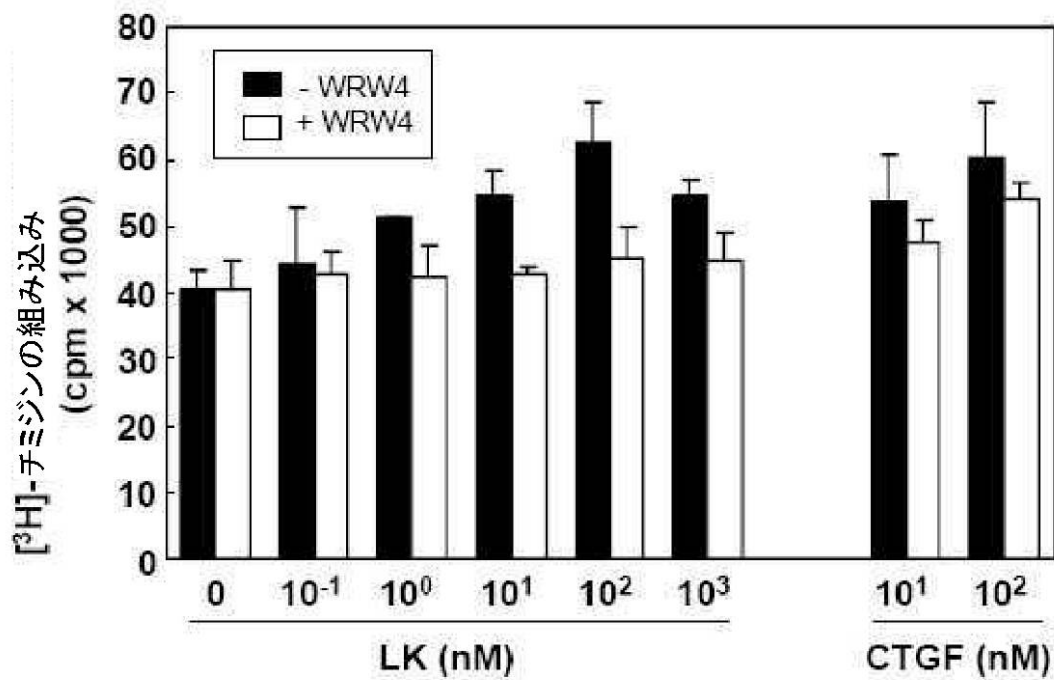
【図 1 3】



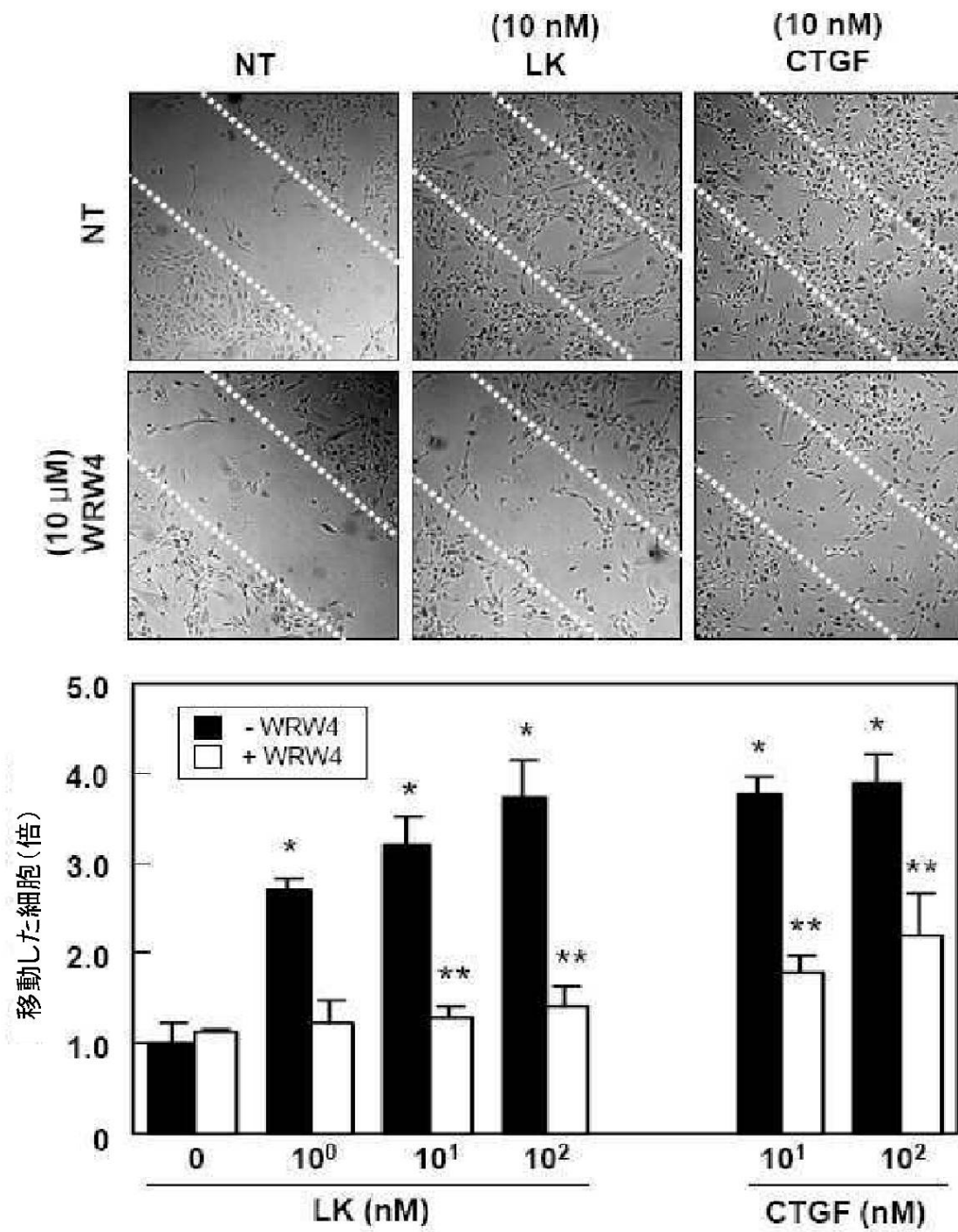
【 図 1 4 】



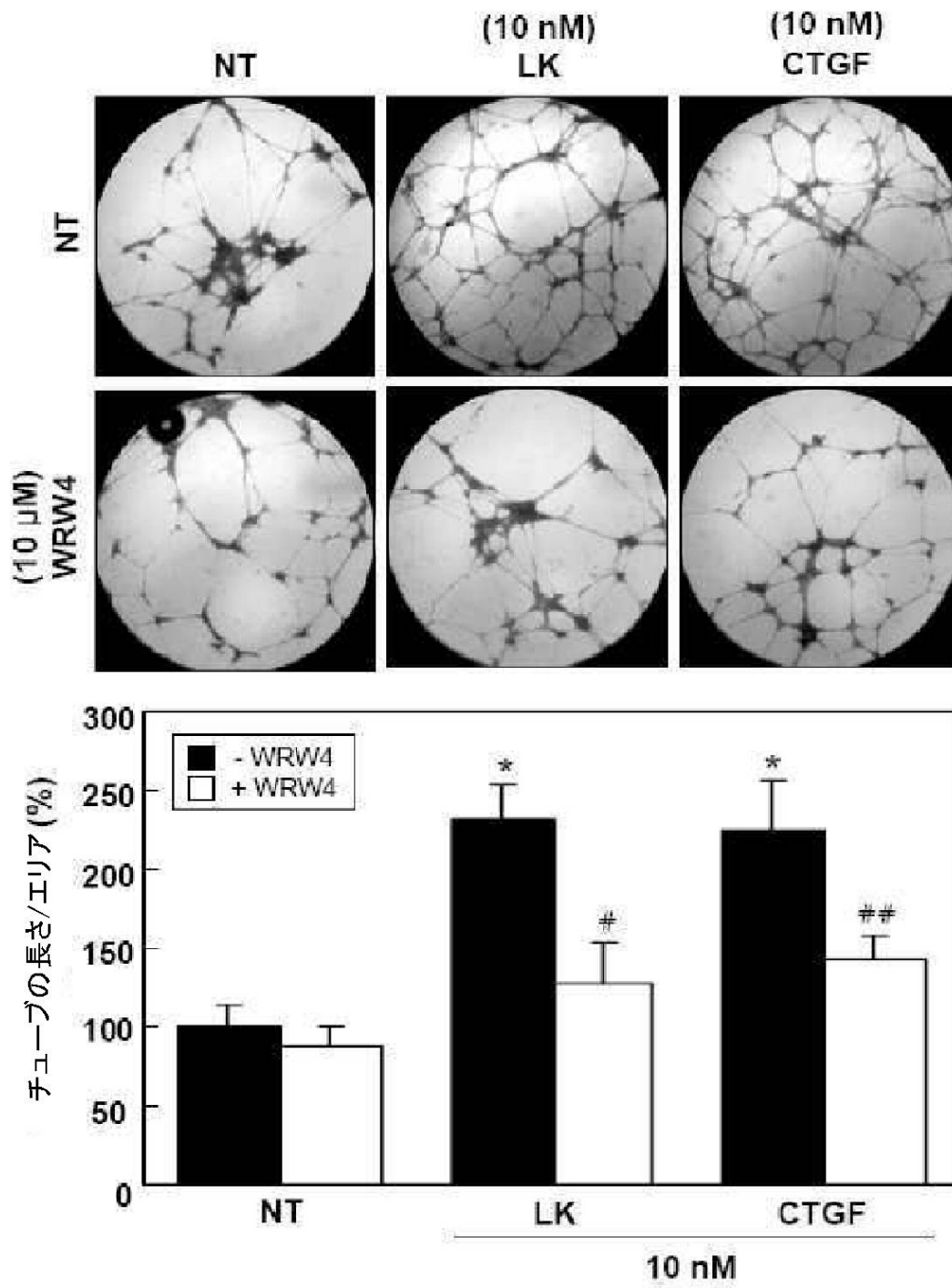
【 図 1 6 】



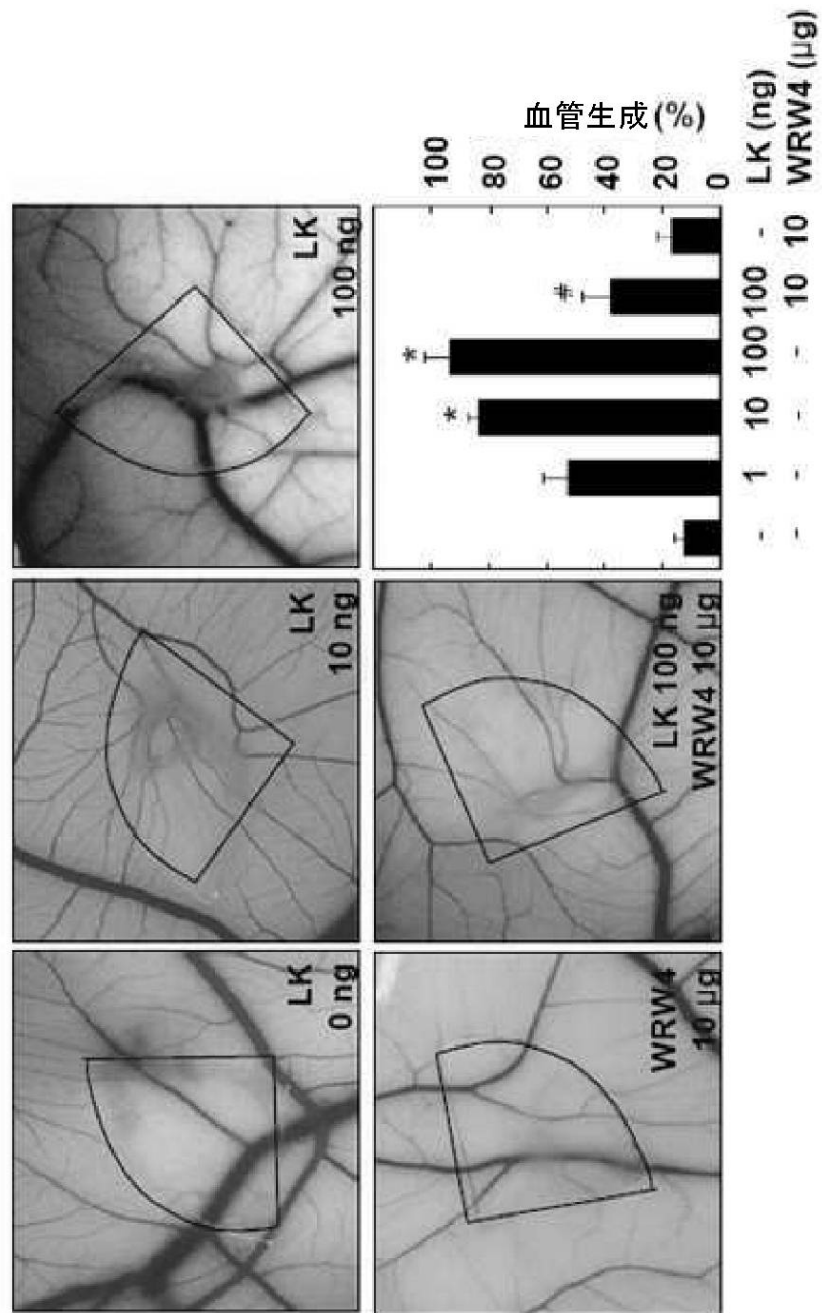
【図 17】



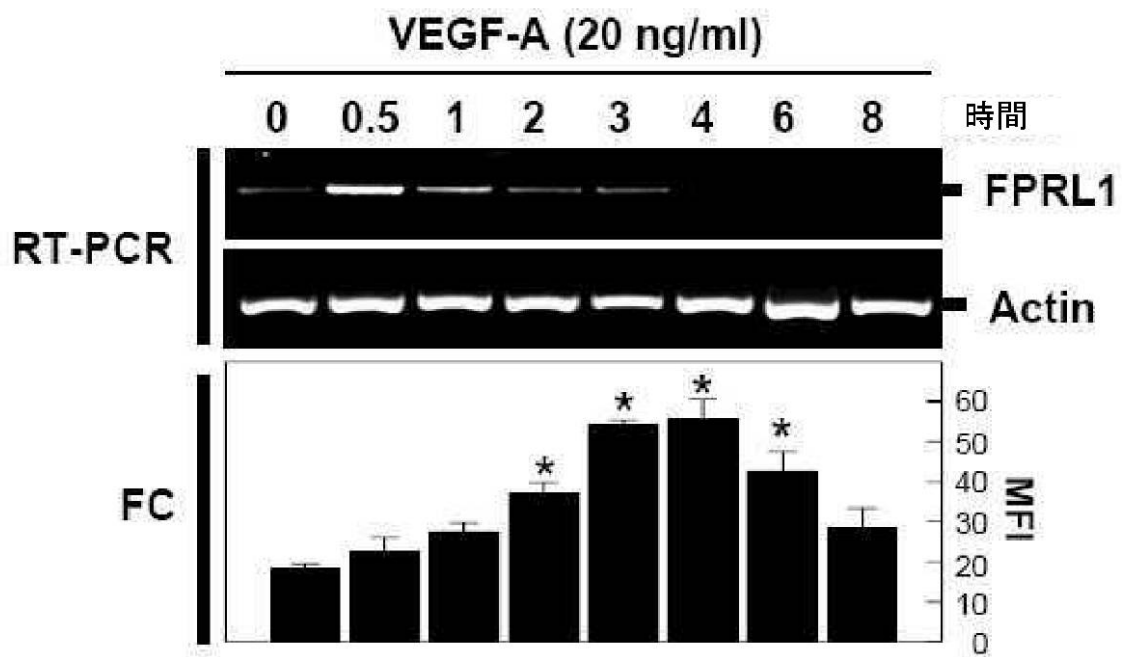
【 図 1 8 】



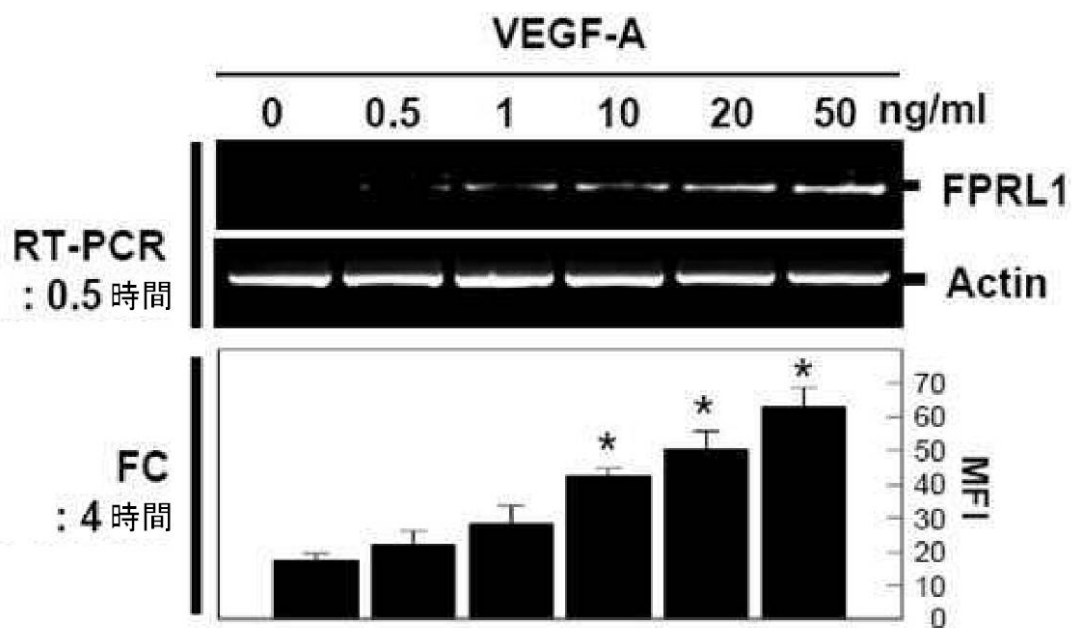
【図 19】



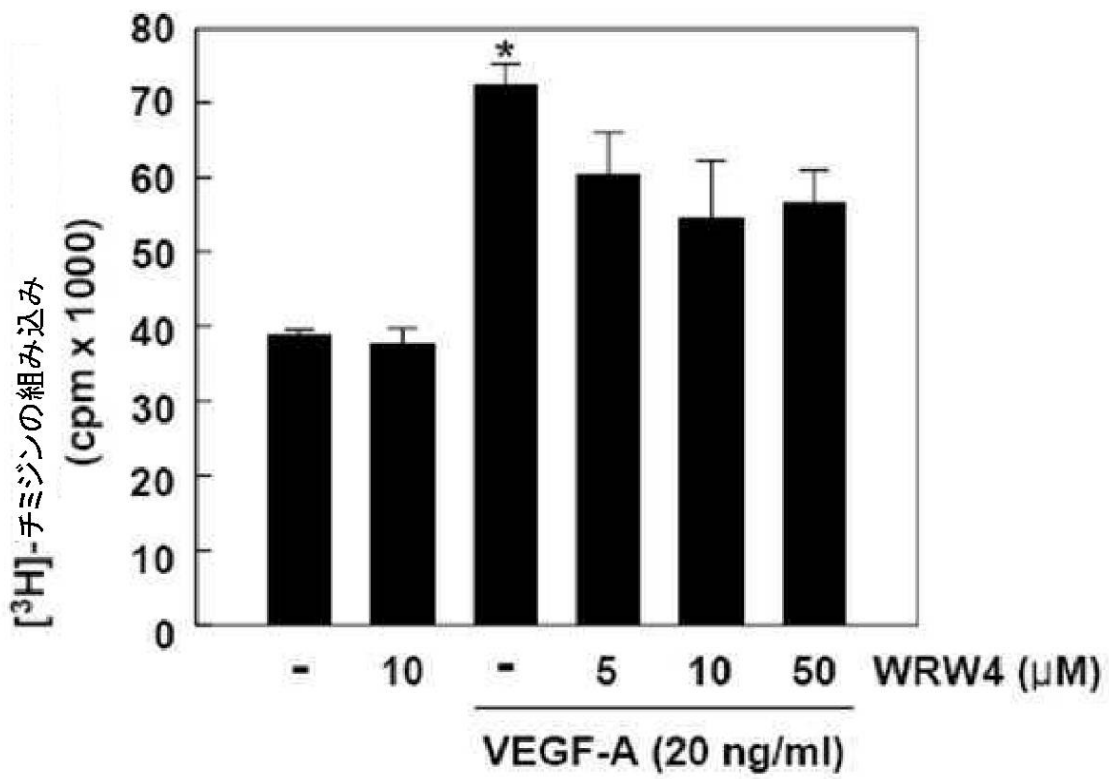
【 図 2 0 】



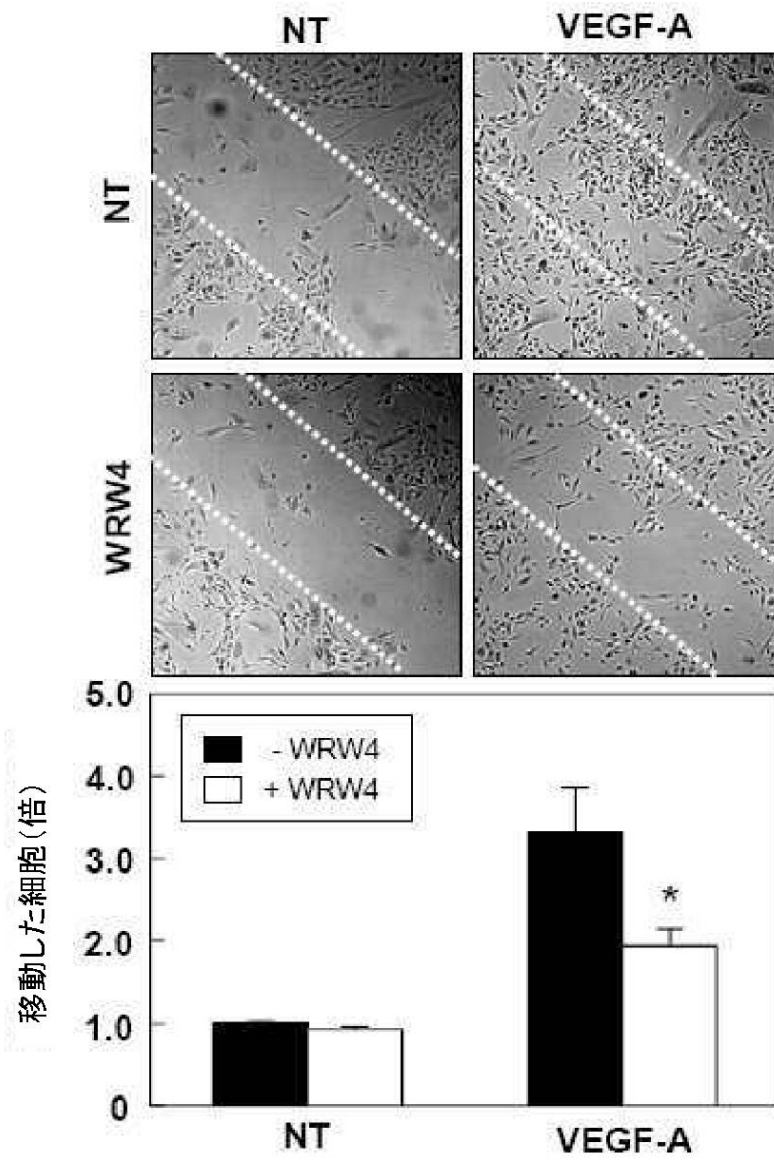
【 図 2 1 】



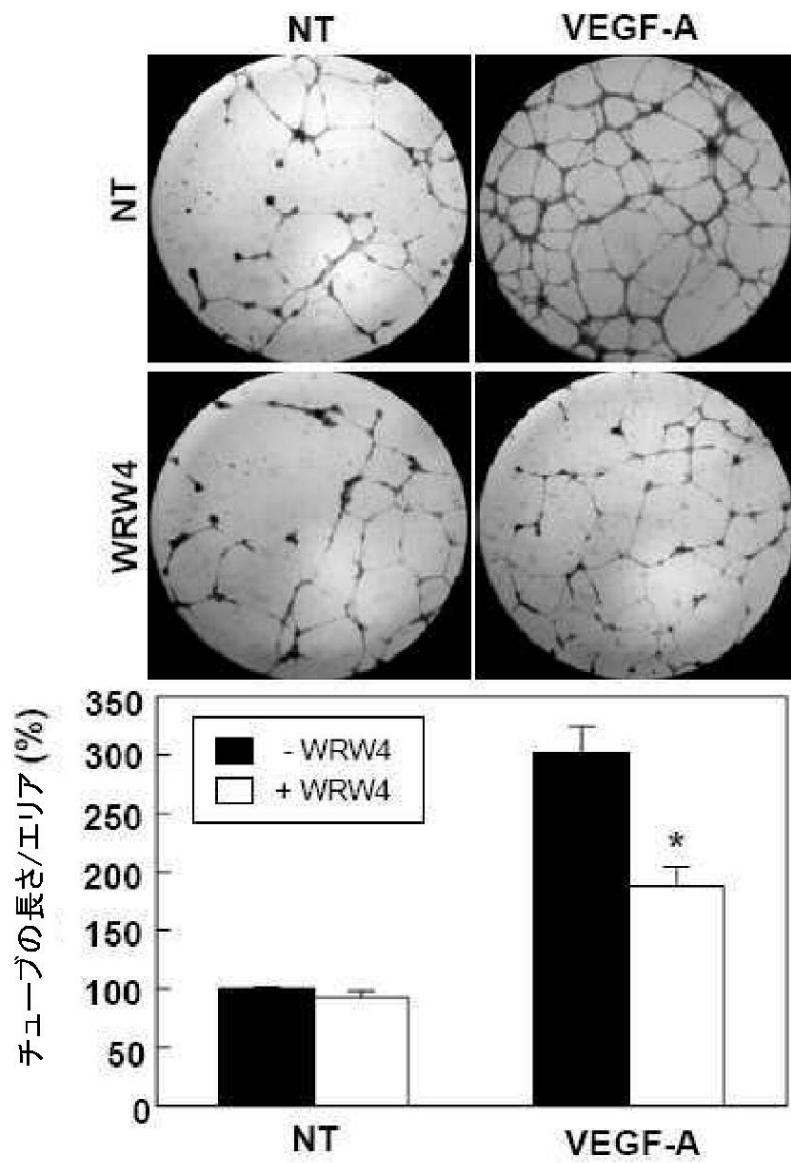
【図 2 2】



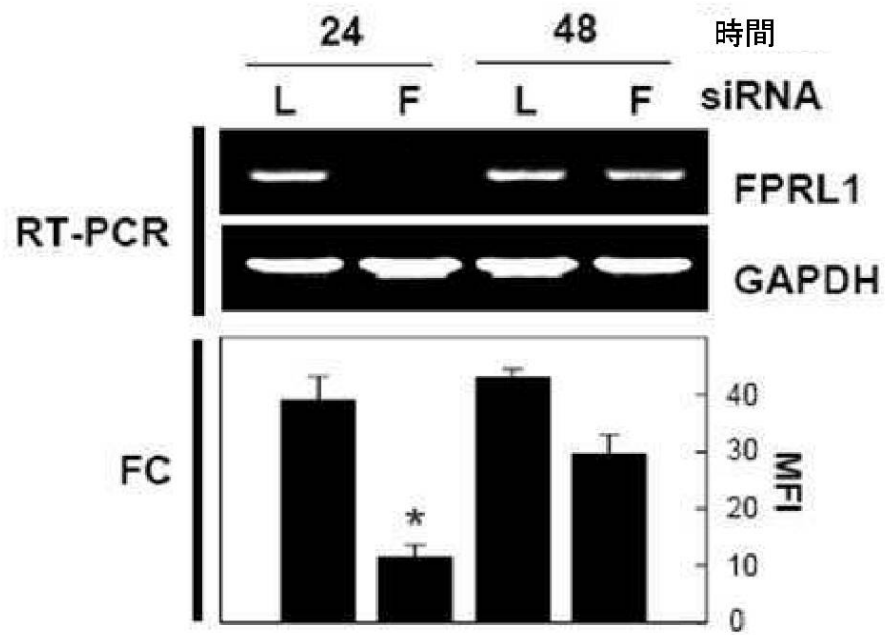
【 図 2 3 】



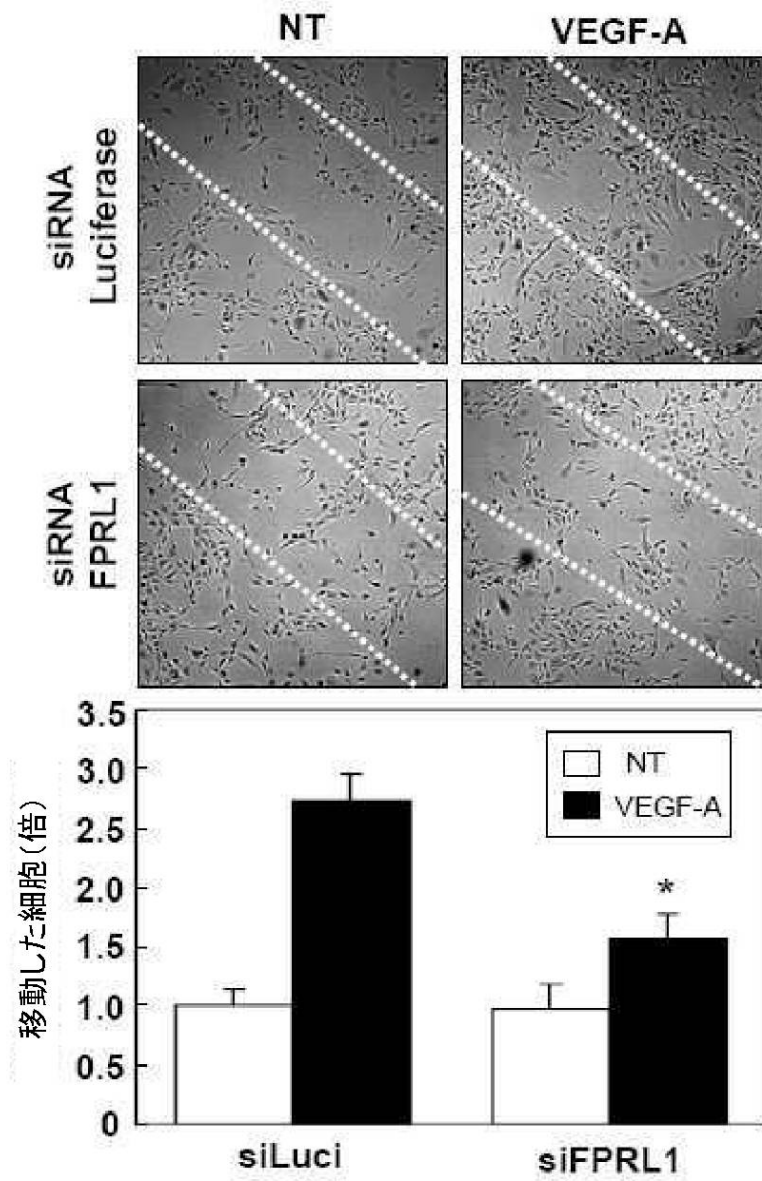
【 図 2 4 】



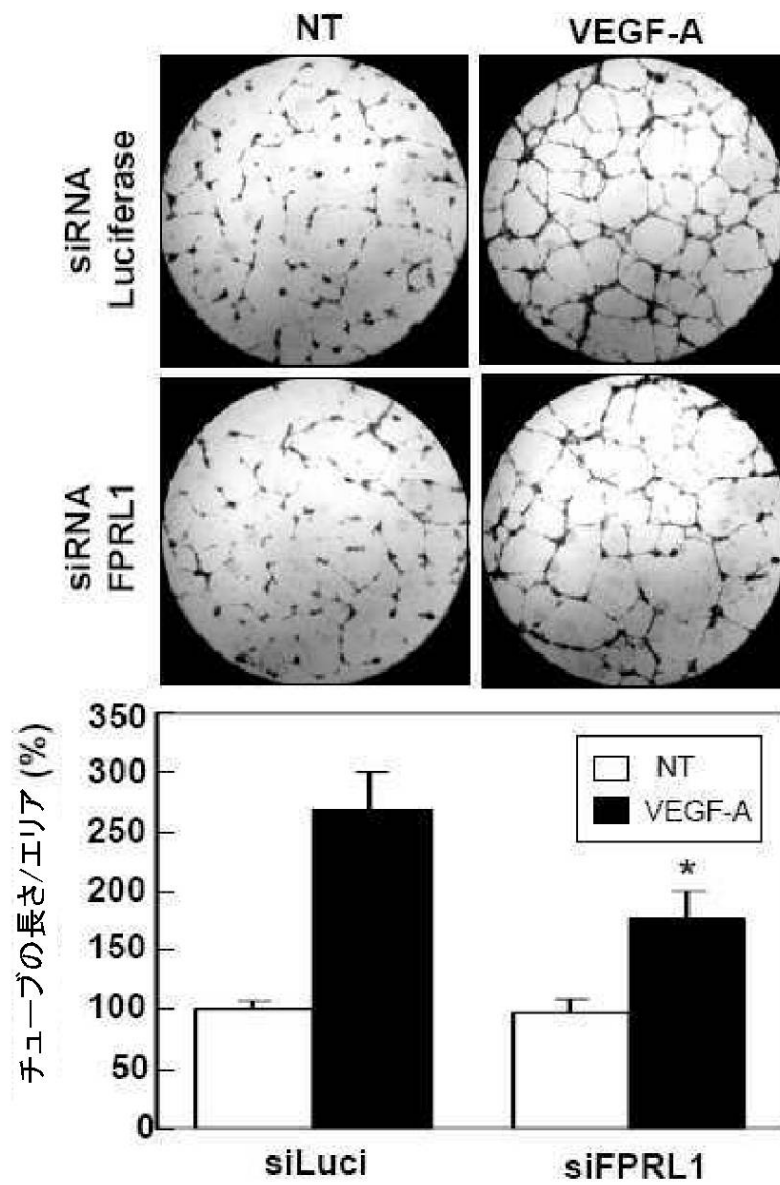
【 図 2 5 】



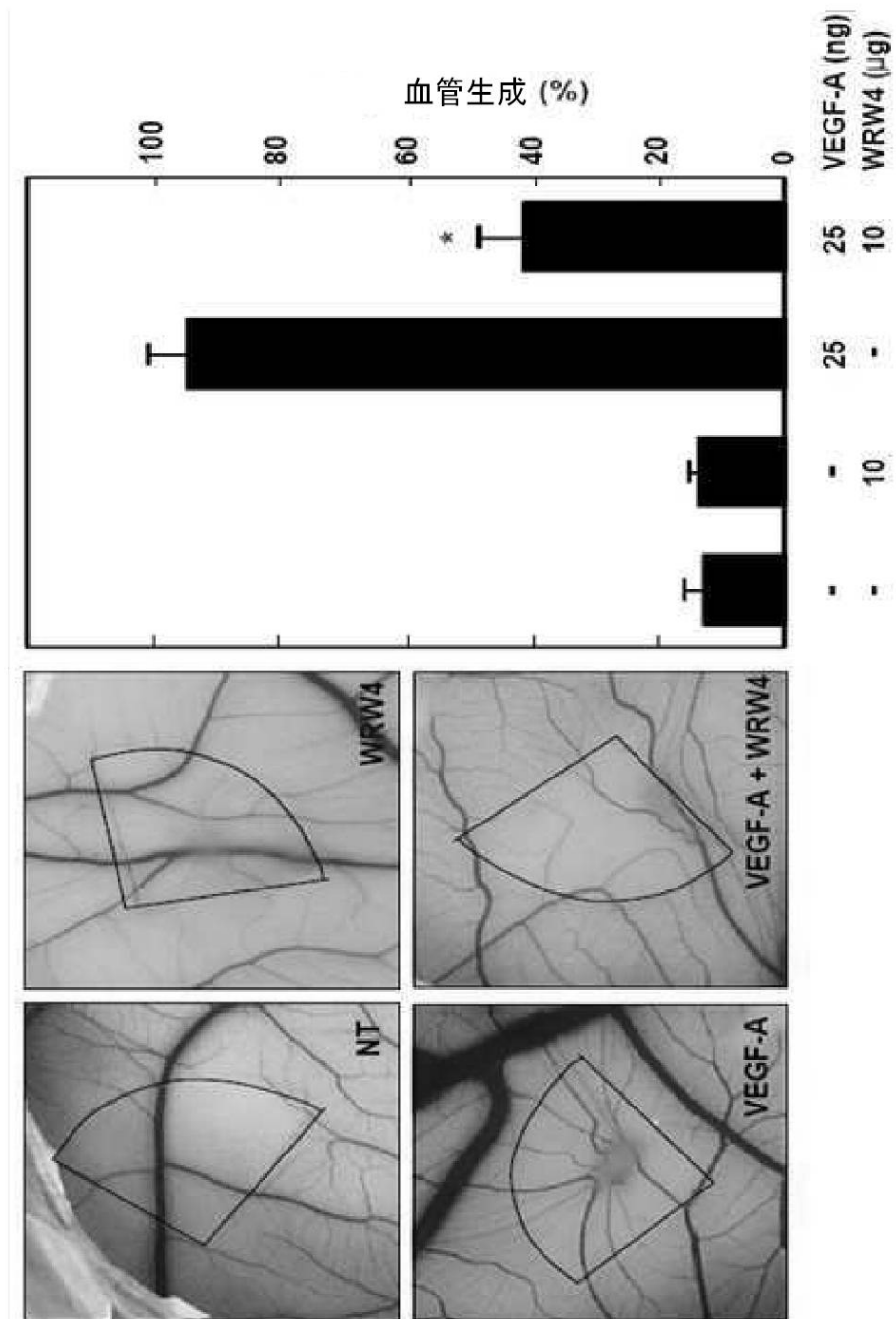
【 図 2 6 】



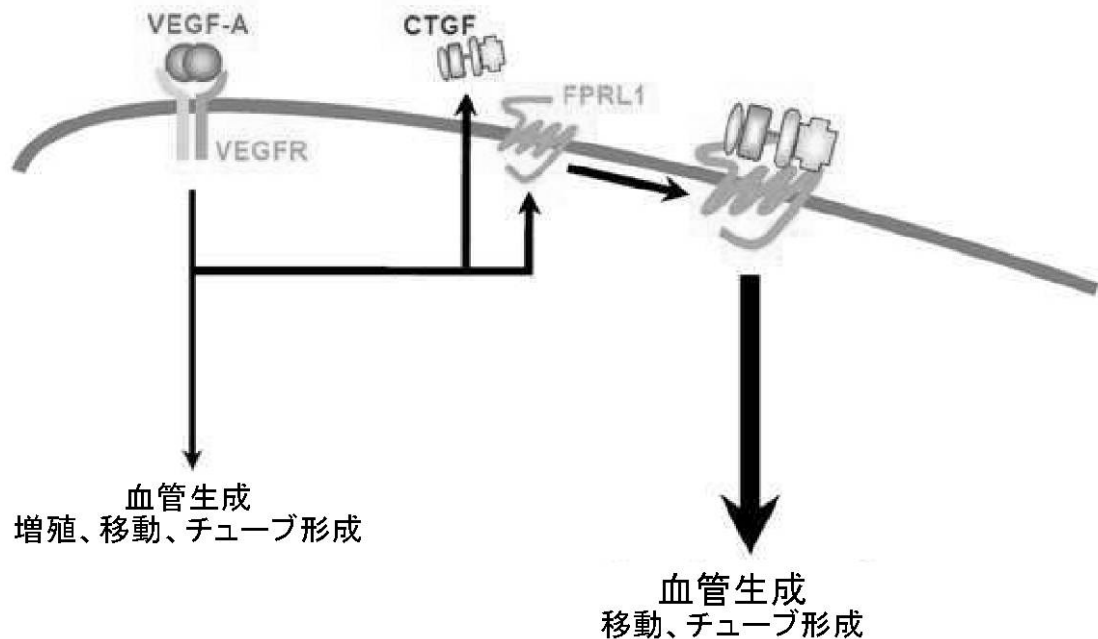
【 図 27 】



【 図 2 8 】



【図 29】



【配列表】

2013530934000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成24年10月29日(2012.10.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

したがって、本発明の一例は、CTGF内のFPRL1との結合部位に相当する蛋白質断片および/またはこれを暗号化する遺伝子を含む血管新生促進用薬学的組成物；CTGF内のFPRL1との結合部位に相当する蛋白質断片および/またはこれを暗号化する遺伝子の血管新生促進剤製造のための用途を提供することを目的とする。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

他の例は、CTGF内のFPRL1との結合部位に相当する蛋白質断片および/またはこれを暗号化する遺伝子の抑制剤を含む血管新生抑制用薬学的組成物；CTGF内のFPRL1との結合部位に相当する蛋白質断片および/またはこれを暗号化する遺伝子の

抑制剤の血管新生抑制および／または血管新生抑制剤製造のための用途を提供することを目的とする。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

上記の目的のために、本発明の一例は、配列番号9のアミノ酸配列内の、164番目のアミノ酸から201番目のアミノ酸までの部位である配列番号5 (WVCD E P K D Q T V V G P A L A A Y R L E D T F G P D P T M I R A N C L V) のアミノ酸配列を含む連続する38個以上、例えば、連続する38個～140個 (例えば、103番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、連続する38個～100個 (例えば、103番目から202番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、または連続する38個～80個 (例えば、163番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、好ましくは、連続する38個～39個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片を含有する血管新生促進用薬学的組成物；前記結合組織成長因子蛋白質の断片の血管新生促進剤製造のための用途を提供する。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

他の例は、配列番号9のアミノ酸配列の中において、配列番号5のアミノ酸配列を含む連続する38個以上、例えば、連続する38個～140個 (例えば、103番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、連続する38個～100個 (例えば、103番目から202番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、または連続する38個～80個 (例えば、163番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、好ましくは、連続する38個～39個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子を含有する血管新生促進用薬学的組成物；前記結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子の血管新生促進剤製造のための用途を提供する。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

さらに他の例は、配列番号9のアミノ酸配列の中において、配列番号5のアミノ酸配列を含む連続する38個以上、例えば、連続する38個～140個 (例えば、103番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、連続する38個～100個 (例えば、103番目から202番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、または連続する38個～80個 (例えば、163番目から242番目のアミノ酸までの部位の中から選択)、好ましくは、連続する38個～39個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するポリペプチド、抗体および化合物からなる群より選択された1種以上を含有する

血管新生抑制用薬学的組成物；前記結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するポリペプチド、抗体および化合物の血管新生抑制剤製造のための用途を提供する。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

さらに他の例は、配列番号 9 のアミノ酸配列の中において、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上、例えば、連続する 38 個～140 個（例えば、103 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、連続する 38 個～100 個（例えば、103 番目から 202 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、または連続する 38 個～80 個（例えば、163 番目から 242 番目のアミノ酸までの部位の中から選択）、好ましくは、連続する 38 個～39 個のアミノ酸を含む結合組織成長因子蛋白質の断片の発現抑制剤を有効成分として含む血管新生抑制用薬学的組成物；結合組織成長因子蛋白質の断片の発現抑制剤の血管新生抑制剤製造のための用途を提供する。例えば、前記発現抑制剤は、配列番号 5 のアミノ酸配列を暗号化する遺伝子の塩基配列（配列番号 7）またはその mRNA、例えば、前記 mRNA のうち連続する 15～30 個、好ましくは、連続する 20～25 個の塩基からなる塩基配列に相補的に結合するアンチセンスヌクレオチド、小さい干渉 RNA（short interfering RNA）、および短いヘアピン RNA（short hairpin RNA）から構成された群より選択された 1 種以上であり得る。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 9】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上のアミノ酸からなる結合組織成長因子蛋白質の断片またはこれを暗号化する遺伝子を有効成分として含有することを特徴とする、血管新生促進用組成物。

【請求項 2】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個～39 個のアミノ酸からなるものであることを特徴とする、請求項 1 に記載の血管新生促進用組成物。

【請求項 3】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 5 または配列番号 6 のアミノ酸配列で表示されるものであることを特徴とする、請求項 2 に記載の血管新生促進用組成物。

【請求項 4】

前記遺伝子は、配列番号 7 または配列番号 8 で表示される塩基配列を有するものであることを特徴とする、請求項 1 に記載の血管新生促進用組成物。

【請求項 5】

前記遺伝子は、ベクターに挿入されたものであることを特徴とする、請求項 1 に記載の血管新生促進用組成物。

【請求項 6】

配列番号 3 および配列番号 4 を含む F P R L 1 (f o r m y l p e p t i d e r e c e p t o r - l i k e 1) の小さい干渉 RNA (s i R N A)。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の s i R N A を有効成分として含むことを特徴とする、血管新生促進用組成物。

【請求項 8】

請求項 1 ～ 5 および請求項 7 のいずれか 1 項に記載の血管新生促進用組成物を有効成分として含むことを特徴とする、狭心症、動脈硬化、脳卒中、脳血管性痴呆、慢性潰瘍、または創傷の予防または治療用組成物。

【請求項 9】

配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上のアミノ酸からなる結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するポリペプチド、抗体、および化合物からなる群より選択された 1 種以上；または

前記結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子の mRNA に相補的に結合するアンチセンスヌクレオチド、小さい干渉 RNA (s h o r t i n t e r f e r i n g R N A 、 s i R N A)、および短いヘアピン RNA (s h o r t h a i r p i n R N A) から構成された群より選択された 1 種以上を含有することを特徴とする、血管新生抑制用組成物。

【請求項 10】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個～39 個のアミノ酸からなるものであることを特徴とする、請求項 9 に記載の血管新生抑制用組成物。

【請求項 11】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 5 または配列番号 6 のアミノ酸配列で表示されるものであることを特徴とする、請求項 10 に記載の血管新生抑制用組成物。

【請求項 12】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子は、配列番号 7 または配列番号 8 の塩基配列を有するものであり、前記アンチセンスヌクレオチド、小さい干渉 RNA (s h o r t i n t e r f e r i n g R N A 、 s i R N A)、および短いヘアピン RNA (s h o r t h a i r p i n R N A) は、前記配列番号 7 または配列番号 8 に対する mRNA の連続する 15 ～ 30 個の塩基からなる塩基配列に相補的に結合するものであることを特徴とする、請求項 9 に記載の血管新生抑制用組成物。

【請求項 13】

請求項 9 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の血管新生抑制用組成物を有効成分として含有することを特徴とする、癌の成長および転移、リウマチ関節炎、乾癬、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎臓病、高血圧、子宮内膜症、脂肪症、未熟児網膜症、角膜移植拒否、新生血管緑内障、増殖性網膜症、血友病性関節、ケロイド、傷顆粒化、血管接着、骨関節炎、クローン病、再発狭窄症、アテローム性動脈硬化、腸管接着、潰瘍、肝硬病症、糸球体腎炎、悪性腎硬化症、器官移植拒否、腎糸球体病症、糖尿病、または炎症の予防または治療用組成物。

【請求項 14】

(a) 配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 38 個以上のアミノ酸からなる結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子を含む細胞に候補化合物を処理するステップと、(b) 前記遺伝子の発現程度を測定するステップとを含み、

前記候補化合物を処理した細胞の遺伝子の発現程度が候補化合物を処理していない細胞に比べて減少した場合、前記候補化合物を血管新生抑制剤として決定することを特徴とする、血管新生抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項 15】

前記 (b) ステップの遺伝子の発現程度は、免疫蛍光法、酵素免疫分析法 (E L I S A)、ウェスタンブロット (W e s t e r n B l o t t i n g) および R T - P C R からなる群より選択された方法で測定するものであることを特徴とする、請求項 1 4 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 1 6】

前記血管新生抑制剤は、癌の成長および転移、リウマチ関節炎、乾癬、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎臓病、高血圧、子宮内膜症、脂肪症、未熟児網膜症、角膜移植拒否、新生血管緑内障、増殖性網膜症、血友病性関節、ケロイド、傷顆粒化、血管接着、骨関節炎、クローン病、再発狭窄症、アテローム性動脈硬化、腸管接着、潰瘍、肝硬病症、糸球体腎炎、悪性腎硬化症、器官移植拒否、腎糸球体病症、糖尿病、または炎症の予防または治療に使用するためのものであることを特徴とする、請求項 1 4 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 1 7】

配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 3 8 個以上のアミノ酸からなる結合組織成長因子蛋白質の断片に結合するポリペプチド、抗体、および化合物からなる群より選択された 1 種以上；または

前記結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子の mRNA に相補的に結合するアンチセンスヌクレオチド、小さい干渉 RNA (s h o r t i n t e r f e r i n g R N A、s i R N A)、および短いヘアピン RNA (s h o r t h a i r p i n R N A) から構成された群より選択された 1 種以上の血管新生抑制剤製造のための用途。

【請求項 1 8】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 9 のアミノ酸配列内の、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む連続する 3 8 個 ~ 3 9 個のアミノ酸からなるものであることを特徴とする、請求項 1 7 に記載の用途。

【請求項 1 9】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、配列番号 5 または配列番号 6 のアミノ酸配列で表示されるものであることを特徴とする、請求項 1 7 に記載の用途。

【請求項 2 0】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片を暗号化する遺伝子は、配列番号 7 または配列番号 8 の塩基配列を有するものであり、前記アンチセンスヌクレオチド、小さい干渉 RNA (s h o r t i n t e r f e r i n g R N A、s i R N A)、および短いヘアピン RNA (s h o r t h a i r p i n R N A) は、前記配列番号 7 または配列番号 8 に対する mRNA の連続する 1 5 ~ 3 0 個の塩基からなる塩基配列に相補的に結合するものであることを特徴とする、請求項 1 8 に記載の用途。

【請求項 2 1】

前記血管新生抑制剤は、癌の成長および転移、リウマチ関節炎、乾癬、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎臓病、高血圧、子宮内膜症、脂肪症、未熟児網膜症、角膜移植拒否、新生血管緑内障、増殖性網膜症、血友病性関節、ケロイド、傷顆粒化、血管接着、骨関節炎、クローン病、再発狭窄症、アテローム性動脈硬化、腸管接着、潰瘍、肝硬病症、糸球体腎炎、悪性腎硬化症、器官移植拒否、腎糸球体病症、糖尿病、または炎症の予防または治療に使用されるものであることを特徴とする、請求項 1 7 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の用途。

。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/001125**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61K 38/18(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 19/02(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)i**

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)

A61K 38/18; A61K 35/12; A61B 17/12; G01N 33/68; C12Q 1/68; A61K 38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), PubMed, Google**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009-0325302 A1 (AYAD A. JAFFA et al.) 31 December 2009 See abstract; claims.	1-27
A	EP 1600109 A1 (MEDGEL CORPORATION) 30 November 2005 See entire document.	1-27
A	US 2009-0232773 A1 (YUKIO KATO et al.) 17 September 2009 See abstract; claims.	1-27
A	US 2006-0281668 A1 (INGRID LANGSETMO PAROBOK et al.) 14 December 2006 See entire document.	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent 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

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 NOVEMBER 2011 (29.11.2011)

Date of mailing of the international search report

30 NOVEMBER 2011 (30.11.2011)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/001125

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **28-38**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 28-38 pertain to a method for treatment of the human, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/001125

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2009-0325302 A1	31.12.2009	AU 2006-244144 A1	16.11.2006
		CA 2606812 A1	16.11.2006
		CN 101213456 A0	02.07.2008
		EP 1889072 A2	20.02.2008
		IL 187114 D0	09.02.2008
		JP 2008-541062 A	20.11.2008
		JP 2008-541062 T	20.11.2008
		MX 2007013831 A	05.02.2008
		NO 20076119 A	30.01.2008
		WO 2006-122043 A2	16.11.2006
		WO 2006-122043 A3	29.03.2007
		ZA 200710199 A	24.06.2009
EP 1600109 A1	30.11.2005	JP 2004-261218 A	24.09.2004
		US 2006-0259130 A1	16.11.2006
		WO 2004-069058 A1	19.08.2004
US 2009-0232773 A1	17.09.2009	EP 1870455 A1	26.12.2007
		EP 1870455 A4	20.01.2010
		EP 2270226 A2	05.01.2011
		EP 2270226 A3	29.06.2011
		WO 2006-106823 A1	12.10.2006
US 2006-0281668 A1	14.12.2006	NONE	

국제조사보고서		국제출원번호 PCT/KR2011/001125
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 38/18(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 19/02(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류물 기재) A61K 38/18; A61K 35/12; A61B 17/12; G01N 33/68; C12Q 1/68; A61K 38/17 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), PubMed, Google		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2009-0325302 A1 (AYAD A. JAFFA et al.) 2009.12.31 See abstract; claims.	1-27
A	EP 1600109 A1 (MEDGEL CORPORATION) 2005.11.30 See entire document.	1-27
A	US 2009-0232773 A1 (YUKIO KATO et al.) 2009.09.17 See abstract; claims.	1-27
A	US 2006-0281668 A1 (INGRID LANGSETMO PAROBOK et al.) 2006.12.14 See entire document.	1-27
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 진구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2011년 11월 29일 (29.11.2011)		국제조사보고서 발송일 2011년 11월 30일 (30.11.2011)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 박정웅 전화번호 82-42-481-8131 

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2009년 7월)

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2011/001125

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

☐ 서면☒ 전자적 형태

b. 제출시기

☒ 출원시 국제출원에 포함☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2011/001125

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 28-38
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제28항 내지 제38항은 사람의 치료방법에 관한 것이므로, PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 중속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2011/001125

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2009-0325302 A1	2009.12.31	AU 2006-244144 A1 CA 2806812 A1 CN 101213456 A0 EP 1889072 A2 IL 187114 D0 JP 2008-541062 A JP 2008-541062 T MX 2007013831 A NO 20076119 A WO 2006-122043 A2 WO 2006-122043 A3 ZA 200710199 A	2006.11.16 2006.11.16 2008.07.02 2008.02.20 2008.02.09 2008.11.20 2008.11.20 2008.02.05 2008.01.30 2006.11.16 2007.03.29 2009.06.24
EP 1600109 A1	2005.11.30	JP 2004-261218 A US 2006-0259130 A1 WO 2004-069058 A1	2004.09.24 2006.11.16 2004.08.19
US 2009-0232773 A1	2009.09.17	EP 1870455 A1 EP 1870455 A4 EP 2270226 A2 EP 2270226 A3 WO 2006-106823 A1	2007.12.26 2010.01.20 2011.01.05 2011.06.29 2006.10.12
US 2006-0281668 A1	2006.12.14	없음	

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2009년 7월)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	4 C 0 8 6	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	4 C 0 8 7	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	4 H 0 4 5	1 0 1
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/02		
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00		1 0 1
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00		H
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/04		
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		1 0 1
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	27/02		
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 P	15/08	(2006.01)	A 6 1 P	9/12		
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	15/08		
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/06		
A 6 1 P	27/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/04		
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	27/06		
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/00		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/16		
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	37/06		
C 0 7 K	14/475	(2006.01)	A 6 1 P	3/10		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 0 7 K	14/475		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 N	15/00		A
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	C 1 2 N	15/00		G
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68		A
G 0 1 N	33/533	(2006.01)	G 0 1 N	33/50		Z
G 0 1 N	33/535	(2006.01)	G 0 1 N	33/15		Z
			G 0 1 N	33/533		
			G 0 1 N	33/535		

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

(72) 発明者 ス, パン - ディル

大韓民国, ギョンサンブク - ド, 7 9 0 - 7 5 1, ポハン - シ, ナム - グ, ジゴク - ドン, 7 5 6
, ギョス アpartment, 7 - 7 0 3

(72) 発明者 リー, ミ - ソオク

大韓民国, ギョンサンブク - ド, 7 9 0 - 7 8 4, ポハン - シ, ナム - グ, ヒョジャ - ドン, サン
3 1 ポステック

(72) 発明者 キム, ワン - ウク

大韓民国, ギョンギ - ド, 4 4 2 - 8 3 6, スウォン - シ, パルダル - グ, ジ - ドン, ヴィンセン
ト ホスピタル ストリート, 9 3 - 6

F ターム(参考) 2G045 AA25

4B024	AA01	BA80	CA11	DA02	EA04	GA11	HA17				
4B063	QA18	QQ02	QQ52	QR35	QR59	QR72	QS25	QS34	QX02		
4C084	AA02	AA03	AA07	BA01	BA19	BA23	BA44	DB57	MA01	NA14	
	ZA332	ZA362	ZA422	ZA452	ZA662	ZA702	ZA752	ZA812	ZA892	ZA962	
	ZB082	ZB112	ZB152	ZB212	ZB262	ZC332	ZC352				
4C085	AA13	AA14	BB11	EE01							
4C086	AA01	AA02	EA16	MA02	MA05	NA14	ZA33	ZA36	ZA42	ZA45	
	ZA66	ZA70	ZA75	ZA81	ZA89	ZA96	ZB08	ZB11	ZB15	ZB21	
	ZB26	ZC33	ZC35								
4C087	AA01	AA02	CA12	MA01	NA14	ZA33	ZA36	ZA42	ZA45	ZA66	
	ZA70	ZA75	ZA81	ZA89	ZA96	ZB08	ZB11	ZB15	ZB21	ZB26	
	ZC33	ZC35									
4H045	AA10	AA30	CA40	DA01	EA23	FA74					

专利名称(译)	使用结缔组织生长因子的药物组合物		
公开(公告)号	JP2013530934A	公开(公告)日	2013-08-01
申请号	JP2013507865	申请日	2011-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	浦项工科大学校产学协力团		
申请(专利权)人(译)	Posutekku学院 - 工业基金会		
[标]发明人	リュウスンホ спанチイル リーミソオク キムワンウク		
发明人	リュウ,スン ホ ス,パン-チイル リー,ミ-ソオク キム,ワン-ウク		
IPC分类号	A61K38/00 A61K31/7088 A61K31/713 A61K35/76 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P17/02 A61P43/00 A61K39/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P29/00 A61P19/02 A61P17/06 A61P27/02 A61P13/12 A61P9/12 A61P15/08 A61P3/06 A61P3/04 A61P27/06 A61P1/00 A61P1/16 A61P37/06 A61P3/10 C07K14/475 C12N15/09 C12N15/113 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/533 G01N33/535		
CPC分类号	A61K38/18 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/04 A61P13/12 A61P15/08 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P29/00		
FI分类号	A61K37/02.ZNA A61K31/7088 A61K31/713 A61K35/76 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P17/02 A61P43/00.101 A61K39/00.H A61P35/00 A61P35/04 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P17/06 A61P27/02 A61P13/12 A61P9/12 A61P15/08 A61P3/06 A61P3/04 A61P27/06 A61P1/00 A61P1/16 A61P37/06 A61P3/10 A61P29/00 C07K14/475 C12N15/00.A C12N15/00.G C12Q1/68.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/533 G01N33/535		
F-TERM分类号	2G045/AA25 4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ52 4B063/QR35 4B063/QR59 4B063/QR72 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA19 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/DB57 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA422 4C084/ZA452 4C084/ZA662 4C084/ZA702 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZC332 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA42 4C086/ZA45 4C086/ZA66 4C086/ZA70 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB15 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZC33 4C086/ZC35 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/CA12 4C087/MA01 4C087/NA14 4C087/ZA33 4C087/ZA36 4C087/ZA42 4C087/ZA45 4C087/ZA66 4C087/ZA70 4C087/ZA75 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA96 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB15 4C087/ZB21 4C087/ZB26 4C087/ZC33 4C087/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/EA23 4H045/FA74		
优先权	1020100132775 2010-12-22 KR 61/328686 2010-04-28 US		
其他公开文献	JP5646732B2		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本公开涉及使用结缔组织生长因子的血管生成相关药物组合物，更具体地涉及用于促进血管生成的药物组合物，其含有结缔组织生长因子或用于抑制血管生成的药物组合物，其含有选自多肽的至少一种，抗体和结缔组织生长因子的化合物。在本发明中发现的结缔组织生长因子蛋白片段是FPRL1的结合区域，有效诱导FPRL1特异性ERK磷酸化，激活FPRL1以增加细胞内Ca²⁺浓度，最后有效诱导血管生成，因此，结缔组织生长因子的片段可用于促进血管生成的药物组合物，而多肽，抗体或结缔组织生长因子蛋白片段的化合物可用于抑制血管生成的药物组合物。

【图 29】

