

(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2018-527898

(P2018-527898A)

(43) 公表日 平成30年9月27日 (2018.9.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/46 (2006.01)	C 0 7 K 14/46	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-501347 (P2018-501347)
 (86) (22) 出願日 平成28年7月13日 (2016.7.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年3月8日 (2018.3.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2016/007621
 (87) 国際公開番号 WO2017/010807
 (87) 国際公開日 平成29年1月19日 (2017.1.19)
 (31) 優先権主張番号 10-2015-0099994
 (32) 優先日 平成27年7月14日 (2015.7.14)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

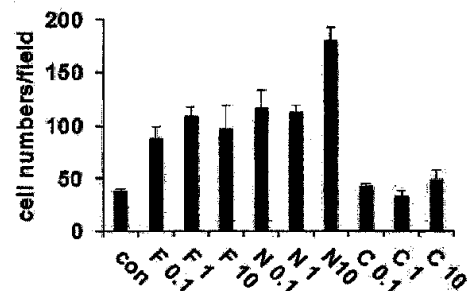
(71) 出願人 514070937
 メディシナル バイオコンバージェンス
 リサーチ センター
 大韓民国 443-270 キョンギード
 スウォンシ ヨントング クァンギ
 ヨーロ 145 アドバンスド インステ
 イチューツ オブ コンバージェンス テ
 クノロジー ビードン 8階 (イウイ
 ドン)
 (74) 代理人 110002354
 特許業務法人平和国際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ケモカイン活性を有する新規なポリペプチド

(57) 【要約】

本発明はケモカイン活性を有する新規なポリペプチドに関する、さらに詳細には、配列番号1で表示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド及びこれの利用に関するものである。本発明のポリペプチドは、配列番号1からなるCCR3への結合を通じたケモカイン活性を示すので、免疫調節、CCR3を媒介とする疾患又は病症の検出、診断、治療、薬剤開発などの多様な目的で活用効果が高い。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号1で表示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドはケモカイン活性を有することを特徴する請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 3】

前記ケモカイン活性はCCR3(C-C chemokine receptor type 3)に結合することにより媒介されることを特徴とする請求項 2 記載のポリペプチド。

【請求項 4】

N末端に2つのアミノ酸を追加して含むことを特徴する請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記2つのアミノ酸は、グリシン及びヒスチジンであることを特徴とする請求項 4 記載のポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 記載のポリペプチドをコードする核酸分子。

【請求項 7】

請求項 6 記載の核酸分子を含む組換えベクター。

【請求項 8】

請求項 7 記載の組み換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 9】

請求項 1 記載のポリペプチドを有効成分として含む脈絡膜血管新生(chroidal neovascularization)検出用組成物。

【請求項 10】

前記ポリペプチドは、発色酵素、放射性同位元素、発色団(chromophore)、発光物質、蛍光物質(fluorescer)、磁気共鳴イメージング物質、常磁性粒子(super paramagnetic particles)及び超常磁性粒子(ultrasuper paramagnetic particles)からなる群より選ばれる一つで標識されることを特徴とする請求項 9 記載の組成物。

【請求項 11】

請求項 1 記載のポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患の診断用組成物。

【請求項 12】

請求項 1 記載のポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患特異的薬剤送達用組成物。

【請求項 13】

前記CCR3-媒介疾患は、喘息、アレルギー性鼻炎、過敏性肺疾患、過敏性肺炎、好酸性肺炎、呼吸器アレルギー性疾患、炎症性腸疾患、乾癬、皮膚炎、湿疹、炎症性皮膚疾患、腎臓癌及び前立腺癌からなる群より選ばれることを特徴する請求項 11 又は請求項 12 記載の組成物。

【請求項 14】

(a)請求項 1 記載のポリペプチドと試験製剤を接触させて、試験製剤が請求項 1 記載のポリペプチド又はこれを含むNRS全長のケモカイン活性を抑制するか否かを測定する段階;
(b)前記(a)段階でケモカイン活性を抑制する試験製剤を選別する段階;及び
(c)前記(b)段階で選別された試験製剤を、CCR3を発現する細胞に処理してCCR3活性を抑制するか否かを測定する段階
を含むCCR3-媒介疾患の予防又は治療剤スクリーニング方法。

【請求項 15】

請求項 1 記載のポリペプチドを有効成分として含む脈絡膜血管新生検出用製剤を製造するための用途。

【請求項 16】

請求項 1 記載のポリペプチドを有効成分として含む脈絡膜血管新生検出用製剤の有効量

10

20

30

40

50

を、これを必要とする個体に投与することを含む、脈絡膜血管新生検出方法。

【請求項 17】

請求項 1 記載のポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患の診断用製剤を製造するための用途。

【請求項 18】

請求項 1 記載のポリペプチドを有効成分として含むCCR3媒介疾患の診断用製剤の有効量を、これを必要とする個体に投与することを含む、CCR3-媒介疾患診断方法。

【請求項 19】

請求項 1 記載のポリペプチドを有効成分として含むCCR3媒介疾患特異的薬剤送達用製剤を製造するための用途。

10

【請求項 20】

請求項 1 記載のポリペプチドを有効成分として含むCCR3媒介疾患特異的薬剤送達用製剤の有効量を、これを必要とする個体に投与することを含む、CCR3-媒介疾患特異的薬剤送達方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ケモカイン活性を有する新規なポリペプチドに関するもので、さらに詳細には、配列番号1で表示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド及びこれの利用に関するものである。

20

【背景技術】

【0002】

本出願は、2015年7月14日に出願された大韓民国特許出願第10-2015-0099994号に基づく優先権を主張し、前記明細書全体は参照により本出願に援用する。

【0003】

アミノアシルtRNA合成酵素 (aminoacyl-tRNA synthetase) は、特定のアミノ酸を対応するtRNAに正確に結合させる酵素であって、タンパク質合成では必ず必要である。アミノ酸とtRNAを結合させる過程は大きく二段階の過程に分けられるが、一番目の過程は、一つのATPを消費してアミノ酸をアミノアシルアデニル酸に活性化する段階であり、二番目の過程は、活性化されたアミノ酸をtRNAに転移する段階である。哺乳動物のアミノアシルtRNA合成酵素は、原核生物のアミノアシルtRNA合成酵素と役割は似ているが、他の付加的なドメインを有する。この付加的なドメインは、アミノアシルtRNA合成酵素又は他の調節因子との様々な複合体形成に関与する。このような構造的な複雑性が、アミノアシルtRNA合成酵素の機能的な多様性及びヒトの多様な疾病に関連することが最近明らかになっている。

30

【0004】

一方、ケモカインは白血球化学走性因子として身体の多様な組織で白血球を誘引する必要不可欠な役割を担うが、その過程は炎症及び感染に対する身体反応の全てに対して必須である。ケモカイン及びこれの受容体は、免疫調節、炎症性及び感染性疾患の病理生理学において中心になるだけでなく、最近になってケモカイン及びこれの受容体の種類によっては、自己免疫疾患を含めて特定病症に対する特異的役割が明らかになり、特定のケモカイン又はその受容体の活性を調節する治療アプローチが提示されている。

40

【0005】

CCケモカイン受容体3 (CCR3) はエオタキシン-1、エオタキシン-2、ランテス (RANTES)、MCP-2、MCP-3、及びMCP-4を含むケモカインに対するGPCR (G protein-coupled receptor) であり、末梢血液及び気道で好酸球反応を起こす。CCR3は好酸球の表面だけでなく好塩基球、肥満細胞及びタイプ2及びヘルパーTリンパ球上でも発現される。CCR3のmRNA及びタンパク質レベルは、気道過敏反応と関連して、喘息患者の気管支粘膜において上昇する

50

。気道内好酸球浸潤にCCR3が関与するとの事実は、CCR3が無いマウスの研究で証明された。ヒトのCCR3遺伝子(MIM#601268)は、アトピー性皮膚炎及び喘息と関連した染色体3p21.3に位置する。このように、CCR3のケモカインリガンドへの結合は、喘息、鼻炎及びアレルギー性疾患及びリウマチ性関節炎のような自己免疫疾患、高血圧疾患及び動脈硬化を含む炎症性及び免疫調節以上の重要なレギュレーターとして知られていて、US877861 6B2などの文献で記載されている通り、CCR3に結合するリガンドを通じて脈絡膜血管新生(choroidal neovascularization)を検出できる等、CCR3の多様な病理的寄与が明らかになりつつある。

【0006】

従来は、特定の病理現象に関与するリガンドと受容体において、受容体に対する拮抗物質を選別して、該当受容体が媒介する疾患の治療を試みたが、実質的に無差別に受容体の作用を遮断する場合には、病理的に患部が適応状態に入るか(つまり、他のレセプターが病理現象を再び主管するようになるか)、又は受容体の生来の機能の過度な抑制による副作用が表れるようになる。これに病気の原因となるリガンドの、該当受容体に対する作用を防ぐことも、疾病の予防及び治療において重要と考えられている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明者らは、アミノアシルtRNA合成酵素の非正規な生物学的活性(non-canonical biological activity)を探索する中で、アスパラギンtRNA合成酵素(NRS)のN末端伸長部断片がケモカイン活性を有することを確認して本発明を完成した。

【0008】

従って、本発明の目的は配列番号1で表示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを提供することである。

【0009】

本発明の他の目的は、前記ポリペプチドをコードする核酸分子を提供することである。

【0010】

本発明のさらに他の目的は、前記核酸分子を含む組換えベクターを提供することである。

【0011】

本発明のさらに他の目的は、前記組換えベクターで形質転換された形質転換体を提供することである。

【0012】

本発明のさらに他の目的は、前記ポリペプチドを有効成分として含む脈絡膜血管新生(choroidal neovascularization)検出用組成物を提供することである。

【0013】

本発明のさらに他の目的は、前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患の診断用組成物を提供することである。

【0014】

本発明のさらに他の目的は、前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患特異的薬剤送達用組成物；及び前記ポリペプチドを利用してCCR3-媒介疾患の予防又は治療剤スクリーニング方法を提供することである。

【0015】

本発明のさらに他の目的は、前記ポリペプチドを有効成分として含む脈絡膜血管新生検出用製剤を製造するための用途を提供することである。

【0016】

本発明のさらに他の目的は、前記ポリペプチドを有効成分として含む脈絡膜血管新生検出用製剤の有効量を、これを必要とする個体に投与することを含む、脈絡膜血管新生検出方法を提供することである。

【0017】

10

20

30

40

50

本発明のさらに他の目的は、前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患の診断用製剤を製造するための用途を提供することである。

【0018】

本発明のさらに他の目的は、前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患の診断用製剤の有効量を、これを必要とする個体に投与することを含む、CCR3-媒介疾患診断方法を提供することである。

【0019】

本発明のさらに他の目的は、前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患特異的薬剤送達用製剤を製造するための用途を提供することである。

【0020】

本発明のさらに他の目的は、ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患特異的薬剤送達用製剤の有効量を、これを必要とする個体に投与することを含む、CCR3-媒介疾患特異的薬剤送達方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0021】

[技術的解決方法]

前記の目的を達成するために、本発明は配列番号1で表示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを提供する。

【0022】

本発明の他の目的を達成するために、本発明は前記ポリペプチドをコードする核酸分子を提供する。

【0023】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記核酸分子を含む組換えベクターを提供する。

【0024】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記組換えベクターで形質転換された形質転換体を提供する。

【0025】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記ポリペプチドを有効成分として含む脈絡膜血管新生検出用組成物を提供する。

【0026】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患の診断用組成物を提供する。

【0027】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患特異的薬剤送達用組成物；及び前記ポリペプチドを利用してCCR3-媒介疾患の予防又は治療剤スクリーニング方法を提供する。

【0028】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記ポリペプチドを有効成分として含む脈絡膜血管新生検出用製剤を製造するための用途を提供する。

【0029】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記ポリペプチドを有効成分として含む脈絡膜血管新生検出用製剤の有効量を、これを必要とする個体に投与することを含む、脈絡膜血管新生検出方法を提供する。

【0030】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記ポリペプチドを有効成分として含む、CCR3-媒介疾患の診断用製剤を製造するための用途を提供する。

【0031】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患の診断用製剤の有効量を、これを必要とする個体に投与することを

10

20

30

40

50

含む、CCR3-媒介疾患診断方法を提供する。

【0032】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患特異的薬剤送達用製剤を製造するための用途を提供する。

【0033】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患特異的薬剤送達用製剤の有効量を、これを必要とする個体に投与することを含む、CCR3-媒介疾患特異的薬剤送達方法を提供する。

【0034】

以下、本発明を詳細に説明する。

10

【0035】

定義

他の定義がない限り、本明細書に使用された全ての技術的及び科学的用語は当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。次の参考文献は、本発明の明細書に使用された複数の用語の一般的な定義を有する技術の一つを提供する。Singleton et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2d ed.1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed.,1988); 及び Hale Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY。また、次の定義は本発明の実施のために読者の助けになるよう提供される。

20

【0036】

本明細書で用語“ポリペプチド”とは、“タンパク質”又はペプチドと互換性を持って使用され、例えば、天然状態のタンパク質で一般的に見られるような、アミノ酸残基の重合体を意味する。

【0037】

本発明で“ポリヌクレオチド”又は核酸とは、一本鎖又は二重鎖の形態のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドを意味する。他の制限がない限り、天然ヌクレオチドと類似した方法で核酸にコードされる、天然ヌクレオチドの公知されたアナログも含まれる。

【0038】

本明細書で用語“発現(expression)”とは、細胞におけるタンパク質又は核酸の生成を意味する。

30

【0039】

本明細書に使用されたアミノ酸の一文字(三文字)は生化学分野における標準略語規定により下記のアミノ酸を意味する:

【0040】

A (Ala): アラニン; C (Cys): システイン; D (Asp): アスパラギン酸; E (Glu): グルタミン酸; F (Phe): フェニルアラニン; G (Gly): グリシン; H (His): ヒスチジン; I (Ile): イソロイシン; K (Lys): リジン; L (Leu): ロイシン; M (Met): メチオニン; N (Asn): アスパラギン; O (Pyl)ピロリシン; P (Pro): プロリン; Q (Gln): グルタミン; R (Arg): アルギニン; S (Ser): セリン; T (Thr): トレオニン; U (Sec): セレノシステイン; V (Val): バリン; W (Trp): トリプトファン; Y (Tyr): チロシン。

40

【0041】

本明細書で用語“NRS”は、“AsnRS”又は“Asparaginyl-tRNA synthetase (アスパラギンtRNA合成酵素)”と互換性を有して使用され、アスパラギンとtRNAとの結合を促進するアミノアシルtRNA合成酵素の一種を意味する。本発明の用語“NRS”は別に言及が無い限り、ヒトのNRS (human NRS)を意味するもので、好ましくは下記配列番号2で表示されるアミノ酸配列からなるものでもある:

【0042】

MVLAELYVSDREGSDATGDGTKEKPFKTLKALMTVGKEPFPTIYVDSQKENERWNVISKSQKLKNIKKMWHREQMKSESREKKEAEDSLRREKNLEEAKK I T I KNDPSLPEPKCVK I GALEGYRGQRVKVFGWVHRLRRQGKNLMFLVLRDGTGYLQCVL

50

ADELCCQCYNGVLLSTESSVAVYGMLNLTPKGKQAPGGHLSCDFWELIGLAPAGGADNLINEESDQVQVQLNNRHMMIRGENMSKILKARSMVTRCFRDHFFDRGYEVTPTPTLVQTQVEGGATLFLKLDYFGEEAFLTQSSQLYLETCLPALGDVFCIAQSYRAEQSRTRRHAEYTHVEAECPLTFDDLLNRLEDLVCDVVDRLKSPAGSVHNLNPNFQPPKRPFKRMNYSDAIVWLKEHDVKKEDGTFYEFGEDEPEAPERLMTDTINEPILLCRFPVEIKSFYMQRCPEDSRLTESVDVLMNVGEIVGGSMRIFDSEELAGYKREGIDPTPYWYTDQRKYGTCPHGGYGLGLERFLTWILNRYHIRDVCLYPRFVQRCTP

【0043】

本発明は、配列番号1で表示されるアミノ酸配列からなるペプチドを提供する。

【0044】

本発明のポリペプチドはヒトのNRSに由来するものであって、本明細書で用語NRS断片、NRSのN末端断片などと互換的に指称されることもある。本発明のポリペプチドは、ヒトのNRSのN末端伸長部ドメインに位置する配列からなるものであり、好ましくは配列番号1のアミノ酸配列からなる。

10

【0045】

本発明の前記配列番号1のNRS断片は、ケモカイン活性を有することがその特徴であって、前記ケモカイン活性は、本発明の配列番号1のNRS断片がCCR3に結合することにより媒介される。これは本発明の明細書の実施例に示されている。配列番号1のアミノ酸配列は下記の通りである：

【0046】

MVLAELYVSDREGSDATGDGTKEKPFKTLKALMTVGKEPFPTIYVDSQKENERWNVISKSQKLKNIKMMWHREQMKS

【0047】

本発明によるポリペプチドは、天然から抽出するか又は、遺伝子工学的的方法により作製され得る。例えば、通常的方法により前記ポリペプチド又はこれの機能的等価物をコードする核酸（例えば、配列番号3）を作製する。前記核酸は適切なプライマーを使用してPCR増幅することにより、作製できる。他の方法には当業界に公知の標準方法により、例えば、自動DNA合成器を使用してDNA配列を合成することもできる。作製された核酸は、これに作動可能に連結されて核酸の発現を調節する一つ以上の発現調節配列（expression control sequence）（例：プロモーター、エンハンサー等）を含むベクターに挿入して、これにより形成された組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換させる。生成された形質転換体を前記核酸が発現されるに適切な培地及び条件下で培養して、培養物から前記核酸により発現された、実質的に純粋なポリペプチドを回収する。前記回収は当業界に公知の方法（例えば、クロマトグラフィー）を利用して行なうことができる。前記“実質的に純粋なポリペプチド”とは、本発明によるポリペプチドが、宿主細胞に由来するどのような他のタンパク質も実質的に含まないことを意味する。本発明のポリペプチド合成のための遺伝子工学的的方法は下記の文献を参考にすることができる：Maniatis et al., Molecular Cloning; A laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, 1982; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY, Second (1998) and Third (2000) Editions; Gene Expression Technology, Method in Enzymology, Genetics and Molecular Biology, Method in Enzymology, Guthrie Fink (eds.), Academic Press, San Diego, Calif, 1991; 及び Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255: 12073-12080, 1990。

20

30

【0048】

また、本発明のポリペプチドは当業界に公知の化学合成（Creighton, Proteins; Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co., NY, 1983）により容易に製造できる。代表的な方法としてこれらで限定されることではないが、液相又は固相合成、分別晶析法、F-MOC又はT-BOC化学法が含まれる（Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., CRC Press, Boca Raton Florida, 1997; A Practical Approach, Atherton Sheppard, Eds., IRL Press, Oxford, England, 1989）。

40

【0049】

さらに、本発明のポリペプチドは、前述したアミノ酸配列を有するポリペプチドだけでなく、これのアミノ酸配列変異体が、さらに本発明の範囲に含まれる。本発明のポリペ

50

チドの変異体とは、本発明のアミノ酸配列で一つ以上のアミノ酸残基が、欠失、挿入、非保存的又は保存的置換、アミノ酸類似体への置換又はこれらの組合せにより、異なる配列を有するポリペプチドを意味する。分子の活性を全体的に変更させないアミノ酸交換は当該分野に公知されている（H.Neurath、RLHill、The Proteins、Academic Press、New York、1979）。

【0050】

場合によって、本発明のポリペプチドは、リン酸化(phosphorylation)、硫化(sulfation)、アクリル化(acrylation)、糖化(glycosylation)、メチル化(methylation)、ファルネシル化(farnesylation)などの修飾(modification)を受けることもある。

【0051】

のみならず、配列番号1のアミノ酸配列又はこれと少なくとも95%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列を含めて、77個乃至100個のアミノ酸からなるポリペプチドも本発明の範囲に含まれる。

【0052】

本発明はさらに、配列番号1のポリペプチドのN末端に2個のアミノ酸を追加的に含むことを特徴とするポリペプチドを提供する。好ましくは、前記2個のアミノ酸はグリシン及びヒスチジンでもあるが、これに制限されるものではない。

【0053】

本発明のポリペプチドは、配列番号1で表示されるポリペプチドの機能的等価物を含む。機能的等価物とは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の配列相同性（又は、同一性）を有するポリペプチドを意味する。例えば、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の配列相同性を有するポリペプチドを含むもので、本発明のポリペプチドと実質的に同質の生理活性を示すポリペプチドを意味する。ここで用語“実質的に”とは、特定の性質の全体又は殆ど同じ程度の性質を示す状態を意味する。

【0054】

本発明で“相同性又は同一性”とは、ポリペプチド分子のようなポリマー分子間の全体的な関連性を意味する。例えば、2個のポリペプチド配列間の相同性/同一性（%）の計算は、最適の比較のために2つの配列をアラインメントして実行できる。好ましくは、比較目的でアラインメントされた配列の長さは、基準配列の長さの少なくとも30%以上、少なくとも40%以上、少なくとも50%以上、少なくとも60%以上、少なくとも70%以上、少なくとも80%以上、少なくとも90%以上、又は実質的に100%でもある。その後、対応するアミノ酸部位のアミノ酸を互いに比較する。第1配列の部位にあるアミノ酸が第2配列の対応する部位のアミノ酸と同じ場合には、2つの配列は当該部位では同一性を有するものである。2つの配列の同一性（%）は、2つの配列間の最適配列のために導入しなければならないギャップの長さを考慮した、2つの配列から共通したアミノ酸を有する部位の長さの関数である。2つの配列間の比較及び同一性（%）の決定は数学的なアルゴリズムを通じて行うことができる。例えば、ClustalW（Thompson他、1994）を使用して、次のパラメータを使用して配列同一性数値を測定できる：ペアワイズアラインメント法のパラメータ - 方法：正確（accurate）、行列：PAM、ギャップ開始ペナルティ（Gap open penalty）：10.00、ギャップ継続ペナルティ（Gap extension penalty）：0.10；マルチプルアラインメント法のパラメータ - 行列：PAM、ギャップ開始ペナルティ（Gap open penalty）：10.00、遅延同一性（%）：30、末端ギャップペナルティ付与（penalize end gaps）：on、ギャップ分離距離（Gap separation distance）：0、負の行列：no、ギャップ延長ペナルティ：0.20、残基特異的ギャップペナルティ（residue-specific gap penalties）：on、親水性ギャップペナルティ：on、親水性残基：GPSNDQEKR。特定残基での配列同一性は単に誘導体化されただけの同じ残基を含む。

【0055】

本発明で用語“実質的に”とは、特定の性質の全体又は殆ど同じ程度の性質を示す状態を意味する。本発明の用語“実質的に同じ”とは、アミノ酸又は核酸配列の間の比較と関連して使用されている。本発明が属する技術分野で通常の知識を有する者には、相応の部位に同じ残基を有する場合に、2つの配列は“実質的に同じ”ものに理解されるであろう。当業界で広く知られている通り、アミノ酸又は核酸配列は多様な種類のアルゴリズムを使用して比較できるが、例えば、核酸配列比較のためにはBLASTNを、アミノ酸配列比較のためにはBLASTP、ギャップBLAST、PSI-BLASTのようなコンピュータプログラムを使用できる。前記のコンピュータプログラムの例は、下記文献に記載されている：Altschul他、Basic local alignment search tool、J. Mol. Biol., 215 (3) : 403-410、1990; Altschul他、Methods in Enzymology、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25 : 3389-3402、1997; Baxevanis 他、Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins、Wiley、1998; 及び Misener他、(eds)、Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology、Vol.132)、Humana Press、1999、同じ配列を検索すること以外に、前記コンピュータプログラムでは、通常の配列同一性の程度を提供する。2つの配列において一定長さの残基にわたって対応する部位の残基の中で少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%以上、少なくとも85%以上、少なくとも90%以上、少なくとも91%以上、少なくとも92%以上、少なくとも93%以上、少なくとも94%以上、少なくとも95%以上、少なくとも96%以上、少なくとも97%以上、少なくとも98%以上、少なくとも99%以上が同じ場合に“実質的に同じ”配列であると見做される。好ましくは前記の“一定長さの残基”は、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、又はそれ以上の残基でもある。

10

20

【0056】

本明細書で前記用語“対応する”とは、所定のポリペプチドのアミノ酸残基の位置(position) / 同一性(identity)の決定にしばしば使用される。通常の技術者であれば、ポリペプチド内の残基は基準ペプチドに基づく標準的ナンバリングシステムを用いてしばしば指定される。

【0057】

前記“機能的等価物”とは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列中の一部の付加、置換又は欠失の結果として生成されたものでもある。前記アミノ酸置換は好ましくは保存的置換である。天然に存在するアミノ酸の保存的置換の例は次の通りである：脂肪族アミノ酸(Gly、Ala、Pro)、疎水性アミノ酸(Ile、Leu、Val)、芳香族アミノ酸(Phe、Tyr、Trp)、酸性アミノ酸(Asp、Glu)、塩基性アミノ酸(His、Lys、Arg、Gln、Asn)及び硫黄含有アミノ酸(Cys、Met)、又は前記機能的等価物には本発明のポリペプチドのアミノ酸配列上でアミノ酸の一部が欠失された変異体も含まれる。前記アミノ酸の欠失又は置換は好ましくは本発明のポリペプチドの生理活性に直接的に関連していない領域に位置している。また、アミノ酸の欠失は好ましくは本発明のポリペプチドの生理活性に直接関与していない部分に位置する。また、前記本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の両末端又は配列内にいくつかのアミノ酸が付加された変異体も含まれる。また、本発明の機能的等価物の範囲には本発明によるタンパク質の基本骨格及びこれの生理活性を維持しながら、タンパク質の一部化学構造が変異されたタンパク質又はポリペプチド誘導体も含まれる。例えば、本発明のタンパク質の安定性、貯蔵性、揮発性又は溶解度などを変更させるための構造変更がこれに含まれる。

30

40

【0058】

また、本発明は、前記本発明のポリペプチドをコードする核酸分子を提供する。

【0059】

前記のような本発明のポリペプチドをコードする核酸配列は、これと同等な活性を有するポリペプチドをコードする限り、一つ以上の核酸塩基が置換、欠失、挿入、又はこれらの組合せにより変異されることもある。前記本発明の配列番号1のポリヌクレオチドは、好ましくは配列番号3のヌクレオチド配列を有する核酸分子によりコードされる。このよ

50

うな核酸分子の配列は、一本鎖又は二重鎖でもあって、DNA分子又はRNA (mRNA) 分子でもある。配列番号3の塩基配列は下記の通りである：

【 0 0 6 0 】

ATGGTGCTTGCAGAGCTGTACGTCTCTGACCGAGAGGGAAGCGATGCCACGGGAGATGGAACCAAGGAGAAACCATTTTAA
AACAGGTCTAAAGGCTTTGATGACAGTAGGGAAAGAACCATTTCTACCATTTACGTAGATTACAAAAAGAAAATGAGA
GGTGAATGTTATTTCTAAATCACAGTTGAAGAACATTAAGATGTGGCATAGGGAACAAATGAAGAGT

【 0 0 6 1 】

本発明の前記ポリペプチドをコードする核酸配列は天然から分離又は人為的に合成又は遺伝的組換え方法を通じて製造できる。本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を、これを発現できるベクターと作動可能に連結させて前記本発明のポリペプチドを提供することができる。

10

【 0 0 6 2 】

本発明のポリペプチドは通常的な遺伝子工学的的方法により作製することができる。ポリヌクレオチド配列は例えば、ヒトのNRS遺伝子をコードするポリヌクレオチドを鋳型として、適切なプライマーを使用してPCR増幅することにより作製できる。他の方法で当業界に公知の標準方法により、例えば、自動DNA合成器 (Biosearch又はApplied Biosystems社製) を使用してDNA塩基配列を合成することもできる。作製されたポリヌクレオチド配列は、このポリヌクレオチドと作動可能に連結されて、そのポリヌクレオチド塩基配列の発現を調節する一つ又はそれ以上の発現調節配列を含むベクターに挿入させて、これより形成された組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換させる。生成された形質転換体を前記DNA配列が発現するように適切な培地及び条件下で培養して、培養物から前記DNA配列によりコードされた実質的に純粋なタンパク質を回収する。前記回収は当業界に公知の方法を利用して行うことができる。

20

【 0 0 6 3 】

前記 “ 実質的に純粋なポリペプチド又はタンパク質 ” とは、本発明によるタンパク質が、宿主細胞に由来したどのような他のタンパク質も実質的に含まないことを意味する。本発明のタンパク質合成のための遺伝子工学的的方法是、次の文献を参考にすることができる：Maniatis et al., Molecular Cloning; A laboratory Manual、Cold Spring Harbor laboratory、1982; Sambrook et al., supra; Gene Expression Technology、Method in Enzymology、Genetics and Molecular Biology、Method in Enzymology、Guthrie & Fink (eds)、Academic Press、San Diego、Calif、1991; 及び Hitzeman et al., J. Biol . Chem., 255 : 12073-12080、1990。

30

【 0 0 6 4 】

また、本発明のポリペプチドは当該分野に公知の技術で化学的に合成することができる (Creighton、Proteins : Structures and Molecular Principles、WH Freeman and Co., NY (1983)) 。すなわち、本発明のポリペプチドは通常の段階的な液相又は固相合成、分別晶析法、F-MOC又はT-BOC化学法を利用して製造することもできる。 (Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins、Williams et al., Eds., CRC Press、Boca Raton Florida、(1997) ; A Practical Approach、Atherton Sheppard、Eds., IRL Press、Oxford、England、(1989)) 。好ましい製造方法は、固相合成法を利用することである。本発明のポリペプチドは、保護されたアミノ酸間の縮合反応により、通常の固相方法で、C-末端から開始して同定されたアミノ酸配列に従って順次的に進行しながら合成することができる。縮合反応後、保護基及びC-末端アミノ酸が連結された担体を、酸分解又はアミン分解 (aminolysis) のような公知の方法によって除去することができる。前記ペプチド合成法は、関連書籍に詳細に記述されている (Gross and Meienhofer's、The Peptides、vol 2、Academic Press、1980) 。

40

【 0 0 6 5 】

遺伝子工学的的方法により製造されたタンパク質又は化学的に合成されたタンパク質は、例えば抽出法、再結晶法、多様なクロマトグラフィー (ゲルろ過、イオン交換、沈殿、吸着、逆相) 、電気泳動、向流分配法など当業界に公知の方法で分離及び精製することがで

50

きる。

【0066】

本発明は、前記核酸分子を含む組換えベクターを提供する。

【0067】

本発明で用語、組換えベクターとは、適当な宿主細胞で目的タンパク質又は目的RNAを発現できるベクターであって、遺伝子インサートが発現されるように作動可能に連結された必須的な調節要素を含む遺伝子コンストラクトを意味する。

【0068】

本発明で用語“作動可能に連結された”とは、一般的機能を遂行するように、核酸発現調節配列と、目的とするタンパク質又はRNAをコードする核酸配列が、機能的に連結されていることを意味する。例えばプロモーターとタンパク質又はRNAをコードする核酸配列が作動可能に連結されて、コードする核酸配列の発現に影響を与え得る。組換えベクターとの作動可能な連結は当該技術分野で公知の遺伝子組換え技術を利用して製造することができ、部位特異的DNA切断及び連結は、当該技術分野で一般的に知られている酵素などを使用する。

10

【0069】

本発明のベクターはプラスミドベクター、コスミドベクター、バクテリオファージベクター、及びウイルスベクターなどを含むが、これに制限されない。適切な発現ベクターは、プロモーター、オペレーター、開始コドン、終止コドン、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーのような発現調節要素の他にも膜標的化又は分泌のためのシグナル配列又はリーダー配列を含み、目的によって多様に製造することができる。ベクターのプロモーターは、構成的又は誘導性でもある。また、発現ベクターはベクターを含有する宿主細胞を選択するための選択マーカーを含めて、複製可能な発現ベクターの場合、複製起点を含む。

20

【0070】

シグナル配列には、宿主がエスキリア属菌の場合には、PhoAシグナル配列、OmpAシグナル配列などが、宿主がバチルス属菌の場合には、 α -アミラーゼシグナル配列、サブチリシンシグナル配列などが、宿主が酵母の場合にはMFシグナル配列、SUC2シグナル配列などが、宿主が動物細胞の場合にはインスリンシグナル配列、 α -インターフェロンシグナル配列、抗体分子シグナル配列などを利用できるが、これに制限されない。

30

【0071】

本発明は、前記組換えベクターで形質転換された形質転換体を提供する。

【0072】

形質転換は、核酸を有機体、細胞、組織又は器官に導入するどんな方法も含まれ、当分野で公知された通り、宿主細胞によって適切な標準技術を選択して遂行することができる。このような方法にはパーティクルガン法、エレクトロポレーション (electroporation)、原形質融合、リン酸カルシウム沈殿、塩化カルシウム沈殿、シリコンカーバイドウィスカーを利用した攪拌、アグロバクテリウム媒介形質転換、PEG媒介融合法、マイクロインジェクション法、リボソーム媒介法、デキストラン硫酸、リボフェクタミン、ヒートショック法などが含まれるが、これに制限されない。

40

【0073】

前記用語“形質転換体”とは、“宿主細胞”などと互換性を有して使用することができ、任意の手段（例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法、形質転換法、ウイルス感染など）により細胞内に導入された異種性DNAを含む原核又は真核細胞を意味する。

【0074】

宿主細胞によってタンパク質の発現量と修飾などが異なるので、当業者が目的とすることに最も適切な宿主細胞を選択して使用することができる。本発明の前記形質転換体は、好ましくは形質転換微生物を意味するものでもある。具体的にはこれに制限されないが、例えば、宿主細胞には、エスキリア・コリ（大腸菌、*Escherichia coli*）、バチルス・

50

サブチリス (*Bacillus subtilis*)、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*)、又はスタフィロコッカス (*Staphylococcus*) のような原核宿主細胞でもある。また、真菌 (例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*))、酵母 (例えば、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*))、サッカロマイセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*)、ネウロスポラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) などのような下等真核細胞、昆虫細胞、植物細胞、哺乳動物などを含む高等真核生物由来の細胞を宿主細胞に使用することができ、これに制限されない。

【0075】

本発明の形質転換体 (又は形質転換微生物) は、好ましくはエスケリキア・コリ (大腸菌、*Escherichia coli*) でもある。前記本発明のエスケリキア・コリ菌株にはこれに制限されないが、例えば Rosetta2 (DE3)、C41 (DE3)、SoluBL21 などが使用することができる。

10

【0076】

一方、本発明のポリペプチド (配列番号1のNRS断片) はCCR3と特異的に結合するので、CCR3が特異的に発現される疾患又は病症の検出及び診断目的のために利用できる。具体的にはAMD (老化関連黄斑変性) での殆どの失明は脈絡膜血管新生による網膜の侵襲から発生し、CCR3はAMD患者の脈絡膜新生血管内皮細胞から特異的に発現される。従って、本発明は、前記本発明のポリペプチドを有効成分として含む脈絡膜血管新生検出用組成物を提供する。特に無症状脈絡膜血管新生において、本発明のポリペプチドはこれの検出及び診断に使用することができる。

20

【0077】

本発明の前記ポリペプチドの脈絡膜血管新生部位への細胞結合 (つまり、CCR3への細胞結合) の確認、検出及び定量を容易にするために、本発明のポリペプチドは標識された状態で提供することもできる。つまり、検出可能な標識を結合されて提供することもできる。前記検出可能な標識は発色酵素 (例: パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ)、放射性同位元素 (例: ^{18}F 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{67}Ga)、発色団 (chromophore)、発光物質又は蛍光物質 (例: FITC、RITC、蛍光タンパク質 (GFP (Green Fluorescent Protein)、EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)、RFP (Red Fluorescent Protein)、DsRed (Discosoma sp. red fluorescent protein)、CFP (Cyan Fluorescent Protein)、CGFP (Cyan Green Fluorescent Protein)、YFP (Yellow Fluorescent Protein)、Cy3、Cy5、及びCy7.5)、磁気共鳴イメージング物質 (例: Gadolinium (Gd、ガドリニウム)、常磁性粒子 (super paramagnetic particles) 又は超常磁性粒子 (ultrasuper paramagnetic particles)) でもある。

30

【0078】

標識による検出方法は、当業界に広く知られているが、例えば次のような方法によって遂行できる。もし、検出可能な標識に蛍光物質を利用する場合には、免疫蛍光染色法を利用することができる。例えば、蛍光物質で標識された本発明のペプチドを試料と反応させて未結合又は非特異的な結合産物を除去した後、蛍光顕微鏡下でペプチドによる蛍光を観察することができる。また、検出可能な標識に酵素を利用する場合には、酵素反応を通じた基質の発色反応により吸光度を測定し、放射線物質の場合には、放射線放出量を測定することにより行うことができる。検出された結果は、検出標識による公知されたイメージング法によってイメージ化することもできる。

40

【0079】

本発明で前記用語試料は生物学的試料を意味するもので、血液及び生物学的起源のその他の液状試料、生検標本、組織培養のような固形組織試料又はこれに由来する細胞が含まれる。前記試料は動物、好ましくは哺乳動物から得られる。前記試料は検出に使用する前に前処理することができる。例えば、抽出、濃縮、妨害成分の不活性化、試薬の添加などを含むことができる。

【0080】

50

本発明のポリペプチドは、CCR3と特異的に結合する効果が優れているので、CCR3-媒介疾患の診断の目的で、又はCCR3-媒介疾患において患部に薬剤を選択的に伝達するインテリジェント薬剤送達体として使用することができる。従って、本発明は前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患の診断用組成物；及び前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患特異的薬剤送達用組成物を提供する。

【0081】

本発明で前記CCR3-媒介疾患は、正常状態と比較して、CCR3が該当疾患において特異的に発現及び活性が増加して表れる病理現象、つまり、前記CCR3が疾患の主な病気のメカニズムとして作用して、CCR3受容体拮抗剤により治療できる疾病を意味する。前記CCR3-媒介疾患は例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、過敏性肺疾患、過敏性肺炎、好酸性肺炎、呼吸器アレルギー性疾患、炎症性腸疾患、乾癬、皮膚炎、湿疹、炎症性皮膚疾患、腎臓癌及び前立腺癌などを含むが、これに制限されない。

10

【0082】

一方、本発明のポリペプチドがCCR3と特異的に結合してケモカイン活性を示す事実は、ヒトのNRSが本発明のポリペプチドを含む位置（つまり、N末端伸長部）でCCR3と結合して過度な免疫反応（自己免疫反応を含む）及びCCR3媒介疾患を誘発し得ることを意味する。

【0083】

前記疾病に対するNRSの作用を抑制するためにNRSの発現又はこれの機能をむやみに抑制することは、タンパク質翻訳過程において必須の役割を果たすヒトのNRSの生来の機能にも影響を及ぼし、他の副作用をもたらし得る。従って、NRSの中でも免疫反応及び疾患との関係がある部位のみに作用して局所的に活性を抑制できる物質を見出すことは、副作用を減らし、目的とする効果が得られるようにすることができ、このように選択性及び特異性が高い物質を発掘することは、疾病治療において有意なことと考えられ、これは単に特定の受容体に対する拮抗剤を探すこととは区別される。

20

【0084】

従って、本発明のポリペプチドを使用すると、NRSで疾病に作用する部位の活性を抑制し、さらに特異性が高く副作用が低減された治療剤をスクリーニングできる長所がある。

【0085】

従って、本発明は、

(a)本発明の前記ポリペプチド(配列番号1のNRS断片)と試験製剤を接触させて、試験製剤が配列番号1のポリペプチド又はこれを含むNRS全長のケモカイン活性を抑制するか否かを測定する段階；

30

(b)前記(a)段階でケモカイン活性を抑制する試験製剤を選別する段階；及び

(c)前記(b)段階で選別された試験製剤を、CCR3を発現する細胞に処理して、CCR3活性を抑制するか否かを測定する段階を含む、CCR3-媒介疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法を提供する。

【0086】

本発明で“製剤”又は“試験製剤”とは、任意の物質、分子、元素、化合物、実在物又はこれらの組合せを含む。例えば、これに限定はされないが、タンパク質、ポリペプチド、有機小分子、多糖類、ポリヌクレオチドなどを含む。また、天然産物、合成化合物又は化学化合物又は2個以上の物質の組み合わせでもある。別に指定されない限り、製剤、物質及び化合物は互換性を有して使用することができる。

40

【0087】

より具体的には、本発明のスクリーニング方法でスクリーニングできる試験製剤は、ポリペプチド、 β ターン模倣体、多糖類、リン脂質、ホルモン、プロスタグランジン、ステロイド、芳香族化合物、ヘテロ環状化合物、ベンゾジアゼピン、N-置換グリシンオリゴマー(oligomeric N-substituted glycines)、オリゴカルバミン酸塩(oligocarbamates)、糖類、脂肪酸、プリン、ピリミジン又はこれらの誘導体、構造的アナログ又は組合せを含む。ある試験製剤は合成物質でもあり、他の試験製剤は天然物質でもある。前記試験製剤は合成又は自然化合物のライブラリを含む広範囲かつ多様な出处から得られる。組合せラ

50

イブラリは、ステップバイステップ方式で合成できる複数種類の化合物で作成できる。多数の組合せライブラリの化合物は、ESL(encoded synthetic library)法(WO95/12608、WO93/06121、WO94/08051、WO95/395503、WO95/30642)により製造できる。ペプチドライブラリは、ファージディスプレイ法(WO91/18980)により製造できる。バクテリア、菌、植物及び動物抽出物形態の自然化合物のライブラリは、商業的な出处から得られるか又はフィールドワークで収集される。公知の薬理学的製剤が構造的アナログを製造するためにアシル化、アルキル化、エステル化反応、アミド化反応のような直接又はランダムな化学的修飾に適用することができる。

【0088】

前記試験製剤は、天然に生成されるタンパク質又はその断片でもある。このような試験製剤は、自然発生源、例えば、細胞又は組織溶解物から得ることができる。ポリペプチド製剤のライブラリは、例えば通常の方法によって生成されるか又は、商業的に入手できるcDNAライブラリから得ることができる。前記試験製剤は、ペプチド、例えば、約5-30個、好ましくは約5-20個、より好ましくは約7-15個のアミノ酸を有するペプチドでもある。前記ペプチドは、自然的に生成されるタンパク質、ランダムペプチド又は“バイアスされた(biased)”ランダムペプチドの切断物でもある。

10

【0089】

また、前記試験製剤は“核酸”でもある。核酸試験製剤は、自然的に生成される核酸、ランダム核酸、又は“バイアスされた”ランダム核酸でもある。例えば、原核又は真核ゲノムの切断物を前記記載と類似して使用できる。

20

【0090】

また、前記試験製剤は、小分子(例：約1,000以下の分子量を有する分子)でもある。小分子の調節製剤をスクリーニングするための方法には、好ましくは、高速分析アッセイ(high throughput assay)が適用することができる。多くのアッセイが前記スクリーニングに有用である(Shultz、Bioorg.Med.Chem.Lett.,8:2409-2414、1998;Weller、Mol.Drivers.,3:61-70、1997;Fernandes、Curr.Opin.Chem.Biol.,2:597-603、1998;and Sittampalam、Curr.Opin.Chem.Biol.,1:384-91、1997)。

【0091】

本発明の方法でスクリーニングされる試験製剤のライブラリは、本発明のポリペプチド又はこれのアナログに対する構造研究を根拠に製造できる。このような構造研究は、NRSのケモカイン活性領域に結合して、タンパク質の生産と関連した生来の機能は維持したまま疾病と関連した否定的な活性のみを抑制する可能性がある試験製剤の同定を可能にする。本発明のポリペプチドの3次元構造は、多様な方法、例えば、結晶学構造及び分子モデリングで研究できる。X線結晶学を利用するタンパク質の構造研究方法が文献で周知である:Physical Bio-Chemistry、Van Holde、K. E.(Prentice-Hall、New Jersey 1971)、pp.221-239、and Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences、D. Eisenberg D.Crothers (Benjamin Cummings、Menlo Park 1979)。本発明のポリペプチドの構造に対するコンピュータモデリングは、スクリーニングするための試験製剤をデザインするための他の手段を提供する。分子モデリングの方法は文献に開示されている:US Pat. No. 612,894 and US Pat. No.5,583,973。タンパク質構造は、中性子回折及びNMRによっても決定できる:Physical Chemistry、4th Ed.Moore、W.J.(Prentice-Hall、New Jersey 1972)and NMR of Proteins and Nucleic Acids、K. Wuthrich (Wiley-Interscience、New York 1986)。

30

40

【0092】

前記(a)段階でケモカイン活性を抑制するか否かを測定する方法は、当業界で公知の方法により遂行することができる、これに対する非制限的な例示には、寒天平板法(Curr Microbiol 30(4):2513)、Boydenチャンバーアッセイ法(J Exp Med 115(3):45366)、Bridgeチャンバーアッセイ法(J. of Cell Biology 75(2):606616)、微細管アッセイ法(Anal Biochem 135(2):4669、Act a Protozool 34:1815)及びT-mazeアッセイ法(J Protozool 29(2):22630)を挙げられる。

50

【 0 0 9 3 】

前記 (c) 段階でCCR3を発現する細胞としては、好酸球、好塩基球、肥満細胞及びヘルパーTリンパ球を挙げられるが、これに制限されるものではない。

【 0 0 9 4 】

一方、本発明は前記 (c) 段階の後で、(d) 選別された製剤をCCR3-媒介疾患を有する動物に投与して治療効果を示すか否かを検査する段階を追加的に行うことができる。

【 0 0 9 5 】

本発明は、前記ポリペプチドを有効成分として含む脈絡膜血管新生検出用製剤を製造するための用途を提供する。

【 0 0 9 6 】

本発明は、前記ポリペプチドを有効成分として含む脈絡膜血管新生検出用製剤の有効量を、これを必要とする個体に投与することを含む、脈絡膜血管新生検出方法を提供する。

【 0 0 9 7 】

本発明は、前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患の診断用製剤を製造するための用途を提供する。

【 0 0 9 8 】

本発明は、前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患の診断用製剤の有効量を、これを必要とされる個体に投与することを含む、CCR3-媒介疾患診断方法を提供する。

【 0 0 9 9 】

本発明は、前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患特異的薬剤送達用製剤を製造するための用途を提供する。

【 0 1 0 0 】

本発明は、前記ポリペプチドを有効成分として含むCCR3-媒介疾患特異的薬剤送達用製剤の有効量を、これを必要とする個体に投与することを含む、CCR3-媒介疾患特異的薬剤送達方法を提供する。

【 0 1 0 1 】

本発明の前記有効量とは、個体に投与したとき、脈絡膜血管新生又はCCR3-媒介疾患を検出、診断又は治療する量を包括的に指称する。前記個体とは、動物、好ましくは哺乳動物、特にヒトを含む動物でもあって、動物から由来した細胞、組織、器官等でもある。前記個体は治療が必要な患者でもある。

【 0 1 0 2 】

本発明の前記治療は、広義には脈絡膜血管新生又はCCR3-媒介疾患による症状を改善させることを指して、これは脈絡膜血管新生又はCCR3-媒介疾患を治癒したり、実質的に予防したり、又は状態を改善させることを含めて、脈絡膜血管新生又はCCR3-媒介疾患から始まった一つの症状又は殆どの症状を緩和させたり、治癒するか又は予防することを含むが、これに制限されるものではない。

【 発明の効果 】

【 0 1 0 3 】

[有利な効果]

本発明のポリペプチドは、配列番号1からなり、CCR3への結合を通じたケモカイン活性を示すので、免疫調節、CCR3を媒介とする疾患又は病症の検出、診断、治療、薬剤開発などの多様な目的で活用の効果が高い。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 0 4 】

【 図 1 】 図1は、A549、H460、WI-26、Daudi及びJurkat細胞株を無血清培地で6時間培養して、培養培地を回収及びTCA処理して分泌されたタンパク質を沈殿させた後、ウエスタンブロットでNRS分泌の有無を確認した結果を示す。

【 図 2 】 図2は、RAW264.7、J774A.1、U937及びHL-60細胞株を無血清培地で6時間培養して、培養培地を回収及びTCA処理して分泌されたタンパク質を沈殿させた後、ウエスタンブ

10

20

30

40

50

ロットでNRS分泌の有無を確認した結果を示す。

【図3】図3は、大食細胞のRAW 264.7細胞にTNF- α 、IFN- γ 、TGH- β のサイトカインそれぞれを10ng/mlの濃度で4時間処理して活性化させたとき、NRS分泌状態を確認した結果を示す(Con: サイトカイン非処理群)。

【図4】図4は、それぞれNRS全長、本発明のNRS N末端断片及びNRS触媒ドメインペプチドに対して、前記ペプチドが癌細胞又はリンパ球の細胞移動を誘導するか否かを確認した結果を示す。癌細胞及びリンパ球細胞をトランスウェルのフィブロネクチンがコーティングされたメンブレンが存在する上室に分株して前記3種のペプチドを1nMの濃度で下室に処理して4時間培養した後、メンブレンに移動した細胞らを染色して顕微鏡で観察した(T細胞: Jurkat、B細胞: Daudi、癌細胞: H460)。

10

【図5】図5は、NRS全長、本発明のNRS N末端断片、NRS触媒ドメインペプチドに対して、各ペプチドの処理濃度に応じたB細胞(Daudi cell)の細胞移動を定量化して示した結果である。各処理群別にトランスウェルを利用した細胞移動アッセイ後、メンブレンに存在する移動性細胞をカウントした。(con: 非処理群、F0.1: NRS全長 0.1nM 処理、F1: NRS全長 1nM 処理、F10: NRS全長 10nM 処理、N0.1: NRS N末端断片0.1nM 処理、N1: NRS N末端断片1nM 処理、N10: NRS N末端断片10nM処理、C0.1: NRS触媒ドメインペプチド0.1nM 処理、C1: NRS触媒ドメインペプチド1nM、C10: NRS触媒ドメインペプチド10nM)。

【図6】図6は、NRS全長、本発明のNRS N末端断片、NRS触媒ドメインペプチドに対して、各ペプチドの処理濃度によるT細胞(Jurkat cell)の細胞移動を定量化して示した結果である。各処理群別にトランスウェルを利用した細胞移動アッセイ後、メンブレンに存在する移動性細胞らをカウントした。(con: 非処理群、F0.1: NRS全長 0.1nM 処理、F1: NRS全長 1nM 処理、F10: NRS全長 10nM 処理、N0.1: NRS N末端断片 0.1nM処理、N1: NRS N末端断片1nM 処理、N10: NRS N末端断片10nM処理、C0.1: NRS触媒ドメインペプチド0.1nM 処理、C1: NRS触媒ドメインペプチド1nM、C10: NRS触媒ドメインペプチド10nM)。

20

【図7】図7は、癌細胞又はリンパ球(T細胞、B細胞)細胞株において、CCR3の発現をウエスタンブロット法で測定した結果を示す(T細胞: Jurkat、B細胞: Daudi、癌細胞: H460)。

【図8】図8は、リンパ球の移動におけるCCR3のノックダウンの影響を定量化して示した結果である。CCR3標的siRNA(si-CCR3)を利用して、CCR3-ノックダウンさせた細胞を、トランスウェルチャンバーを利用した細胞移動アッセイに使用した。下室にNRS全長、本発明のNRS N末端断片、NRS触媒ドメインペプチド及びRANTES(陽性対照群)を処理した後で、上室のメンブレンから移動した細胞を顕微鏡でカウントした結果を示す。

30

【図9】図9はCCR3標的siRNA(si-CCR3)を利用してCCR3のノックダウン結果をウエスタンブロットで確認した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0105】

以下本発明を詳細に説明する。

【0106】

ただし、下記実施例は、本発明を例示するのみで、本発明の内容が下記実施例に限定されるものではない。

40

【0107】

<実施例1>

組換えNRS N末端伸長部M1-S77タンパク質の生産

1)MBP-NRS N末端伸長部融合タンパク質作成

【0108】

本発明者らはNRSのN末端伸長部タンパク質の過剰発現及び高い溶解性タンパク質を得るためにpET-28aベクターを利用して組換えタンパク質を作成した。pET-28aベクターにマルトース結合タンパク質(MBP)-タバコエッチ病ウイルス(TEV)プロテアーゼ切断サイト-NRS N末端伸長部を融合させた。次はマルトース結合タンパク質と融合させたタンパク質配列情報である。

50

【 0 1 0 9 】

MGSSHHHHHHSKIEEGKLVIIWINGDKGYNGLAEVGGKKFEKDTG|KVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPD|IFWAHDRF
GGYAQSGLLAE|TPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGK|IAYPIAVEALSL|YNKDLLPNPPKTWEE|PALDKELKAKGKSAL
MFNLQEPYFTWPL|AADGGYAFKYENGKYD|KDVGVNDAGAKAGLTFLVDL|KNKHMNADTDYS|AEAAFNKGETAMT|N
GPWAWSN|DTSKVNYYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAG|NAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSY
EEELAKDPR|AATMENAQKGE|MPN|PQMSAFWYAVRTAV|NAASGRQTVDEALKDAQTNSSSENLYFQGHMVLAELYVS
DREGSDATGDGTKEKPFKTGLKALMTVGKEPFPT|YVDSQKENERWNV|SKSQLKN|KKMWHREQMKS*

【 0 1 1 0 】

TEVプロテアーゼで切断した後、NRS配列1-77のN末端にGHアミノ酸が残ったままNRS N-termタンパク質を得た。ヒトNRS配列をベクターに入れるためにNde1とXho1制限酵素部位を使用した。

10

【 0 1 1 1 】

2)組換えMBP-NRS N末端伸長部タンパク質を含む大腸菌培養及びタンパク質過発現

【 0 1 1 2 】

前記の通り、組換えタンパク質であるMBP-NRS N末端伸長部を発現するように製作したベクターを利用して大腸菌Rosetta2 (DE3) (Novagen)をヒートショック法で形質転換し、カナマイシン (+30 mg/L) が含まれたLB培地で培養して抵抗性を有するコロニーを選別した。選別されたコロニーを利用して、大量培養のための種菌培養を、カナマイシンが含まれたLB液体培地に接種して37 °Cで16時間行った。種菌培養液の一部をカナマイシンが含まれた本培養 LB培地 (2%) に接種して37 °CでOD₆₀₀が0.5になったとき、0.5mM IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)により組換えタンパク質の発現を誘導した。発現が誘導された本培養は、37 °Cで8時間程度培養した後、4 °Cで、6000gで10分間遠心分離をして菌体沈殿物を回収した。

20

【 0 1 1 3 】

3)組換えNRS N末端伸長部タンパク質の精製

【 0 1 1 4 】

回収された菌体沈殿物を破砕溶液[35mM イミダゾール、500mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH7.5)/菌体1g当たり破砕溶液10 mL]に懸濁して、100mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride/菌体1g当り100mM PMSF 100 uL)を添加して、超音波破砕機 (SONICS)を利用して破砕した。破砕後、4 °Cで35000gで60分間遠心分離した後、上澄み液を分離して0.45um ニトロセルロースメンブレンフィルター (Sartorius)を使用して上澄み液を濾過した後、Pump P-1 (GE Healthcare)を使用して、ニッケルが充填されたHiTrap Chelating HP (GE Healthcare)カラムにローディングした。ローディングしたカラムをFPLC(GE Healthcare)に連結して、溶離溶液[1M イミダゾール、500mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH7.5)]を使用して50%の勾配溶離法で組換え蛋白質を1次分離精製した。分離精製された組換えタンパク質をHiPrep 26/10 Desalting (GE Healthcare)カラムを用いてTEVプロテアーゼ処理溶液[200mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH7.5)]に交換して、TEVプロテアーゼ 1 mgを4 °Cで20時間処理してMBPとNRS N末端伸長部を互いに分離した。その後再びPump P-1 (GE Healthcare)を使用して、ニッケルが充填されたHiTrap Chelating HP (GE Healthcare)カラムにローディングした。ローディングしたカラムをFPLC(GE Healthcare)に連結して溶離溶液[1M イミダゾール、500mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH7.5)]を使用して、50%の勾配溶離方法でタンパク質を2次分離精製した。2次分離された組換えタンパク質をサイズ排除クロマトグラフィー[HiLoad16/600 Superdex75 (GE Healthcare)、PBS buffer]を利用して、3次タンパク質分離精製を実施して最終NRS N末端伸長部断片 (配列番号1)を得た。各段階別の精製過程で2D電気泳動を通じてタンパク質の純度を確認した。

30

40

【 0 1 1 5 】

< 比較例1 >

NRS全長タンパク質の生産

【 0 1 1 6 】

full-length NRS (配列番号2) 発現遺伝子をpET-28a (NOVAGEN)ベクターのNde1サイト

50

及びXho1サイト間に挿入した。このように製造した組換えベクターを利用してE. coli株であるC41 (DE3)を形質転換した。振盪培養器を利用して前記形質転換細胞をカナマイシンが含まれたLB培地で、37℃で培養した。OD_{600nm}が0.5になったとき、NRS全長の発現を誘導するために前記培養細胞にIPTG (Isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside)を添加した。IPTG処理後、細胞培養物は、37℃、振盪培養器で8時間培養された。前記培養されたE. coli細胞は、6,000gで10分間の遠心分離により収集された。500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、35 mM イミダゾール (pH 7.5) が含まれた緩衝溶液に前記収集された細胞を再懸濁して超音波破砕機で細胞を溶解した。

【0117】

前記細胞溶解物から目的タンパク質の精製及び収得は次のように行われた。まず、溶解された細胞サンプルは、35,000gで1時間遠心分離され、0.45 µmシリンジフィルター (Sartorius)で濾過 (filtered)された。このように得られたサンプルをペリスタポンプ用いてNi (II) ion charged HiTrap 5 ml chelating HP (GE HEALTHCARE)カラムにローディングした。ローディングされたサンプルは、50%の勾配溶離法を利用して500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、1 M イミダゾール (pH 7.5) が含まれた緩衝溶液に溶出された。NRS全長を含む分画はHiPrep desalting 26/10 (GE HEALTHCARE)カラムを利用して、50 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、(pH 7.5) が含まれた緩衝溶液から脱塩された。前記脱塩されたサンプルは、HiTrap 5 ml Q HP (GE HEALTHCARE)カラムにローディングされ、50%の勾配溶離法を利用して1 M NaCl、20 mM Tris-HCl、(pH 7.5)を含む緩衝溶液に溶出された。このように得られた分画は、HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE HEALTHCARE)カラムにローディングされた後、PBS緩衝液 (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、4.3 mM Na₂HPO₄、1.4mM KH₂PO₄、pH7.4)に溶出され、最終的にNRS全長 (配列番号2)のタンパク質サンプルを得た。そして前記タンパク質サンプルは、10%グリセロールと混合された。各段階別の精製過程で2D電気泳動を通じてタンパク質の純度を確認した。

【0118】

< 比較例2 >

NRS触媒ドメインの高純度調製

【0119】

NRS触媒ドメイン (98-548) の遺伝子をpET-28a (NOVAGEN)ベクターのNde1サイト及びXho1サイト間に挿入した。前記組換えベクターを利用してE. coli株のSolu-BL21を形質転換した。振盪培養器を利用して前記形質転換細胞をカナマイシンが含まれたLB培地で、37℃で培養した。OD_{600nm}が0.5になったとき、NRS触媒ドメイン断片の発現を誘導するために前記培養細胞にIPTG (Isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside)を添加した。IPTG処理後、細胞培養物は37℃、振盪培養器で8時間培養された。培養されたE. coli細胞は、6,000gで10分間の遠心分離によって収集された。500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、35 mM イミダゾール (pH 7.5) が含まれた緩衝溶液に前記収集された細胞を再懸濁して超音波破砕機で細胞を溶解した。前記細胞溶解物からNRS触媒ドメイン (98-548) 断片の収得は前記比較例1でタンパク質精製過程と同様に行われた。

【0120】

< 実施例2 >

組換えNRS N末端伸長部M1-S77タンパク質のサイトカイン活性確認

【0121】

[実験準備]

1. 細胞培養及び試料

【0122】

A549、H460、J774A.1、WI-26、Daudi、Jurkat細胞は10%ウシ胎児血清及び抗生剤 (100 UIペニシリン及び100 mg/mlストレプトマイシン) が含まれたRPMI1640培地で培養された。RAW264.7の培養のために10%ウシ胎児血清及び抗生剤 (100 UIペニシリン及び100 mg/mlストレプトマイシン) が含まれたDMEM培地が使用された。抗-CCR3抗体はMillipore社から購入し、抗-チューブリン抗体はSigma社から購入し、抗-NRS抗体はAbcam社から購入した

。

【 0 1 2 3 】

2. 細胞移動性検査 (Cell Migration assay)

【 0 1 2 4 】

細胞移動は、Boydenトランスウェルプレート (5 mm pore size、24 well、Corning) を使用して測定された。まず、メンブレンを 50 ug/ml フィブロネクチン (BD Biosciences) で事前にコーティングし、細胞を上室に分株した。NRS N末端伸長部断片及びRANTESはそれぞれ誘導物質及び陽性対照群として下室に添加された。4時間の培養後に、メンブレンをPBSで2回洗浄した後、70%メチルアルコールが含まれているPBSを使用して細胞を固定した。その後前記メンブレンはヘマトキシリン (Sigma-Aldrich) で染色された。上部の非移動細胞は綿棒により除去された。メンブレンをバラバラにした後、スライドガラスにマウントした。移動された細胞らは20X対物レンズを利用した顕微鏡で観察及びカウントされた。

10

【 0 1 2 5 】

3. 分泌アッセイ

【 0 1 2 6 】

細胞は分株された後、70%の細胞飽和度で培養された。細胞をPBSで2回洗浄した後、下記のように多様な条件で培養した。(i) 無血清培地で6時間培養、(ii) それぞれTNF- α 、IFN- γ 、TGF- β を10 ng/mlの濃度で添加して4時間培養。

20

【 0 1 2 7 】

培養培地を回収した後、細胞及び残骸等を除去するために順次1,000gで10分及び10,000gで20分遠心分離した。タンパク質を沈殿させるために、トリクロロ酢酸 (TCA、Sigma) を最終10%の濃度になるように添加した。12時間培養後に分泌されたタンパク質は、20,000gでの遠心分離によりペレット化された。沈殿したタンパク質は、100 mM HEPES (pH 8.0) に懸濁され、その後SDS-PAGEにより分離及びウエスタンブロットに利用した。

【 0 1 2 8 】

4. ウエスタンブロット (Western blot)

【 0 1 2 9 】

氷上で細胞をM-PER (Pierce) で溶解した。遠心分離で細胞残骸を除去した後、ブラッドフォード液 (Bio-rad) を利用して製造社の方法によりタンパク質濃度を測定した。その後タンパク質らをSDS-PAGEで分離し、PVDFメンブレンにトランスファー (transfer) した後、それぞれの目的タンパク質に特異的な抗体を使用してウエスタンブロットを行った。1次抗体として抗-CCR3抗体はMillipore社から購入し、抗-チューブリン抗体はSigma社から購入し、抗-NRS抗体はAbcam社から購入した。2次抗体としてNRSにはHRP標識抗-ウサギヤギIgGをThermo社から購入し、チューブリンに対してはHRS標識抗-マウス ヤギIgGをThermo社から購入した。

30

【 0 1 3 0 】

[実験結果]

1. Th1サイトカインは、大食細胞からNRSの分泌を誘導する。

【 0 1 3 1 】

NRSに対する自己抗体は、自己免疫、間質性肺疾患 (interstitial lung disease、ILD) 患者から検出される。NRSを分泌できる細胞を探すためにいくつかの細胞株をテストした。9つの互いに異なる細胞株 (A549、H460、WI-26、Daudi、Jurkat、RAW264.7、J774A.1、U937及びHL-60) を無血清培地で6時間の培養し、培地に分泌されたタンパク質は、TCAにより沈殿された。沈殿されたタンパク質をSDS PAGEで分離した後、抗-NRS抗体を使用したウエスタンブロットでNRSの存在を測定した。9つの細胞株の中でNRSは大食細胞株であるRAW264.7及びJ774A.1 (図1及び図2参照) 細胞の培養培地でのみ検出された。前記と同じ条件で、培地にチューブリンが放出されることは観察できず、これにより、培養後に培地に含まれているNRSが細胞溶解によるものでないことを確認した。これらの結果は、NRSが大食細胞から分泌されることを提示する。他の刺激源によりNRSの分泌が誘導されるか否か

40

50

を確認するために、RAW264.7細胞にTNF- α 、IFN- γ 及びTGF- β のような幾つかの互いに異なるシグナル分子を処理した。TNF- α 及びIFN- γ は、Th1分化に影響を及ぼすものとして知られている。これと対照的に、TGF- β は、Th2の分化を調節するものとして知られている。これらの中でTNF- α 及びIFN- γ は、処理後4時間でNRS分泌を誘導した(図3参照)。これらの結果に基づいて、NRSはTh1分化条件下で特別に大食細胞から分泌されることが分かった。

【0132】

2.NRSのN末端伸長部ドメイン断片はリンパ球の細胞移動を誘導する。

【0133】

トランスウェルチャンバーを利用して細胞移動をモニターした。NRSの触媒ドメインはリンパ球の移動に影響を与えなかったが、NRS全長及びNRS N末端伸長部ドメインはリンパ球の移動を誘導することを確認した(図4乃至図6を参照)。これらの結果は、N末端伸長部ドメインがNRSのケモカイン様活性を有するようにする部分であることを提示する。他の種類の細胞でNRSのケモカイン様活性を観察するために、癌細胞にNRS N末端伸長部断片を処理し、NRS N末端伸長部断片が癌細胞の移動を活性化できない事実を明らかにした(図4)。CCR3がNRSの機能受容体として示されたため、癌細胞とリンパ球でCCR3発現水準を比較した。CCR3発現はリンパ球で増加(up-regulated)された様相を示したが、癌細胞ではそうでなかった(図7参照)。リンパ球のCCR3発現が高かったため、CCR3ノックダウンリンパ球でNRSのケモカイン様活性を比較した。si-CCR3によりCCR3が抑制されたとき(図9)、NRS全長又はNRS N末端伸長部ドメイン断片による細胞移動活性は減少した(図8参照)。これらの結果は、NRSのN末端伸長部ドメインがNRSのケモカイン様活性において主要部分であり、CCR3はこれのための受容体であることを示す。

10

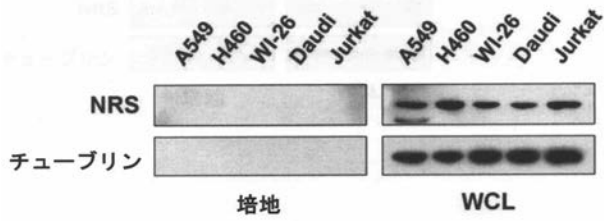
20

【産業上の利用可能性】

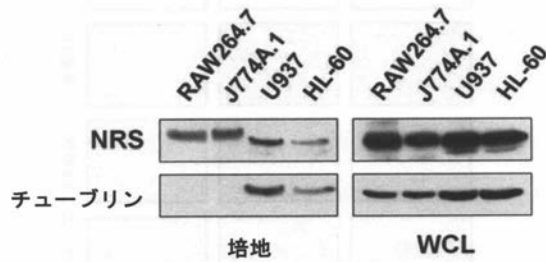
【0134】

以上示した通り、本発明はケモカイン活性を有する新規なポリペプチドに関するもので、さらに詳細には、配列番号1で表示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド及びこれの利用に関する。本発明のポリペプチドは、配列番号1で表され、CCR3への結合を通じたケモカイン活性を示すので、免疫調節、CCR3を媒介とする疾患又は病症の検出、診断、治療、薬剤開発などの様々な目的で活用可能で、産業上の利用可能性が高い。

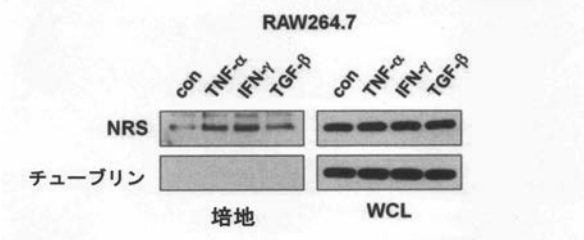
【 図 1 】



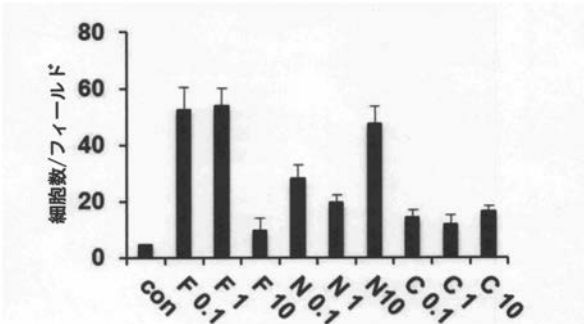
【 図 2 】



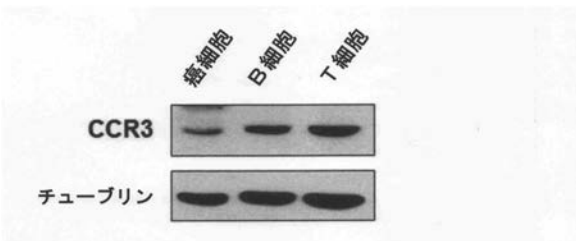
【 図 3 】



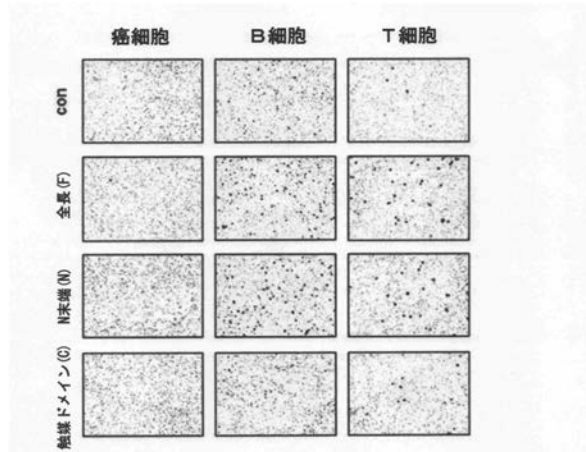
【 図 6 】



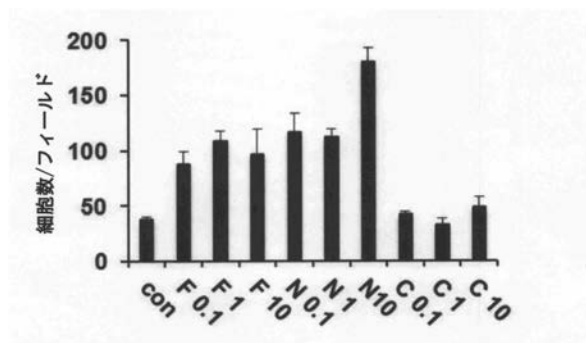
【 図 7 】



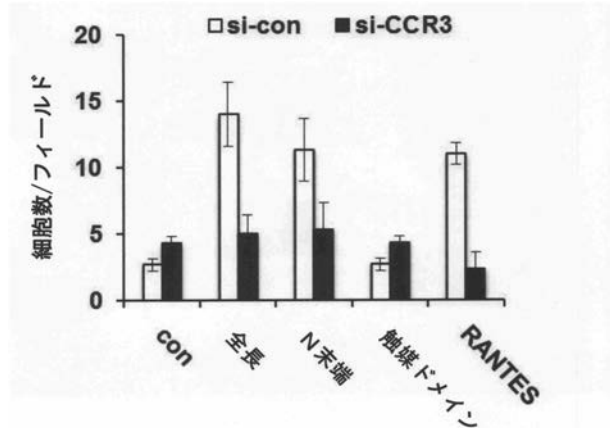
【 図 4 】



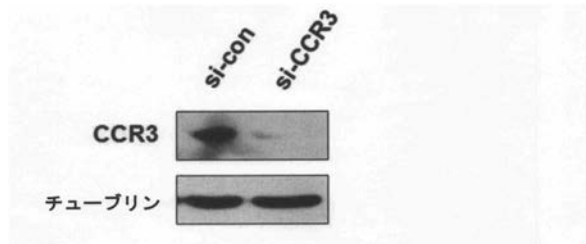
【 図 5 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2018527898000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/007621

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C07K 14/52(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i</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) C07K 14/52; A61K 38/53; A61K 38/00; C12N 15/09; C12N 15/52; C12N 9/00; A61K 31/711; A61K 47/48; G01N 33/574; G01N 33/58; G01N 33/50 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) & Keywords: asparagine tRNA synthetase, N-terminus, chemokine, CCR3(C-C chemokine receptor type 3), choroidal neovascularization		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NCBI, GenBank Accession No. BAG57627.1 (31 July 2008) See the entire document.	1-8
A		9-20
A	HOWARD et al., "Histidyl-tRNA Synthetase and Asparaginyl-tRNA Synthetase, Autoantigens in Myositis, Activate Chemokine Receptors on T Lymphocytes and Immature Dendritic Cells", The Journal of Experimental Medicine, vol. 196, no. 6, pp. 781-791 (2002) See abstract; pages 782, 785-788; and figure 4.	1-20
A	US 2012-0263702 A1 (SCHIMMEL et al.) 18 October 2012 See abstract; claims 1-20; and figure 1.	1-20
A	WO 2010-107825 A2 (PANGU BIOPHARMA LIMITED) 23 September 2010 See the entire document.	1-20
A	JP 2001-029079 A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 06 February 2001 See the entire document.	1-20
☐ 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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 OCTOBER 2016 (20.10.2016)		Date of mailing of the international search report 20 OCTOBER 2016 (20.10.2016)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/007621

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2012-0263702 A1	18/10/2012	AU 2001-245899 B2	15/06/2006
		AU 2001-250904 B2	13/04/2006
		AU 2006-202830 A1	27/07/2006
		AU 2006-220352 A1	12/10/2006
		AU 2006-220352 B2	12/11/2009
		AU 2010-200514 A1	04/03/2010
		AU 2010-200514 B2	15/03/2012
		AU 4589901 A	15/10/2001
		AU 5090401 A	15/10/2001
		CA 2404484 A1	11/10/2001
		CA 2404488 A1	11/10/2001
		DE 60142508 D1	19/08/2010
		EP 1272506 A1	08/01/2003
		EP 1272506 A4	02/06/2004
		EP 1272506 B1	29/07/2015
		EP 1274834 A1	15/01/2003
		EP 1274834 A4	09/06/2004
		EP 1274834 B1	07/07/2010
		EP 2258834 A1	08/12/2010
		EP 2258834 B1	23/09/2015
		IL 151943 A	03/08/2009
		IL 195677 A	31/05/2011
		IL 195854 A	29/01/2015
		JP 2003-529354 A	07/10/2003
		JP 2004-500121 A	08/01/2004
		JP 4868681 B2	01/02/2012
		JP 5036115 B2	26/09/2012
		NZ 522182 A	29/07/2005
		NZ 522183 A	24/02/2006
		US 2004-0009163 A1	15/01/2004
		US 2006-0216745 A1	28/09/2006
		US 2009-0227662 A1	10/09/2009
		US 2011-0110917 A1	12/05/2011
		US 7067126 B2	27/06/2006
		US 7521215 B2	21/04/2009
		US 7901917 B2	08/03/2011
		US 8148125 B2	03/04/2012
		US 8562977 B2	22/10/2013
		WO 01-74841 A1	11/10/2001
		WO 01-75078 A1	11/10/2001
WO 2010-107825 A2	23/09/2010	AU 2010-226726 A1	20/10/2011
		AU 2010-226726 A8	14/08/2014
		AU 2010-226726 B2	03/07/2014
		CA 2755784 A1	23/09/2010
		CN 102428175 A	25/04/2012
		CN 104830812 A	12/08/2015
		EP 2408905 A2	25/01/2012
		EP 2408905 A4	19/12/2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/007621

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 2012-520681 A	10/09/2012
		JP 2015-034176 A	19/02/2015
		JP 5730280 B2	03/06/2015
		US 2010-0297149 A1	25/11/2010
		US 2013-0243766 A1	19/09/2013
		US 2014-0371294 A1	18/12/2014
		US 8404242 B2	26/03/2013
		US 8753638 B2	17/06/2014
		WO 2010-107825 A3	03/03/2011
JP 2001-029079 A	06/02/2001	NONE	

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2016/007621

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/52(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/52; A61K 38/53; A61K 38/00; C12N 15/09; C12N 15/52; C12N 9/00; A61K 31/711; A61K 47/48; G01N 33/574; G01N 33/58; G01N 33/50 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) & 키워드: 아스파라긴 tRNA 합성효소, N-말단, 케모카인, CCR3(C-C chemokine receptor type 3), 맥락막 혈관신생		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	NCBI, GenBank accession no. BAG57627.1 (2008.07.31) 전체 문헌 참조	1-8
A		9-20
A	HOWARD 등, 'Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells' The Journal of Experimental Medicine, Vol.196, No.6, pp.781-791 (2002) 요약; 페이지 782, 785-788; 및 도면 4 참조.	1-20
A	US 2012-0263702 A1 (SCHIMMEL 등) 2012.10.18 요약; 청구항 1-20; 및 도면 1 참조.	1-20
A	WO 2010-107825 A2 (PANGU BIOPHARMA LIMITED) 2010.09.23 전체 문헌 참조.	1-20
A	JP 2001-029079 A (KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD) 2001.02.06 전체 문헌 참조.	1-20
☐ 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 가진 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 신규성 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 2016년 10월 20일 (20.10.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 10월 20일 (20.10.2016)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2016/007621

제1기제관 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

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

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/007621

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2012-0263702 A1	2012/10/18	AU 2001-245899 B2	2006/06/15
		AU 2001-250904 B2	2006/04/13
		AU 2006-202830 A1	2006/07/27
		AU 2006-220352 A1	2006/10/12
		AU 2006-220352 B2	2009/11/12
		AU 2010-200514 A1	2010/03/04
		AU 2010-200514 B2	2012/03/15
		AU 4589901 A	2001/10/15
		AU 5090401 A	2001/10/15
		CA 2404484 A1	2001/10/11
		CA 2404488 A1	2001/10/11
		DE 60142508 D1	2010/08/19
		EP 1272506 A1	2003/01/08
		EP 1272506 A4	2004/06/02
		EP 1272506 B1	2015/07/29
		EP 1274834 A1	2003/01/15
		EP 1274834 A4	2004/06/09
		EP 1274834 B1	2010/07/07
		EP 2258834 A1	2010/12/08
		EP 2258834 B1	2015/09/23
		IL 151943 A	2009/08/03
		IL 195677 A	2011/05/31
		IL 195854 A	2015/01/29
		JP 2003-529354 A	2003/10/07
		JP 2004-500121 A	2004/01/08
		JP 4868681 B2	2012/02/01
		JP 5036115 B2	2012/09/26
		NZ 522182 A	2005/07/29
		NZ 522183 A	2006/02/24
		US 2004-0009163 A1	2004/01/15
		US 2006-0216745 A1	2006/09/28
		US 2009-0227662 A1	2009/09/10
		US 2011-0110917 A1	2011/05/12
		US 7067126 B2	2006/06/27
		US 7521215 B2	2009/04/21
		US 7901917 B2	2011/03/08
		US 8148125 B2	2012/04/03
		US 8562977 B2	2013/10/22
		WO 01-74841 A1	2001/10/11
		WO 01-75078 A1	2001/10/11
WO 2010-107825 A2	2010/09/23	AU 2010-226726 A1	2011/10/20
		AU 2010-226726 A8	2014/08/14
		AU 2010-226726 B2	2014/07/03
		CA 2755784 A1	2010/09/23
		CN 102428175 A	2012/04/25
		CN 104830812 A	2015/08/12
		EP 2408905 A2	2012/01/25
		EP 2408905 A4	2012/12/19

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/007621

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2012-520681 A	2012/09/10
		JP 2015-034176 A	2015/02/19
		JP 5730280 B2	2015/06/03
		US 2010-0297149 A1	2010/11/25
		US 2013-0243766 A1	2013/09/19
		US 2014-0371294 A1	2014/12/18
		US 8404242 B2	2013/03/26
		US 8753638 B2	2014/06/17
		WO 2010-107825 A3	2011/03/03
JP 2001-029079 A	2001/02/06	없음	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08		
A 6 1 P	11/14	(2006.01)	A 6 1 P	11/14		
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06		
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/02		
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00		
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	13/08		
A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 K	38/19		
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/00		
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z	
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z	
G 0 1 N	33/566	(2006.01)	G 0 1 N	33/566		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

(72) 発明者 キム、スンフン

大韓民国 0 6 2 6 9 ソウル カンナム - グ 3 6 5 - ギル ナムブスンハン - ロ 4 2 # 4
- 1 0 0 5 (ドゴク - ドン ドゴクハンシン アパート)

(72) 発明者 パク、ミン チュル

大韓民国 1 4 0 6 6 キョンギ - ド アニョン - シ トンアン - グ プリム - ロ 1 1 3 ピョ
ンチョン ヒュンダイ I - スペース # 1 8 2 3

(72) 発明者 ハン、ピョン ウ

大韓民国 0 6 6 3 5 ソウル ソチョ - グ 6 4 - ギル ソチョ - テロ 3 6 # 1 0 1 - 6 0
7 (ソチョ - ドン テソン ユニド アパート)

(72) 発明者 パク、ジュン - スン

大韓民国 0 8 8 1 4 ソウル クァナク - グ 7 ナ - ギル シリム - ロ 7 - 5 # 2 0 2 (シリム - ドン)

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA24 AA25 AA40 BA13 BA14 BB20 BB24 CA17 CA18
CA19 CB01 CB02 CB17 DA36 FA16 FA20 FB01 FB02 FB03
GC10
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ79 QR77 QR80 QS28 QX02 QX04 QX07
4B065 AA01X AA57X AA72X AA83X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24

CA46
4C084 AA01 AA02 BA02 BA08 BA22 BA23 CA59 DA01 NA14 ZA341
ZA342 ZA591 ZA592 ZA621 ZA622 ZA661 ZA662 ZA811 ZA812 ZA891
ZA892 ZB131 ZB132 ZB261 ZB262 ZC411 ZC412
4C085 HH03 HH07 HH11 HH13 KA11 KA27 KA28 KA29 KB82 LL01
4H045 AA10 AA30 BA10 BA50 BA63 BA70 BA71 CA40 EA20 EA50
FA74 GA22 GA26

专利名称(译)	具有趋化因子活性的新多肽		
公开(公告)号	JP2018527898A	公开(公告)日	2018-09-27
申请号	JP2018501347	申请日	2016-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	医药生命融合研究团		
申请(专利权)人(译)	医药生物融合研究中心		
[标]发明人	キムスンフン パクミンチュル ハンビョンウ パクジュンスン		
发明人	キム、スンフン パク、ミン チュル ハン、ビョン ウ パク、ジュン-スン		
IPC分类号	C12N15/12 C07K14/46 C12Q1/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/63 A61P43/00 A61P37/08 A61P11/14 A61P11/06 A61P11/02 A61P11/00 A61P1/04 A61P17/00 A61P17/06 A61P35/00 A61P13/12 A61P13/08 A61K38/19 A61K49/00 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/566 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/19 A61P1/04 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P11/14 A61P13/08 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P35/00 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/52 C07K2319/24 C07K2319/50 G01N33/6863 G01N2333/521 G01N2800/12 G01N2800/7095 G01N33/50 G01N33/574 G01N33/58		
FI分类号	C12N15/12.ZNA C07K14/46 C12Q1/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/63.Z A61P43/00.111 A61P37/08 A61P11/14 A61P11/06 A61P11/02 A61P11/00 A61P1/04 A61P17/00 A61P17/06 A61P35/00 A61P13/12 A61P13/08 A61K38/19 A61K49/00 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/566 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CA17 2G045/CA18 2G045/CA19 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA20 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/GC10 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS28 4B063/QX02 4B063/QX04 4B063/QX07 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA83X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA59 4C084/DA01 4C084/NA14 4C084/ZA341 4C084/ZA342 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZA621 4C084/ZA622 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZB131 4C084/ZB132 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH11 4C085/HH13 4C085/KA11 4C085/KA27 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KB82 4C085/LL01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/BA63 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA22 4H045/GA26		
优先权	1020150099994 2015-07-14 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了通过结合包含SEQ ID NO : 1的C-C趋化因子受体3型 (CCR3) 介导的具有趋化因子活性的多肽及其用途。

