

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5646732号
(P5646732)

(45) 発行日 平成26年12月24日 (2014. 12. 24)

(24) 登録日 平成26年11月14日 (2014. 11. 14)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02 Z N A

A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 31/713 (2006. 01)

A 6 1 K 31/713

A 6 1 K 35/76 (2006. 01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 48/00 (2006. 01)

A 6 1 K 48/00

請求項の数 13 (全 43 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)
 (65) 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)
 (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)
 審査請求日 平成24年10月29日 (2012. 10. 29)
 (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)

(73) 特許権者 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 31
 (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, 790-
 751, ポハンシ, ナムグ, ジゴク
 ドン, 756, ギョス アパートメント,
 5-204

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) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 5 または配列番号 6 のアミノ酸配列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からなることを特徴
 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 4】

請求項 1 ~ 3 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 5】

配列番号 5 または配列番号 6 のアミノ酸配列からなる結合組織成長因子蛋白質の部位に
 結合するポリペプチド、および抗体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、血管新生抑制用組成物。

【請求項 6】

10

20

前記結合組織成長因子蛋白質の部位を暗号化する遺伝子は、配列番号7または配列番号8の塩基配列からなることを特徴とする、請求項5に記載の血管新生抑制用組成物。

【請求項7】

請求項5および6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。

10

【請求項8】

(a) 配列番号5または配列番号6のアミノ酸配列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9】

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8に記載のスクリーニング方法。

20

【請求項10】

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8に記載のスクリーニング方法。

【請求項11】

配列番号5または配列番号6のアミノ酸配列からなる結合組織成長因子蛋白質の部位に結合するポリペプチド、および抗体からなる群より選択された1種以上の血管新生抑制剤製造のための用途。

30

【請求項12】

前記結合組織成長因子蛋白質の部位を暗号化する遺伝子は、配列番号7または配列番号8で表示される塩基配列からなることを特徴とする、請求項11に記載の用途。

【請求項13】

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11に記載の用途。

40

【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。

50

【背景技術】

【0002】

血管新生 (a n g i o g e n e s i s) 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 (e m b r y o n i c d e v e l o p m e n t)、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 (F o l k m a n J e t a l. , I n t. R e v. E x p. P a t h o l. , 1 6, p p 2 0 7 - 2 4 8, 1 9 7 6)。

【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。

10

【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。

20

【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 ' A m a t o R J e t a l. , O p h t h a l m o l o g y, 1 0 2 (9), p p 1 2 6 1 - 1 2 6 2, 1 9 9 5; A r b i s e r J L, J. A m. A c a d. D e r m a t o l., 3 4 (3), p p 4 8 6 - 4 9 7, 1 9 9 6; O ' B r i e n K D e t a l. C i r c u l a t i o n, 9 3 (4), p p 6 7 2 - 6 8 2, 1 9 9 6; H a n a h a n D e t a l., C e l l, 8 6, p p 3 5 3 - 3 6 4, 1 9 9 6)。

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 (F o l k m a n a n d T y l e r, C a n c e r I n v a s i o n a n d m e t a s t a s i s, B i o l o g i c m e c h a n i s m s a n d T h e r a p y (S. B. D a y e d.) R a v e n p r e s s, N e w Y o r k, p p 9 4 - 1 0 3, 1 9 7 7; P o l v e r i n i P J, C r i t. R e v. O r a l . B i o l. M e d., 6 (3), p p 2 3 0 - 2 4 7, 1 9 9 5)。

30

【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。

40

【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 (

50

vascular endothelial growth factor-A、VEGF-A)とFPR L1(formyl peptide receptor-like)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有する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剤製造のための用途を提供することを目的とする。

10

【0009】

他の例は、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 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。

【0010】

さらに他の例は、CTGF内のFPR L1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。

20

【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)または配列番号6のアミノ酸配列からなる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。

【0012】

他の例は、配列番号5または配列番号6のアミノ酸配列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。

30

【0014】

さらに他の例は、配列番号5または配列番号6のアミノ酸配列からなる結合組織成長因子蛋白質の部位に結合するポリペプチド、および抗体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部位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。

【0015】

さらに他の例は、配列番号5または配列番号6のアミノ酸配列からなる結合組織成長因子蛋白質の部位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部位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)で表示される塩基配列からなり得る。

40

【0017】

さらに他の例は、(a)配列番号5または配列番号6のアミノ酸配列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。

【0018】

以下、本発明をより詳細に説明する。

50

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～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FPR1（formyl peptide receptor-like1）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FPR1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、FPR1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）、FPR1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）。

【0020】

特に、前記結合組織成長因子蛋白質がFPR1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）。

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（EWVCDEPKDQTVVGPAALAYRLEDTFGPDPTMIRANCLV）で表示されたものであり得る。

【0021】

前記結合組織成長因子蛋白質の断片は、FPR1と結合する部位で（実験結果5参照）、FPR1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）、FPR1を活性化して細胞内の Ca^{2+} 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を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-TGG GTG TGT GAC GAG CCC AAG GAC CAA ACC GTG GTT GGG CCT GC C CTC GCG GCT TAC CGA CTG GAA GAC ACG TT T GGC CCA GAC CCA ACT ATG ATT AGA GCC AAC C TGC CTG GTC-201）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（163-GAG TGG GTG TGT GAC GAG CCC AAG GAC CAA ACC GTG GTT GGG CCT GCC CTC GCG GCT TAC CGA CTG GAA GAC ACG TTT GGC CCA GAC CCA ACT ATG ATT AGA GCC AAC TGC CTG GTC-201）であり得る。

10

【0023】

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、EcoRI-INSERT-XbaI in pAB-beeTM-FH vector (including signal peptide & flag tag) 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。

20

【0024】

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。

【0025】

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。

30

【0026】

前記「作動可能に連結された (operably linked)」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、部位一特異的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。

40

【0027】

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 (in frame) になければならない。

【0028】

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

50

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。

【0029】

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。

10

【0030】

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。

20

【0031】

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。

30

【0032】

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。

【0033】

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。

40

【0034】

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mR

50

NA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。

10

【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シーケンス (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 111 (5): 563-74)。

20

【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。

30

40

【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]; [M

50

iyagishi M等(2002), Nat. Biotechnol. 20:497-500]; [Paddison PJ等(2002), Genes Dev. 16:948-958; Lee NS等(2002), Nat. Biotechnol. 20:500-505]; 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、本発明の一実施例においては、FPRL1のsiRNAとしてターゲット部位をAAUUCACAUCGUGGUGGACA U (配列番号10) とする二重鎖RNA分子 (例えば、Sense: UUCACAUCGUGGUGGACA UdTdT (配列番号3) およびAntisense: AUGUCCACCA CGAUGUGAA dTdT (配列番号4)) を使用することができる。

10

【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、糖尿病性膜網症、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。

20

【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。

30

40

【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介体と混合できる。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

50

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を特徴とする。

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

40

【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、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。

【0047】

50

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。

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】

10

【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。

【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。

20

【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。

【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。

30

【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。

【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。

40

【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。

【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

50

成を誘導することを確認した結果である。

【図20】VEGF-AがHUVECs細胞でFPR L1の発現を誘導するか否かを培養時間に応じてRT-PCR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21】VEGF-AがHUVECs細胞でFPR L1の発現を誘導するか否かを処理量に応じてRT-PCR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22】VEGF-Aによって誘導されたHUVECsの増殖がFPR L1拮抗剤(WRW4)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23】VEGF-Aによって誘導されたHUVECsの移動がFPR L1拮抗剤(WRW4)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。

10

【図24】VEGF-Aによって誘導されたHUVECsの管形態構造の形成がFPR L1拮抗剤(WRW4)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25】FPR L1 siRNAをHUVECsに処理した結果、FPR L1の発現が抑制されることを確認した結果である。

【図26】FPR L1 siRNAをHUVECs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27】FPR L1 siRNAをHUVECs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28】FPR L1拮抗剤(WRW4)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。

20

【図29】VEGF-Aによって発現したCTGFとFPR L1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。

30

【0050】

<実験方法>

1. 実験材料

Phospho-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) およびERK1/2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-A165、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。

40

FPR L1に対するsiRNA (sense: UUCACAUCGUGGUGGACA UdTdT (配列番号3)、anti-sense: AUGUCCACCACGAUGUGAAdTdT (配列番号4)) およびルシフェラーゼ(luciferase)に対するsiRNA (sense: CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT (配列番号11)、anti-sense: UCGAAGUAUUCGCGGUACGdTdT (配列番号12)) をDharmacon Research, Inc. (Chicago, IL) 社で合成した。また、WKY M Vm (配列番号1)、WRWWW (配列番号2

50

、WRW4)、およびbiotinylated WKYMVmはA&PEP 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(EWVCDEPKDQTVVGPAALAAAYRLEDTFGPDPTMIRANCLV(配列番号6)-NH₂)はAnygen Co. Ltd. (Gwangju, 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 precursor: 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)を取得した。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(1×10⁵ 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 Tech

nology、Beverly、MA、USA)、anti-CTGF (Abcam、Cambridge、MA、USA)、anti-Actin (Sigma、St. Louis、MO、USA)、またはanti-Flag (Sigma、St. Louis、MO、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) C18 column) 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℃にて一晩中培養した。

【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/I-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 (transient 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-Link 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、FPRL1/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、anti-human fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)-conjugated スレプトアビジン (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, FPRL1/LXA4 R. Blood 101, 1572-1581, 2003)

【0059】

8. Ca^{2+} 測定

FPRL1/RBL、vector/RBL または FPR/RBL 細胞を、37℃にて1時間、0.03% (w/v) plutonic 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 20 μM /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、LSM510 Meta; 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

10

20

30

40

50

〕ーチミジン ($1 \mu\text{Ci}$ 、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]ーチミジンを、 37°C 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 (liquid 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 ($10^{-1} \sim 10^2 \text{ nM}$) 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程度を定量化し、前記細胞を50倍に拡大して撮影した。

【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- A_{165} 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、チューブの形成程度を定量化した。

【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°C 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、 $1-2\text{ml}$ 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。

【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: UUCACAUCGUGGUGGACAUDTdT (配列番号3)、anti-sense: AUGUCCACCACGAUGUGAAdTdT (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 20 nM 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

10

20

30

40

50

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。前記細胞を培養して24時間および48時間後に収集し、FPR L1の発現程度をRT-PCR分析によって確認した。

【0065】

12. RT-PCR分析

製造会社の指示に従って、商業的に利用可能なTRI試薬 (Molecular Research Center) を用い、前記形質感染したHUV ECsで全てのRNAを分離した。3ugの各DNA-free total RNA試料およびoligo(dT)₁₅とMoloney murine leukemia virus逆転写酵素 (Promega、WI、USA) を用い、製造会社の指示に従ってfirst-strand cDNAを合成した。以降、1xPCRバッファー、200uM dNTPs、10uMの各特異的プライマー (sFPR L1: 5'-GACCTTGGA TTCTTGC TCTAGTC-3' (配列番号13)、asFPR L1: 5'-GGATCAGTCTCTCTCGGAAGTC-3' (配列番号14)、sCTGF: 5'-TTCCAGAGCAGCTGCAAGTACCA-3' (配列番号15)、asCTGF: 5'-TTGTCATTGGTAACCCGGGTGGA-3' (配列番号16))、および1.25units Taq DNA重合酵素 (Perkin-Elmer) が含有されている50ulの反応溶液で同量のcDNA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、EtBr (ethidium bromide) で染色して赤外線透視で現像化した。

【0066】

<実験結果>

1. VEGF-Aが処理されたHUV ECsの条件培地によるERK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 (vascular endothelial growth factor-A、VEGF-A) は、血管新生 (angiogenesis) の調節において、G-蛋白質連結受容体 (G-protein-coupled receptor) であるFPR L1 (formyl peptide receptor-like1) と多くの細胞機能を共有する。しかし、VEGF-AとFPR L1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。

【0067】

本発明者らは、これを確認するために、VEGF-Aが処理されたヒトの臍帯静脈内皮細胞 (HUV EC) から条件培地 (CM) を取得し、これをFPR L1-過発現する細胞のFPR L1/RBLに10ng/mlまたは50ng/mlで8時間処理した。この時、陽性対照群としてFPR L1の作用ペプチド (agonistic peptide) のWKYVM (Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met、配列番号1) を10nMで処理した。

【0068】

前記処理後、anti-phospho ERK (extracellular signal regulated kinase) 1/2およびanti-ERK1/2抗体 (Cell Signaling Technology、Beverly、MA、USA) 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ブロットを行った後、前記膜を化学発光 (chemiluminescence substrate、Amersham Pharmacia) 基質で視角化した結果を図1に記載した。

前記図1に記載したように、VEGF-Aが処理されたHUV ECsから取得した条件培地は、濃度依存的にERK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VEGF-Aを、前記記載したvector/RBL、FP

R/RBL、またはFPRL1/RBL細胞に10ng/ml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(agonistic peptide)のWKYMVM(配列番号1)を10nM処理した。以降、前記と同様の方法で免疫ブロットを行い、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FPRL1を過発現させるFPRL1/RBL細胞でのみERK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ERKリン酸化は、FPRL1に特異的であることが分かる。

【0070】

2. 条件培地でERKリン酸化誘導活性がある蛋白質の同定

10

前記<実験方法5>に記載したように、前記条件培地のHPLC分画物40ugをFPRL1/RBL細胞に5分処理し、前記<実験結果1>のようにERK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、B12~C4が含まれている分画物がFPRL1/RBL細胞でERKリン酸化を誘導することが分かり、B11からC4までの各分画物の活性ピークを調べた結果、B12、C3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、FPRL1/RBL細胞でERKリン酸化を誘導できる活性のある蛋白質はB12に含有されていると仮定し、前記B12分画物に対して前記<実験方法5>に記載されたMS/MS分析を実施し、その結果を図4に記載した。

20

前記図4に記載したように、ヒトの結合組織成長因子(connective tissue growth factor、CTGF)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、FPRL1/RBL細胞でERKリン酸化を誘導できる活性のある蛋白質は、CTGFであることが分かる。

【0072】

3. VEGF-AによるCTGF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HUVECsから分泌した条件培地でCTGFがFPRL1と結合し、FPRL1/RBL細胞でERKリン酸化を誘導できる活性があるものと考えた。

30

【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RT-PCR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HUVECsにおいて細胞溶解物または条件培地でのCTGFの発現程度をVEGF-Aの処理時間に応じて分析した結果、またはVEGF-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、RT-PCR分析結果、VEGF-AをHUVECsに処理して0.5時間が経過した時からCTGF mRNA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CTGF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CTGF数値が増加することが分かる。

40

また、図6に記載したように、RT-PCR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CTGF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CTGF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 Systems、Minneapolis、MN、USA)、VEGF receptor-1(VEGFR-1)(R&D Systems、Minneapolis、MN、USA)、VEGF receptor-2(VEGFR-2)(R&D Systems、Minneapolis、MN、USA)の中和抗体、そして、対照群としてIgG抗体をHUVECsに5ug/mlで

50

30分間処理し、VEGF-Aを20ng/ml処理した。2時間経過後、細胞溶解物を取得し、抗-human CTGF抗体で免疫プロットを行い、その結果を図7に記載した。

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. FPRL1に対するCTGF結合部位の決定

本発明者らは、FPRL1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/II-L、CTGF/II-L、CTGF/II、CTGF/L、CTGF/L-II-L-IV、およびCTGF/L-L-II-L-IVが挿入されたプラスミドを製造し、これをHEK293T細胞(ATCC、Manassas、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FPRL1/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/II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/II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(MTAASMGPVRFVFLALCS
RPAVGQNCSPGCRCPDEPAPRC
PAGVSLVLDGCGCCRVCA
KQLGELCTERDPCDPHKGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGA
PCIFGGTIVYRSGESFQSSCKYQCTCLDGAVGCMPLCSMDV
RLPSPDCPPFPRRVKLP
GKCC
EEWVCDEPKDQTVVGPALAA
YRLEDTFGPDPTMIRANCLVQTTEWSACSKTCGMGISTRV
TNDNASCRLEKQSRLCMV
RPCEADLEENIKKGKKCIRTPK
ISKPIKFELSGCTSMKTYRAKFCGVCTDGRCCTPHRTTTL
PVEFKCPDGEVMKKNMFIKTCACHYNC
PGDNDIFESLYY
RKMYGDMA)の164~201番目の部位(太い文字で表示、配列番号5)がFPRL1に対するCTGF結合部位であることが分かる。

【0078】

5. CTGFリンカーポリペプチドのFPRL1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
YRLEDTFGPDPTMIRANCLV、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FPRL1/RBL、vector/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。

【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、FPRL1/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、FPRL1拮抗剤のWRW4(配列番号2)10uMを、FPRL1/RBL、vector/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。

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FPRL1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FPRL1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

10

20

30

40

50

CTGF (recombinant human CTGF, rhCTGF) と比較した。具体的には、F P R L 1 / R B L 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E R K リン酸化の有無を測定し、その結果を図11に記載した。

前記図11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E R K 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F P R L 1 / R B L 細胞に添加する時、W R W 4 を10 uM添加するか添加しない場合、E R K リン酸化程度を比較して図11に記載した。

前記図11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E R K リン酸化を誘導することが分かり、特に、F P R L 1 拮抗剤のW R W 4 を処理した場合、E R K リン酸化が抑制されることが分かる。

【0081】

7. CTGFリンカーポリペプチドによるCa²⁺濃度の上昇

F P R L 1 が活性化されると、細胞内のCa²⁺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F P R L 1 が活性化され、最終的に細胞内のCa²⁺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12に記載した。

【0082】

前記図12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F P R L 1 / R B L 細胞でのみCa²⁺濃度が上昇することが分かる。さらに、実際にF P R L 1 / R B L 細胞内のCa²⁺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F P R L 1 の作用剤のW K Y M V m (Wmと表示) と類似することが分かる。また、F P R L 1 の拮抗剤であるW R W 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Ca²⁺濃度の増加程度が減少することが分かる。

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

【0083】

8. H U V E C s でCTGFリンカーポリペプチドのF P R L 1 結合および活性化の確認

本発明者らは、ヒトの臍帯静脈内皮細胞(H U V E C s)でF P R L 1 を多量発現するため、V E G F - A が処理されたH U V E C 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】

H U V E C s 細胞で前記CTGF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前記<実験方法7>のように調べ、その結果を図13に記載した。具体的には、H U V E C 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W R W 4 を共に処理した。

前記図13に記載したように、H U V E C 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、F P R L 1 拮抗剤であるW R W 4 を処理した場合、このような移動は観察されなかった。

【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H U V E C 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 E R K 1 / 2 抗体で免疫プロットを行い、その結果を図14に記載した。

前記図14に記載したように、CTGFリンカーポリペプチドをHUVECsに処理した場合にも、ERKリン酸化が効果的に誘導され、FPR L1の拮抗剤のWRW4 (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。

【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HUVECsに1時間処理し、前記記載したように、細胞内のCa²⁺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Ca²⁺濃度を増加させるが、FPR L1の拮抗剤であるWRW4 (10 uM)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HUVECsでもFPR L1と特異的に結合し、これによってHUVECsを活性化させることが分かる。

【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 (angiogenesis) 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 (Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 407, 249-257, 2000)、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HUVECs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。

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HUVECs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 uM)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、HUVECs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 uM)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。

【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 uM)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 *in vitro* およびインビボで血管生成を誘導することが分かる。

【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HUVECs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、HUVECsに20 ng/ml VEGF-Aを処理し、多様な時間

10

20

30

40

50

培養した後、前記＜実験方法12＞によってRT-PCRを行ってFPRL1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。

さらに、HUVECsに多様な濃度でVEGF-Aを処理し、培養した後、前記＜実験方法12＞によってRT-PCRを行ってFPRL1の発現程度を測定し、その結果を図21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21に記載した。

前記図20および図21に記載したように、VEGF-AがHUVECsで濃度依存的にFPRL1の発現を誘導することが分かる。

【0092】

11. VEGF-AのCTGF/FPRL1結合体を通した血管生成誘導効果

本発明者らは、FPRL1拮抗剤のWRW4によってVEGF-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、VEGF-Aによる血管形成にFPRL1の活性化が関与することが分かった。

まず、HUVECsにVEGF-Aを20ng/ml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22～図24に記載した。この時、FPRL1拮抗剤であるWRW4を追加的に添加した。

前記図22に記載したように、VEGF-AがHUVECsの増殖を誘導することが分かるが、VEGF-AによるHUVECsの増殖にFPRL1の拮抗剤であるWRW4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。

【0093】

また、前記図23に記載したように、VEGF-Aは、HUVECsの移動を誘導することが分かり、さらに、FPRL1の拮抗剤であるWRW4(10uM)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。

【0094】

なお、前記図24に記載したように、VEGF-Aは、HUVECsの管形態構造の形成を誘導することが分かり、さらに、FPRL1の拮抗剤であるWRW4(10uM)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。

【0095】

一方、前記＜実験方法11＞に記載したように、FPRL1 siRNAを用いてFPRL1の発現を抑制し、前記＜実験方法12＞によってRT-PCRを行ってFPRL1の発現程度を測定し、その結果を図25に記載した。

前記図25に記載したように、FPRL1 siRNAをHUVECsに処理した結果、FPRL1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(Luciferase) siRNAを処理した場合は、そうでないことが分かる。

【0096】

これにより、前記FPRL1 siRNAをHUVECsに処理した場合、VEGF-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26および図27に記載した。

前記図26および図27に記載したように、前記FPRL1 siRNAをHUVECsに処理した場合、対照群のルシフェラーゼ(Luciferase) siRNAを処理した場合に比べて、VEGF-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。

【0097】

また、インビボでFPRL1拮抗剤(10ug/CAM)を処理した場合、VEGF-A(25ng/CAM)による血管生成活性が抑制されるか否かを＜実験方法10＞を通して確認し、その結果を図28に記載した。

前記図28に記載したように、FPRL1拮抗剤は、VEGF-Aによる血管生成を非常に抑制することが分かる。

10

20

30

40

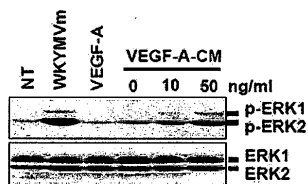
50

【 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かる。つまり、V E G F - A によって誘導された C T G F と F P R L 1 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、V E G F - A による新生血管形成に関与することが分かる。

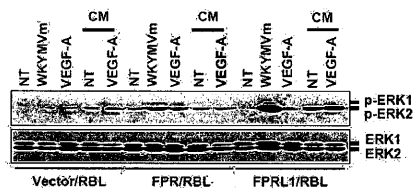
【 図 1 】

【 図 1 】



【 図 2 】

【 図 2 】



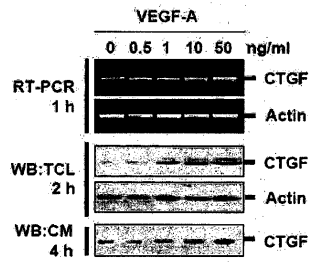
【 図 4 】

【 図 4 】

MTAASMGPVRVAFVLLALCSRPAVG
 QNCSGPCRCPPDEPAPRCPAGVSLVLD
 GCGCCRVCAKQLGELCTERDPCDPH
 KGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPCI
 FGDTVYRSGESFQSSCKYQCTCLDGA
 VGCMPPLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKL
 PGKCCEEWCDEPKDQTVVGPALAAAY
 RLEDTFGPDPTMIRANCLVQTTEWSA
 CSKTCGMGISTRVTNDNASCRLEKQS
 RLCMVRPCEADLEENIKKGKKCIRTPK
 ISKPIKFELSGCTSMKTYRAKFCGVCT
 DGRCCTPHRTTTLPEFKCPDGEVMK
 KNMMFIKTCACHYNCPGDNDIFESLYY
 RKMYGDMA

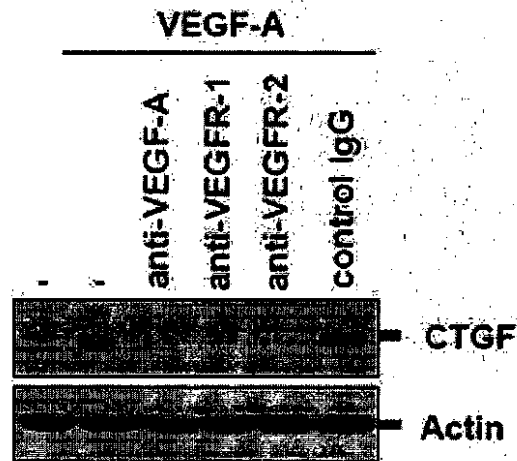
【図 6】

[図 6]



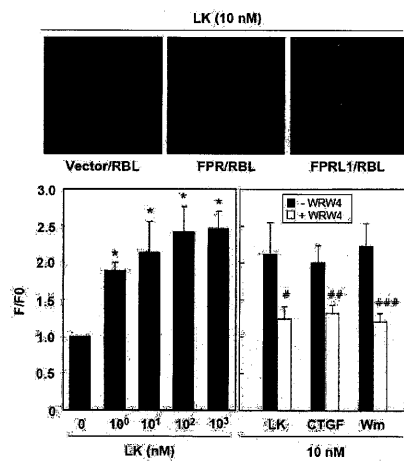
【図 7】

[図 7]



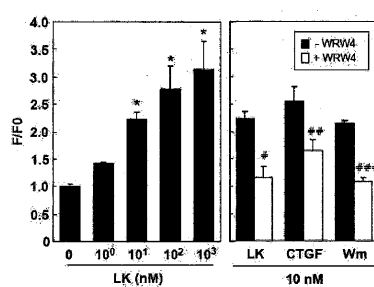
【図 12】

[図 12]



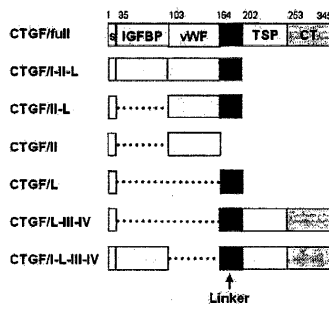
【図 15】

[図 15]



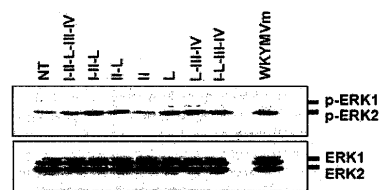
【図 8】

[図 8]

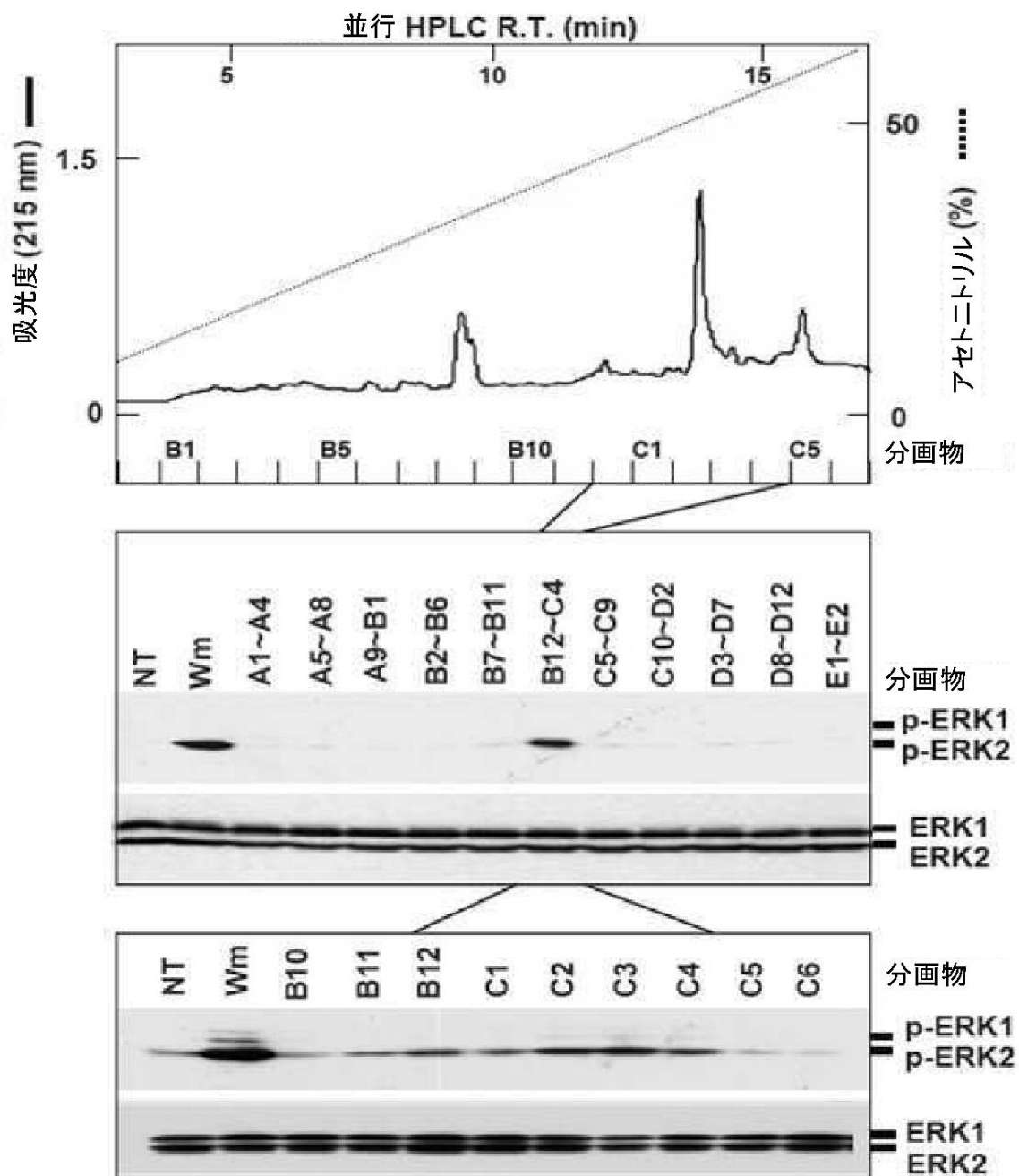


【図 9】

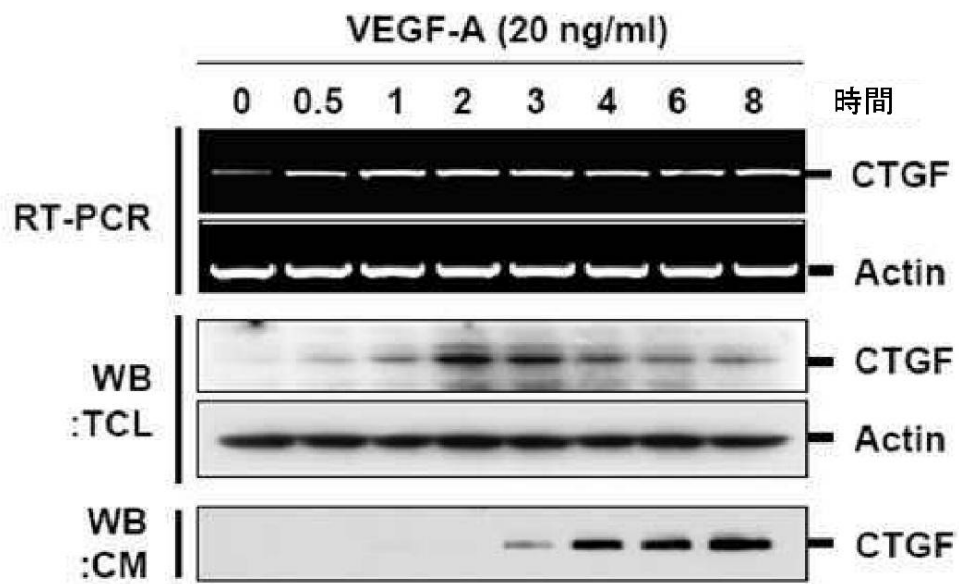
[図 9]



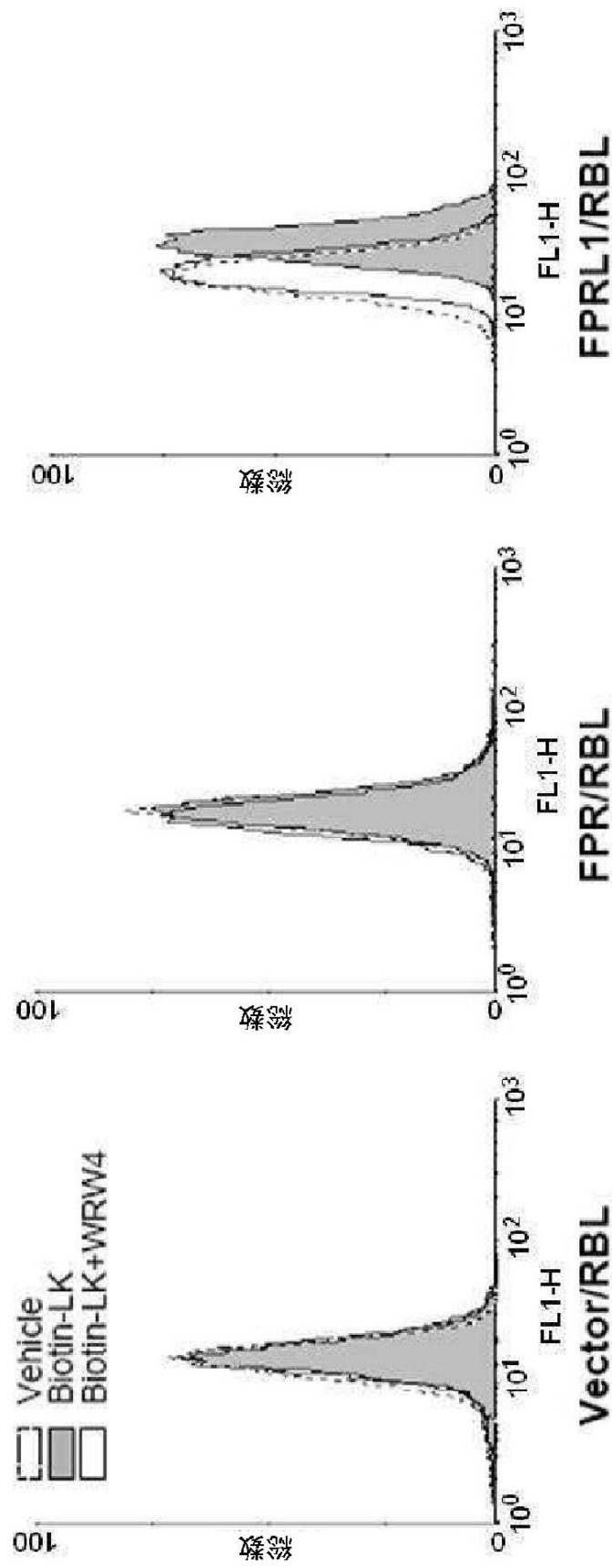
【図 3】



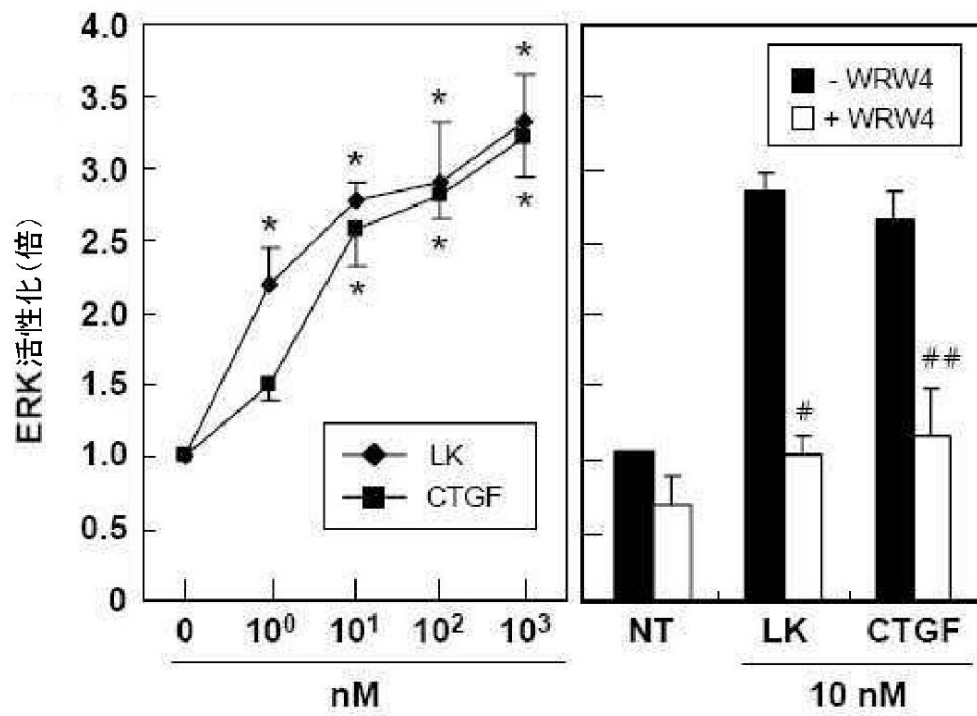
【図 5】



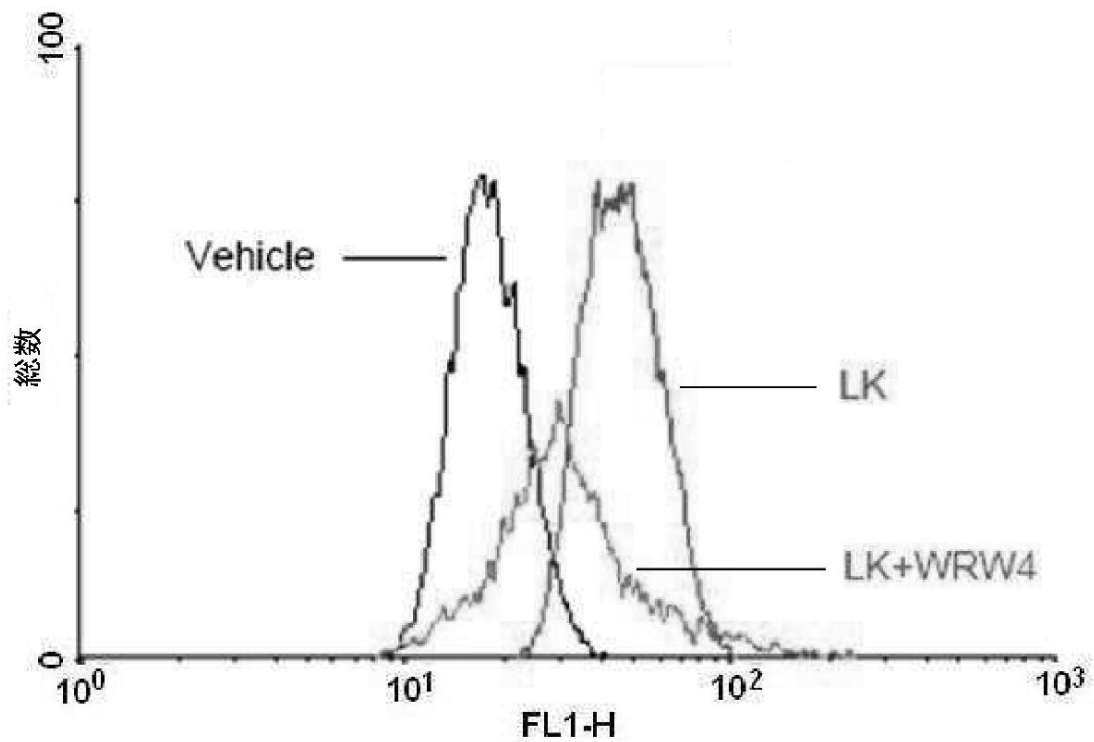
【図 10】



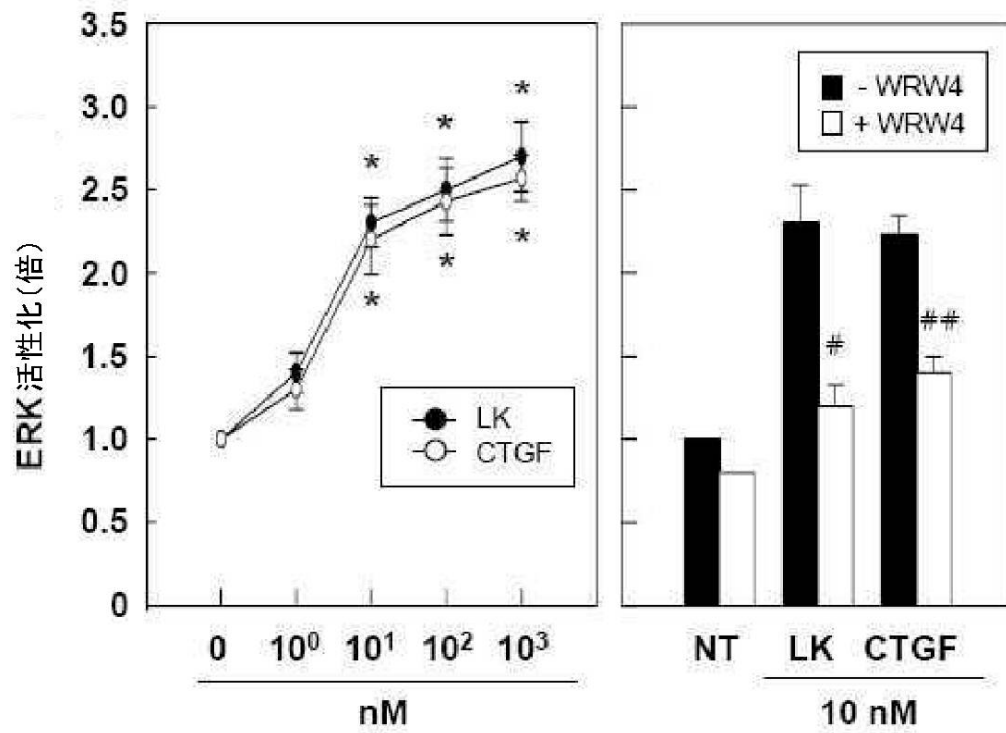
【図 1 1】



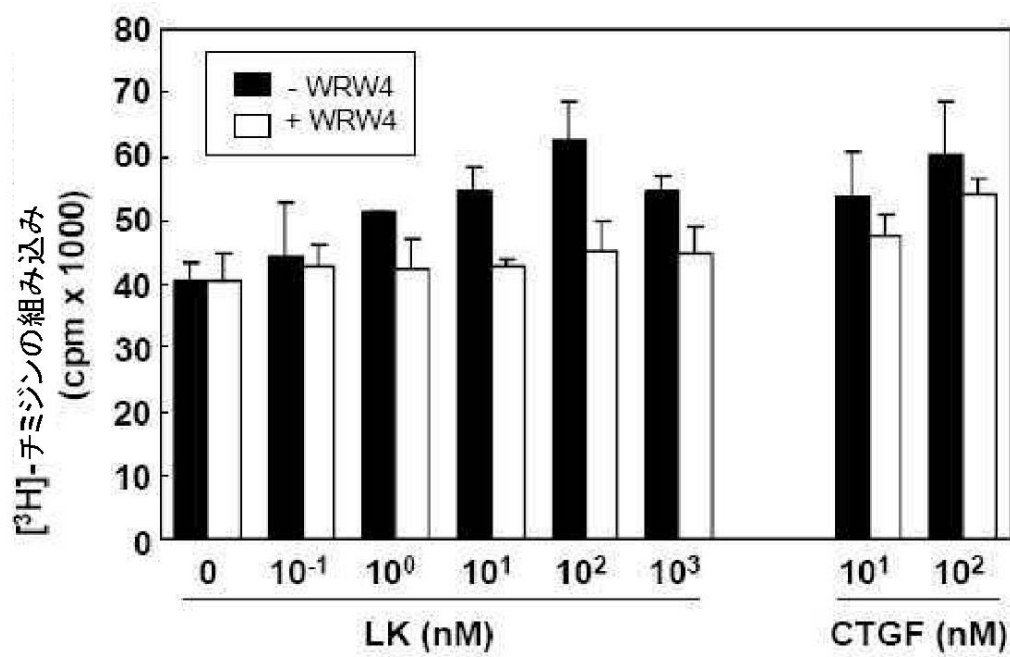
【図 1 3】



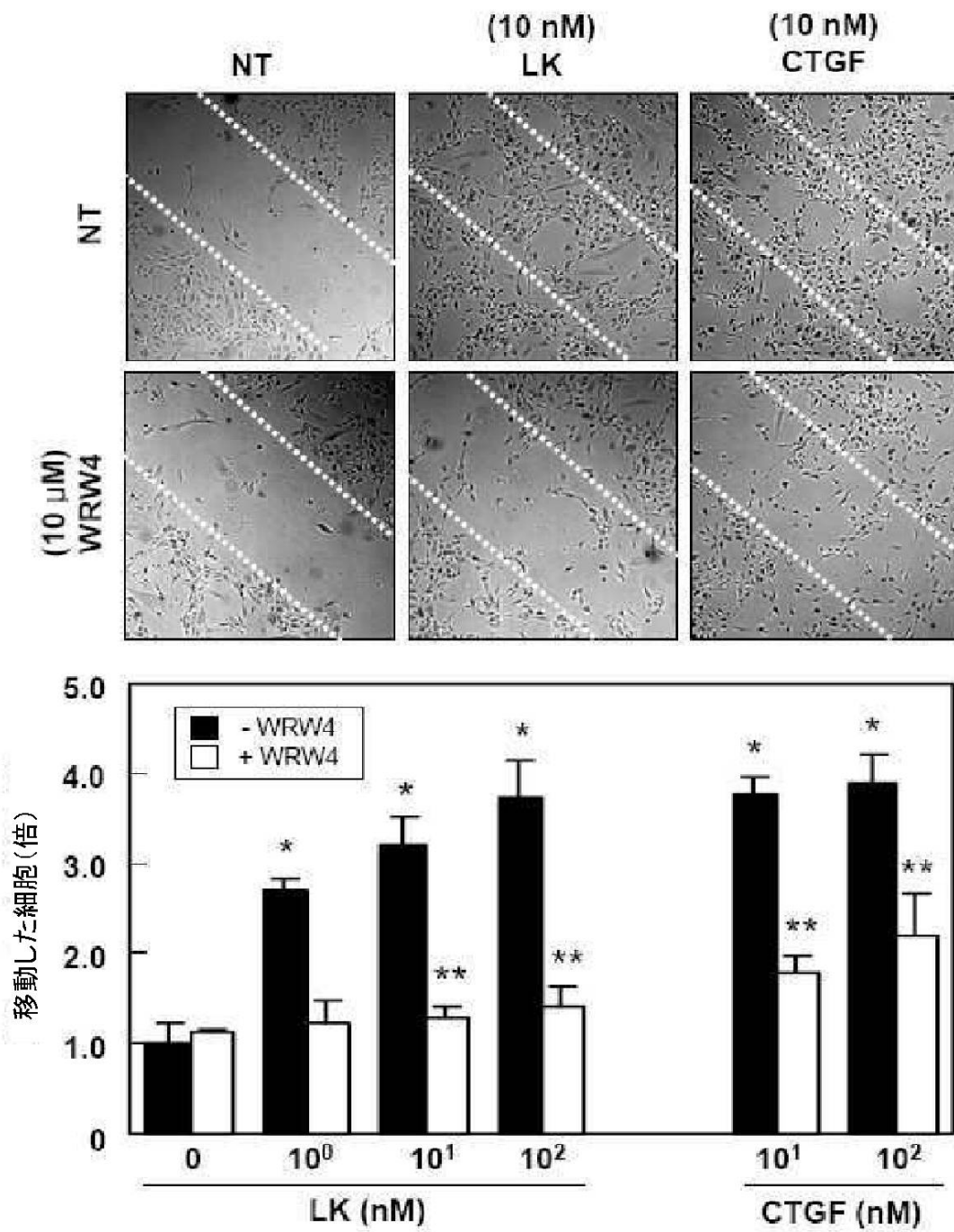
【図 1 4】



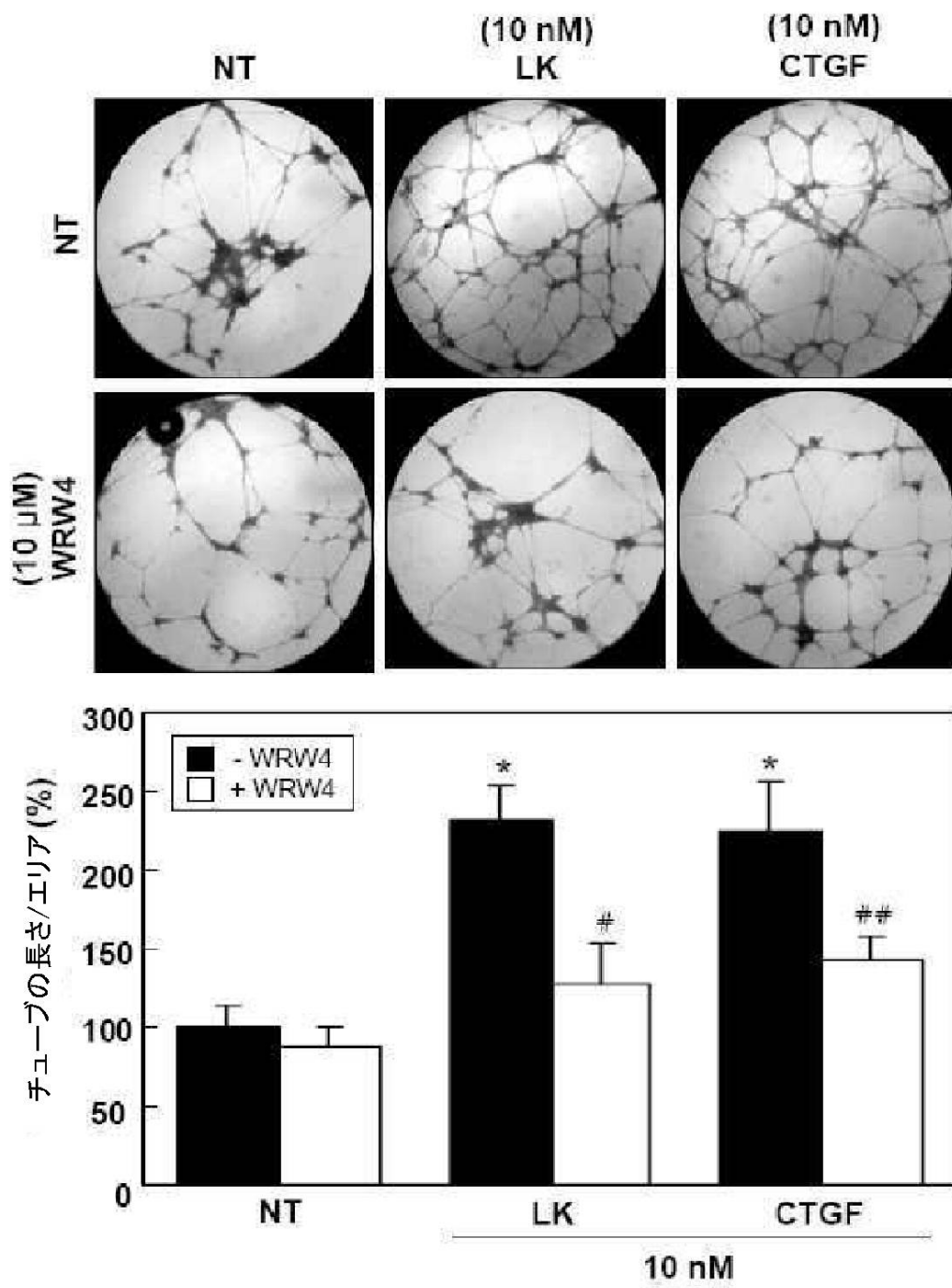
【図 1 6】



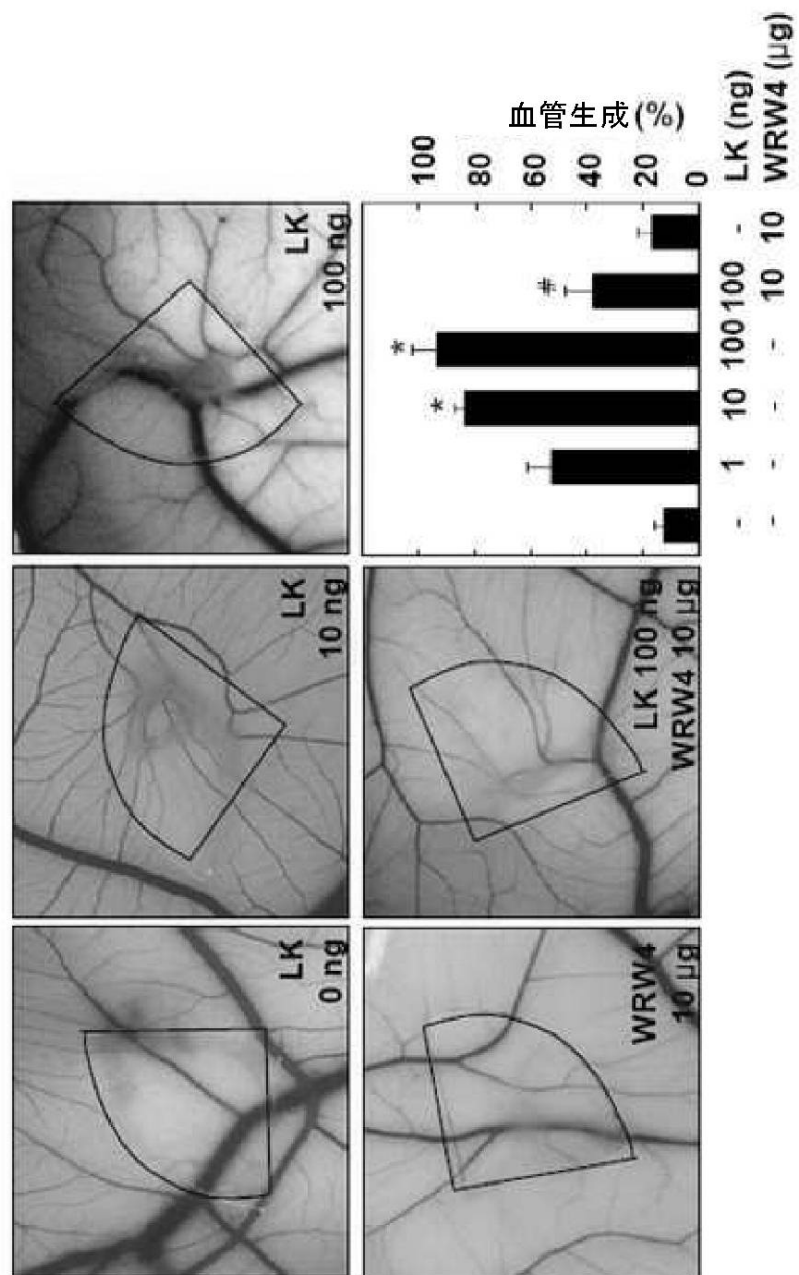
【図 17】



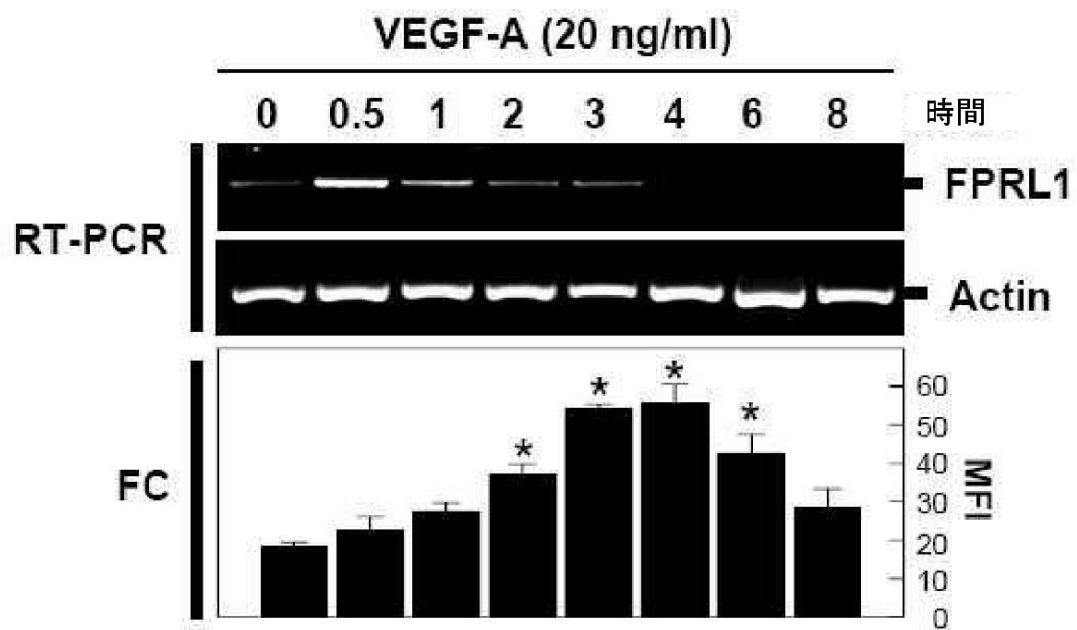
【図 18】



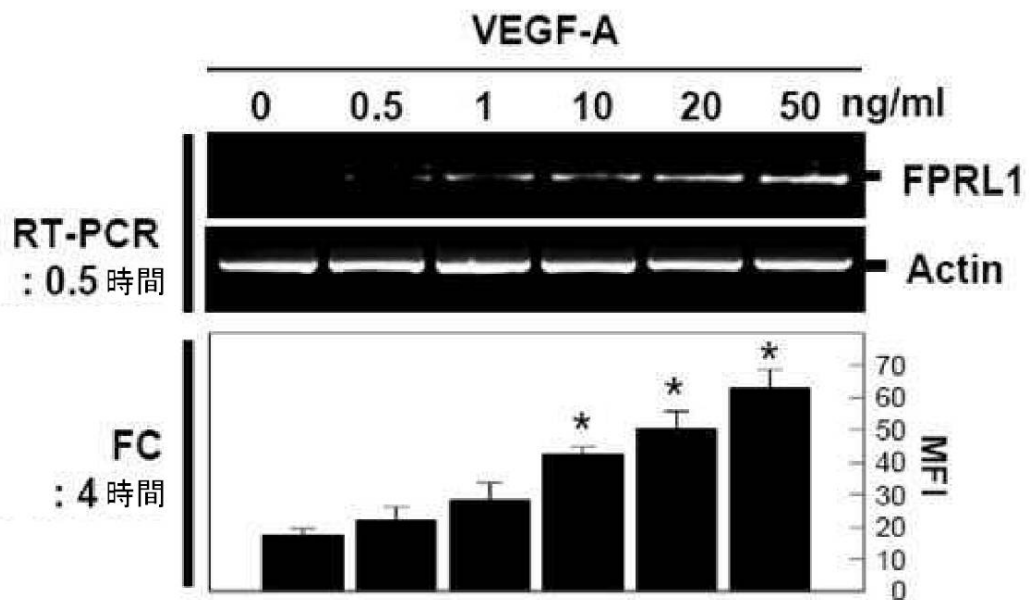
【図 19】



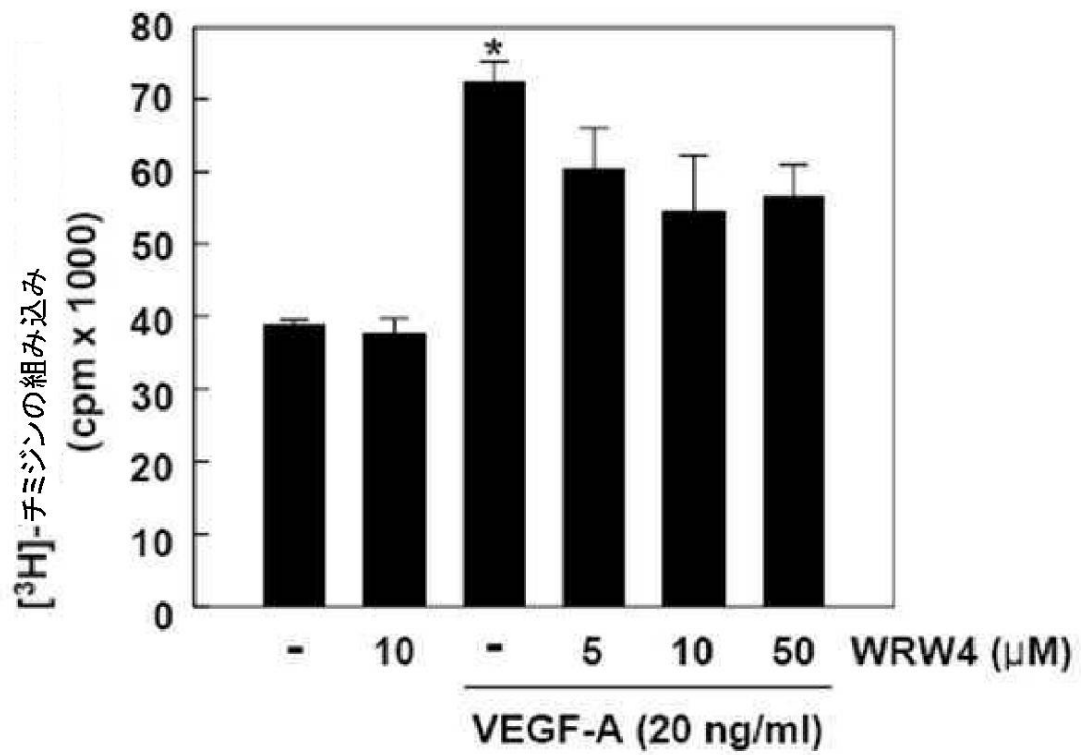
【図 2 0】



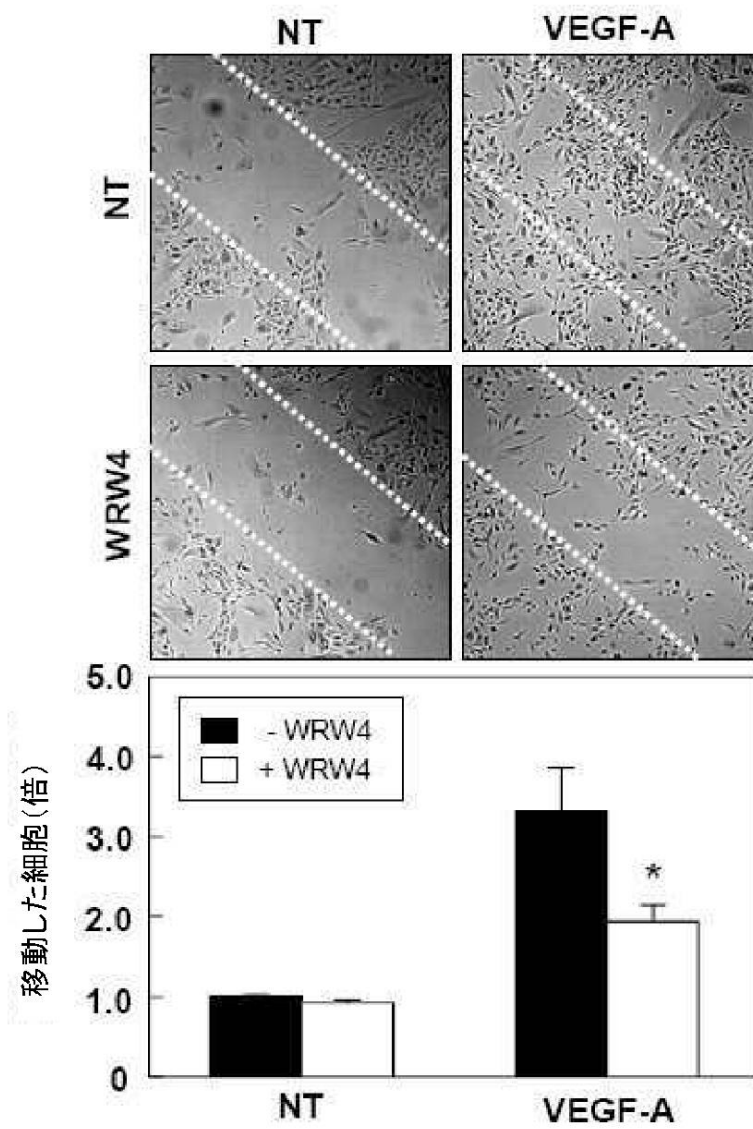
【図 2 1】



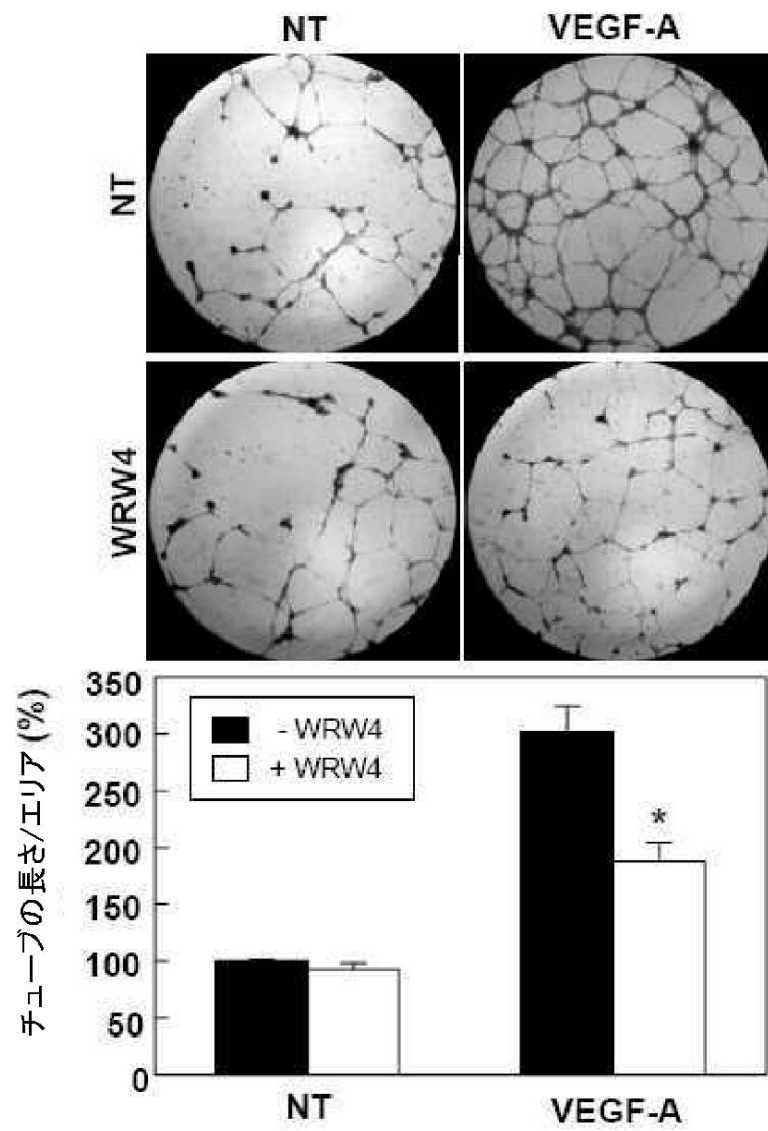
【図 2 2】



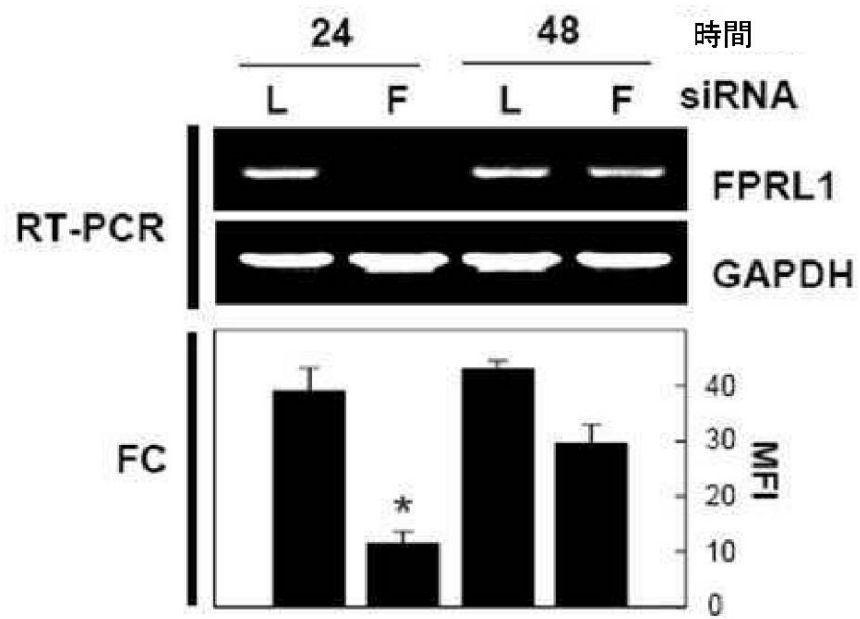
【図 23】



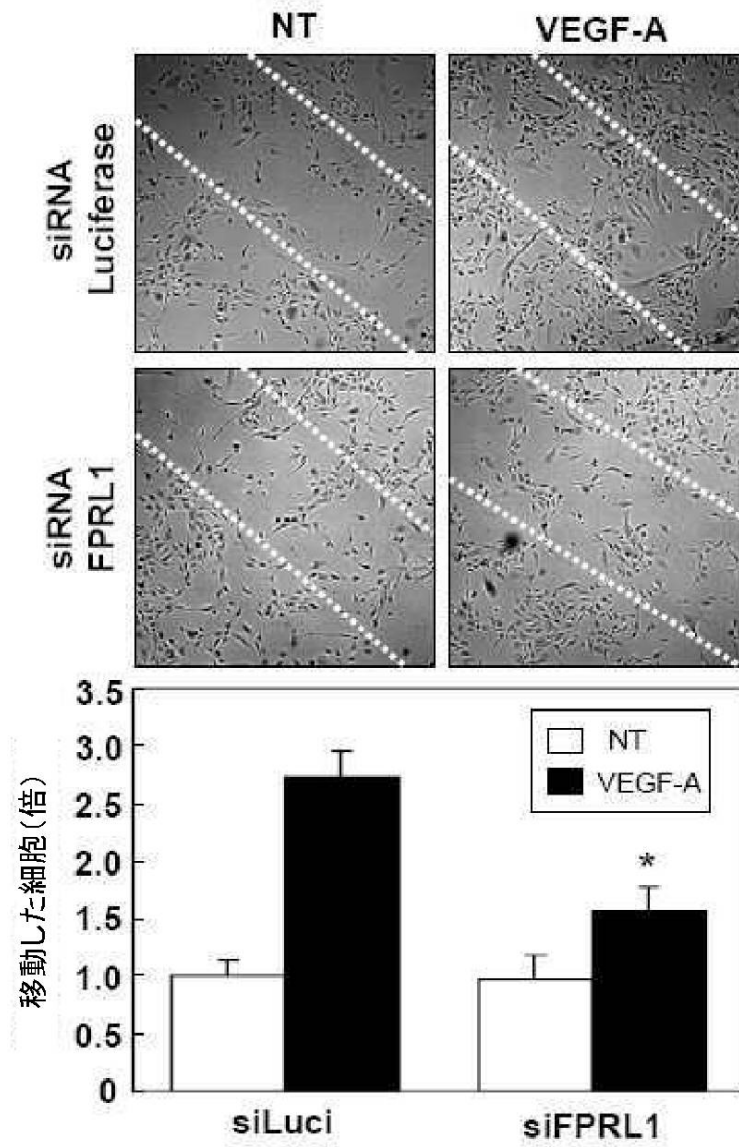
【図 24】



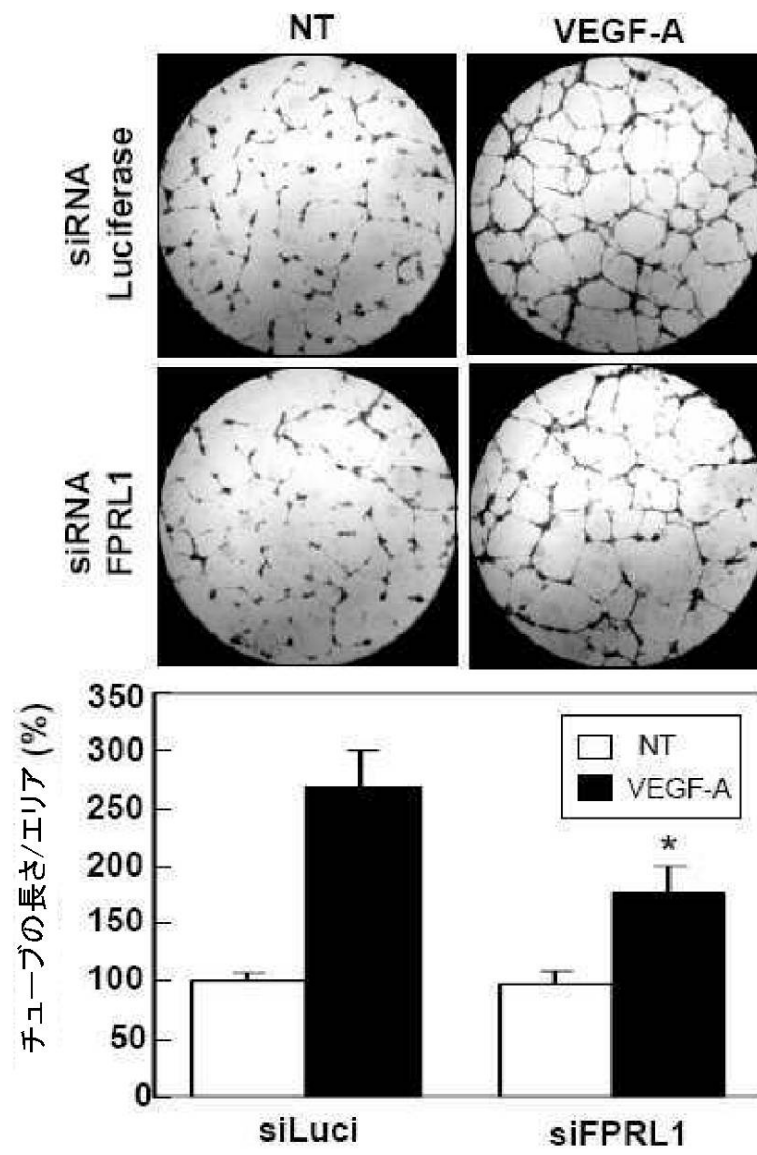
【図 2 5】



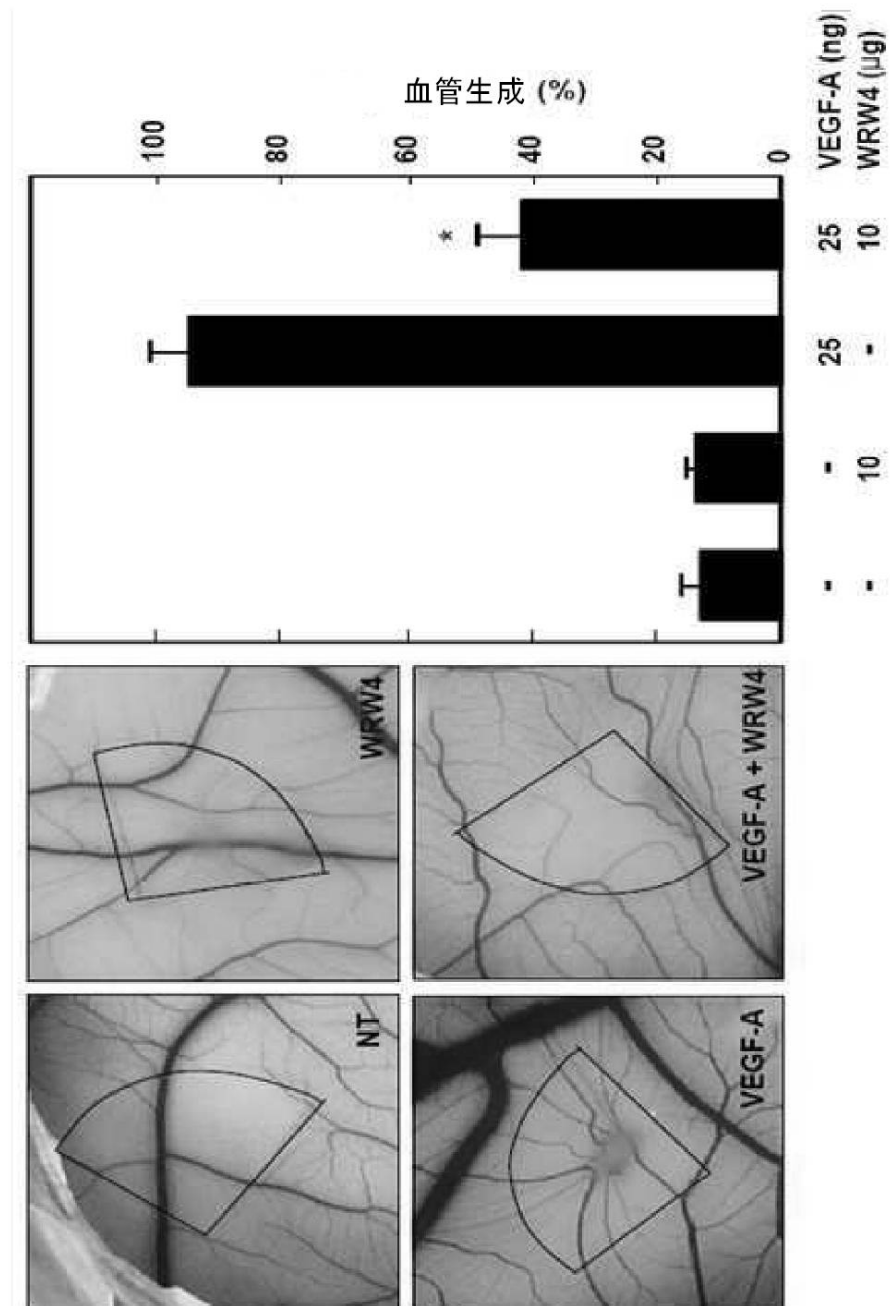
【図 26】



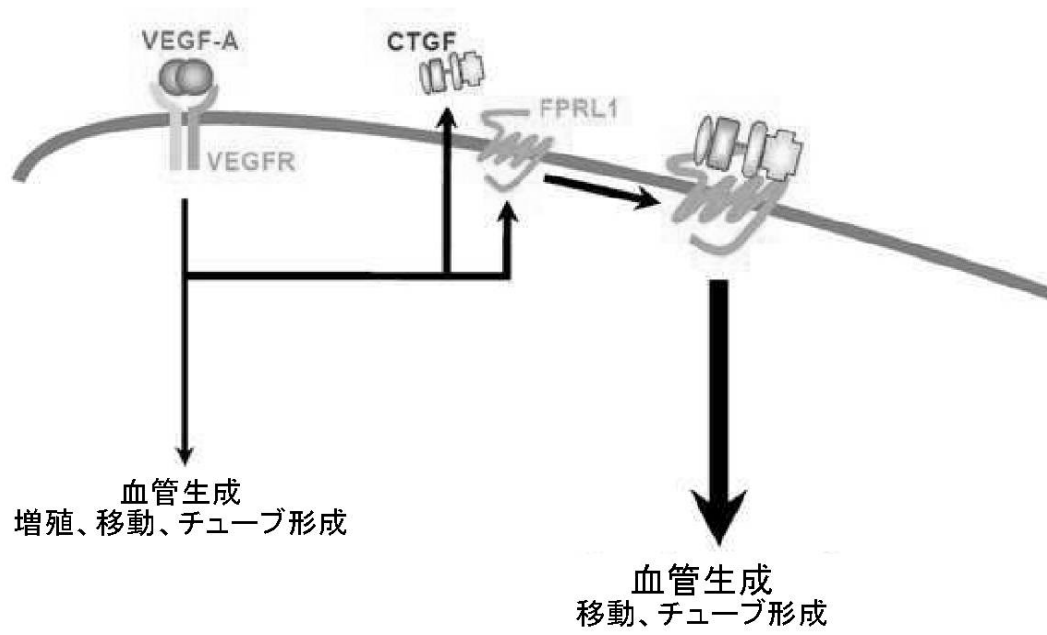
【図 27】



【図 28】



【図 29】



【配列表】

0005646732000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	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	

(72)発明者 ス, パンーディル

大韓民国, ギョンサンブクド, 790-751, ポハンーシ, ナムーグ, ジゴクードン, 756
 , ギョス アパートメント, 7-703

(72)発明者 リー, ミーソオク

大韓民国, ギョンサンブクド, 790-784, ポハンーシ, ナムーグ, ヒョジャードン, サン
 31 ポステック

(72)発明者 キム, ワンーウク

大韓民国, ギョンギード, 442-836, スウォンーシ, パルダルーグ, ジードン, ヴィンセン
 ト ホスピタル ストリート, 93-6

審査官 櫛引 明佳

(56)参考文献 特表平11-507332 (JP, A)

特表2002-532084 (JP, A)

特表2008-525460 (JP, A)

国際公開第2010/027831 (WO, A1)
国際公開第2010/027830 (WO, A1)
国際公開第01/015729 (WO, A1)
国際公開第03/053340 (WO, A1)
国際公開第2007/066823 (WO, A1)
国際公開第2010/042281 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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	JP5646732B2	公开(公告)日	2014-12-24
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		
当前申请(专利权)人(译)	Posutekku学院 - 工业基金会		
[标]发明人	リュウスンホ span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 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P13/12 A61P15/08 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/06 A61P43/00		
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		
优先权	1020100132775 2010-12-22 KR 61/328686 2010-04-28 US		
其他公开文献	JP2013530934A		
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。

