

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-149365

(P2006-149365A)

(43) 公開日 平成18年6月15日(2006.6.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 C O 8 4
C O 7 K 7/04 (2006.01)	C O 7 K 7/04	4 H O 4 5
C O 7 K 14/715 (2006.01)	C O 7 K 14/715	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
審査請求 未請求 請求項の数 31 O L 外国語出願 (全 105 頁)		

(21) 出願番号 特願2005-146848 (P2005-146848)
 (22) 出願日 平成17年5月19日 (2005.5.19)
 (31) 優先権主張番号 0426146.7
 (32) 優先日 平成16年11月29日 (2004.11.29)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

特許法第30条第1項適用申請有り

(71) 出願人 505184768
 ビオエクセル エスピーエー
 BioXcell SpA
 イタリア 1-20132 ミラン ビア
 オルゲッチナ 58
 (71) 出願人 505186371
 ユニベルシテ ヘンリ ポインカレ
 ナンシー 1
 Universite Henri Po
 incare-Nancy 1
 フランス共和国 F-54003 ナンシ
 ー ビー. ビー. 60120 ルエリ
 オンノイス 24
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療用ペプチド及びその使用方法

(57) 【要約】

【課題】

本発明の目的は、感染症、特に敗血症、及び敗血症ショックの治療、又は敗血症-様状態の治療方法及び治療用組成物を提供することである。

【解決手段】

敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の症状を治療、改善、又は軽減する能力を特徴とする、TREM-1蛋白質のCDR2又はCDR3由来の1種以上の配列を含むポリペプチド、及びその使用方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の症状を、治療、改善、又は軽減する能力を特徴とする、TREM-1蛋白質のCDR2又はCDR3由来の1種以上の配列を含むポリペプチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが、該TREM-1蛋白質の30個よりも少ない連続的なアミノ酸を含む、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 3】

(i) CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸を含む未変性のTREM-1蛋白質配列に対応する15-25個のアミノ酸の連続的な配列；又は、(ii) 1個以上のアミノ酸が提供された別のアミノ酸により保存的に置換されているが、CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸は置換されていない配列；又は、(iii) そのN及びC末端の一方又は両方で異種ポリペプチドに連結された(i) もしくは(ii) の配列からなる、抗-敗血症又は抗-敗血症ショック活性を有するTREM-1ポリペプチド。 10

【請求項 4】

該未変性のTREM-1蛋白質配列が、配列番号1として特定されたヒト配列であり、並びにCDR2及びCDR3配列は、各々RPSKNS及びQPPKEである、請求項3記載のポリペプチド。

【請求項 5】

CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸が、QPPである、請求項4記載のポリペプチド。 20

【請求項 6】

CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸が、QPPKである、請求項4記載のポリペプチド。

【請求項 7】

CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸が、QPPKEである、請求項4記載のポリペプチド。

【請求項 8】

CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸が、RPSKNSである、請求項4記載のポリペプチド。

【請求項 9】

該未変性のTREM-1蛋白質配列は、配列番号：2として特定されたマウス配列であり、並びにCDR2及びCDR3配列は、各々RPFTRP及びHPPNDである、請求項3記載のポリペプチド。 30

【請求項 10】

CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸が、HPPである、請求項9記載のポリペプチド。

【請求項 11】

CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸が、HPPNである、請求項9記載のポリペプチド。

【請求項 12】

CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸が、HPPNDである、請求項9記載のポリペプチド。 40

【請求項 13】

CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸が、RPFTRPである、請求項9記載のポリペプチド。

【請求項 14】

前記ポリペプチドが、敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の症状を、治療、改善、又は軽減する能力を特徴とする、請求項1~13のいずれか1項記載のポリペプチド。

【請求項 15】

配列番号：3、4、6、7、16、17、18、又は19のいずれかひとつの配列と実質的配列同一性を有し、かつ敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の症状を、治療、改善、又は 50

軽減する能力を特徴とする、ポリペプチド。

【請求項 16】

配列番号：3、4、6、7、16、17、18、又は19の配列のポリペプチド、その活性断片、アナログ、及び誘導体で、並びに敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の症状を、治療、改善、又は軽減する能力を特徴とするポリペプチド。

【請求項 17】

配列番号：3、4、6、7、16、17、18、又は19の配列と少なくとも80%の配列同一性を有し、かつ敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態を治療する能力を特徴とし、かつTREM-1蛋白質のCDR2又はCDR3由来の少なくとも2個の連続したアミノ酸を有する、ポリペプチド。

10

【請求項 18】

配列番号：3、4、6、7、16、17、18、又は19の配列と少なくとも80%の配列同一性を有し、かつ敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態を治療する能力を特徴とするポリペプチドであり、ここでペプチドは、TREM-1蛋白質のCDR2又はCDR3由来の少なくとも3個の連続したアミノ酸を有する、ポリペプチド。

【請求項 19】

配列番号：3、4、6、7、16、17、18、又は19の配列と実質的配列同一性を有し、かつ敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態を治療する能力を特徴とするポリペプチドをコードし得る単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 20】

20

配列番号：3、4、6、7、16、17、18、又は19の配列と少なくとも80%の配列同一性を有し、かつ敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態を治療する能力を特徴とするポリペプチドをコードし得るポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 21】

前記ポリペプチドは、未変性のTREM-1蛋白質の30個未満の連続的なアミノ酸を含む、請求項15～20のいずれか1項記載のポリペプチド。

【請求項 22】

請求項1～21のいずれか1項記載のペプチド、又はポリペプチドを含む組成物。

【請求項 23】

療法における使用のための、請求項1～22のいずれか1項記載のペプチド、又はポリペプチド。

30

【請求項 24】

敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の治療における療法において使用するための、請求項1～23のいずれか1項記載のペプチド、又はポリペプチド。

【請求項 25】

敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の治療のための医薬品の製造における、請求項1～24のいずれか1項記載のペプチド、又はポリペプチドの使用。

【請求項 26】

対象へ、請求項1～25のいずれか1項記載のペプチド、又はポリペプチドを治療有効量投与することを含む、対象における敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態を、治療、又は改善する方法。

40

【請求項 27】

前記ペプチド又はポリペプチドが、配列番号：3、4、6、7、16、17、18、又は19の配列と実質的配列同一性を有する、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

前記ペプチド又はポリペプチドが、配列番号：3、4、6、7、16、17、18、もしくは19、又は配列番号：3、4、6、7、16、17、18、もしくは19の活性断片、アナログもしくは誘導体である、請求項26記載の方法。

【請求項 29】

前記ペプチド、又はポリペプチドが、配列番号：3、4、6、7、16、17、18、又は19と少

50

なくとも約80%の配列同一性を有する、請求項26記載の方法。

【請求項30】

敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態を治療するために、化合物、又は組成物をスクリーニングする方法であり；

TREM-1ペプチド又はTREM-1ポリペプチドを提供する工程；

TREM-1ペプチドを盲腸結紮穿刺モデルの動物と接触する工程；

敗血症の変化が存在するかどうか決定する工程を含み、

ここで生存率の増加が、TREM-1ペプチドが、敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の治療に有用であることを示している、方法。

【請求項31】

適用が、敗血症、又は敗血症ショックである、請求項1～30のいずれか1項記載の、ポリペプチド、ベクターの使用、方法、又は組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫学の分野に関する。より詳細に述べると、本発明は、炎症、並びに、疾患、例えば敗血症及び敗血症ショックの治療におけるTREM-1蛋白質のある配列を含む蛋白質及びペプチド（本願明細書においてTREM-1ペプチドと称される）並びにそれらの機能的同等物の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

敗血症は、集中治療の資源を著しく消費し、そのために集中治療室において問題が絶えず存在している。米国及び欧州の両方において、毎年40万～50万人の患者が罹患していると推定されている。支持療法及び抗菌療法の両者共改善されているにもかかわらず、罹患率及び死亡率は依然高い。死亡率は、合併症を伴わない敗血症の40%から、敗血症ショック及び多臓器不全を罹患しているものの80%まで変動する。これらの状態の病理は、現在より良く理解され始めている。免疫、炎症及び血液メディエーターの複雑なネットワークのより大きい理解は、理論的かつ新規の療法の開発を可能にしている。

【0003】

感染後、先天性及び認知性（cognitive）の免疫応答は、特異性及び複雑性を蓄積する持続発相で発達し、最終的には感染物質のクリアランス及び恒常性の回復をもたらす。先天性の免疫応答は、防御の第一線として利用され、並びに様々な病原体-関連微生物パターン（PAMP）（3）による、トール様受容体（TLR）（1, 2）のようなパターン認識受容体の活性化時に開始される。TLRの活性化は、TNF- α 及びIL-1 β のようなサイトカイン類の大量放出の引き金をひき、これは、敗血症のような大規模な感染症の場合、組織損傷及び致命的ショックを早める（4, 5）。この状況において、TNF- α 及びIL-1 β のアンタゴニストは、関心のある敗血症の治療的物質としての可能性が認められるが、残念ながらこれらの臨床試験における効果は限定されたものである（6-8）。このことは、これらのサイトカインは、感染症のクリアランスに必要であるという事実、及びそれらの除去は致命的細菌増殖を可能にする（9-11）という事実起因しているであろう。

【0004】

とりわけ感染症に対する反応に関連している別の受容体である骨髄細胞-1に発現する誘発性受容体（TREM-1）は、好中球及び単球サブセットの表面に発現される受容体の最近発見されたファミリーであるTREMファミリーの一員である。TREM受容体は、アダプター分子DAP12との会合を介して、骨髄細胞を活性化する。TREM-1の結合は、微生物の生成物質の存在下で、前炎症性サイトカインの合成の引き金を引くことが報告されている。

【0005】

骨髄細胞に発現する誘発性受容体（TREM）-1は、ヒト及びマウスの多形核好中球及び成熟単球の両方で同定された最近発見された細胞-表面分子である（12）。これは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、DAP12と称されるアダプター蛋白質の補助により下

10

20

30

40

50

流のシグナル伝達経路を活性化する(12-15)。Bouchonとその同僚は、TREM-1の発現は、細胞培養物中及び感染症患者の組織試料中の両方において、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)又は黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)のような細菌の存在下で、好中球及び単球において大きくアップレギュレーションされることを示した(16)。TREM-1は、免疫複合体により引き起こされた乾癬、潰瘍性大腸炎又は血管炎のような非-感染性炎症疾患に罹患した患者から得た試料においてはアップレギュレーションされないことは特筆すべき対比である(16)。更にTREM-1がそのリガンドに結合される場合、LPSの相乗作用並びに前炎症性サイトカインTNF- α 及びGM-CSFの増幅された合成が、IL-10生成の阻害と共に存在する(17)。LPS-誘導した敗血症ショックのマウスモデルにおいて、TREM-1シグナル伝達の遮断は、動物を死亡から保護し、更にはこの分子の決定的な役割を際立たせている(13, 16)。

10

【0006】

最近の研究は、TREM-1が感染症に対する炎症反応において重要な役割を果たすことを示している(BOUCHONらの論文、J. Immunol., 164: 4991-4995 (2000) 参照)。TREM-1の発現は、ヒトにおいて細菌及び真菌の両感染症に対し反応し、骨髄細胞上で増大する。同様にマウスにおいて、リポ多糖(LPS)によるショックの誘導は、TREM-1の増大した発現に関連している。更にマウスの「デコイ」受容体としての可溶性TREM-1/Ig融合蛋白質による処置は、LPS又は大腸菌に起因した死亡からマウスを保護する。

【0007】

米国特許第6,420,526号、名称「186分泌蛋白質」は、ヒトTREM-1の少なくとも30個の連続的なアミノ酸を含むTREM-1の特定されずかつ例証されない単離された断片について請求している。このような断片に関する生物学的データは提供されていない。

20

米国特許出願公開第2003165875A号に説明されているように、ヒトIgG1定常領域と、マウスTREM-1の細胞外ドメイン又はヒトTREM-1の細胞外ドメインとの間の融合蛋白質は、マウスの内毒素血症に対する作用を示す。

【0008】

本発明者らは驚くべきことに、TREM-1蛋白質に由来したある種のペプチドは、TREM-1蛋白質のアンタゴニストとして作用することが可能であり、その結果敗血症及び敗血症ショックの治療に適応であることを発見した。更に本発明者らは、このペプチドは同じく、*in vivo*において、感染症により引き金を引かれた前炎症性カスケードを変化し、その結果敗血症動物モデルにおける過剰反応及び死亡を阻害することを明らかにしている。

30

先に本発明者らは、TREM-1の可溶型(sTREM-1)を同定し、これを敗血症ショック患者の血清試料中においては有意なレベルで認めたが、対照においては認めなかった。本願明細書においても説明されたように、本発明者らは、敗血症時の炎症の変化におけるその推定上の役割を調べた(Gibotらの論文、Ann. Intern. Med., 141(1): 9-15 (2004)、及びGibotらの論文、N. Engl. J. Med., 350(5): 451-8 (2004))。

【0009】

本願明細書に説明されるように、本発明者らは、TREM-1の可溶型(sTREM-1)は、マウスにおける感染症攻撃時に末梢血中に放出されることを示している。本発明者らは同じく、sTREMの主要な給源が単球であることを確認し、及びTREM-1の細胞外ドメインの一部を模倣している合成ペプチドは、*in vitro*において活性化された単球によるサイトカイン生成を変化することができることを示している。

40

本発明者らは、sTREM-1は、LPSにより*in vitro*において、更には敗血症ショックの実験モデルに関連した動物の血清中に、活性化された単球により分泌されることを認めている。In vitro及び*in vivo*の両方において、sTREM-1の短い高度に保存されたドメインを模倣している合成ペプチドは、ヒト単球によるサイトカイン生成を減弱し、敗血症動物を過剰反応及び死亡から保護する。これらのペプチドは、前炎症性サイトカインの有害な作用を単に妨害することのみではなく、ダウンレギュレーションすることにおいても効率的である。これらのデータは、TREM-1ペプチドによるTREM-1の*in vivo*変化は、感染症、例えば敗血症もしくは敗血症ショックの治療、又は敗血症-様状態の治療のための価値のある治

50

療道具であることを明らかにしている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従って本発明は、感染性疾患、特に敗血症、及び敗血症ショックを治療するための、又は敗血症-様状態を治療するための、方法及び組成物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本願明細書に説明されたように、本発明者らは、「CDR2」及び「CDR3」からの配列を取
込んでいるTREM-1蛋白質の細胞外部分のいくつかのペプチド（表1参照）は、驚くべきこ
とに、先に説明されたIgG1定常領域及び敗血症モデルにおけるTREM-1の細胞外ドメインの
融合蛋白質に類似した活性を有していることを決定した。これらのペプチドは、特に製造
コストに関してこの蛋白質に勝る利点も有する。

10

従って本発明は、TREM-1蛋白質のCDR2又はCDR3由来の1種以上の配列を含むポリペプチ
ドを提供する。好ましくは、該ポリペプチドは、該TREM-1蛋白質の30個未満の連続的なア
ミノ酸を含む。

【0012】

表1に示されたように、このようなペプチド又はポリペプチドの例は、例えばTREM-1蛋
白質由来の15-25個のアミノ酸（「AA」）ペプチドを包含又は含み、並びにCDR-様ドメイ
ンの機能が失われない限りは長さ変動し得るその蛋白質由来の天然の配列が側方に位置
したこの受容体のCDRドメイン（3-6AA）の全て又は一部を包含するか又は含む。このよう
なペプチドは、例えば、表2（ヒト）及び表3（マウス）に示されたような、TREM-1受容体
蛋白質アミノ酸配列に由来している。

20

【0013】

表1は、マウスTREM-1「mPX」（NCBI参照配列（RefSeq）NP_067381）又はヒトTREM-1「h
PX」（NCBI参照配列（RefSeq）NP_061113）由来のペプチドを示している。下線を付けた
アミノ酸は、Radaevらの論文（Structure（Camb.）、11（12）1527-1535（2003））に記
された、ヒトTREM-1相補性決定領域（CDR）に広がっている。

表2は、ヒトTREM-1アミノ酸配列NP_061113を示している。下線を付けたアミノ酸は、Ra
daevらの論文（Structure（Camb.）、11（12）1527-1535（2003））に記された、ヒトTRE
M-1相補性決定領域（CDR）2（RPSKNS；[配列番号：20]）及び3（QPPKE [配列番号：21]）
に広がっている。

30

表3は、マウスTREM-1アミノ酸配列NP_067381を示している。下線を付けたアミノ酸は、
マウスTREM-1相補性決定領域（CDR）2（RPFTRP；[配列番号：22]）及び3（HPPND；[配列
番号：23]）に広がっている。

【0014】

【表 1】

表1. ヒト及びマウスTREM-1 CDR2及びCDR3の配列を含むペプチド

hCDR 2	
mP1 (67-89) : [配列番号:3]	LVVTQRPFTRPSEVHMKGFTLKH
hP1 (67-89) : [配列番号:16]	LACTERPSKNSHPVQVGRIILED
hCDR 3	
mP2 (114-136) : [配列番号:4]	VIYHPPNDPVVLFHPVRLVVTKG
mP4 (103-123) : [配列番号:6]	LQVTDGSLYRCVIYHPPNDPV
mP5 (103-119) : [配列番号:7]	LQVTDGSLYRCVIYHPP
hP2 (114-136) : [配列番号:17]	VIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
hP4 (103-123) : [配列番号:18]	LQVEDSGLYQCVIYQPPKEPH
hP5 (103-119) : [配列番号:19]	LQVEDSGLYQCVIYQPP

10

【0015】

20

【表 2】

表2. ヒトTREM-1 アミノ酸配列 NP_061113

1	MRKTRLWGLL	WMLFVSELRA	ATKLTEEKYE	LKEGQTLQV	CDYTLKQFAS	SQKAWQIIRD
61	GEMPKTLACT	ERPSKNSHPV	QVGRIILEDY	HDHGLLRVRM	VNLQVEDSGL	YQCVIYQPPK
121	EPHMLFDRIR	LVVTKGFSGT	PGSNENSTQN	VYKIPPTTTK	ALCPLYTSPR	TVTQAPPKST
181	ADVSTPDSEI	NLTNVTDIIR	VPVFNIVILL	AGGFLSKSLV	FSVLFAVTLR	SFVP
[配列番号:1]						

30

【0016】

【表 3】

表3. マウスTREM-1 アミノ酸配列 NP_067381

1	MRKAGLWGLL	CVFFVSEVKA	AIVLEEERYD	LVEGQTLTVK	CPFNIMKYAN	SQKAWQRLPD
61	GKEPLTLVVT	QRPFTRPSEV	HMGKFTLKHD	PSEAMLQVQM	TDLQVTDGSL	YRCVIYHPPN
121	DPVVLFFHPV	LVVTKGSSDV	FTPVIIPITR	LTERPILITT	KYSPSDTTTT	RSLPKPTAVV
181	SSPGLGVTTI	NGTDADSVST	SSVTISVICG	LLSKSLVFII	LFIVTKRTFG	
[配列番号:2]						

40

【0017】

従って本発明は、本願明細書に定義されたように、本質的にTREM-1蛋白質のCDR2もしくはCDR3由来の1種以上の配列を含む又はからなる単離された又は組換えにより調製されたポリペプチドもしくはペプチド、又はそのようなポリペプチドの断片、ホモログ、誘導体、融合蛋白質もしくは変種を提供し、これらは本願明細書においては集合的に「本発明のポリペプチド又はペプチド」もしくは「TREM-1ペプチド又はTREM-1ポリペプチド」と称され、このような実体は、例えば表2又は表3に示されたようなTREM-1蛋白質の30個未満の連

50

統的なアミノ酸を含むことが好ましい。一般に本発明のポリペプチドもしくは蛋白質、又はそれらの断片、ホモログ、誘導体、もしくは変種は、特定の種における使用（例えば治療）が意図されており、TREM-1蛋白質のCDR2又はCDR3配列は、その種の、又はその配列が不明である場合は類似種のTREM-1蛋白質アミノ酸配列から選択される。例えば、ヒトの疾患、特に敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の治療のための本発明のポリペプチド又は蛋白質は、ヒトTREM-1蛋白質からのCDR2又はCDR3の全て、又は一部を含む1種以上の配列を含有するであろう。

【0018】

更に本発明は、配列番号：20、21、22、23のアミノ酸配列と少なくとも約60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは98%同一であるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドもしくは蛋白質、又はそれらの断片、ホモログ、誘導体、もしくは変種を提供する。本発明は、TREM-1蛋白質の少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、もしくは29個、又はそれよりも多い連続的なアミノ酸を含む又はからなるアミノ酸配列を含む単離されたペプチド、ポリペプチド又は蛋白質も提供し、その3個又はそれよりも多い連続的なアミノ酸は、配列番号：20、21、22又は23の配列（別の表現をすると、TREM-1蛋白質のCDR2又はCDR3の全て又は一部を表している配列は、そのペプチド、ポリペプチド又は蛋白質中に存在する。）、又はそれらの断片、ホモログ、誘導体、もしくは変種に由来する。好ましい実施態様において、このようなペプチド、ポリペプチドもしくは蛋白質、又はそれらの断片、ホモログ、誘導体、もしくは変種は、TREM-1完全長蛋白質の生物学的活性、例えば抗原性、免疫原性、前炎症性ケモカイン及びサイトカインの引き金、細胞質ゾルCa²⁺の移動、蛋白質チロシン-リン酸化、メディエーター放出、並びに容易にアッセイ可能な他の活性などを有する。一般にこのようなペプチド、ポリペプチドもしくは蛋白質、又はそれらの断片、ホモログ、誘導体、もしくは変種は、敗血症、敗血症ショックもしくは敗血症-様状態を治療することが可能であるか、又は例えば、TREM-1受容体の活性のアンタゴニストとして作用することにより、敗血症、敗血症ショックもしくは敗血症-様状態の実験モデルにおいて活性がある。このようなペプチド、ポリペプチドもしくは蛋白質、又はそれらの断片、ホモログ、誘導体、もしくは変種は、敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の症状を治療、改善、又は軽減する能力により特徴付けられる。

【0019】

特に、本発明は、(i) CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸を含む未変性のTREM-1蛋白質配列に相当する5~29個、例えば15-25個のアミノ酸の連続的な配列；又は、(ii) 1個以上のアミノ酸が提供された別のアミノ酸により保存的に置換されているが、CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸は置換されないような配列；又は、(iii) そのN及びC末端の一方又は両方で、異種ポリペプチドに連結されている(i)又は(ii)の配列からなる、敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態に対する活性を有するTREM-1ポリペプチドを提供する。例えば、未変性のTREM-1蛋白質配列が[配列番号：1]として同定されたヒト配列であるようなポリペプチドにおいて、CDR2及びCDR3配列は、各々、RPSKNS及びQPPKEである。このようなポリペプチドにおいて、CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸は、QPP、PPK、PKE、RPS、PSK、SKN、又はKNSである。このようなポリペプチドは、配列QPPK、QPPKE、又はRPSKNSを含んでもよい。例えば、未変性のTREM-1蛋白質配列が[配列番号：2]として同定されたマウス配列であるようなポリペプチドにおいて、CDR2及びCDR3配列は、各々、RPFTRP及びHPPNDである。このようなポリペプチドにおいて、CDR2又はCDR3配列由来の少なくとも3個のアミノ酸は、HPP、PPN、PND、RPF、PFT、FTR、又はTRPである。このようなポリペプチドは、配列HPP、HPPN、HPPND、又はRPFTRPを含んでも良い。

【0020】

ある実施態様において、本発明のポリペプチドは、Gibotらの論文（J. Exp. Med., 200, 1419-1426 (2004)）に明らかにされた配列番号7であるか又はこれを含む。

ある実施態様において、本発明のポリペプチドは、配列番号7でないか又はこれを含ま

ない。

ある実施態様において、本発明のポリペプチドは、配列番号：3、4、及び6から選択された配列であるか又はこれを含む。

ある実施態様において、本発明のポリペプチドは、配列番号：16、17、18、及び19から選択された配列であるか又はこれを含む。

ある実施態様において、本発明のポリペプチドは、CDR2由来の配列を含む。

ある実施態様において、本発明のポリペプチドは、CDR3由来の配列を含む。

【0021】

本発明のポリペプチド又はペプチドは、療法、特に敗血症、敗血症ショック及び敗血症-様状態の治療における使用のために、並びに敗血症、敗血症ショック及び敗血症-様状態の治療のための医薬品の製造における使用のために提供される。更に、本発明のポリペプチド又はペプチドを含有する組成物及び医薬組成物、並びに本発明のポリペプチド又はペプチドを使用する敗血症、敗血症ショック及び敗血症-様状態の治療法が提供される。加えて、本発明のポリペプチド又はペプチドは、敗血症、敗血症ショック及び敗血症-様状態における血行動態パラメータを回復するための療法において使用するために、並びに敗血症、敗血症ショック及び敗血症-様状態における異常な血行動態パラメータの治療のための医薬品製造において使用するために提供される。

【0022】

用語「骨髄細胞に発現する誘発性受容体」又は「TREM」は、マスト細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞（DC）、及び好中球などの様々な種類の骨髄細胞上で選択的に発現され、並びに免疫応答及び炎症反応において支配的な役割を有することがある、活性化する受容体の群を意味する。TREMは主に、細胞外ドメインにおいてIg-型フォールドを伴う膜貫通糖蛋白質であり、従ってIg-SFに属する。これらの受容体は、短い細胞内ドメインを含むが、しかしシグナル伝達メディエーターのドッキングモチーフを欠いており、細胞活性化のためにアダプター蛋白質、例えばDAP12を必要とする。

本願明細書において使用される用語「骨髄細胞」は、顆粒球（好中球、好酸球、及び好塩基球）、単球、マクロファージ、及びマスト細胞を含む一連の骨髄-由来の細胞系統を意味する。更に骨髄起源の末梢血樹状細胞、並びに適当な培養条件下in vitroにおいて単球由来の樹状細胞及びマクロファージも含まれる。

【0023】

本願明細書において定義された用語「敗血症、敗血症ショック」又は「敗血症又は敗血症ショック」は、全身性炎症反応症候群（SIRS）の亜群を意味する。用語「敗血症」は一般に、感染症が疑わしい場合又は証明される場合のSIRSに限定される。生理学的変量のパターンは、外傷、火傷、肺炎及び感染症を含む幅のある傷害に対する反応における重大な疾患の患者において示される。これらは、炎症反応、白血球増加症又は重度の白血球減少症、高体温又は低体温、頻脈及び頻呼吸を含み、並びに集合的に全身性炎症反応症候群（SIRS）と称される。この定義は、感染症の存在とは無関係のこれらの状態における炎症プロセスの重要性を強調している。更に敗血症は、臓器の低灌流の証拠が存在する場合に重度の敗血症に階層化され、低酸素血症、尿量過少症、乳酸アシドーシス、又は変更された脳機能などの、臓器機能不全の徴候により明らかにされる。「敗血症ショック」とは、通常ヒトにおいて適切な輸液蘇生法にも関わらず収縮期血圧が90mmHg未満と定義される低血圧が合併した重度の敗血症である。敗血症及びSIRSは、不調な臓器灌流及び酸素療法のために、2種又はそれよりも多い臓器の機能不全が合併することがあり、これは多臓器不全（MOF）と称される。肺炎及び火傷のような重度の炎症状態において、感染症の全身作用に加え、全身性炎症反応が生じることがある。外傷性傷害に続く炎症反応の徴候の出現は、余り良く定義されていない。集中治療室においては、グラム陰性菌が敗血症症例の50～60%に関与し、グラム陽性菌が症例の更に35～40%を占める。残りの症例は、余り一般的でない真菌、ウイルス及び原虫が原因である。

【0024】

本願明細書において使用される用語「敗血症-様状態」は、患者が、敗血症又は敗血症

10

20

30

40

50

ショックに類似した症状を示すが、感染性物質が敗血症の症例において認められるのと同様の炎症メディエーターのカスケード及び／又は血行動態パラメータの変化の主要又は最初の原因ではないような状態を意味し、例えば急性又は慢性肝不全患者（Wasmuth HEらの論文、J. Hepatol.、2005年2月；42（2）：195-201参照）、心停止後の救急蘇生後の疾患症例（Adrie Cらの論文、Curr. Opin. Crit. Care.、2004年6月；10（3）：208-12参照）、癌化学療法後の敗血症-様症状の治療（Tsuji Eらの論文、Int J Cancer.、2003年11月；107（2）：303-8参照）、組換えTNF- α による高体温の孤立された四肢（isolated limb）の灌流もしくは同様の治療を受けている患者（Zwaveling JHらの論文、Crit Care Med.、1996年5月；24（5）：765-70参照）、又は新生児の敗血症-様疾患（Griffin MPらの論文、Pediatr Res.、2003年6月；53（6）：920-6参照）がある。

10

【0025】

本願明細書において使用される用語「敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態に対する活性」は、分子、例えばペプチド、ポリペプチド又は操作された抗体の、敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態を治療する能力、もしくは例えばTREM-1受容体の活性のアンタゴニストとして作用することにより、敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の実験モデルにおいて、活性があることを意味する。

典型的には本発明のポリペプチドの適応は、敗血症又は敗血症ショックである。

【0026】

用語「実質的配列同一性」は、ペプチド/アミノ酸配列と組合せて使用される場合は、配列が実質的に同一又は類似し、コンホメーションの相同性を生じ、その結果生物学的活性が類似しているペプチド/アミノ酸配列を意味する。この用語は、それらの配列の共通の進化を意味することは意図されない。

20

典型的には、「実質的配列同一性」を有するペプチド/アミノ酸配列は、少なくとも所望の活性に関与していることがわかっている領域にわたり、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも80%配列が同一である配列である。最も好ましくは、末端でない、5個を超えない残基が異なる。好ましくは少なくとも前述の領域における配列の多様性は、「保存的修飾」の形である。

【0027】

ふたつのペプチド/アミノ酸配列の又はふたつの核酸配列の%配列同一性を決定するために、これらの配列は、最適な比較目的のために並置される（例えば、最適なアラインメントのために、第一又は第二のアミノ酸又は核酸配列の一方又は両方にギャップが導入され、並びに非相同配列は、比較のためには無視することができる。）。例えば、比較のために並置された参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、更により好ましくは少なくとも60%、及びより更に好ましくは少なくとも70%、80%、又は90%である（例えば、第二の配列を、例えば100個のアミノ酸残基を有する第一のアミノ酸配列と並置する場合、少なくとも30個、好ましくは少なくとも40個、より好ましくは少なくとも50個、更により好ましくは少なくとも60個、及びより更に好ましくは少なくとも70、80又は90個のアミノ酸残基が並置される。）。次に、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置でのアミノ酸残基又はヌクレオチドが比較される。第一の配列の位置が、第二の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドで占拠される場合、これらの分子は、その位置で同一である（本願明細書において使用されるアミノ酸又は核酸「同一性」は、アミノ酸又は核酸「相同性」と同等である。）。ふたつの配列間の%同一性は、ふたつの配列の最適なアラインメントを導入するために必要である、ギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮した、これらの配列により共有される同一の位置の数の関数である。ふたつの配列間の配列の比較及び%同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて実現することができる。ひとつの実施態様において、ふたつのアミノ酸配列間の%同一性は、Blossom 62行列又はPAM250行列のいずれか、並びにギャップ重み16、14、12、10、8、6、又は4、及び長さ重み1、2、3、4、5、又は6で用い、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラム（<http://www.gcg.com>で入手可能）に組込まれたNeedleman及びWunsch（J. Mol. Biol.、（48）：444-453（1970）

30

40

50

）アルゴリズムを用い、決定される。別の実施態様において、ふたつのヌクレオチド配列間の%同一性は、NWSgapdna.CMP行列及びギャップ重み40、50、60、70、又は80、及び長さ重み1、2、3、4、5、又は6を用いる、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラム（<http://www.gcg.com>で入手可能）を用いて決定される。別の実施態様において、ふたつのアミノ酸又はヌクレオチド配列間の%同一性は、PAM120重み残基テーブル（weight residue table）、ギャップ長ペナルティ12、及びギャップペナルティ4を使用する、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組込まれている、E. Meyers及びW. Miller（CABIOS, 4: 11-17（1989））のアルゴリズムを用いて決定される。本発明の核酸及び蛋白質配列は更に、例えば、他のファミリーメンバーの配列又は関連配列を同定するために、公のデータベースに対し検索を行う「クエリー配列」として使用することができる。このような検索は、Altschulらの論文（J. Mol. Biol., 215: 403-10（1990））のNBLAST及びXBLASTプログラム（バージョン2.0）を用い、実行することができる。BLASTヌクレオチド検索は、本発明のNIP2b、NIP2cL、及びNIP2cS核酸分子と相同であるヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラムを用い、スコア=100、ワードレングス=12で実行することができる。BLAST蛋白質検索は、本発明のNIP2b、NIP2cL、及びNIP2cS蛋白質分子と相同であるアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラムを用い、スコア=50、ワードレングス=3で実行することができる。比較目的でギャップ付きアラインメントを得るために、Gapped BLASTを、Altschulらの論文（Nucleic Acids Res., 25（17）: 3389-3402（1997））に記されたように利用することができる。BLAST及びGapped BLASTプログラムを利用する場合、各プログラム（例えば、XBLAST及びNBLAST）のデフォルトのパラメータを使用することができる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照。

【0028】

用語「蛋白質」及び「ポリペプチド」は、本願明細書において互換的に使用される。用語「ペプチド」は、ペプチド（-NHCO-）結合により連結された連続的なアミノ酸を伴う、2個又はそれよりも多いアミノ酸又はアミノ酸アナログ（非天然のアミノ酸を含む）の鎖を意味するように本願明細書において使用される。従って本発明のペプチドは、オリゴペプチド、ポリペプチド、蛋白質、ミメトープ及びペプチド擬態を含む。ミメトープ及びペプチド擬態を調製する方法は、当該技術分野において公知である。

【0029】

用語「ミメトープ」及び「ペプチド擬態」は、本願明細書において互換的に使用される。化合物Xの「ミメトープ」は、Xの機能活性に必要なXの化学構造が、Xのコンホメーションを模倣している別の化学構造により交換されているような化合物を意味する。ペプチド擬態の例は、そのペプチド骨格が1個以上のベンゾジアゼピン分子により置換されているペプチド化合物（例えば、James, G.L.らの論文、Science, 260: 1937-1942（1993）参照）及び「retro-inverso」ペプチド（Sistoの米国特許第4,522,752号参照）を含む。用語「ミメトープ」及び「ペプチド擬態」は、ペプチドの機能を有意な程度有害に妨害することのないペプチド-含有化合物の特定のアミノ酸との置換としてコンホメーション的及び機能的に利用される天然のアミノ酸以外の部分も意味する。アミノ酸擬態の例は、D-アミノ酸を含む。1個以上のD-アミノ酸で置換されたペプチドは、周知のペプチド合成法を用い作成することができる。追加の置換は、官能基を伴う変種側鎖を有するアミノ酸アナログを含み、例えば、b-シアノアラニン、カナバニン、ジェンコール酸、ノルロイシン、3-ホスホセリン、ホモセリン、ジヒドロキシフェニルアラニン、5-ヒドロキシトリプトファン、1-メチルヒスチジン、又は3-メチルヒスチジンがある。

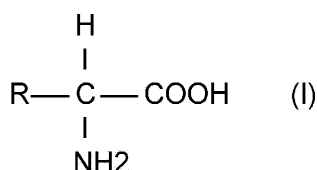
【0030】

本願明細書において使用される化合物Xの「アナログ」は、Xの機能活性に必要なXの化学構造を保持するが、依然Xとは異なるある種の化学構造を含むような化合物を意味する。天然のペプチドアナログの例は、1種以上の非-天然のアミノ酸を含むペプチドである。用語「アナログ」も、修飾されたミメトープ及び／又はペプチド擬態、修飾されたペプチド及びポリペプチド、並びにペプチド及びポリペプチドのアレル変種を含むことが意図されている。従ってペプチドのアナログは、当初のペプチドと、実質的にホモログであるか

、別の表現をすると実質的配列同一性を有するような、ペプチドアナログを生じるであろう。用語「アミノ酸」は、その技術分野において認められた意味を含み、広範には式Iの化合物を包含している：

【0031】

【化1】



10

【0032】

好ましいアミノ酸は、天然のアミノ酸に加え、合成誘導体、及び蛋白質、例えば、カゼインのような蛋白質由来のアミノ酸、すなわちカザアミノ酸、又は例えば、酵母、動物製品の酵素的もしくは化学的消化物、例えばミートダイジェスト、又は植物製品の、例えばダイズ蛋白質、綿実蛋白質、もしくはトウモロコシステイープリカーなどの消化物を含む（例えば、Traders' Guide to Fermentation Media, Traders Protein, Memphis, TN (1988), Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Sinauer Associates, Sunderland, MA (1989)、及びProduct Data Sheet for Corn Steep Liquor, Grain Processing Corp., I0を参照のこと。）。

【0033】

用語「天然のアミノ酸」は、生体システムのほとんどのポリペプチドを通常構成する、20種のアミノ酸残基、線維性蛋白質で認められる稀なアミノ酸（例えば、4-ヒドロキシプロリン、5-ヒドロキシリシン、-N-メチルリシン、3-メチルヒスチジン、デスモシン、イソデスモシン）、並びに蛋白質において認められない天然のアミノ酸（例えば、-アラニン、-アミノ酪酸、ホモシステイン、ホモセリン、シトルリン、オルニチン、カナバニン、ジェンコール酸、及び-シアノアラニン）のいずれかを含む。

20

【0034】

用語「天然のアミノ酸の側鎖」は、式IにおいてRで表されるような、天然のアミノ酸の側鎖を含むことが意図される。当業者は、式Iの構造は、側鎖が環式又はヘテロ環式構造であるプロリンのようなアミノ酸を包含する（すなわち、プロリンにおいて、R基及びアミノ基は、5員ヘテロ環式環を形成する。）ことが意図されていることを理解するであろう。同様に前記式Iの化合物は、式Iにおいて、例えばR₃及びR₄はヘテロ環式環を形成するプロリンのようなアミノ酸を包含することが意図されている。

30

本願明細書において使用される用語「ホモログ」は、抗原性/免疫原性及び炎症調節活性を含む、共通の生物学的活性、及び／又は構造ドメインを有する、並びに本願明細書において定義された十分なアミノ酸を有する、多くの一連のペプチド又はポリペプチドを意味する。このようなホモログは、同じ又は異なる動物種のいずれかに由来することができ

【0035】

本願明細書において使用される用語「変種」は、所定のペプチドの天然のアレル変異、又は1種もしくは複数種のアミノ酸残基が、アミノ酸の置換、付加、もしくは欠失により修飾されているような所定のペプチドもしくは蛋白質の組換えにより調製された変異のいずれかを意味する。

40

本願明細書において使用される用語「誘導体」は、別の方法で修飾された、すなわち非-天然のアミノ酸を含むペプチド又は蛋白質への、好ましくは生体活性を有する、いずれかの種類の分子の共有結合による、所定のペプチド又は蛋白質の変異を意味する。

好ましくは、このようなホモログ、変種、及び誘導体は、例えばTREM-1受容体の活性のアンタゴニストとして作用することにより、敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態を治療するか、もしくは、敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の実験モデルにおいて活性があることが可能である。

50

【0036】

「単離された」又は「精製された」ペプチド又は蛋白質は、実質的に細胞性物質を又はその蛋白質が由来した細胞もしくは組織給源由来の他の夾雑蛋白質を含まないか、又は化学的に合成された場合は化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。

語句「細胞物質を実質的に含まない」は、ポリペプチド/蛋白質が、そこから単離された又は組換えにより作出された細胞の細胞成分から分離されているポリペプチド/蛋白質の調製物を含む。従って細胞物質を実質的に含まないポリペプチド/蛋白質は、夾雑蛋白質を約30%、20%、10%、5%、2.5%、又は1%（乾量について）未満有するポリペプチド/蛋白質の調製物を含む。ポリペプチド/蛋白質が組換えにより作出される場合は、同じく培養培地を実質的に含まないことが好ましく、すなわち培養培地は、蛋白質調製物容量の約20%、10%、又は5%未満である。ポリペプチド/蛋白質が化学合成により生成される場合は、化学前駆体又は他の化学物質を実質的に含まないことが好ましく、すなわち、その蛋白質の合成に関連する化学前駆体又は他の化学物質から分離されている。従って、ポリペプチド/蛋白質のそのような調製物は、関心のあるポリペプチド/蛋白質断片以外の化学前駆体又は化学物質を約30%、20%、10%、5%（乾量について）未満有する。好ましい本発明の実施態様において、ポリペプチド/蛋白質は、単離又は精製されている。

【0037】

前述のポリペプチドに加え、本発明のポリペプチドは、共通の生物学的活性及び／又は構造ドメインを有し、並びにここに定義されたような十分なアミノ酸同一性（ホモログ）を有するポリペプチドを包含している。これらのホモログは、同じ又は異なるいずれかの動物種、好ましくは哺乳類、より好ましくはマウス及びラットなどの齧歯類、及び最も好ましくはヒトに由来することができる。好ましくは、これらは、TREM-1の少なくとも1種の構造的及び／又は機能的特徴を示し、好ましくは例えば、TREM-1受容体活性のアンタゴニストとして作用することにより、敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態を治療することが可能である。このような修飾は、アミノ酸の置換、欠失、及び／又は挿入を含む。アミノ酸修飾は、当該技術分野においていずれか公知の方法により行うことができ、及び様々な方法が利用可能でありかつ当業者には慣習的なものである。

【0038】

加えて、アミノ酸置換の作成において、一般に置換されるアミノ酸残基は、保存的アミノ酸置換（すなわち、「保存的に置換される」）であることができ、例えば、極性残基は、極性残基と、親水性残基は親水性残基と、疎水性残基は疎水性残基と、正帯電した残基は正帯電した残基と、又は負帯電した残基は負帯電した残基と置換される。更に一般に、修飾されるアミノ酸残基は、種を超えて高度にもしくは完全には保存されず、並びに／又はそれが由来したペプチド及び／もしくは蛋白質の生物学的活性を維持するために重要である。

【0039】

本発明のペプチドは、簡便な方法で直接合成され得る。一般に存在する反応基（例えば、アミノ、チオール及び／又はカルボキシル）は、全体の合成時には保護されるであろう。本発明のペプチドのある割合、すなわち含まれたアミノ酸が遺伝的にコードされたアミノ酸であるものは、当業者に周知の発現システムにより原核宿主及び真核宿主において発現されることが可能であろう。例えば微生物により発現されたペプチドの単離及び精製の方法も、周知である。本発明のこれらのペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、本発明の更なる態様を構成する。本願明細書において使用される「ポリヌクレオチド」は、個別の断片の形の、又は例えばプラスミドなどの発現ベクターのようなより大きい構築物の成分としての、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドのポリマーを意味する。本発明のポリヌクレオチド配列は、DNA、RNA及びcDNA配列を含む。遺伝暗号の縮重のために、当然1種よりも多いポリヌクレオチドが、本発明の特定のペプチドをコードすることが可能である。細菌宿主がペプチド発現のために選択される場合、宿主を発現された抗-菌性ペプチドから保護する工程が必要である。このような技術は、当該技術分野において公知であり、及び発現される特定のペプチドに抵抗性である細菌株の使用又は本発明

のペプチドの抗生物質活性を無効にする一方又は両方の末端での切片 (sections) との融合ペプチドの発現を含む。後者の場合、ペプチドは、収集後に切断され、活性ペプチドを作成することができる。ペプチドが化学修飾を取込むならば、その後発現されたペプチドの活性/安定性は低く、合成後化学修飾によって変化されるのみである。

【0040】

更に本発明は、本発明のポリペプチドの誘導体も包含している。例えば、限定するものではないが、誘導体は、例えばグリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、蛋白質分解性切断、細胞リガンドもしくは他の蛋白質への連結などにより、修飾されたペプチド又は蛋白質を含んでよい。多くの化学修飾のいずれかを含むが、これらに限定されるものではない、特異的切断、アセチル化、ホルミル化などの公知の技法により行ってもよい。加えて誘導体は、1種以上の非-古典的アミノ酸を含んでもよい。当業者は、効力を増大、活性を持続及び／又は半減期を延長するために、ペプチドを修飾する様々な方法を知っているであろう。ひとつの例において (国際公開公報第0210195号)、修飾は、ペプチドのN-末端、ペプチドのC-末端、又はペプチド鎖に沿った遊離アミノ基もしくはカルボキシル基のいずれかでの、少なくとも1種のコンホメーション上剛性な置換基とのアミド結合によるカップリングを介して行われる。同様の作用を有するペプチド修飾の他の例は、例えば、国際公開公報第2004029081号、第03086444号、第03049684号、第0145746号、第0103723号及び第9101743号に説明されている。

【0041】

本発明は更に、本発明のペプチドもしくはポリペプチドを含む抗体、又は本発明のペプチドもしくはポリペプチドの活性を模倣する抗体を提供する。このような抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fvs、及び本発明のポリペプチドに特異的に結合するV_L又はV_Hドメインのいずれか、更には相補性決定領域 (CDR) を含む断片を含むが、これらに限定されるものではない。別の実施態様において、抗体は、当該技術分野において公知である様々なファージディスプレイ法を用い作成することもできる。Fab、Fab'及びF(ab')₂断片を組換えにより作成する技法は同じく、PCT国際公開公報第92/22324号；Mullinaxらの論文、Biotechniques、12 (6) : 864-869 (1992)；及び、Sawaiらの論文、AJRI、34 : 26-34 (1995)；及び、Betterらの論文、Science、240 : 1041-1043 (1988) (これらは各々全体が本願明細書に参照として組入れられている。) に明らかにされた方法のような、当該技術分野において公知の方法を用い、利用することができる。単鎖Fvs及び抗体を作成するために使用することができる技法の例は、米国特許第4,946,778号及び第5,258,498号；Hustonらの論文、Methods in Enzymology、203 : 46-88 (1991)；Shuらの論文、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90 : 7995-7999 (1993)；及び、Skerraらの論文、Science、240 : 1038-1040 (1988) に明らかにされている。ヒトにおける抗体のin vivo使用及びin vitro検出アッセイを含むいくつかの用途のために、キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体を使用することが好ましい。キメラ抗体は、マウスのモノクローナル抗体由来の可変領域及びヒト免疫グロブリン由来の定常領域を有する抗体のような、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。キメラ抗体の作出法は、当該技術分野において公知である。例えば、Morrison、Science、229 : 1202 (1985)；Oiらの論文、Biotechniques、4 : 214 (1986)；Gilliesらの論文、J. Immunol. Methods、125 : 191-202 (1989)；米国特許第5,807,715号；第4,816,567号；及び、第4,816,397号を参照し；これらは全体が本願明細書に参照として組入れられている。ヒト化抗体は、非-ヒト種由来の1個以上の相補性決定領域 (CDR) 及びヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域、又は本発明の場合はTREM-1蛋白質由来の1個以上のCDRを有する、所望の抗原に結合する非-ヒト種由来の抗体分子である。当該技術分野において公知であるように、ヒトフレームワーク領域内のフレームワーク残基は、CDRドナー抗体由来の対応する残基により置換することができ、抗原結合を変更、好ましくは改善する。これらのフレームワーク置換は、当該技術分野において周知の方法、例えばCDR及び

フレームワーク残基の相互作用のモデリングにより同定され、抗原結合、及び配列比較に重要なフレームワーク残基を同定し、特定位置での普通でないフレームワーク残基を同定する。例えば、Queenらの米国特許第5,585,089号；Riechmannらの論文、Nature、332：323（1988）を参照し、これらは全体が本願明細書に参照として組入れられている。抗体は、例えば、CDR-移植片（grafting）（欧州特許第EP239,400号；PCT国際公開公報第91/09967号；米国特許第5,225,539号；第5,530,101号及び第5,585,089号）、薄板化（veneering）又は再表面作成（resurfacing）（欧州特許第EP 592,106号；第EP 519,596号；Padlanの論文、Molecular Immunology、28（4/5）：489-498（1991）；Studnickaらの論文、Protein Engineering、7（6）：805-814（1994）；Roguskaらの論文、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91：969-973（1994）、並びに鎖シャッフリング（米国特許第5,565,332号）を含む、当該技術分野において公知の様々な技法を使用し、ヒト化することができ、これらはその全体が本願明細書に参照として組入れられている。

【0042】

完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置にとって特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来した抗体ライブラリーを用い、先に説明されたファージディスプレイ法を含む、当該技術分野において公知の様々な方法により作成することができる。米国特許第4,444,887号及び第4,716,111号；及び、PCT国際公開公報第98/46645号；第98/50433号；第98/24893号；第98/16654号；第96/34096号；第96/33735号；及び、第91/10741号を参照し、これらはその全体が本願明細書に参照として組入れられている。ヒト抗体は、トランスジェニックマウスを用い作出することもできる（Lonberg及びHuszar、Int. Rev. Immunol.、13：65-93（1995）参照）。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体を作出する技術及びそのような抗体を作出するプロトコルに関する詳細な考察については、例えばPCT国際公開公報第98/24893号；第92/01047号；第96/34096号；第96/33735号；欧州特許第EP0 598 877号；米国特許第5,413,923号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,569,825号；第5,661,016号；第5,545,806号；第5,814,318号；第5,885,793号；第5,916,771号；及び、第5,939,598号を参照し；これらは全体が本願明細書に参照として組入れられている。加えて、Abgenix社（フリーモント、CA）、Medarex社（NJ）及びGenpharm社（サンディエゴ、CA）などの会社は、先に説明された技術に類似した技術を用い、選択された抗原に対するヒト抗体を提供することを保証している。選択されたエピトープを認識する完全なヒト抗体は、「ガイド付き選択」と称される技法を用い作成される。この方法において、選択された非-ヒトモノクローナル抗体、例えばマウス抗体は、同じエピトープを認識する完全なヒト抗体の選択のガイドとして使用される（Jespersらの論文、Bio/technology、12：899-903（1988））。異種ポリペプチドに融合又は複合された抗体は、当該技術分野において周知の、in vitroイムノアッセイ及び精製法（例えばアフィニティークロマトグラフィー）において使用されてもよい。例えば、PCT国際公開公報第93/21232号；欧州特許第EP 439,095号；Naramuraらの論文、Immunol. Lett.、39：91-99（1994）；米国特許第5,474,981号；Gilliesらの論文、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89：1428-1432（1992）；及び、Fellらの論文、J. Immunol.、146：2446-2452（1991）を参照し、これらは本願明細書に参照として組入れられている。

【0043】

別の態様において、本発明は、本発明のポリペプチドに結合又はその活性を変化する化合物又はリガンドを同定する方法を提供する。このような方法は、被験化合物の存在又は非存在下におけるポリペプチドの生物学的活性を測定すること、ポリペプチドの生物学的活性を変更（増加又は減少）する被験化合物を同定することを含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0044】

ひとつの実施態様において、本発明は、生体活性分子及び本発明のポリペプチド又はそれらの断片の1種以上のドメインを含む融合蛋白質を提供する。特に本発明は、本発明のポリペプチド又はそれらの断片の1種以上のドメインへ、組換えにより融合された又は化学的に複合された（共有的及び非-共有的複合の両方を含む）生体活性分子を含む融合蛋

白質を提供する。

本発明は更に、融合蛋白質を作成するために、本発明のポリペプチド又はそれらの断片が、異種ポリペプチド（すなわち、無関係のポリペプチド又はそれらの一部、好ましくはポリペプチドの少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90又は少なくとも100個のアミノ酸）へ、組換えにより融合された又は化学的に複合された（共有的及び非-共有的の両方を含む）、融合蛋白質を包含している。この融合は、必ずしも直接である必要はなく、リンカー配列を介して生じることができる。

【0045】

ひとつの例において、融合蛋白質は、本発明のポリペプチド又はそれらの断片が様々な種類の免疫グロブリンに由来した配列に融合されている。例えば、本発明のポリペプチドは、ヒトIgG1又はIgM分子の定常領域（例えば、ヒンジ、CH2、及びCH3ドメイン）に融合され（例えばHudson及びSouriauso、Nature Medicine、9（1）：129-134（2003）に説明されたように）、その結果in vivoにおいてより可溶性及び安定性の融合ポリペプチド又はそれらの断片を作成する。抗体断片の短い半減期は、「PEG化」、すなわちポリエチレングリコールへの融合によっても延長することができる（Leong、S.R.らの論文、Cytokine、16：106-119（2001）参照）。このような融合の一例において、国際公開公報第0183525号に開示されたように、Fcドメインは、生物学的活性ペプチドに融合される。医薬として活性のある化合物は、Fcドメインの、選択されたペプチドの少なくとも1個のアミノ酸への共有結合により作成される。ビヒクルへの結合は、そうでなければin vivoにおいて迅速に分解されるペプチドの半減期を増大する。

【0046】

あるいは、非-古典的代替蛋白質スカフォールド（例えば、Nygren及びSkerra、J Immunol Methods、290（1-2）：3-28（2004）又は国際公開公報第03049684号参照）を用い、例えば、TREM-1 CDR2又はCDR3由来のペプチド配列を蛋白質フレームワークへ挿入し、固定された空間的配置において、CDR2又はCDR3と構造的/機能的類似性を有するコンホメーション上変動可能なループを支えることにより、本発明のペプチドを取込み、及びその特性を複製することができる。

このような融合蛋白質又はスカフォールドベースの蛋白質は、本発明のポリペプチド又はそれらの断片を認識する特異的抗体の作成のための免疫原として使用することができる。別の好ましい実施態様において、リガンドとその受容体の間のin vivoにおける相互作用を阻害するために、このような融合蛋白質又はスカフォールドベースの蛋白質を対象へ投与することができる。このような相互作用の阻害は、敗血症及び敗血症ショックに関連したある種の細胞反応をブロック又は抑制するであろう。

【0047】

ひとつの態様において、融合蛋白質は、そのN-末端で異種シグナル配列に融合された本発明のポリペプチドを含む。様々なシグナル配列が市販されている。例えば、メリチン及びヒト胎盤アルカリホスファターゼ（Stratagene社；ラホヤ、CA）の分泌配列は、真核細胞異種シグナル配列として利用できる。原核細胞異種シグナル配列の例としての、phoA分泌シグナル（Sambrookらの著書、前掲；及び、Current Protocols in Molecular Biology、1992、Ausubelら編集、John Wiley & Sons社）及び蛋白質A分泌シグナル（Pharmacia Biotech社；ピスカタウェイ、NJ）を挙げることができる。別の例は、バキュロウイルスエンベロープ蛋白質のgp67分泌配列である（Current Protocols in Molecular Biology、1992、Ausubelら編集、John Wiley & Sons社）。

【0048】

別の実施態様において、本発明のポリペプチドは、その多くは市販されているタグ配列、中でも、例えばpQEベクター（QIAGEN社、9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311）において提供されたタグのような、ヘキサ-ヒスチジンペプチドに融合することができる。Gentzらの論文（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86：821-824（1989））に説明されるように、例えばヘキサ-ヒスチジンは、融合蛋白質の簡便な精製を提供する。ペプチドタグ

の別の例は、インフルエンザヘマグルチニン蛋白質に由来するエピトープに対応するヘマグルチニン「HA」タグ (Wilsonらの論文、Cell、37:767 (1984))、及び「フラッグ」タグ (Knappikらの論文、Biotechniques、17 (4):754-761 (1994)) がある。これらのタグは、組換えにより生成された本発明のポリペプチドの精製に特に有用である。

【0049】

融合蛋白質は、標準の組換えDNA技法又は蛋白質合成技法、例えばペプチド合成装置の使用により作成することができる。例えば融合蛋白質をコードしている核酸分子は、自動DNA合成装置を含む、従来の技法により合成することができる。あるいは、遺伝子断片のPCR増幅は、ふたつの連続した遺伝子断片の間に相補的に突出したアンカープライマーを用い実行し、これは引き続きアニーリング及び再増幅し、キメラ遺伝子配列を作成することができる (例えば、Current Protocols in Molecular Biology、1992、Ausubelら編集、John Wiley & Sons社参照)。融合蛋白質をコードしているヌクレオチド配列は、適当な発現ベクター、すなわち、挿入された蛋白質のコード配列を転写及び翻訳するために必要なエレメントを含むベクターへ挿入することができる。様々な宿主-ベクターシステム及び選択システムが知られている。具体的実施態様において、融合蛋白質の発現は、構成性プロモーターにより調節される。別の実施態様において、融合蛋白質の発現は、誘導性プロモーターにより調節される。これらの実施態様に従い、プロモーターは、組織-特異的プロモーターであることができる。融合蛋白質をコードしている遺伝子の挿入断片を含む発現ベクターは、以下の3種の一般的方法により同定することができる: (a) 核酸ハイブリダイゼーション、(b) 「マーカー」遺伝子機能の存在又は非存在、及び (c) 挿入された配列の発現。第一の方法において、発現ベクター中の融合蛋白質をコードしている遺伝子の存在は、融合蛋白質をコードしている挿入された遺伝子に対しホモログである配列を含むプローブを使用する核酸ハイブリダイゼーションにより検出することができる。第二の方法において、組換えベクター/宿主システムは、ベクター内の融合蛋白質をコードしているヌクレオチド配列の挿入により引き起こされる、ある種の「マーカー」遺伝子機能 (例えば、チミジンキナーゼ活性、抗生物質耐性、形質転換表現型、バキュロウイルスにおける封入体形成など) の存在又は非存在を基に、同定及び選択することができる。例えば、融合蛋白質をコードしているヌクレオチド配列が、ベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入される場合、融合蛋白質挿入断片をコードしている遺伝子を含む組換え体は、マーカー遺伝子機能の非存在により同定することができる。第三の方法において、組換え発現ベクターは、組換えにより発現された遺伝子産物 (すなわち、融合蛋白質) をアッセイすることにより同定することができる。このようなアッセイは、例えばin vitroアッセイシステムにおける融合蛋白質の生理的又は機能的特性、例えば、抗-融合蛋白質抗体への結合などを基にすることができる。組換え蛋白質の長期にわたる高収率の生成のためには、安定した発現が好ましい。例えば、融合蛋白質を安定して発現する細胞株を、操作することができる。宿主細胞は、ウイルスの複製起点を含む発現ベクターの使用よりもむしろ、適当な発現制御エレメント (例えば、プロモーター、エンハンサー配列、転写終結因子、ポリアダニル化部位など)、並びに選択マーカーにより制御されたDNAで形質転換することができる。外来DNAの導入後、操作された細胞は、強化培地において1~2日間増殖され、その後選択培地と交換される。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択に対する抵抗性をもたらし、細胞にプラスミドをそれらの染色体に安定して組込ませ、細胞増殖巣を形成するまで増殖させ、次に細胞株へクローニングし及び増殖することができる。この方法は有利なことに、異なるように発現された蛋白質又は経路遺伝子蛋白質を発現する細胞株を操作するために使用することができる。このように操作された細胞株は、異なるように発現される蛋白質又は経路遺伝子蛋白質の内因性活性に影響を及ぼす化合物のスクリーニング及び評価において特に有用であることができる。一旦本発明の融合蛋白質が組換え発現により作成されたならば、例えばクロマトグラフィー (例えばイオン交換クロマトグラフィー、特に特異的抗体に対するアフィニティーによる、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除カラムクロマトグラフィー)、遠心分離、示差的溶解度、又はいずれか他の蛋白質精製の標準技法などの、蛋白質の精製のための当該技術分野において公知の方

法のいずれかにより精製することができる。

【0050】

本発明は同じく、本発明のペプチド又はポリペプチドを投与することにより、敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態に罹患した対象を治療する方法も提供する。別の実施態様において、このモジュレーターは、本発明のポリペプチドの活性を模倣する抗体であることができる。特に本発明は、対象へ、先の請求項のいずれか1項記載のペプチド又はポリペプチドを治療有効量投与することを含む、対象において敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態を治療又は改善する方法を提供する。このような方法において、投与されるペプチド又はポリペプチドは、配列番号：3、4、6、7、16、17、18、又は19の配列と実質的配列同一性を有することができるか、配列番号：3、4、6、7、16、17、18、もしくは19であるか、又は配列番号：3、4、6、7、16、17、18、もしくは19の活性断片、アナログもしくは誘導体であるか、又は配列番号：3、4、6、7、16、17、18、もしくは19と少なくとも約80%の配列同一性を有する。

10

【0051】

ひとつの態様において、本発明は、本発明のペプチド又はポリペプチドを対象へ投与することにより、敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態を予防する方法を提供する。敗血症又は敗血症ショックのリスクのある対象は、例えば当該技術分野において公知の診断アッセイ又は予防アッセイのいずれかにより同定することができる（特に診断に適した方法については、国際公開公報第2004081233号、Gibotらの論文、Ann. Intern. Med., 141 (1) : 9-15 (2004)、及びGibotらの論文、N. Engl. J. Med., 350 (5) : 451-8 (2004) 参照）。本願明細書に説明された予防的物質は、例えば、先に考察されたような障害を発症するリスクのある対象を治療するために使用することができる。本発明の方法は、哺乳類、例えばヒト、非ヒト霊長類、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、イヌ、ネコ及び齧歯類、例えばマウス及びラットに適用可能である。一般に、本発明の方法は、ヒト対象で使用される。

20

【0052】

更に、本発明は、本発明のポリペプチド、又は本発明のポリペプチドを模倣するそれらの抗体又は断片を含有する医薬組成物を提供する。本発明のペプチド、ポリペプチド及び抗体（本願明細書において「活性化化合物」とも称される）は、投与に適した医薬組成物に混入することができる。このような組成物は典型的には、ペプチド、蛋白質、又は抗体及び医薬として許容できる担体を含む。

30

本願明細書において使用される用語「医薬として許容できる希釈剤、担体又は賦形剤」は、医薬投与に適合性のある、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張化剤及び吸収遅延剤などのいずれか及び全てを含むことが意図されている。医薬として活性のある物質のためのこのような媒体及び物質の使用は、当該技術分野において周知である。従来の媒体又は物質がこの活性化化合物と不適合である場合を除いて、組成物中のそれらの使用が企図されている。補助的活性化化合物も、この組成物に混入することができる。

【0053】

本発明は、本発明のペプチド又はポリペプチドを含有する医薬組成物を調製する方法を含む。このような組成物は更に、追加の活性物質を含有することができる。従って本発明は更に、本発明のペプチド又はポリペプチド及び1種以上の追加の活性化化合物と共に医薬として許容できる担体を製剤することによる、医薬組成物を調製する方法を含む。

40

本発明の医薬組成物は、その意図された投与経路と適合性があるように製剤される。投与経路の例は、非経口、例えば静脈内、皮内、皮下、経皮（外用）、経粘膜、動脈内、腹腔内、及び胸膜腔内、更には経口、吸入、及び経直腸投与がある。非経口、皮内、又は皮下適用のために使用される溶液又は懸濁液は、下記の成分を含むことができる：滅菌希釈剤、例えば注射用水、生理食塩水、不揮発油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又は他の合成溶媒；抗菌剤、例えばベンジルアルコール、又はメチルパラベン；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸；緩衝剤、例えば酢酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩、

50

並びに張性調節剤、例えば塩化ナトリウム又はデキストロース。pHは、塩酸又は水酸化ナトリウムのような酸又は塩基により、調節することができる。非経口調製物は、ガラス又はプラスチックで製造されたアンプル、ディスポーザブルシリンジ、又は反復投与用バイアル中に封入することができる。

【0054】

注射用途に適した医薬組成物は、滅菌水溶液（水溶性である場合）又は分散剤及び滅菌注射溶液又は分散液の用時調製のための滅菌散剤を含む。静脈内投与に関して、適当な担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF；パーシパニー、NJ）又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を含む。全ての場合において、この組成物は、無菌でなければならず、及び現存の注射器で容易に注射できる程度流動性でなければならない。これは、製造及び貯蔵の条件下で安定でなければならず、並びに細菌及び真菌のような微生物の混入作用に対して保存されなければならない。この担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの適当な混合物を含む、溶媒又は分散媒であることができる。適当な流動性を例えばレシチンのようなコーティングを使用することにより、分散剤の場合、必要な粒子サイズを維持することにより、及び界面活性剤を使用することにより、維持することができる。微生物の作用の予防は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどの様々な抗菌剤及び抗真菌剤により、実現することができる。多くの場合、組成物中に、等張化物質、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、塩化ナトリウムを含むことは好ましいであろう。注射用組成物の持続吸収は、組成物中に、吸収を遅延する物質、例えばアルミニウムモノステアレート及びゼラチンを含むことによりもたらされ得る。

【0055】

滅菌注射溶液は、活性化合物（例えば、ポリペプチド又は抗体）を必要量、単独で又は必要に応じ先に列記した成分と組合せて、適当な溶媒中に混入し、引き続き滅菌濾過することにより調製することができる。一般に分散剤は、活性化合物の、基本の分散媒及び先に列記したものから必要なその他の成分を含む滅菌溶剤への混入により調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌散剤の場合、調製に好ましい方法は、予め濾過滅菌したそれらの溶液からの、活性成分に加えいずれか追加の所望の成分の散剤を生じる、真空乾燥及び凍結乾燥である。

【0056】

経口組成物は一般に、不活性希釈剤又は食用担体を含む。これらは、ゼラチンカプセル内に封入又は錠剤に圧縮することができる。経口治療用投与を目的として、活性化合物は、賦形剤と混入することができ、及び錠剤、トローチ剤、又はカプセル剤の形で使用される。医薬として適合性のある結合剤、及び／又はアジュバント材料は、この組成物の一部として含有され得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、下記の成分、又は類似の性質の化合物を含有することができる：結合剤、例えば微晶質セルロース、トラガカントガム又はゼラチン；賦形剤、例えばデンプン又は乳糖；崩壊剤、例えばアルギン酸、Primogel、又はコーンスターチ；滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム又はSterot es；流動促進剤、例えばコロイド状二酸化ケイ素；甘味剤、例えばショ糖又はサッカリン；もしくは、矯味矯臭剤、例えばペパーミント、サリチル酸メチル、又はオレンジ風味。

【0057】

吸入投与のために、この化合物は、例えば、二酸化炭素などの気体のような、適当な噴射剤を含有した加圧された容器もしくはディスペンサー、又はネブライザーから、エアロゾルスプレーの形で送達される。

全身投与は、経粘膜又は経皮手段によっても行うことができる。経粘膜又は経皮投与に関して、浸透されるべき障壁に適した浸透剤が、製剤において使用される。このような浸透剤は、一般に当該技術分野において公知であり、例えば経粘膜投与のためには、デタージェント、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻腔内スプレー又は坐剤により実現することができる。経皮投与に関して、活性化合物は、当該技術分野にお

いて一般に公知である軟膏剤、塗り薬 (salve)、ゲル剤又はクリーム剤に製剤される。これらの化合物は、直腸送達のために、坐剤 (例えば、通常の坐薬用基剤、例えばココアバター及び他のグリセリドを伴う) 又は持続性浣腸剤の形で調製することもできる。

【0058】

ひとつの実施態様において、これらの活性化合物は、インプラント及びマイクロカプセル送達システムを含む制御された放出製剤のような、迅速な体からの排泄に対し化合物を保護する担体と共に調製される。酢酸ビニルエチレン、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸のような、生分解性で生体適合性のポリマーを、使用することができる。このような製剤を調製する方法は、当業者には明らかであろう。これらの材料は、Alza社及びNova Pharmaceuticals社から市販されてもいる。リボソーム懸濁液 (ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体による、感染細胞へ標的化されたりリボソームを含む) も、医薬として許容できる担体として使用することができる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に開示されているような、当業者に公知の方法により調製することができる。

【0059】

投与の簡便さ及び用量の均一性のために単位剤形で経口又は非経口組成物を製剤することは、特に有利である。本願明細書において使用されるような単位剤形は、治療される対象のための単一の用量として適している物理的に個別の単位を意味し; 各単位は、所望の治療的作用をもたらすように算出された予め定められた量の活性化合物を、必要な医薬担体と共に含有する。本発明の単位剤形の規格は、活性化合物の独自の特性及び達成されるべき具体的治療的作用、並びに個体の治療のための活性化合物のような配合技術に固有の制限により指示又は直接決定される。

【0060】

本願明細書に定義されたように、蛋白質又はポリペプチドの治療有効量 (すなわち、有効量) は、約0.001~30 mg/kg体重、好ましくは約0.01~25 mg/kg体重、より好ましくは約0.1~20 mg/kg体重、及び更により好ましくは約1~10 mg/kg、2~9 mg/kg、3~8 mg/kg、4~7 mg/kg、又は5~6 mg/kg体重の範囲である。

抗体に関して、好ましい用量は、0.1 mg/kg~100 mg/kg体重 (一般に、10 mg/kg~20 mg/kg) である。抗体が脳に作用する場合は、用量50 mg/kg~100 mg/kgが通常適している。一般に、部分的ヒト抗体及び完全なヒト抗体は、ヒトの体内で他の抗体よりも長い半減期を有する。従って、より低い用量及びより少ない投与回数が可能になることが多い。脂質化のような修飾を用い、抗体を安定化させ、取込み及び組織浸透 (例えば脳への) を促進することができる。抗体の脂質化の方法は、Cruikshankらの論文 (J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology, 14: 193 (1997)) に記載されている。

【0061】

この医薬組成物は、容器、パック又はディスペンサー内に、投与に関する使用説明書と共に、入れることができる。

本発明は更に、本発明の発明的ペプチドもしくはポリペプチド、又は本発明のポリペプチドを模倣するそれらの抗体もしくは断片を、好ましくは例えば敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の治療における使用説明書と共に備えたキットを提供する。

【0062】

本発明は、本発明のポリペプチドを模倣するか、又は例えば本発明のポリペプチドの活性の刺激作用もしくは阻害作用を有するモジュレーター、すなわち、候補物質又は被験化合物もしくは物質 (例えば、ペプチド、ペプチド擬態、小分子又は他の薬物) を同定 (又はスクリーニング) する方法を提供する。特に本発明は、敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態を治療するための、化合物又は組成物をスクリーニングする方法を提供し; これは、TREM-1ペプチドを提供すること; 盲腸結紮穿刺モデル (又は、本願明細書に説明されたもしくは当該技術分野において公知の他のアッセイを使用し) において動物を、TREM-1ペプチドと接触すること; 敗血症の変化が存在するかどうか決定することを含み、例

えば、生存の増加は、TREM-1ペプチドが敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の治療に有用であり得ることを示す。

本発明は更に、前述のスクリーニングアッセイにより同定された新規物質及び本願明細書に説明されたような治療のためのそれらの使用に関する。

【0063】

本願明細書に列記された、特許及び特許出願を含むが、これらに限定されるものではない全ての刊行物は、各々個々の刊行物が、完全に説明されるように本願明細書に参照として組入れられていることが具体的かつ個別に示されるように、本願明細書に参照として組入れられている。

本発明の各態様の好ましい特徴は、必要な変更を加え、互いの態様に適応される。

10

本発明は、ここで下記の限定的でない実施例を参照し、図面を基に説明される。

【実施例】

【0064】

(実施例1)：TREM-1ペプチドはマウスを敗血症ショックによる死亡から保護する

下記基準に合致するTREM-1ペプチドを合成した：i) ヒト及びマウスTREM-1の間の最高の相同性、並びにTREM-2との最低の相同性；ii) TREM-1の相補性決定領域(CDR)に広がるペプチド。公表されたTREM-1の結晶構造、及び抗体との類似点に従い、これらの残基は、おそらくコグネイトリガンド認識に関与しているであろう(Radaevらの論文、Structure (Camb)、Dec;11(12)：1527-35(2003)、及びKelkerらの論文、J. Mol. Biol., Sep 24;342(4)：1237-48(2004)) (図1参照)。1種のペプチド(P1)はCDR2領域で、3種のペプチド(P2、P4及びP5)はCDR3領域でデザインした。第四のペプチド(P3)は、V-型免疫グロブリン(Ig)-様ドメイン(Ig-V)を膜貫通ドメインに接続している首領域でデザインした。TREM-1とTREM-2の間の高い配列相同性のために、CDR1領域ではペプチドをデザインしなかった。

20

【0065】

従って下記TREM-1蛋白質ペプチドが、University of LausanneのInstitute of BiochemistryのProtein and Peptide Chemistry Facilityにおいて配列され、合成及び精製された：

P1	(CDR2 67-89)	LVVTQRPFTRPSEVHMGKFTLKH	[配列番号：3]
P2	(CDR3 114-136)	VIYHPPNDPVVLFHPVRLVVTKG	[配列番号：4]
P3	(首領域168-184)	TTTRSLPKPTAVVSSPG	[配列番号：5]
P4	(CDR3 103-123)	LQVTDGSLYRCVVIYHPPNDPV	[配列番号：6]
P5	(CDR3 103-119)	LQVTDGSLYRCVVIYHPP	[配列番号：7]
P1sc*	(P1スクランブル配列)	LTPKHGQRSTHVTKFRVFEPVML	[配列番号：8]
P5sc*	(P5スクランブル配列)	TDSRCVIGLYHPPLQVY	[配列番号：9]

30

*これは、コントロールペプチドであり、実際保護しない。

【0066】

本実施例の実験において、ペプチドは、示された溶液モル濃度を容量200 μ lで投与した。TREM-1ペプチドがマウスをLPSが誘導した内毒素血症から保護する能力を評価するために、本発明者らは、ペプチドP1、P2、P3、及びP5(300 μ M)を、致死量のリポ多糖(LPS)の1時間前に投与した(図2)。死亡率を、経時的にモニタリングし、溶剤単独の対照注射を受け取った動物と比較した。P5注射は、最大の保護をもたらし、コントロールマウスの10%と比べ、動物の90%がLPS注射後更に7日間生存した($p < 0.001$)。コントロールマウスの10%に対し、P1-処置したマウスの60%及びP2処置したマウスの50%が、内毒素血症で生存した(各々、 $p < 0.01$ 及び $p < 0.05$)。興味深いことに、P3-処置したマウスは全て、LPS注射後4日以内に死亡した。これらの結果は、推定リガンド結合部位(CDR2及びCDR3)に対応するTREM-1の細胞外部分の配列を含むペプチドは、マウスを致死性のショックから保護することができることを示している。

40

【0067】

TREM-1ペプチド治療をLPS投与後まで遅らせることができるかどうかを調べるために、

50

本発明者らは、これらのペプチドをLPS注射後4時間で注射した。P1の場合のみ、この遅延された治療は、致死量のLPSに対し有意な保護をもたらした（図3）。LPSの4時間後にP1注射したマウスの80%が、内毒素血症で生存したのに対し、LPSの1時間前に処置したマウスの60%及び溶剤単独で処置したマウスの10%が生存した（各々、 $p<0.001$ 及び $p<0.01$ ）。従って、P1は、例えば内毒素血症の発生後の注射であっても、有効である。1週間にわたり、遅れた死亡例は生じず、このことは、P1は単にLPS死亡の発生を遅延するのみではなく、持続した保護を提供することを示している。P1投与は、 $600\mu\text{M}$ 投与時に最大の保護（80%）をもたらした（ $p<0.01$ ）、及びこの保護レベルは、 $300\mu\text{M}$ で50%に下落し（ $p<0.05$ ）、更に $150\mu\text{M}$ で30%に低下し、コントロールマウスでは20%であり、このことはP1の用量依存性の作用を示している（図4）。次に本発明者らは、「CLP」モデル（盲腸結紮穿孔は広範に使用される敗血症実験モデルである。）において、P1は敗血症ショックに対し保護するかどうかを調べた。CLP後5及び24時間の時点で、2種のP1用量で処置されたマウスは、対照で処置したマウスと比べ、死亡から保護された（ $p=0.0791$ ）が、その差異には統計学的有意性はなかった。CLP後5日目に、P1注射したマウスの40%は生存したのに対し、P3ペプチドで処置したマウスでは5%であった。CLP後10日目に、これらの処置したマウスは依然生存しており、このことは、P1は単に死亡を遅延するのみではなく、持続性の保護を提供することを示している（図5）。

10

【0068】

（実施例2）：TREM-1ペプチドP1は可溶性マウスTREM-1/IgGのTREM-1リガンド陽性細胞への結合を阻害する

20

CLPにおいて試験したTREM-1由来のペプチドの中で、ペプチドP1、P2、及びP5は、保護活性を示している。可能性のある作用機序は、TREM-1由来のペプチドの、TREM-1/TREM-1リガンド相互作用を妨害する能力であろう。この疑問に対処するために、本発明者らは、競合実験をTREM-1リガンド陽性細胞：CLP処置したマウスから得たPEC（腹膜滲出細胞）について行った。

【0069】

盲腸結紮穿孔（CLP）が誘導した腹膜炎に罹患したマウスから得た腹膜滲出細胞（PEC）又は末梢血細胞を、可溶性マウスTREM-1/IgG1キメラ、又は対照IgG1とインキュベーションした後、フローサイトメトリー分析を施した。その後結合を、FITC-染色した抗-ヒトIgG1（Jackson Laboratory社、バーハーバー、USA）を用い明らかにした。細胞は、PE-複合した抗-GR1又は抗-Ly-6G（BD Bioscience社、ミラノ、イタリア）で、二重染色した。TREM-1ペプチドとの競合を、mTREM-1-IgG1の添加前に、細胞を指示された濃度のペプチドと45分間、氷上でプレ-インキュベーションすることにより行った。感度を増大するために、一部の染色は、下記のように作成した四量体化されたTREM-1/IgG1を用いても行った：各染色試料に関して、 $8\mu\text{g}$ mTREM-1/IgG1又は対照IgG1を、Alexa 488-コンジュゲートプロテインA（Molecular Probes社、ブリュッセル、ベルギー）と共に、モル比4：1で、30分間、PBS/BSAの0.5%緩衝液中、室温暗所において複合体化した。プロテインA抗体の非特異的結合部位を完全にブロックするために、この溶液に、追加のヒトIgG1（ $10\mu\text{g}$ ）を添加した。

30

【0070】

図6に示されたように、mTREM-1のCDR2領域由来のP-1ペプチド、並びにCDR3領域に広がるP2及びP5ペプチドは、TREM-1のそのリガンドとの相互作用を、用量依存的に阻害した。対照的に、膜貫通ドメインにIgG様部分を接続しているTREM-1首領域に由来するP3ペプチドは、無効であった。

40

【0071】

（実施例3）：TREM-1ペプチドP5によるマウス敗血症における炎症反応の変化に関する追加試験方法

（末梢血からの単球の調製）

末梢血試料10mLを、実験室スタッフ5名の健常志願者ドナーからEDTA-Kで採取した。RPMI（Life Technologies社、グランドアイランド、NY）中に希釈（v/v）後、Ficoll勾配（A

50

mersham Pharmacia社、ウプスラ、スウェーデン) 上、室温で30分間遠心し、PBMCを分離した。勾配の上部に回収された細胞を、洗浄し、計測した。リンパ球浮遊液を潤渇するために、次に細胞を、24-ウェル平底組織培養プレート (Corning社、コーニング、NY) に、濃度 5×10^6 /mLで播種し、2時間かけて37°Cで接着させた。得られるリンパ球浮遊液を廃棄し、接着している単球細胞を、10% FCS (Invitrogen社、セルギー、フランス) を補充した完全培地 (RPMI 1640、0.1mMピルビン酸ナトリウム、2mMペニシリン、50 μ g/mLストレプトマイシン; Life Technologies社) において、5% CO₂ 恒温培養器中で37°Cで維持した。

【0072】

(TREM-1ペプチド)

Gen-BankのヒトTREM-1配列 (寄託番号AF287008) 及びマウスTREM-1配列 (AF241219) を使用し、ペプチド「P5」 (LQVTDSGLYRCVIYHPP; [配列番号: 7]) を、C-末端がアミド化されたペプチドとして化学的に合成した (Pepscan Systems社、レーリスタッド、オランダ)。正確なペプチドを、収率99%以上で得、これは計算した質量は1962Daであるのに対し測定した質量は1961Daであり、分取精製後均質であることが、質量分析及び分析用逆相高速液体クロマトグラフィーにより確認された。P5と同じアミノ酸を含むが配列の順番が異なるペプチド「P5sc」 (TDSRCVIGLYHPPLQVY; [配列番号: 9]) を、同様に合成し、「コントロールペプチド」として利用した。

【0073】

(単球のin vitro刺激)

活性化のために、単球を、大腸菌LPS (0111: B4、1 μ g/mL、Sigma-Aldrich社、ラベルピレール、フランス) の存在下で培養した。細胞生存力を、トリパンプルー排除及び乳酸デヒドロゲナーゼ放出の測定により評価した。一部の実験において、この刺激は、TNF- α (5~100 ng/mL、R&D Systems社、リル、フランス)、IL-1 β (5~100 ng/mL、R&D Systems社)、rIFN- γ (最大100 U/mL、R&D Systems社)、rIL-10 (500 U/mL、R&D Systems社) 又はP5もしくはコントロールペプチド最大100 ng/mLを組合せて行った。単球をTREM-1により活性化するために、抗-TREM-1アゴニストモノクローナル抗体 (R&D Systems社) を下記のように添加した: 平底プレートを、1ウェルにつき抗-TREM-1 10 μ g/mLで予めコートした。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した後、単球浮遊液を、先と同じ濃度で添加した。一部の実験は、プロテアーゼインヒビター (PMSF及びプロテアーゼカクテルインヒビター; Invitrogen社) の存在下で行った。細胞-非含有上清を、TNF- α 及びIL-1 β の生成について、製造業者 (BD Biosciences社、サンディエゴ、USA) の推奨に従いELISAによりアッセイした。単球のNF-kB活性に対するP5の作用を説明するために、ELISAベースのアッセイを行った (BD Mercury (商標) Transfactor Kit、BD Biosciences社)。単球を、大腸菌LPS (0111: B4、1 μ g/mL)、及び/又はアゴニスト抗-TREM-1モノクローナル抗体 (10 μ g/mL)、及び/又はP5 (100 ng/mL) の存在下で、24時間培養した。次に全細胞抽出物を調製し、NF-kB p50及びp65のレベルを、製造業者の推奨に従い決定した。全ての実験は、3つ組で行い、データは平均 (SEM) で表した。

【0074】

(sTREM-1放出の同定及び定量)

初代単球浮遊液を、前述のように培養した。これらの細胞を、大腸菌LPS (0111: B4、1 μ g/mL) により37°Cで24時間処理した。抗-TREM-1により認識された27kDa物質の存在を確認するために、細胞-馴化培地に、抗-TREM-1モノクローナル抗体 (R&D Systems社) を使用するウェスタンブロットを行った。可溶性TREM-1レベルを、別所記載 (18) のように、反射型スキャナー及びQuantity One Quantitation Software (Bio-Rad社、セルギー、フランス) によりイムノドット上のバンドの光学強度を評価することにより測定した。各試料からの可溶性TREM-1濃度は、試料の光学濃度を、精製したTREM-1で作成された標準曲線参照と比較することにより決定した。全ての測定は、3つ組で行った。この技術の感度は、5 pg/mLと低いsTREM-1レベルの検出を可能にした。

【0075】

(TREM-1 RT-PCR)

総mRNAを、TRIzol試薬 (Invitrogen社) を用いLPSの存在下で培養された初代単球から抽出し、Superscript RT II (Invitrogen社) を用い逆転写し、cDNAを作成した。全ての反応に使用したRT-PCR条件は、94℃、30秒/65℃、30秒/68℃、1分間を30サイクルであった。増幅は、2.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTP、2.0 U Taqポリメラーゼ、並びに20 pM 5'及び3'オリゴヌクレオチドプライマー (Proligos社、パリ、フランス) で行った。

【0076】

使用した5'及び3'プライマー対の配列は下記であった：

TREM-1 (17) について

TTGTCTCAGAACTCCGAGCTGC；[配列番号：10]、及び

GAGACATCGGCAGTTGACTTGG；[配列番号：11]。

TREM-1sv (19) について

GGACGGAGAGATGCCCAAGACC；[配列番号：12]、及び

ACCAGCCAGGAGAATGACAATG；[配列番号：13]。

β-アクチン (ハウスキーピングアンプリコンとして使用) について

GGACGACATGGAGAAGATCTGG；[配列番号：14]、及び

ATAGTAATGTCACGCACGATTTC；[配列番号：15]。

PCR産物は、アガロースゲル上を流し、臭化エチジウム染色により可視化した。

【0077】

(マウスのLPS-誘導した内毒素血症)

地域の倫理委員会が承認した後、雄のBalb/Cマウス (20~23 g) を、無作為に群別し、LPSチャレンジ前後のP5 (通常の生理食塩水500 µl中) 又はコントロールベクターと組合せ、大腸菌LPSで腹腔内 (i.p.) 処置した。一部の実験において、抗TREM-1モノクローナル抗体5 µgを、LPS注射後1時間でi.p.投与した。マウスの生存力を、毎時間試験するか、又は動物を一定期間で屠殺した。血清試料を、心臓穿刺により採取し、TNF-α及びIL-1βについて、ELISA (BD Biosciences社) で、及びsTREM-1レベルについてイムノドットでアッセイした。

【0078】

(CLPの複数菌による敗血症モデル)

雄のBalb/Cマウス (7~9週齢、20~23 g) を、0.2 mL滅菌パイロジェン-非含有生理食塩水中のケタミン及びキシラジンのi.p.投与により麻酔をかけた。1.0 cmの腹部正中切開により盲腸を露出し、先端部の半分で (distal half) 結紮し、その後G21針で2箇所穿刺した。少量の糞便を、穿孔から排出し、開通性を確認した。盲腸を腹腔に戻し、腹部切開を二層縫合した。手術後、全てのマウスに、輸液蘇生のために、0.5 mL生理食塩水を注射し、イミペネム1.25 mg (すなわち50 µg/g) を12時間毎にs.c.注射した。これらの動物を無作為に群別し、通常の生理食塩水 (n=14)、コントロールペプチド (n=14、100 µg) 又はP5 (100 µg) を、H0 (n=18)、H+4 (n=18) 又はH+24 (n=18) に単回注射することにより処置した。最後の群のマウス (n=18) は、P5 (100 µg) を、H+4、H+8、及びH+24に反復注射することにより処置した。全ての処置は、通常の生理食塩水500 µlに希釈し、i.p.投与した。本発明者らは次に、様々な用量のP5の作用を決定しようとした。この目的のために、マウス (n=15/群) を、生理食塩水又はP5の10 µg、20 µg、50 µg、100 µgもしくは200 µgのCLP 後H0での単回注射により処置し、生存をモニタリングした。1群につき追加動物5匹を、CLPの24時間後に麻酔下で屠殺し、細菌数及びサイトカインレベルを決定した。2 mL RPMI 1640 (Life Technologies社) を用い腹膜洗浄液を得、心臓穿刺により血液を収集した。血清中のTNF-α及びIL-1βの濃度を、ELISA (BD Biosciences社) により決定した。細菌数の評価のために、血液及び腹膜洗浄液を、連続対数希釈し、5%ヒツジ血液を補充したトリプシン処理したダイズ寒天プレートに播種した。播種後、トリプシン処理したダイズ寒天プレートを、37℃で好気性に24時間、嫌気性に48時間インキュベーションした。結果は、血液についてのCFU/mL及び腹膜洗浄液についてのCFU/マウスとして表した。

10

20

30

40

50

【0079】

(統計解析)

血清sTREM-1及びサイトカインレベルを、平均(±SD)として表した。P5によるLPS死亡率に対する保護は、Log-Rank検定を用い、生存曲線の比較により評価した。全ての統計解析は、Statviewソフトウェア(Abacus Concepts社、バークレー、CA)により完了し、及び両側 $P < 0.05$ を有意とみなした。

【0080】

(結果)

(可溶型TREM-1は、大腸菌LPSによる刺激後、培養したヒト単球から放出される)

sTREM-1のin vitroにおける放出の可能性を確定するために、本発明者らは、ヒト単球をLPSで刺激し、SDS-PAGEにより馴化培養培地を分析した。LPS刺激は、時間依存型で27-kDa蛋白質の出現を誘導した(図7A)。ウェスタンブロット分析は、この蛋白質は、TREM-1の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体により特異的に認識されたことを明らかにした(図7A)。細胞生存力は、馴化培地中のsTREM-1の存在を誘導したLPS濃度では影響を受けず、このことは、TREM-1放出は、細胞死に起因するものではないことを示している。同様に、単球のプロテアーゼインヒビターによる処置は、TREM-1放出に影響を及ぼさなかった(図7A)。TREM-1 mRNAレベルは、LPS処置時に増加した(図7B)のに対し、TREM-1sv mRNAレベルは依然検出不能であった。このことは、TREM-1放出はおそらく、その遺伝子の転写増大に関連し、TREM-1sv発現とは無関係であることを示している。TNF- α (5~100 ng/mL)又はIL-1 β (5~100 ng/mL)による単球の16時間の刺激は、サイトカインの用量に依存した方式で非常に少量のTREM-1放出を誘導した。IFN- γ は、最大濃度100 U/mLであっても、TREM-1放出を誘導しなかった。

【0081】

(前炎症性サイトカインのLPS関連した放出はP5により減弱される)

有意なTNF- α 及びIL-1 β 生成は、LPSと共に培養された単球の上清において観察された。TNF- α 及びIL-1 β 生成は、TREM-1 mAb及びLPSの両方と共に培養された細胞の方が、mAb又はLPS単独と共に培養されたものと比べて、更により高かった(図8A)。前炎症性サイトカインの誘導性放出は、培地にP5又はIL-10が補充された場合、LPS刺激後有意に低下した。P5は、濃度依存した方式で、LPS又はLPS及びmAbと共に培養された細胞からのTNF- α 及びIL-1 β 生成を低下し、同時にLPSと共に培養した細胞からのsTREM-1放出を増加した。コントロールペプチドは、サイトカイン又はsTREM-1放出に対する作用を示さなかった(データは示さず)。際だって対照的なことに、IL-10はTREM-1及び炎症性サイトカインの両方の放出を全般的に阻害した(図8A)。LPS及びTREM-1 mAbの両方は、単球NF-kB p50及びp65の強力な活性化を誘導し、並びにLPS及びTREM-1 mAbの併用投与は、相乗作用につながっている。P5は、TREM-1の結合により誘導されたNF-kB活性化を阻害したが、LPSの作用は変更しなかった(図8B)。

【0082】

(LPS-処置したマウスの血清sTREM-1レベルは増加する)

sTREM-1は、マウスにおいて内毒素血症時に全身放出されるかどうかを決定するために、本発明者らは、LPS投与後の血清sTREM-1レベルを測定した。血清sTREM-1は、LPSのLD₅₀用量投与後1時間で容易に検出可能であり、LPS処置後4~6時間はピークプラトーレベルに維持された(図9)。

【0083】

(TREM-1ペプチド「P5」は内毒素血症マウスを死亡から保護する)

LPS致死量(LD₁₀₀)投与の60分前にP5の単回用量により処置されたマウスは、用量依存方式で死亡から保護された(図10A)。P5処置を、LPS投与後まで遅延できるかどうかを調べるために、本発明者らは、LPS注射後4又は6時間でP5注射を開始した。この最大4時間遅延された処置は、LD₁₀₀用量のLPSに対する有意な保護をもたらした(図10B)。遅れた死亡例は1週間にわたり生じず、このことは、P5は、LPS死亡の発生が単に遅延されるのではなく、持続性の保護を提供することを示している。コントロールマウスは全て、死亡前

に嗜眠、起毛、及び下痢を生じた。対照的にP5-処置マウスは、よく毛繕いし活動的であり、下痢をせず、活発であった。P5がマウスをLPS死亡から保護する機序を明確にするために、本発明者らは内毒素血症マウスの血清レベルのTNF- α 、IL-1 β 、及びsTREM-1を、2及び4時間で決定した。対照と比較して、P5 100 μ gによる前処置は、表4に示されるように、サイトカインレベルを30%低下し、sTREM-1レベルを2倍に増加した：

【0084】

【表4】

表4. 内毒素血症マウスにおけるTNF- α 、IL-1 β 及びsTREM-1の血清濃度

	TNF- α (ng/mL)		IL-1 β (ng/mL)		sTREM-1 (ng/mL)	
	H2	H4	H2	H4	H2	H4
コントロール	3.3 $\pm$ 1.0	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.2	249 $\pm$ 48	139 $\pm$ 8
P5 (100 μ g)	2.4 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2	475 $\pm$ 37	243 $\pm$ 28

10

【0085】

(TREM-1の結合はマウスを死亡する)

20

更にLPS-媒介した死亡におけるTREM-1結合の役割に注目するために、マウスを、LD₅₀用量のLPS投与と組合せて、アゴニスト抗-TREM-1 mAbで処置した。これは、死亡率の50%から100%への有意な増加を誘導した(図10C)。

【0086】

(P5はマウスをCLP-誘導した死亡から保護する)

敗血症ショックのより関連性のあるモデルにおけるP5の役割を調べるために、本発明者らは、CLP実験を行った(図11A)。対照群は、通常の生理食塩水又はコントロールペプチドが注射されたマウスで構成された。この複数菌による敗血症モデルにおいて、敗血症発症後24時間と遅く投与された場合にも、P5は依然、死亡に対する有意な保護をもたらした。興味深いことに、P5の反復注射は、生存により好ましい作用を有した($P < 0.01$)。P5の生存(図11B)及びサイトカイン生成(表5)に対する用量反応作用があった。P5は、細菌クリアランスには作用を有さなかった(図12)。

30

【0087】

【表5】

表5. CLP後24時間のTNF- α 、IL-1 β 及びsTREM-1の血清濃度

	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	sTREM-1 (ng/mL)
コントロールペプチド	105 $\pm$ 12	841 $\pm$ 204	52 $\pm$ 3
コントロール生理食塩水	118 $\pm$ 8	792 $\pm$ 198	35 $\pm$ 5
P5 10 μ g	110 $\pm$ 11	356 $\pm$ 62	43 $\pm$ 8
P5 20 μ g	89 $\pm$ 10	324 $\pm$ 58	58 $\pm$ 8
P5 50 μ g	24 $\pm$ 6	57 $\pm$ 11	93 $\pm$ 10
P5 100 μ g	20 $\pm$ 3	31 $\pm$ 3	118 $\pm$ 12
P5 200 μ g	21 $\pm$ 7	37 $\pm$ 8	158 $\pm$ 13

40

【0088】

50

敗血症は、重度の感染症に対する有害な又は損傷を及ぼす宿主反応から生じる複雑な臨床症候群を例示している。敗血症は、全身への感染症に対する最初の適当な宿主反応が増幅され始めた時に発症し、その後調節不全となる（4, 5）。例えばLPSに曝露された好中球及び単球/マクロファージは、活性化され、TNF- α 及びIL-1 β などの前炎症性サイトカインを放出する。これらのサイトカインの過剰な生成は、敗血症患者において認められる多臓器不全に寄与すると広く考えられている（20-23）。

TREM-1は、単球活性化及び炎症反応に関連した最近同定された分子である（12, 14）。これは、下流のシグナル伝達事象を活性化するNK細胞受容体に関連したファミリーに属する。TREM-1のPNN及び単球/マクロファージ上での発現は、LPSにより誘導されることが示されている（16, 17）。

10

【0089】

本願明細書に説明されたように、本発明者らは、可溶性TREM-1は、大腸菌LPSによる刺激後、培養されたヒト単球から放出されたことを明らかにしている。このような可溶性は、LPSチャレンジ後1時間と早い時期に、内毒素血症マウスの血清中にも検出可能であった。これは、感染症に対する先天免疫応答の極初期相におけるTREM-1の関与と一致している（14, 15, 24）。sTREM-1が放出される機序は、明確には解明されていないが、TREM-1遺伝子の増大した転写に関連しているように見える。しかしながら、プロテアーゼインヒビターカクテルとのインキュベーションはsTREM-1放出を変更しないが、表面TREM-1の膜からの切断は、完全には排除することができない。興味深いことに、ヒト単球のTNF- α 、IL-1 β 又はIFN- γ のような前炎症性サイトカインによる刺激は、LPSが共刺激として添加されなくとも、非常に少量のsTREM-1放出を誘導した。代替りのmRNA TREM-1スプライシング変種（TREM-1sv）の発現が、単球において検出され、これはウシ型マイコバクテリア（*Mycobacterium bovis*）BCGの細胞壁画分で刺激時に、可溶性受容体へ翻訳することができるが（18）、LPSではできない（25）。このことは、本試験において、i) LPSは、単球におけるmRNA TREM-1svレベルを増加しなかったこと、及びii) 27-kDa蛋白質のみが、LPS刺激時に単球により放出され、17.5-kDa変種は放出されなかったことから確認された。

20

【0090】

その天然のリガンドは同定されていないが（13, 14）、単球上のTREM-1のアゴニストモノクローナル抗体との結合は、前炎症性サイトカイン生成の更なる増強を生じたのに対し、P5は、これらの合成を濃度-依存様式で減少し、IL-10はこれを完全に抑制した。

30

炎症性サイトカイン、及び特にTNF- α は、有害であると考えられるが、損なわれたTNF- α 反応を伴う動物における腹膜炎の致命的問題により示されるように（9-11）、これらは敗血症において有益な作用を有するとも考えられる（5）。更に臨床試験において、TNF- α の阻害は死亡率を上昇した（8）。最後に、感染症のクリアランスにおけるTNF- α の役割が、敗血症はTNF- α アンタゴニストで治療された関節リウマチ患者における頻出する合併症であるという知見（26）により注目されている。

【0091】

P5がサイトカイン生成を変化する機序は、依然明らかではない。P5は、TREM-1の細胞外ドメインの相補性決定領域（CDR）-3及び'F' β 鎖を含む。後者は、二量体化を媒介するチロシン残基を含む。Radaevらの論文は、TREM-1は、そのリガンドを、そのCDR-同等ループ領域により捕獲する（27）ことを主張している。従ってP5は、TREM-1二量体化を損ない及び／又はTREM-1の天然のリガンドと競合することができる。更に、P5により媒介された単球からのsTREM-1放出の増加は、膜TREM-1の結合を防止し、TNF- α システムにおけるように、sTREM-1はデコイ受容体として機能する（28, 29）。転写因子NF- κ Bの活性化は、LPSのような細菌刺激への曝露後の、単球炎症性サイトカイン生成において重要な工程である（30, 31）。様々なNF- κ B/Rel二量体の中で、p65/p50ヘテロ二量体は、単球におけるLPS-誘導性NF- κ Bのプロトタイプ型である（32）。P5は、TREM-1の結合により誘導された、p65/p50 NF- κ Bの過剰-活性化を廃止する。これはP5の、サイトカイン生成に対する作用、及びLPS-誘導した敗血症ショックの前1時間又は最大4時間も後までにペプチドが注射された場合に生じることがここで示された死亡からの保護に対する作用を、少なくとも部分的に

40

50

説明している。

【0092】

内毒素血症は、簡単に実験的に実現することができるが、ヒト敗血症を再現するためには余り適しておらず、CLPにより誘導された複数菌敗血症は、より複雑であるがより良いモデルである。従って後者が本試験において使用され、例えば敗血症発症後24時間と遅れて投与された場合であっても、P5により用量依存方式の保護が提供されることを確認した。しかしP5の好ましい作用は、増強された細菌のクリアランスとは無関係であった。

【0093】

免疫調節療法の使用におけるひとつの難点は、敗血症の発症を予想することは不可能である点であり、従ってこれらの治療を受ける患者は、既に十分敗血症が確立されていることが多い(6)。P5は敗血症の発生後注射されたとしても有効であることが明らかであるので、これは実際の治療を構成することができる(24, 33)。

対照的に、TREM-1のアゴニスト抗-TREM-1モノクローナル抗体による結合は、LPS-チャレンジしたマウスにおける死亡率の劇的な増加を媒介し：これは更に、敗血症ショック時のTREM-1結合の有害な作用を強調している。

【0094】

実験性敗血症ショックは、ヒト敗血症を一部のみ再現する。実際本発明者らのグループは最近、有意なレベルのsTREM-1が、敗血症に罹患した重症患者の血清中に放出され(34)、最高レベルは生存患者において認められることを示した。これは、本発明者らの実験の知見と一致し、sTREM-1放出のより大きい重要性、より好ましさが転帰であり、従って持続性の、少なくとも理論的には可溶性TREMペプチドによる発症後の敗血症療法としての可能性を示している。

【0095】

TREM-1は、感染症により誘発された即時型免疫応答における重要なプレーヤーであるように見える。感染の初期相において、好中球及び単球は、細菌産物によるパターン認識受容体の結合に起因する炎症反応を開始する(3, 4)。同時に細菌産物は、sTREM-1のアップレギュレーション及び放出を誘導する。未知のリガンドの認識時に、TREM-1は、特に単球/マクロファージにおいて、これらの炎症反応を増幅するシグナル伝達経路を活性化する。TREM-1シグナル伝達の変化は、完全な阻害を伴わずに、サイトカイン生成を低下し、並びに敗血症動物を過剰反応及び死亡から保護する。TREM-1結合のP5のようなペプチドによる変化は、特にこれは感染の攻撃に続く敗血症の発症後であっても活性があるように見えるので、敗血症治療に適した治療道具である。

【0096】

(実施例4)：P1及びP5により処置したLPS処置したラット及び敗血症ラットにおける血行動態試験

敗血症ショックの更なるモデルにおけるTREM-1ペプチドの役割を、ラットにおいてLPS及びCLP(盲腸結紮穿刺)実験を行うことにより調べた。

(材料及び方法)

(LPS-誘導した内毒素血症)

動物は、無作為に群別し(n=10~20)、大腸菌LPS(0111:B4, Sigma-Aldrich社、リヨン、フランス)の、TREM-1ペプチド又はスクランブルペプチドとの組合せのi.p.投与により処置した。

【0097】

(CLP複数菌による敗血症モデル)

この手法は、別所に詳細に説明されている(Mansart, A.らの論文、Shock, 19: 38-44 (2003) 参照)。簡単に述べると、ラット(n=6~10/群)を、ケタミン(150 mg/kg)のi.p.投与により麻酔をかけた。3.0 cmの腹部正中切開により盲腸を露出し、先端部の半分で結紮し、その後G21針で2箇所を穿孔した。少量の糞便を、穿孔から排出し、開通性を確認した。盲腸を腹腔に戻し、腹部切開を二層縫合した。手術後、全てのマウスに、輸液蘇生のために、50 ml/kgの通常の生理食塩水をs.c.注射した。TREM-1ペプチド又はスクラン

ブルペプチドを前述のように投与した。

【0098】

(ラットにおける血行動態測定)

LPS投与直後に加え、CLPの16時間後に、動脈血圧 (BP) (収縮期、拡張期及び平均)、心拍数、腹部動脈血流量、及び腸間膜血流量を、別所記載の方法を用い記録した (Mansart, A.らの論文、Shock、19: 38-44 (2003) 参照)。簡単に述べると、左頸動脈及び左頸静脈を、PE-50チューブでカニューレ挿管した。動脈BPを、圧変換器及び増幅器-記録システム (IOX EMKA Technologies社、パリ、フランス) により連続モニタリングした。血管周囲探子 (Transonic Systems社、イタカ、NY) を、上腹部大動脈及び腸間膜動脈で包み、それらの各流れを流量計 (Transonic Systems社) により、モニタリングした。最後の測定後 (LPS実験時の4時間目、及びCLP時の24時間目)、動物を、過量のチオペンタールナトリウムのi.v.投与により屠殺した。

10

【0099】

(生物学的測定)

血液を、左頸動脈から逐次採取した。動脈血中乳酸濃度及び血液ガス分析を、自動血液ガス分析装置 (ABL 735、Radiometer社、コペンハーゲン、デンマーク) において行った。血漿中のTNF- α 及びIL-1 β 濃度を、ELISA試験 (Biosource社、ニベル、ベルギー) により製造業者の推奨に従い決定した。硝酸塩/亜硝酸塩の血漿濃度を、Griess反応 (R&D Systems社、アビンドン、英国) を用い測定した。

【0100】

(統計解析)

結果は、平均 $\pm$ SDとして表した。群間比較は、スチューデントt検定を用い行った。全ての統計解析は、Statviewソフトウェア (Abacus Concepts, CA) を用いて完了し、及び両側 $P < 0.05$ を有意とみなした。

20

【0101】

(結果)

(内毒素血症モデル)

LPS投与後、動脈圧、大動脈及び腸管膜血流量は、コントロール動物 (スクランブルペプチド処置したラット) において急激に低下したが、心拍数は変化しなかった (表6)。動脈圧及び動脈血流量の低下は、TREM-1ペプチド処置した動物においては2時間目まで遅延し、その時点までコントロール動物よりもより有意に高い値であった。P1とP5の処置群間に差異はなかった。対照的に、これら2種のペプチドは、腸間膜血流量の減少に対する作用を有さなかった (表6)。

30

【0102】

動脈pHは、LPS注射後4時間目まで経時的に一定であり続け、この時点でこれは対照群のみで大きく低下した (表6)。3時間目でのコントロール動物に存在した有意な動脈血乳酸レベル上昇は、TREM-1ペプチドにより排除された (表6)。P1とP5の間にpH、動脈血炭酸塩及び乳酸濃度に関して差異は無かった。

予想されたように、TNF- α 血漿濃度のピークは、注射後30分から1時間の間に、LPSにより誘導され、その後漸減した (図13A)。P-1ペプチド注射は、この生成に影響を示さなかったが、P5はTNF- α 生成を $\sim 30\%$ 減少した。

40

P1は、IL-1 β ピークをLPS注射後3時間目まで遅らせたが、減弱しなかった、対照的に、P5は、IL-1 β 放出を強力に低下した (図13B)。

硝酸塩/亜硝酸塩濃度は、対照及びP1処置動物において、LPS投与後迅速に増加したが、P5処置においては安定して続けた (図14)。

【0103】

【表 6】

表6. LPS-誘導した内毒素血症時の血行力学パラメータ

		心拍数 (bpm)	MAP (mmHg)	動脈血流量 (mL/min)	腸間膜血流量 (mL/min)	pH	乳酸 (mmol/L)	
コントロール	H0	486±13	123±21	45±7	13.6±3.4	7.31±0.03	3.3±0.8	10
	H1	522±16	103±25	25±8 ^a	9.6±3.3	7.28±0.03	4.2±0.3	
	H2	516±13	98±23	12±5 ^{a,b}	8.0±3.7	7.29±0.03	5.9±0.6	
	H3	490±20	78±8 ^{a,b}	8±3 ^{a,b}	5.8±1.1	7.26±0.01	7.9±1.8 ^{a,b}	
	H4	510±18	67±9 ^{a,b}	6±1 ^{a,b}	4.1±0.8	7.03±0.10 ^{a,b}	11.5±0.7 ^{a,b}	
P1	H0	464±25	116±10	49±11	12.0±3.7	7.32±0.04	2.7±0.1	20
	H1	492±26	119±14	39±12 ^a	10.5±1.7	7.29±0.04	4.9±1.1	
	H2	492±26	113±21	26±14 ^a	7.7±2.7	7.30±0.01	5.0±0.9	
	H3	480±30	97±29 ^a	22±8 ^a	5.0±1.0	7.26±0.06	5.7±0.7 ^a	
	H4	480±20	92±7 ^a	16±6 ^a	4.8±0.9	7.26±0.08 ^a	7.9±1.7 ^a	
P5	H0	474±49	115±16	48±9	12.8±6.4	7.33±0.04	3.4±1.5	30
	H1	498±26	99±22	32±8	11.4±2.7	7.28±0.06	5.4±1.4	
	H2	510±42	101±18	23±4 ^b	9.2±1.9	7.32±0.07	5.5±1.6	
	H3	517±62	93±21 ^b	20±7 ^b	6.0±0.8	7.29±0.11	5.9±1.7 ^b	
	H4	510±26	89±10 ^b	15±6 ^b	5.0±1.0	7.28±0.12 ^b	7.4±1.8 ^b	

^a p<0.05 P1:コントロール^b p<0.05 P5:コントロール

【0104】

(CLPモデル)

本発明者らのモデルの重症度は、CLPの完了後16～20時間で最高であったので、本発明者らは、16時間目まで（by）動物を調べることを選択した。重要なことは、この時点以前には死亡例はなかったことである。全ての動物は輸液蘇生されたが、これらのペプチドの役割を厳密に考慮するために抗生物質は受け取らなかった。

コントロール動物において経時的な動脈圧の劇的な低下があり、並びにH24までに、収縮期、拡張期及び平均動脈圧は、各々、58±7mmHg、25±4mmHg、及び38±2mmHgであった。この減少は、P1又はP5処置ではほぼ完全に失われ、H16及びH24の間で有意差はなかった（図15）。P1及びP5処置ラットの間に差異はなかった。

【0105】

同じくTREM-1ペプチドは、コントロール動物において認められた動脈及び腸間膜血流量の減少を防いだ（表7）。腸間膜血流量変化に対する保護作用は、P5処置下で更により高かった。血流量の相対的な維持は、増加した心拍数とは関係がなく、その理由は後者はコントロール動物においてむしろ遅くなったからである（表7）。

コントロールラットにおいて発症した進行性代謝アシドーシスは、P1ペプチドにより減弱され、P5によりほぼ取り消された。同じ保護的傾向が、動脈血乳酸上昇において認められ、P5の作用はより顕著であった（表7）。

【0106】

【表7】

表7. CLP 複数菌による敗血症時の血行力学及び選択された生化学パラメータ

		心拍数 (bpm)	動脈血流量 (mL/min)	腸間膜血流量 (mL/min)	pH	炭酸水素塩 (mmol/L)	乳酸 (mmol/L)
コントロール	H16	516±44 ^{a,b}	38±10	10.6±3.0 ^b	7.31±0.07 ^b	16.9±2.7	4.7±1.5 ^b
	H20	543±35 ^{a,b}	19±11 ^{a,b}	4.3±1.5 ^b	7.23±0.05 ^{a,b}	12.0±5.6 ^{a,b}	8.5±1.4 ^{a,b}
	H24	480±20	14±9 ^{a,b}	2.5±0.7 ^b	7.17±0.01 ^{a,b}	10.3±3.3 ^a	10.8±1.9 ^{a,b}
P1	H16	462±16 ^a	41±12	13.5±7.2	7.32±0.04	16.8±4.4	4.9±0.4
	H20	480±30 ^a	28±17 ^a	5.3±3.0 ^c	7.31±0.18 ^a	16.0±5.4 ^b	5.3±1.1 ^{a,c}
	H24	420±30	22±16 ^a	4.5±2.1 ^c	7.24±0.06 ^{a,c}	11.2±0.8 ^c	6.8±0.9 ^{a,c}
P5	H16	460±17 ^b	41±14	15.3±3.5 ^b	7.35±0.01 ^b	18.6±2.0	3.3±0.4 ^b
	H20	500±17 ^b	31±5 ^b	11.0±6.9 ^{b,c}	7.34±0.01 ^b	18.0±0.9 ^a	3.6±0.9 ^{b,c}
	H24	510±20	28±8 ^b	8.5±3.5 ^{b,c}	7.36±0.01 ^{b,c}	17.1±0.9 ^{a,c}	4.9±1.1 ^{b,c}

^a p<0.05 P1:コントロール

^b p<0.05 P5:コントロール

^c p<0.05 P5:P1

10

20

30

【0107】

P1及びP5の両方は、TNF-α生成の減少を誘導し、再度P5の作用はより強力であった。H20までに、血漿TNF-αは、P5処置下ではほぼ検出不能であったのに対し、これは他の動物群においては上昇し続けた（図16）。

亜硝酸塩/硝酸塩濃度は、コントロール動物において増加したが、両方のTREM-1ペプチド処置群においては低レベルであり続けた（図17）。

【0108】

従ってP5及びP1の両方の血行力学に対する保護的作用が、敗血症ラットにおいて認められた。動脈圧及び血流量の両方が保存され、心拍数は独立していた。更に、TREM-1シグナル伝達の変化は低下したが、完全にはサイトカイン生成は低下されず、及び敗血症動物は過剰反応から保護された。サイトカイン生成は完全に阻害されなかったという事実は、重要な点である。実際TNF-αのような炎症性サイトカインは、有害であると考えられるが、これらは損なわれたTNF-α反応を伴う動物の腹膜炎モデルの致命的問題が基礎となる敗血症においては有益な作用も示す。

【0109】

敗血症ショック時に認められたiNOSの活性化は、末梢血管障害（注目される血管拡張及び高血圧）を部分的に説明する大量のNOの生成につながる。心筋それ自身に対しては、NOの作用のほとんどは、細胞質ゾルカルシウムの収縮に対する作用を損なうcGMPの生成に寄与する可溶性グアニレート-シクラーゼの活性化により媒介される。cGMPは、一部のホスホジエステラーゼの活性も刺激することができる。細胞内cAMPレベルのその後の減少は、

40

50

β アドレナリン作用性刺激の作用を減弱するNOの能力を説明することができる。従って動脈圧の維持は、TREM-1ペプチド処置した動物における血漿亜硝酸塩/硝酸塩の濃度の低下により反映されるように、NO生成の減少により一部説明することができる。

【0110】

炎症性サイトカイン生成の減少は、血流量に対する注目された作用を部分的に説明することができる。実際、心筋機能低下の可能性のあるサイトカインメディエーターのリストは多いが、TNF- α 及びIL-1 β が良好な候補であることが示されている。これらのサイトカインは両方とも、*in vitro*又は*ex vivo*において心筋の収縮性を弱める。更にヒト敗血症血清由来のTNF- α 又はIL-1 β の中和又は除去は、*in vitro*及び*in vivo*における心筋の抑制性の作用を一部無効にする。P1及びP5は、内毒素血症時に血流量及び動脈圧に同一の作用を有したが、それらのサイトカイン生成に対する作用は異なり、P1の血漿TNF- α 及びIL-1 β 濃度に対するわずかな作用のみであった。従ってTREM-1ペプチドの保護的役割は、サイトカイン放出に対するそれらの作用にわずかに部分的に関連するか、又は不必要な(redundant)経路に関与する。

【0111】

TREM-1経路の小さい合成ペプチドの使用による変化は、炎症性サイトカイン生成の減弱と共に、ラットにおける実験的敗血症ショック時の血行動態パラメータに対する有益な作用を有する。

まとめると、これらのデータは、TREM-1ペプチドは、1) 対象動物を敗血症-関連した血行力学の悪化から効率的に保護すること；2) 乳酸アシドーシスの発生を減弱すること；3) TNF- α 及びIL-1 β のような前炎症性サイトカインの生成を変化すること、及び4) 一酸化窒素の生成を減少することを示している。従ってTREM-1ペプチドは、敗血症、敗血症ショック又は敗血症-様状態の患者の血行動態パラメータの回復に有用な可能性がある。

【0112】

(参考文献)

1. Aderem, A、及び R.J. Ulevitch, R.J. の論文、「先天性免疫応答の導入におけるトール様レセプター」 Nature 406: 782-786, 2000
2. Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, O. Takeuchi, M.T. Ochoa, P.A. Engele, P.A. Sieling, P.F. Barnes, M. Rollinghoff, P.L. Bolcskei、及び M. Wagner. の論文、「哺乳類トール様レセプターを介する直接抗菌活性の導入」 Science 291: 1544-1549, 2001
3. Medzhitov, R.、及び C Jr. Janeway. の論文、「先天性免疫」 N. Engl. J. Med. 343: 338-344., 2000
4. Cohen, J. の論文、「敗血症の免疫病理学」 Nature 420: 885-91, 2002
5. Hotchkiss, R.S.、及び I.E. Karl. の論文、「敗血症の病理と治療」 N. Engl. J. Med. 348: 138-50, 2003
6. Vincent, J.L., Q. Sun、及び M.J. Dubois. の論文、「重度敗血症及び敗血症性ショックにおける免疫モジュール療法の臨床試験」 Clin. Infect. Dis. 34: 1084-1093., 2002
7. Riedemann, N.C., R.F. Guo、及び P. Ward. の論文、「敗血症治療における新戦略」 Nat. Med. 9: 517-524, 2003

【0113】

8. Fisher, C.J.Jr., J.M. Agosti, S.M. Opal, S.F. Lowry, R.A. Balk, J.C. Sadof, E. Abraham, R.M. Schein、及び E. Benjamin. の論文、「腫瘍壊死因子レセプター：Fc融合たんぱく質を用いる敗血症ショックの治療、多様性TNFレセプター敗血症研究グループ」 N. Engl. J. Med 334: 1697-702, 1996
9. Echtenacher, B., W. Falk, D.N. Mannel、及び P.H. Krammer. の論文、「実験的腹膜炎から回収された内因性腫瘍壊死因子／カクフェチンの要求」 J. Immunol. 145: 3762-3766, 1990
10. Echtenacher, B., K. Weigl, N. Lehn、及び D.N. Mannel. の論文、「マウスに

おける敗血性腹膜炎の早期における腫瘍防御機序としての腫瘍壊死因子依存性接着」 *Infect. Immun.* 69: 3550-5, 2001

1 1. Eskandari, M.K., G. Bolgos, C. Miller, D.T. Nguyen, L.E. DeForge、及び D.G. Remick. の論文、「盲腸結紮穿刺又は内毒素血漿後における抗腫瘍壊死因子抗体治療による致死防止の失敗」 *J. Immunol.* 148: 2724-30, 1992

1 2. Bouchon, A., J. Dietrich、及び M. Colonna. の論文、「TREM-1, 好中球及び単核白血球状に発現された新規レセプターによる炎症性応答が開始されること」 *J. Immunol.* 164: 4991-4995, 2000

【0 1 1 4】

1 3. Colonna, M.、及び F. Facchetti. の論文、「TREM-1 (脊髄細胞上に発現されるトリガーレセプター): 急性炎症応答における新規なプレーヤー」 *J. Infect. Dis.* 187 (Suppl): S297-301, 2003 10

1 4. Colonna, M. の論文、「免疫系及びそれを超える TREMs」 *Nat. Rev. Immunol.* 6: 445-453, 2003

1 5. Nathan, C.、及び A. Ding. の論文、「TREM-1: 敗血症候群における先天性免疫の新規なレギュレーター」 *Nat. Med.* 7: 530-2, 2001

1 6. Bouchon, A., F. Facchetti, M.A. Weigand、及び M. Colonna. の論文、「TREM-1による炎症の増幅、及び肺血性ショックの重要なメディエーター」 *Nature* 410: 1103-1107, 2001

1 7. Bleharski, J.R., V. Kiessler, C. Buonsanti, P.A. Sieling, S. Stenger, M. Colonna、及び R.L. Modlin. の論文、「免疫応答の早期導入、及び適応段階における、畜主防御における、脊髄細胞-1状に発現したトリガーレセプターの機序」 *J. Immunol.* 170: 3812-3818, 2003 20

1 8. Gibot, S., A. Cravoisy, B. Levy, M.C. Bn, G. Faure、及び P.E. Bollaert の論文、「脊髄細胞上に発現したトリガーレセプター、及び肺炎の診断」 *N. Engl. J. Med.* 350: 451-8, 2004

1 9. Gingras, M.C., H. Lapillonne、及び J.F. Margolin. の論文、「TREM-1、MDL-1、及び DAP12 発現が脊髄発達の成熟段階に関連すること」 *Mol. Immunol.* 38: 817-24, 2001

【0 1 1 5】

2 0. Dinarello, C.A. の論文、「肺血性ショックの病態におけるメディエーターとしての前進炎症性及び抗炎症性サイトカイン」 *Chest* 112 (suppl): S21-9, 1997 30

2 1. Bone, R.C., R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, W.A. Knauss, R.M. Schein、及び W.J. Sibbald. の論文、「敗血症及び臓器不全に関する定義、及び敗血症における革新的治療方法の使用に関するガイドライン The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.」 *Chest* 101: 1644-55, 1992

2 2. Warren, H.S. の論文、「敗血症の治療に関する戦略」 *N. Engl. J. Med.* 336: 952-3, 1997 40

2 3. Stone, R. の論文、「過去の失敗にかかわらず継続する敗血症用薬剤の検索」 *Science* 264: 365-7, 1994

2 4. Cohen, J. の論文、「敗血症における TREM-1」 *Lancet* 358: 776-8, 2001

2 5. Begun, N.A., K. Ishii, M. Kurita-Taniguchi, M. Tanabe, M. Kobayashi, Y. Moriwaki, M. Matsumoto, Y. Fukumori, I. Azuma, K. Toyoshima、及び T. Seya の論文、「ヒトマクロファージにおいて示差表示、及び cDNA 基礎構造によって、ミコバクテリウム ポピス BCG 細胞壁-特異性区別的に発現された遺伝子」 *Infect. Immun.* 12: 937-48, 2004

【0 1 1 6】

2 6. Keane, J., S. Gershon, R.P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W.D. 50

- Schwieterman, J.N. Siegel、及び M.M. Braun. の論文、「インフリキシマブを伴う結核、腫瘍壊死因子 α 中性化剤」 *N. Engl. J. Med.* 345: 1098-104, 2001
27. Radaev, S., M. Kattah, B. Rostro, M. Colonna、及び P. Sun. の論文、「ヒト脊髄細胞活性化レセプター TREM-1の結晶構造」 *Structure* 11: 1527-35, 2003
28. Lantz, M., U. Gullberg、及び E. Nilsson. の論文、「ヒト腫瘍壊死因子結合性タンパク質のインビトロにおける特徴付け：腫瘍壊死因子レセプターの可溶性形態」 *J. Clin. Invest.* 86: 1396-1401, 1990
29. van Zee, K.J., T. Kohno、及び E. Fischer. の論文、「腫瘍壊死可溶性レセプターの実験的、及び臨床的炎症における循環、及び該レセプターの過剰腫瘍壊死因子 α に対するインビトロ及びインビボにおける防御の可能性」 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 4845-4853, 1992
30. Collart, M.A., P. Baeuerle、及び P. Vassalli. の論文、「マクロファージにおける腫瘍壊死因子 α 転写の制御 4種のNFkBモチーフ、及びNFkBの構造的及び導入的形態の関与」 *Mol. Cell Biol.* 10: 1498-506, 1990

【0117】

31. Hiscott, J.M., J.J. Garoufalidis, A. Roulston, I. Kwan, N. Pepin, J. Lacoste, H. Nguyen, G. Bensi、及び M. Fenton. の論文、「ヒトIL-1 β プロモーターにおける機能的NFkB部位における特徴付け：陽性自家制御ループに関する証拠」 *Mol. Cell Biol.* 13: 6231-40, 1993
32. Urban, M.B., R. Schreck、及び P.A. Baeuerle. の論文、「p50及びp65サブユニットのヘテロダイマーによる、NFkBのDNA接触」 *EMBO J.* 10: 1817-25, 1991
33. Lolis, E.、及び R. Bucala. の論文、「中性免疫：重篤敗血症及び敗血症ショックに対する治療的アプローチ」 *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2: 635-45, 2003
34. Gibot, S., M.N. Kolopp-Sarda, M.C. Bn, A. Cravoisy, B. Levy, G. Faure、及び P.E. Bollaert. の論文、「脊髄細胞-1状に発現されたトリガーレセプターの血漿レベル：敗血症が疑われる患者におけるその臨床検査の正確性」 *Ann. Intern. Med.* 141: 9-15, 2004

【図面の簡単な説明】

【0118】

【図1A】図1Aは、TREM-1及びTREM-2ファミリーメンバーの配列アラインメントを示している。CLUSTAL W.バージョン1.74を用い、ヒトTREM-1を、マウスTREM-1並びにヒト及びマウスTREM-2と並置している。二次構造の割当ては、公表されたヒトTREM-1構造に対応している（矢印は β 鎖を及び円筒は α ヘリックスを）（Radaevらの論文、*Structure* (Camb) Dec; 11 (12) : 1527-35 (2003)）。ホモ-ヘテロ二量体形成に関連した残基は、黒色背景上に白色で示されている。V-型Igフォールドのために保存されたジスルフィド結合を形成するシステインは、太字で示されている。ギャップは、(-)で、同一残基は(*)で、類似残基は(:又は.)で印を付けた。ヒトとマウスのTREM-1配列の間の類似性の延長された領域は、灰色背景をつけた四角の中に記されている。本願明細書の実施例において使用したTREM-1ペプチド配列には下線をつけている。

【図1B】図1Bは、公表されたTREM-1ホモ二量体構造のリボン図を示している（Kelkerらの論文、*J. Mol. Biol. Sep*, 24;342 (4) : 1237-48 (2004)）。相補性決定領域(CDR)と同等の抗体を含むと仮定された結合部位は赤色で記されている。

【図2】図2は、LPSの1時間前のTREM-1ペプチドの投与は、内毒素血症により誘導される死亡を減少することを示している。BALB/cマウス(1群10匹)に、LPS 200 μ gを腹腔内注射した。TREM-1ペプチドP1、P2、P3、又はP5(1匹のマウスにつき300 μ M溶液200 μ l)を、LPSの1時間前に腹腔内注射した。マウスの生存力を、7日間1日2回モニタリングした。統計解析は、Logrank検定により行った。コントロールマウスからのデータは、同一条件下で行われた2回の独立した実験からの累積した生存曲線を表している。

【0119】

【図3】図3は、TREM-1ペプチドP1を、LPSの4時間後に注射した場合、内毒素血症により

誘導された死亡を効果的に低下することができることを示している。BALB/cマウス（1群10匹）に、200 μ g LPSを腹腔内注射した。1匹のマウスあたりTREM-1ペプチドP1の300 μ M溶液200 μ lを、LPSの1時間前又は4時間後に腹腔内注射した。マウスの生存力を、7日間1日2回モニタリングした。統計解析は、Logrank検定により行った。コントロールマウスからのデータは、同一条件下で行われた2回の独立した実験からの累積した生存曲線を表している。

【図4】図4は、LPSの4時間後のTREM-1ペプチドの投与は、内毒素血症により誘導された死亡を低下することを示している。BALB/cマウス（1群10匹）に、200 μ g LPSを腹腔内注射した。1匹のマウスあたりP1ペプチド150、300、及び600 μ M（丸）又はP3 600 μ M溶液200 μ l（黒四角）を、LPSの4時間後に腹腔内注射した。マウス生存力を、7日間1日2回モニタリングした。統計解析は、Logrank検定により行った。 10

【図5】図5は、TREM-1ペプチドP1は、盲腸結紮穿孔（CLP）に対し保護することを示している。CLPは、「材料及び方法」に記したように、C57BL/6マウス（1群15匹）において誘導した。P-1ペプチド（白丸）又はP3ペプチド（黒四角）（1匹のマウスにつき600 μ M溶液200 μ l）を、CLP誘導後5及び24時間に腹腔内注射した。マウス生存力を、10日間1日2回モニタリングした。統計解析は、Logrank検定により行った。

【0120】

【図6】図6は、P1、P2、及びP5ペプチドは、可溶性TREM-1/IgG1のTREM-1リガンド陽性腹膜滲出細胞への結合を阻害するが、P3ペプチドはそうではないことを示している。1匹のマウスにつき500 μ M溶液200 μ l（細い線）、1匹のマウスにつき100 μ M溶液200 μ l（点線）存在下、又はペプチド非存在下（太い線）でのマウスTREM-1/hIgG1の200 ngによる、腹膜滲出細胞の細胞蛍光測定分析が示されている。灰色ヒストグラムは、対照としてのヒトIgG1による免疫染色を表している。 20

【図7A】図7Aは、プロテアーゼインヒビターを伴う又は伴わない、LPSによる刺激後、培養した単球からのsTREM-1の放出を示している。LPS刺激は、抗-TREM-1 mAbにより特異的に認識された27-kD蛋白質の出現を誘導した（差し込み図）。馴化培養培地におけるsTREM-1レベルは、イムノドットの反射により測定した。データは、平均 $\pm$ SD（n=3）で示した。

【図7B】図7Bは、単球におけるTREM-1 mRNA発現を示している。培養した単球は、LPS（1 μ g/mL）で、指定されたように0、1及び16時間で刺激した。LPSは、1時間以内に、TREM-1 mRNA産生を誘導した。 30

【図8A】図8Aは、培養した単球からのサイトカイン及びsTREM-1の放出を示している。細胞活性化について、初代単球は、24-ウェル平底組織培養プレートにおいて、LPS（1 μ g/mL）の存在下で培養した。一部の実験において、この刺激は、P5（10~100 ng/mL）、コントロールペプチド（10~100 ng/mL）又はrIL-10（500 U/mL）との組合せにおいて提供された。TREM-1により単球を活性化するために、アゴニスト抗-TREM-1 mAb（10 μ g/mL）を示したように添加した。細胞-非含有上清を、TNF- α 、IL-1 β 及びsTREM-1の産生について、ELISA又は免疫ブロットにより分析した。全ての実験は、3つ組で行い、データは平均（SEM）として表した。a：培地，b：P5 10 ng/mL，c：抗-TREM-1，d：LPS，e：LPS+抗-TREM-1，f：LPS+P5 10 ng/mL，g：LPS+P5 50 ng/mL，h：LPS+P5 100 ng/mL，i：LPS+IL10； 40

【図8B】図8Bは、P5のNFkB活性化に対する作用を示している。単球は、示したように大腸菌 LPS（0111：B4，1 μ g/mL）、抗-TREM-1 mAb（10 μ g/mL）及び／又はP5（100 ng/mL）の存在下で、24時間培養し、NFkB p50及びp65のレベルを、ELISAベースのアッセイを用いて決定した。実験は、3つ組で行い、光学濃度平均（SEM）として表した。

【0121】

【図9】図9は、LPS-処置したマウス血清中のsTREM-1の蓄積を示している。雄Balb/Cマウス（20~23 g）を、LPS（LD₅₀、腹腔内）で処置した。血清を、イムノドットによりsTREM-1について、アッセイした。血清sTREM-1はLPS投与後1時間で容易に検出可能であり、及び4~6時間、プラトーレベルで維持された。 50

【図 10 A】図10Aは、P5による前処置は、マウスをLPSによる死亡から保護することを示している。雄のBalb/Cマウス（20～23 g）を、無作為に群別し（1群に10匹のマウス）、及びLD₁₀₀のLPSで処置した。P5（50 μg又は100 μg）又はコントロールベクターを、LPSの60分前に投与した。

【図 10 B】図10Bは、P5の遅れた投与は、マウスにおけるLPSによる死亡を防ぐことを示している。雄のBalb/Cマウス（20～23 g）を、無作為に群別し（1群8匹のマウス）、LPSのLD₁₀₀で処置した。P5（75 μg）又はコントロールベクターを、示されたようにLPSの4又は6時間後に投与した。

【図 10 C】図10Cは、アゴニストTREM-1 mAb投与は、マウスに対して致命的であることを示している。雄のBalb/Cマウス（20～23 g）を、無作為に群別し（1群に8匹のマウス）、示したようにLD₅₀のLPS+コントロールベクター、LD₅₀のLPS+抗-TREM-1 mAb（5 μg）、又はLD₁₀₀のLPS+コントロールベクターの併用で処置した。コントロールベクター及び抗-TREM-1 mAbは、LPS注射後1時間で投与した。 10

【図 11 A】図11Aは、P5は、マウスをCLP-誘導した致死性から部分的に保護することを示している。雄のBalb/Cマウス（20～23 g）を無作為に群別し、通常の生理食塩水（n=14）又はコントロールペプチド（n=14, 100 μg）、又はP5（100 μg）により、H0（n=18）、H+4（n=18）又はH+24（n=18）での単回感染（infection）により処置した。最後の群のマウス（n=18）は、P5（100 μg）のH+4、H+8、及びH+24での反復注射により処置した。

【図 11 B】図11Bは、P5の生存に対する用量作用を示している。マウス（1群n=15）は、通常の生理食塩水又は10 μg、20 μg、50 μg、100 μgもしくは200 μgのP5の、CLP後H0での単回注射により処置し、生存をモニタリングした。 20

【0122】

【図 12】図12は、P5は、CLP時の細菌数に影響を及ぼさないことを示している。マウス（1群5匹）を、CLP後24時間で、麻酔下で屠殺した。腹膜洗浄液及び血液中の細菌数を決定し、結果をCFU/mL血液及びCFU/腹膜洗浄したマウス1匹として表した。

【図 13】図13は、ラットにおけるLPS（15 mg/kg）投与後のTNF-α及びIL-1β血漿濃度の展開を示している。*p<0.05 P5-処置動物：コントロール動物， § p<0.05 P5-処置動物：P1-処置動物；

【図 14】図14は、ラットにおけるLPS（15 mg/kg）投与後の亜硝酸塩/硝酸塩濃度の展開を示している。*p<0.05 P5-処置：コントロール及びP1-処置動物； 30

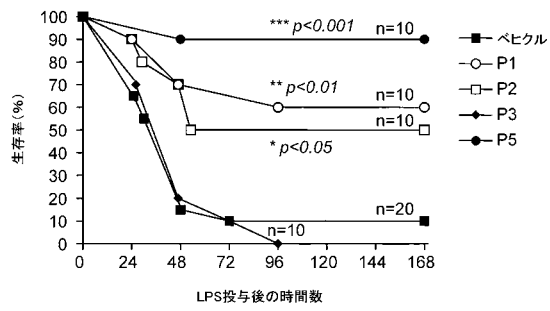
【図 15】図15は、ラットにおける盲腸結紮穿刺-誘導した腹膜炎の期間の平均動脈圧の展開を示している。*p<0.05：コントロール動物；

【図 16】図16は、ラットにおける盲腸結紮穿刺-誘導した腹膜炎の期間のTNF-α血漿濃度を示している。*p<0.05 P5-処置動物：コントロール動物， § p<0.05 P1-処置動物：コントロール動物， § p<0.05 P5：P1-処置動物；

【図 17】図17は、ラットにおける盲腸結紮穿刺が誘導した腹膜炎の期間の亜硝酸塩/硝酸塩濃度の展開を示している。*p<0.05 P5及びP1-処置動物：コントロール動物；

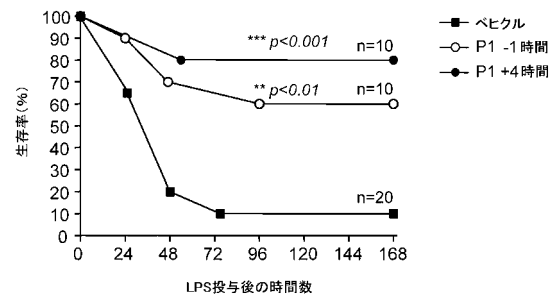
【図 2】

図2



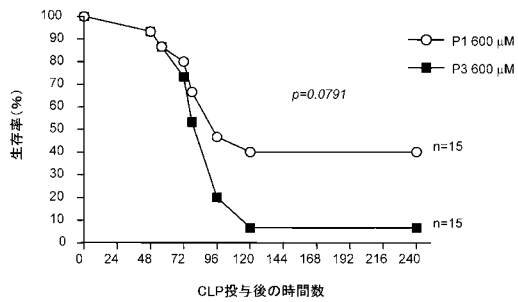
【図 3】

図3



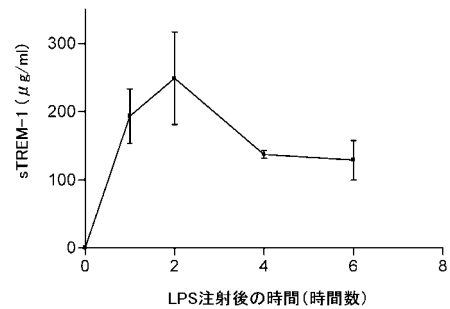
【図 5】

図5



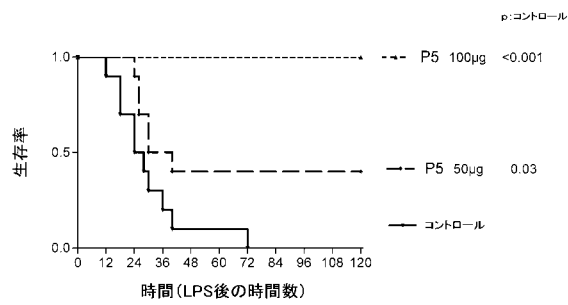
【図 9】

図9



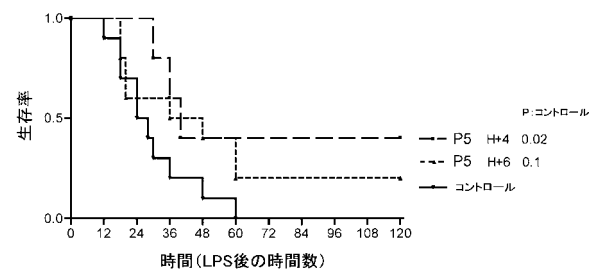
【図 10 A】

図10A



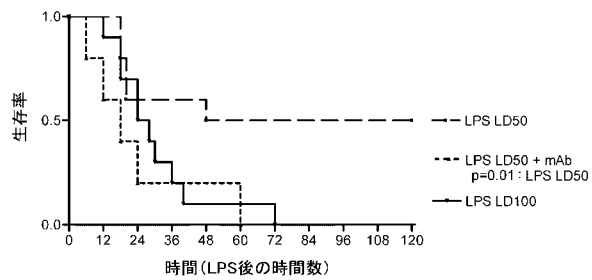
【図 10 B】

図10B



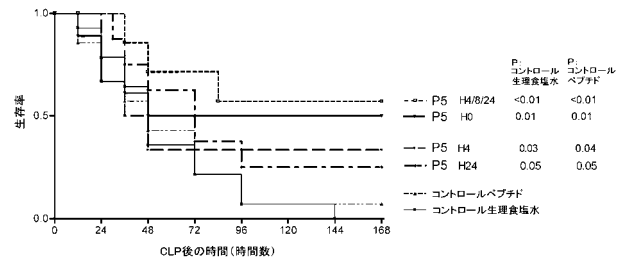
【図 10 C】

図10C



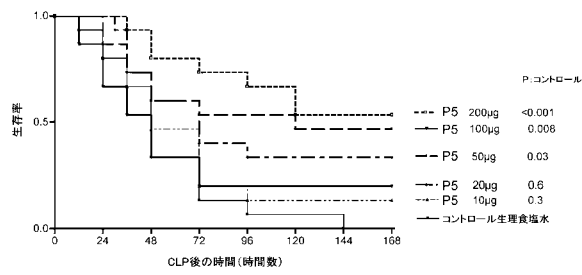
【図 11 A】

図11A



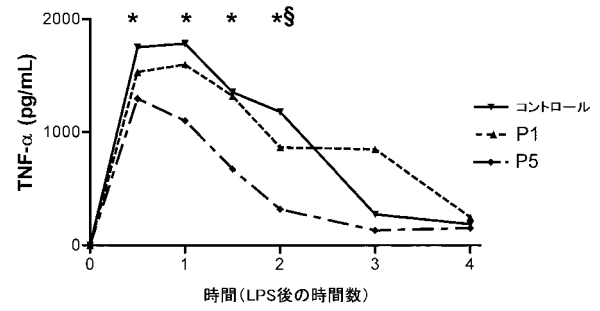
【図 1 1 B】

図11B



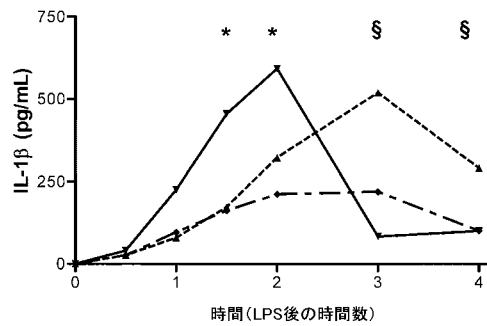
【図 1 3 A】

図13A



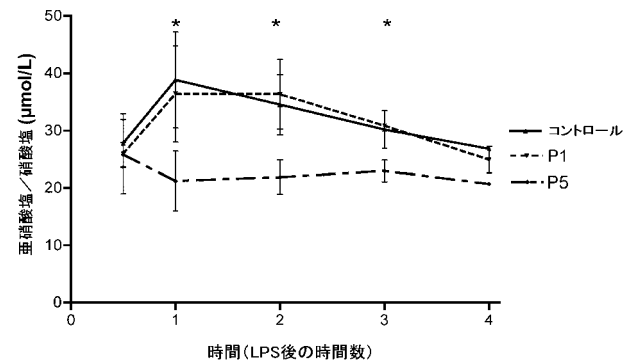
【図 1 3 B】

図13B



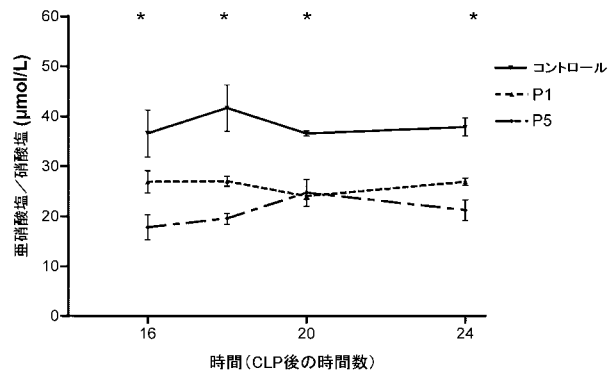
【図 1 4】

図14



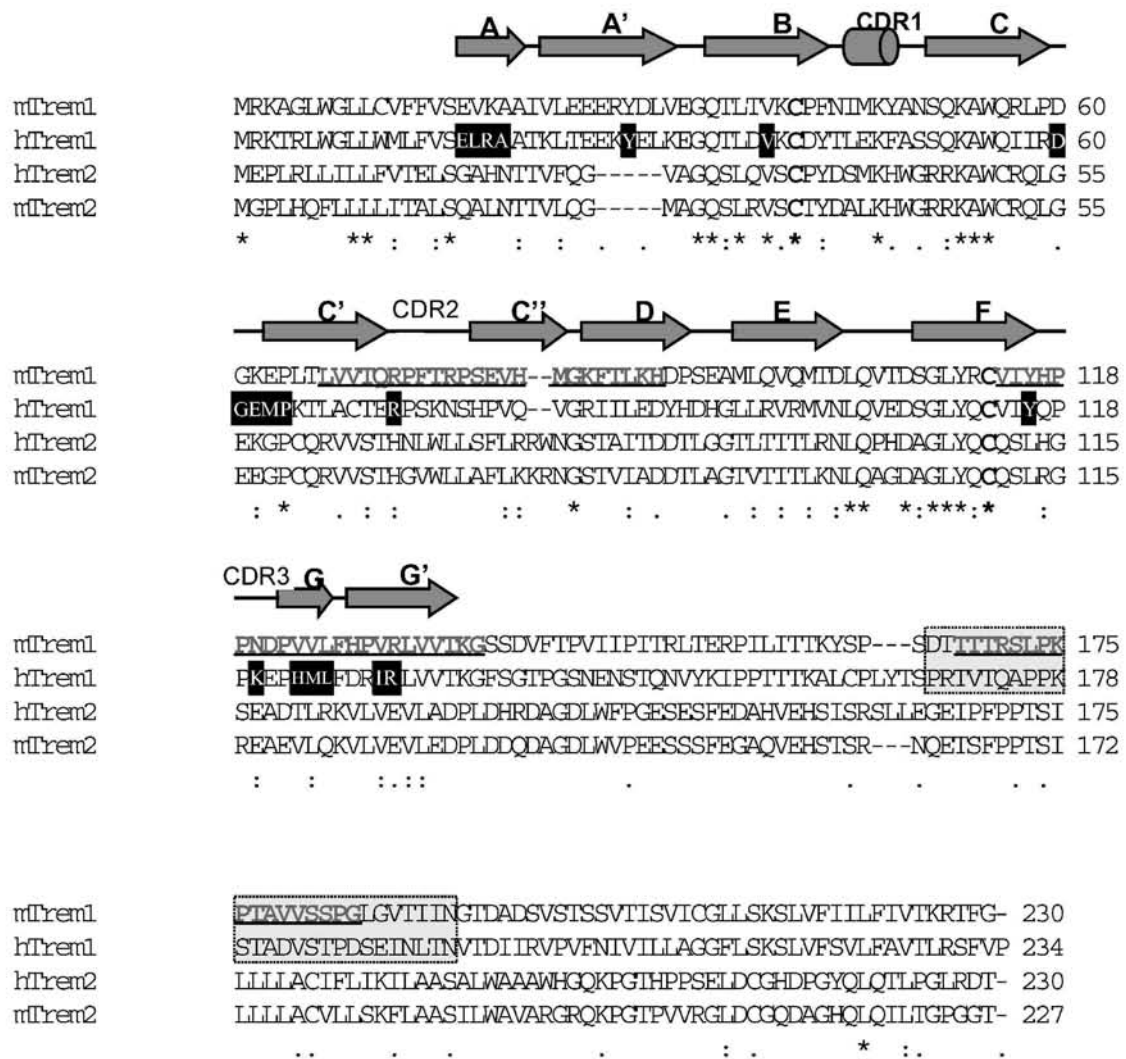
【図 17】

図17



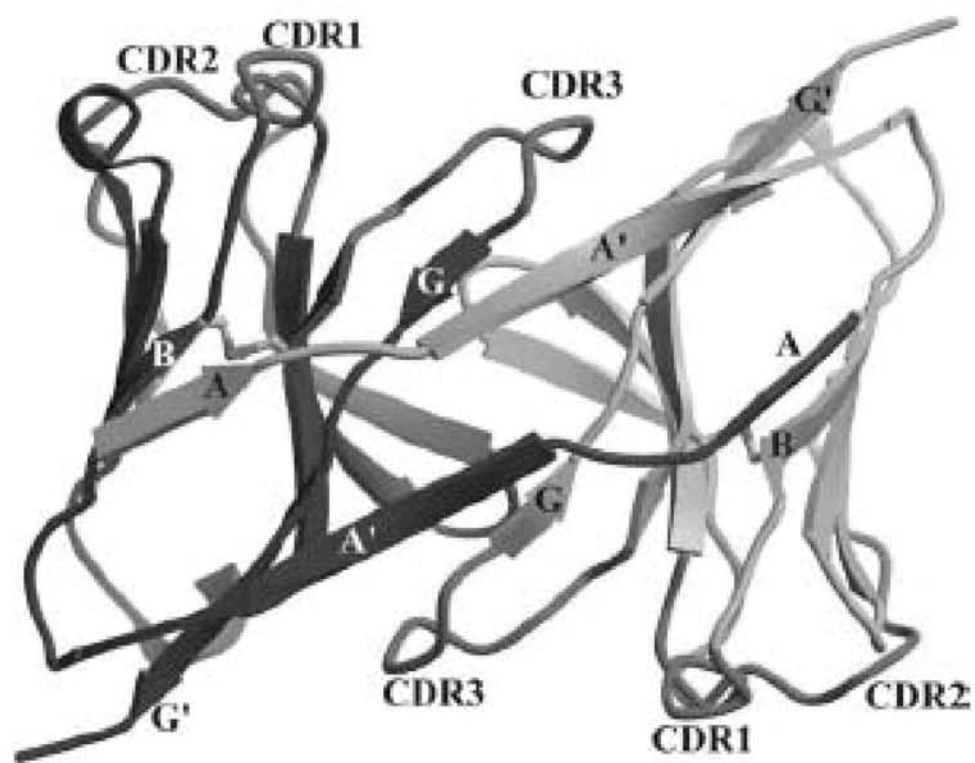
【図 1 A】

図1A



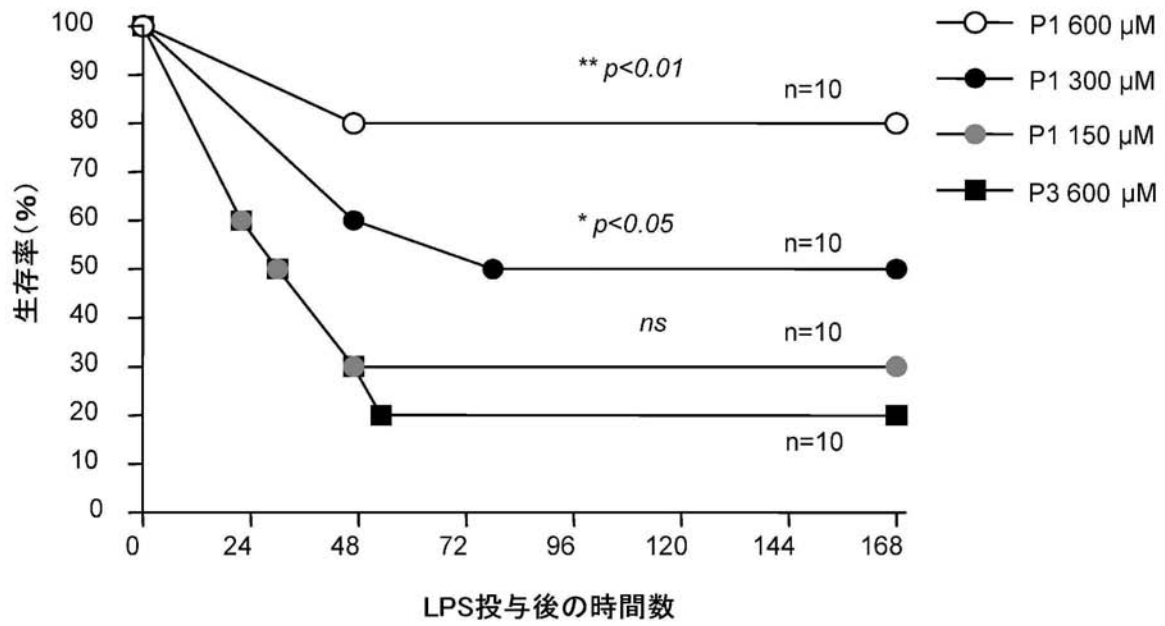
【図 1 B】

図1B



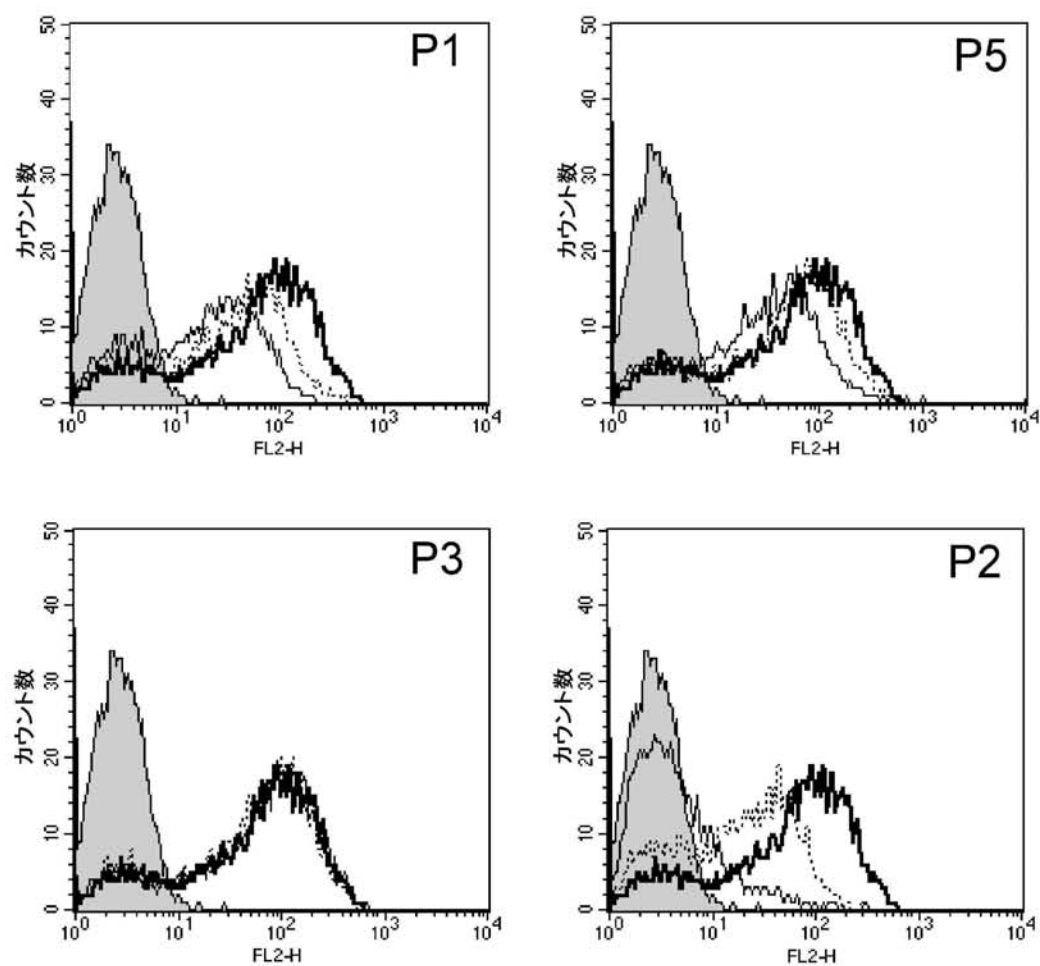
【図 4】

図4



【図 6】

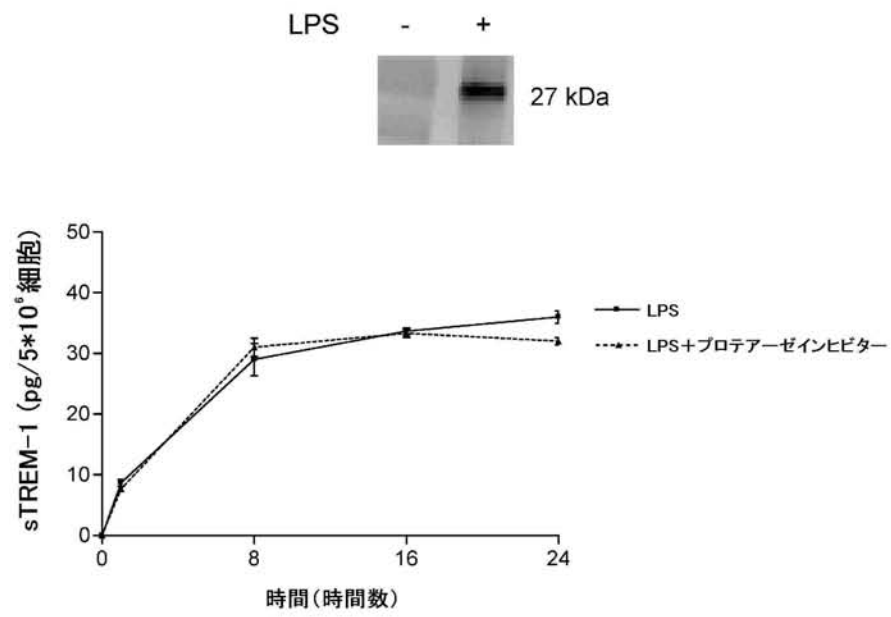
図6



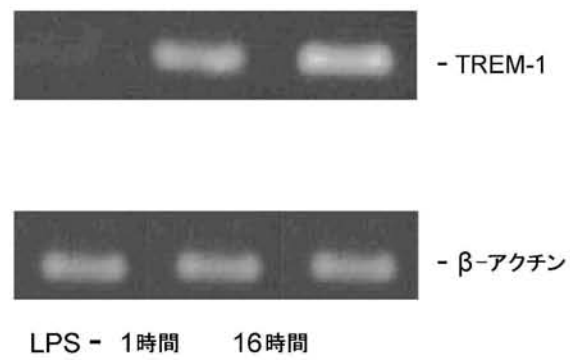
【図 7】

図7

A

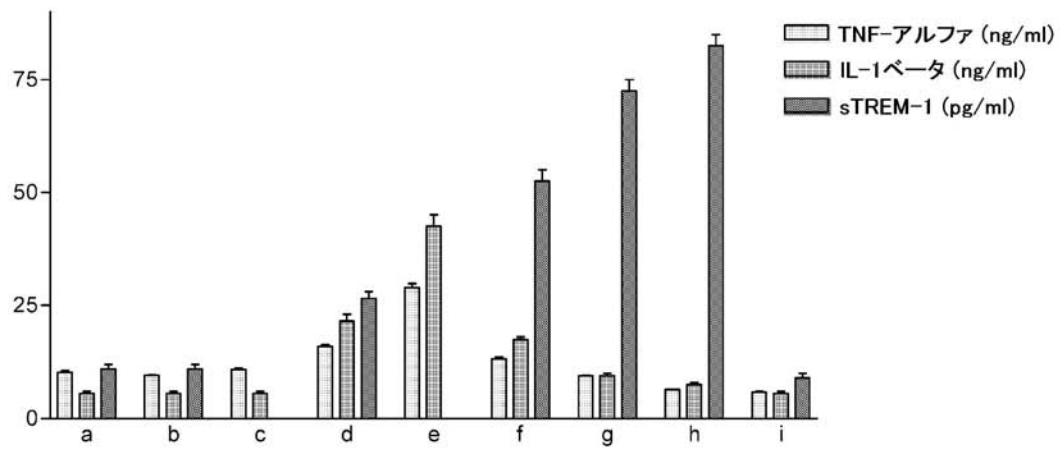


B



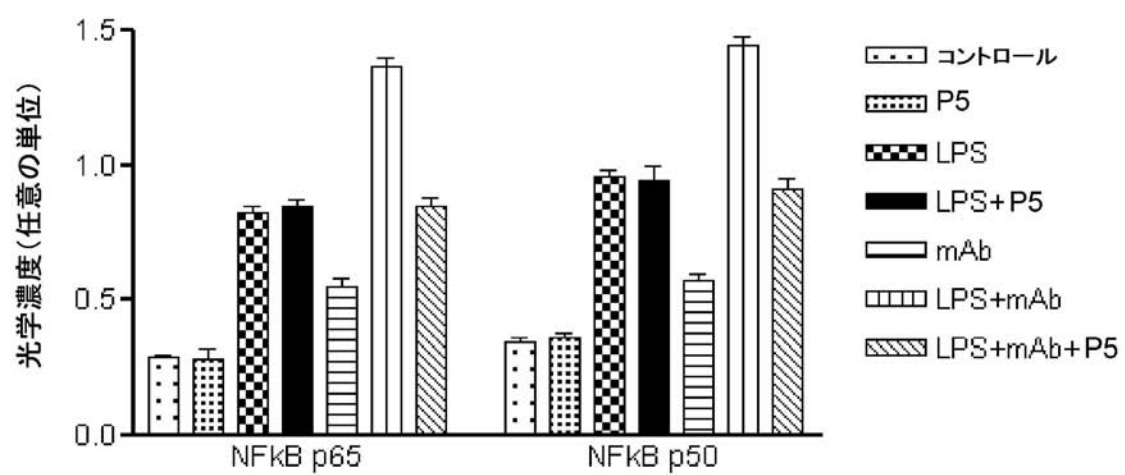
【図 8 A】

図8A



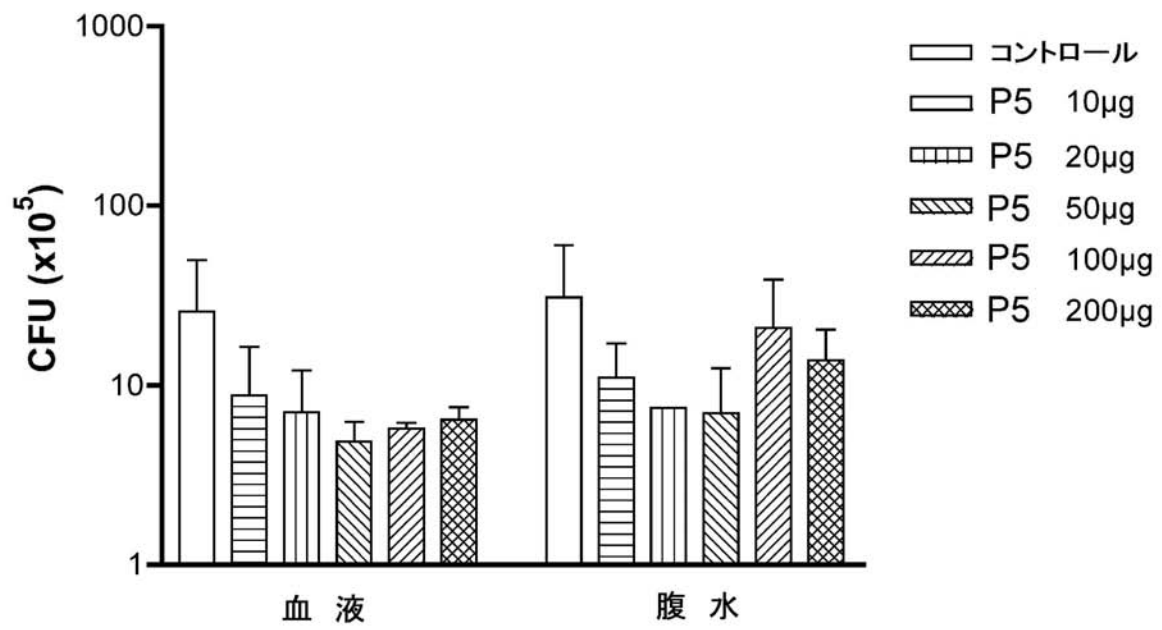
【図 8 B】

図8B



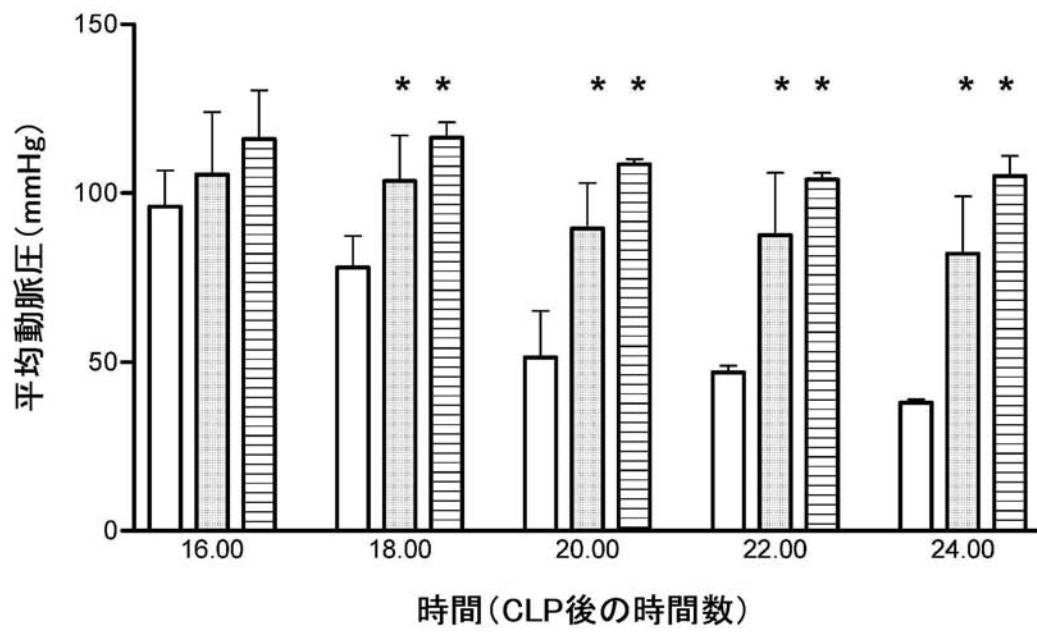
【図 12】

図12



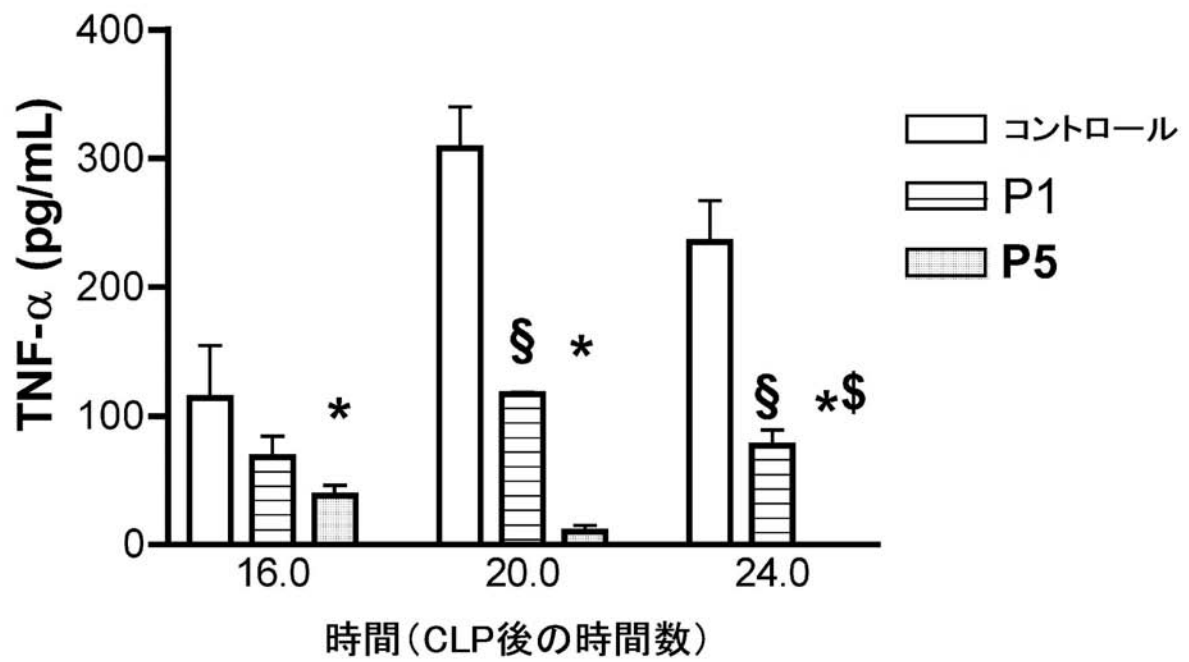
【図 15】

図15



【図 16】

図16



フロントページの続き

(72)発明者 ギルベルト ファウレ

フランス共和国 54500 バンドエウブレ レス ナンシー ビー.ピー. 184 ファク
ルテ デ メデシネ ラボラトイレ デルムノロギエ ジーアールピー

(72)発明者 セバスチエン ギボト

フランス共和国 54500 バンドエウブレ レス ナンシー ビー.ピー. 184 ファク
ルテ デ メデシネ ラボラトイレ デルムノロギエ ジーアールピー

(72)発明者 パオラ パニナ

イタリア I-20132 ミラン ビア オルゲッチナ 58 ビオエクセル エスピーエー内

(72)発明者 ナディア パッシニ

イタリア I-20132 ミラン ビア オルゲッチナ 58 ビオエクセル エスピーエー内

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 EA02 EA04 HA17

4C084 AA02 AA07 BA01 BA18 BA19 DC50 NA14 ZB35

4H045 AA10 AA30 BA17 CA40 EA22 EA29 EA50 FA74

【外国語明細書】

(Title of Invention) THERAPEUTIC PEPTIDES AND METHOD

The present invention relates to the field of immunology. More particularly, the present invention relates to inflammation and the use of proteins and peptides containing certain sequences of the TREM-1 protein and their functional equivalents (referred to herein as TREM1-peptides) in the treatment of disease, for example, sepsis and septic shock.

Sepsis constitutes a significant consumption of intensive care resources and remains an ever-present problem in the intensive care unit. It has been estimated that between 400 000 and 500 000 patients are so affected each year in both the USA and Europe. Morbidity and mortality have remained high despite improvements in both supportive and anti-microbial therapies. Mortality rates vary from 40% for uncomplicated sepsis to 80% in those suffering from septic shock and multi-organ dysfunction. The pathogenesis of the conditions is now becoming better understood. Greater understanding of the complex network of immune, inflammatory and haematological mediators may allow the development of rational and novel therapies.

Following an infection, innate and cognitive immune responses develop in sequential phases that build-up in specificity and complexity, resulting ultimately in the clearance of infectious agents and restoration of homeostasis. The innate immune response serves as the first line of defence and is initiated upon activation of pattern recognition receptors, such as Toll-like receptors (TLRs) (1, 2), by various pathogen-associated microbial patterns (PAMPs) (3). Activation of the TLRs triggers the release of large quantities of such cytokines as TNF- α and IL-1 β , which, in case of such massive infections as sepsis, can precipitate tissue injury and lethal shock (4, 5). Although antagonists of TNF- α and IL-1 β appeared in this context as possibly interesting therapeutic agents of sepsis, they have unfortunately shown limited efficacy in clinical trials (6-8).

This could be due to the fact that these cytokines are necessary for the clearance of infections, and that their removal would allow for fatal bacterial growth (9-11).

Another receptor involved in, inter alia, response to infection, triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) is a member of a recently discovered family of receptors, the TREM family, expressed on the surface of neutrophils and a subset of monocytes. TREM receptors activate myeloid cells via association with the adaptor molecule DAP12. Engagement of TREM-1 has been reported to trigger the synthesis of pro-inflammatory cytokines in the presence of microbial products.

The triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 is a recently discovered cell-surface molecule that has been identified both on human and murine polymorphonuclear neutrophils and mature monocytes (12). It belongs to the immunoglobulin superfamily and activates downstream signalling pathways with the help of an adapter protein called DAP12 (12-15). Bouchon and co-workers have shown that the expression of TREM-1 was greatly up-regulated on neutrophils and monocytes in the presence of such bacteria as *Pseudomonas aeruginosa* or *Staphylococcus aureus*, both in cell culture and in tissue samples from patients with infection (16). In striking contrast, TREM-1 was not up-regulated in samples from patients with non-infectious inflammatory diseases such as psoriasis, ulcerative colitis or vasculitis caused by immune complexes (16). Moreover, when TREM-1 is bound to its ligand, there is a synergistic effect of LPS and an amplified syn

thesis of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and GM-CSF, together with an inhibition of IL-10 production (17). In a murine model of LPS-induced septic shock, blockade of TREM-1 signalling protected the animals from death, further highlighting the crucial role of this molecule (13, 16).

Recent studies demonstrate that TREM-1 plays a critical role in the inflammatory response to infection (see BOUCHON et al. (2000) J. Immunol. 164: 4991-4995). Expression of TREM-1 is increased on myeloid cells in response to both bacterial and fungal infections in humans. Similarly, in mice the induction of shock by lipopolysaccharide (LPS) is associated with increased expression of TREM-1. Further, treatment of mice with a soluble TREM-1/Ig fusion protein, as a 'decoy' receptor, protects mice from death due to LPS or E.coli.

US 6,420,526 entitled "186 Secreted Proteins" claims unspecified and unexampled isolated fragments of TREM-1 containing at least 30 contiguous amino acids of human TREM-1. No biological data relating to such fragments are provided.

As described in US2003165875A, fusion proteins between human IgG1 constant region and the extracellular domain of mouse TREM-1 or that of human TREM-1 show an effect against endotoxemia in mice.

The inventors have surprisingly found that certain peptides derived from the TREM-1 protein are capable of acting as antagonists of the TREM-1 protein and therefore have applications in the treatment of sepsis and septic shock. The inventors further demonstrate that the same peptides also modulate in vivo the pro-inflammatory cascade triggered by infection, thus inhibiting hyper-responsiveness and death in an animal model of sepsis.

Previously, the inventors have identified a soluble form of TREM-1 (sTREM-1) and observed significant levels in serum samples from septic shock patients but not controls. As also described herein the inventors have investigated its putative role in the modulation of inflammation during sepsis (see Gibot et al. (2004) Ann. Intern. Med. 141(1): 9-15 and Gibot et al. (2004) N. Engl. J. Med. 350(5): 451-8).

As described herein the inventors show that a soluble form of TREM-1 (sTREM-1) is released in the peripheral blood during infectious aggression in mouse. The inventors also confirm monocytes as a major source of sTREM, and show that synthetic peptides mimicking a part of the extra-cellular domain of TREM-1 can modulate cytokine production by activated monocytes in vitro.

The inventors have observed that sTREM-1 is secreted by monocytes activated in vitro by LPS, as well as in the serum of animals involved in an experimental model of septic shock. Both in vitro and in vivo, synthetic peptides mimicking a short highly conserved domain of sTREM-1 attenuate cytokine production by human monocytes and protect septic animals from hyper-responsiveness and death. These peptides are efficient not only in preventing but also in down-regulating the deleterious effects of pro-inflammatory cytokines. These data demonstrate that in vivo modulation of TREM-1 by TREM-1 peptides is a valuable therapeutic tool for the treatment of infection, for example sepsis or septic shock or for the treatment sepsis-like conditions.

Accordingly, the present invention provides methods and compositions for the treatment of infectious disease, in particular, sepsis and septic shock or for the treatment of sepsis-like conditions.

As described herein, the inventors have determined that several peptides of the extracellular portion of the TREM-1 protein (see Table 1), which incorpo

rate sequences from "CDR2" and "CDR3" surprisingly have activity similar to previously described fusion proteins of IgG1 constant region and the extracellular domain of TREM-1 in models of sepsis. These peptides also have advantages over the protein particularly in terms of cost of manufacture.

Thus, the invention provides polypeptides comprising one or more sequences derived from CDR2 or CDR3 of a TREM-1 protein. Preferably, said polypeptides comprise less than 30 contiguous amino acids of said TREM-1 protein.

As shown in Table 1, examples of such peptides or polypeptides, contain or comprise for example 15-25 amino acid ("AA") peptides from the TREM-1 protein and contain or comprise all or part of a CDR domain (3-6 AAs) of the receptor flanked by natural sequences from the protein that can vary in length so long as function of the CDR-like domain is not lost. Such peptides are derived from the TREM-1 receptor protein amino acid sequence for example, as shown in Table 2 (human) and Table 3 (mouse).

Table 1 shows peptides derived from mouse TREM-1 "mPX" (NCBI Reference Sequences (RefSeq) NP_067381) or human TREM-1 "hPX" (NCBI Reference Sequences (RefSeq) NP_061113). Underlined amino acids span the human TREM-1 Complementarity Determining Regions (CDR), as described by Radaev et al. 2003 Structure (Camb.) 11 (12), 1527-1535 (2003).

Table 2 shows the human TREM-1 amino acid sequence NP_061113. Underlined amino acids span the human TREM-1 Complementarity Determining Regions (CDR) 2 (RPSKNS; [SEQ ID NO:20]) and 3 (QPPKE [SEQ ID NO:21]), as described by Radaev et al. 2003 Structure (Camb.) 11 (12), 1527-1535 (2003).

Table 3 shows the mouse TREM-1 amino acid sequence NP_067381. Underlined amino acids span the mouse TREM-1 Complementarity Determining Regions (CDR) 2 (RPFTRP; [SEQ ID NO:22]) and 3 (HPPND; [SEQ ID NO:23]).

【表 1】

Table 1. Peptides including sequences from human and mouse TREM-1 CDR 2 and CDR 3

hCDR 2	
mP1 (67-89) : [SEQ ID NO:3]	LVVT <u>Q</u> RPFTRPSEVHMGKFTLKH
hP1 (67-89) : [SEQ ID NO:16]	LACTER <u>P</u> SKNSHPVQVGRIILED
hCDR 3	
mP2 (114-136) : [SEQ ID NO:4]	VIYHPPNDPVVLFHPVRLVVTKG
mP4 (103-123) : [SEQ ID NO:6]	LQVTD ^{SG} LYRCVIYHPPNDPV
mP5 (103-119) : [SEQ ID NO:7]	LQVTD ^{SG} LYRCVIYHPP
hP2 (114-136) : [SEQ ID NO:17]	VIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
hP4 (103-123) : [SEQ ID NO:18]	LQVED ^{SG} LYQCVIYQPPKEPH
hP5 (103-119) : [SEQ ID NO:19]	LQVED ^{SG} LYQCVIYQPP

【表 2】

Table 2 Human TREM-1 amino acid sequence NP_061113

1	MRKTRLWGLL	WMLFVSELRA	ATKLTEEKYE	LKEGQTLQDVK	CDYTLQKFAS	SQKAWQIIRD
61	GEMPKTLACT	<u>ERPSKNSHPV</u>	QVGRIILEDY	HDHGLLRVRM	VNLQVEDSGL	YQCVIYQPPK
121	<u>EPHMLFDRIR</u>	LVVTKGFSGT	PGSNENSTQN	VYKIPPTTTK	ALCPLYTSPR	TVTQAPPKST
181	ADVSTPDSEI	NLTNVTDIIR	VPVFNIVILL	AGGFLSKSLV	FSVLFAVTLR	SFVP
[SEQ ID NO:1]						

【表 3】

Table 3 Mouse TREM-1 amino acid sequence NP_067381

1	MRKAGLWGLL	CVFFVSEVKA	AIVLEEERYD	LVEGQTLTVK	CPFNIMKYAN	SQKAWQRLPD
61	GKEPLTLVVT	<u>QRPFTRPSEV</u>	HMGKFTLKHD	PSEAMLQVQM	TDLQVTDSSL	YRCVIYHPPN
121	<u>DPVVLFHPVR</u>	LVVTKGSSDV	FTPVIIPITR	LTERPILITT	KYSPSDTTTT	RSLPKPTAVV
181	SSPGLGVTII	NGTDADSVST	SSVTISVICG	LLSKSLVFII	LFIVTKRTFG	[SEQ ID
NO:2]						

Accordingly, the invention provides isolated or recombinantly prepared polypeptides or peptides comprising or consisting essentially of one or more sequences derived from CDR2 or CDR3 of a TREM-1 protein, or fragments, homologues, derivatives, fusion proteins or variants of such polypeptides, as defined herein, which are herein collectively referred to as "polypeptides or peptides of the invention" or "TREM-1 peptides or TREM-1 polypeptides", preferably such entities comprise less than 30 contiguous amino acids of a TREM-1 protein, for example as shown in Table 2 or Table 3. Generally where polypeptides or proteins of the invention or fragments, homologues, derivatives, or variants thereof are intended for use (for example treatment) in a particular species, the sequences of CDR2 or CDR3 of a TREM-1 protein are chosen from the TREM-1 protein amino acid sequence of that species, or if the sequence is not known, an analogous species. For example, polypeptides or proteins of the invention for the treatment of human disease, in particular sepsis, septic shock or sepsis-like conditions, will comprise one or more sequences comprising all or part of CDR2 or CDR3 from the human TREM-1 protein.

Furthermore, the invention provides isolated polypeptides or proteins comprising an amino acid sequence that is at least about 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, or 98% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23 or fragments, homologues, derivatives, or variants thereof. The invention also provides isolated peptides, polypeptides or proteins comprising an amino acid sequence that comprises or consists of at least about 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 or 29 or more contiguous amino acids of a TREM-1 protein of which 3 or more contiguous amino acids are derived from the sequences of SEQ ID NO: 20, 21, 22 or 23 (in other words a sequence representing all, or part of CDR2 or CDR3 of a TREM-1 protein is present in the peptide, polypeptide or protein), or fragments, homologues, derivatives, or variants thereof. In preferred embodiments, such peptides, polypeptides or proteins, or fragments, homologues, derivatives or variants thereof have a biological activity of a TREM-1 full-length protein, such as antigenicity, immunogenicity, triggering of proinflammatory chemokines and cytokines, mob

ilization of cytosolic Ca^{2+} , protein tyrosine-phosphorylation, mediator release, and other activities readily assayable. Generally, such peptides, polypeptides or proteins or fragments, homologues, derivatives or variants thereof are capable of treating sepsis, septic shock or sepsis-like conditions, or are active in experimental models of sepsis, septic shock or sepsis-like conditions, for example by acting as antagonists of the activity of the TREM-1 receptor. Such peptides, polypeptides or proteins or fragments, homologues, derivatives or variants thereof are characterised by the ability to treat, ameliorate, or lessen the symptoms of sepsis, septic shock or sepsis-like conditions.

In particular, the invention provides, a TREM-1 polypeptide having activity against sepsis, septic shock or sepsis-like conditions which consists of (i) a contiguous sequence of 5 to 29, for example 15-25, amino acids corresponding to the native TREM-1 protein sequence which includes at least 3 amino acids from the CDR2 or CDR3 sequences; or (ii) such a sequence in which one or more amino acids are substituted conservatively with another amino acid provided, however that at least 3 amino acids from the CDR2 or CDR3 sequences are not substituted; or (iii) a sequence of (i) or (ii) linked at one or both of its N and C termini to a heterologous polypeptide. For example, in a polypeptide wherein the native TREM-1 protein sequence is the human sequence identified as [SEQ ID NO: 1], the CDR2 and CDR3 sequences are RPSKNS and QPPKE respectively. In such polypeptides, the at least 3 amino acids from the CDR2 or CDR3 sequences can be QPP, PPK, PKE, RPS, PSK, SKN or KNS. Such polypeptides may comprise the sequence QPPK, QPPKE or RPSKNS. For example, in a polypeptide wherein the native TREM-1 protein sequence is the mouse sequence identified as [SEQ ID NO: 2] the CDR2 and CDR3 sequences are RPFTRP and HPPND respectively. In such polypeptides, the at least 3 amino acids from the CDR2 or CDR3 sequences can be HPP, PPN, PND, RPF, PFT, FTR or TRP. Such polypeptides may comprise the sequences HPP, HPPN, HPPND or RPFTRP.

In certain embodiments, the polypeptide of the invention is or comprises SEQ ID No. 7 which is disclosed in Gibot et al (2004) J Exp Med 200, 1419-1426.

In certain embodiments the polypeptide of the invention neither is nor comprises SEQ ID No. 7.

In certain embodiments the polypeptide of the invention is or comprises a sequence selected from SEQ ID Nos. 3, 4 and 6.

In certain embodiments the polypeptide of the invention is or comprises a sequence selected from SEQ ID Nos. 16, 17, 18 and 19.

In certain embodiments the polypeptide of the invention comprises a sequence derived from CDR2.

In certain embodiments the polypeptide of the invention comprises a sequence derived from CDR3.

The polypeptides or peptides of the invention are provided for use in therapy, in particular in the treatment of sepsis, septic shock and sepsis-like conditions, and for use in the manufacture of a medicament for the treatment of sepsis, septic shock and sepsis-like conditions. Further provided are compositions and pharmaceutical compositions containing polypeptides or peptides of the invention and methods of treatment of sepsis, septic shock and sepsis-like conditions using polypeptides or peptides of the invention. In addition the polypeptides or peptides of the invention are provided for use in therapy to restore haemodynamic parameters in sepsis, septic shock and sepsis-like conditions and for use in the manufacture of a medicament for the treatment of aberrant haemodynamic parameters in sepsis, septic shock and sepsis-like conditions.

The term "triggering receptor expressed on myeloid cells" or "TREM" refers to a group of activating receptors which are selectively expressed on different types of myeloid cells, such as mast cells, monocytes, macrophages, dendritic cells (DCs), and neutrophils, and may have a predominant role in immune and inflammatory responses. TREMs are primarily transmembrane glycoproteins with a Ig-type fold in their extracellular domain and, hence, belong to the Ig-SF. These receptors contain a short intracellular domain, but lack docking motifs for signaling mediators and require adapter proteins, such as DAP12, for cell activation.

The term "myeloid cells" as used herein refers to a series of bone marrow-derived cell lineages including granulocytes (neutrophils, eosinophils, and basophils), monocytes, macrophages, and mast cells. Furthermore, peripheral blood dendritic cells of myeloid origin, and dendritic cells and macrophages derived in vitro from monocytes in the presence of appropriate culture conditions, are also included.

The term "sepsis, septic shock" or "sepsis or septic shock" as defined herein, refers to sub-groups of systemic inflammatory response syndrome (SIRS). The term "sepsis" is generally reserved for SIRS when infection is suspected or proven. A pattern of physiological variables have been shown in critically ill patients in response to a range of insults including; trauma, burns, pancreatitis and infection. These include inflammatory responses, leucocytosis or severe leucopaenia, hyperthermia or hypothermia, tachycardia and tachypnoea and have been collectively termed the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). This definition emphasises the importance of the inflammatory process in these conditions regardless of the presence of infection. Sepsis is further stratified into severe sepsis when there is evidence of organ hypoperfusion, made evident by signs of organ dysfunction such as hypoxaemia, oliguria, lactic acidosis or altered cerebral function. "Septic shock" is severe sepsis usually complicated by hypotension, defined in humans as systolic blood pressure less than 90 mmHg despite adequate fluid resuscitation. Sepsis and SIRS may be complicated by the failure of two or more organs, termed multiple organ failure (MOF), due to disordered organ perfusion and oxygenation. In addition to systemic effects of infection, a systemic inflammatory response may occur in severe inflammatory conditions such as pancreatitis and burns. The appearance of signs of an inflammatory response is less well defined following traumatic insults. In the intensive care unit, gram-negative bacteria are implicated in 50 to 60% of sepsis cases with gram-positive bacteria accounting for a further 35 to 40% of cases. The remainder of cases are due to the less common causes of fungi, viruses and protozoa.

The term "sepsis-like conditions" as used herein refers to those states in which a patient presents with symptoms similar to sepsis or septic shock but where an infectious agent is not the primary or initial cause of a similar cascade of inflammatory mediators and/or change in haemodynamic parameters as seen in cases of sepsis, for example in patients with acute or chronic liver failure (see Wasmuth HE, et al. *J Hepatol.* 2005 Feb; 42(2): 195-201), in cases of post-resuscitation disease after cardiac arrest (see Adrie C et al. *Curr Opin Crit Care.* 2004 Jun; 10(3): 208-12) in the treatment of sepsis-like symptoms after cancer chemotherapy (see Tsuji E et al. *Int J Cancer.* 2003 Nov. 1; 107(2): 303-8) in patients undergoing hyperthermic isolated limb perfusion with recombinant TNF-alpha or similar treatments (see Zwaveling JH et al. *Crit Care Med.* 1996 May; 24(5): 765-70) or sepsis-like illness in neonates (see Griffin MP et al. *Pediatr Res.* 2003 Jun; 53(6): 920-6).

The term "activity against sepsis, septic shock or sepsis-like conditions" as used herein refers to the capability of a molecule, for example a peptide, polypeptide or engineered antibody, to treat sepsis, septic shock or sepsis-like conditions, or be active in experimental models of sepsis, septic shock or sepsis-like conditions, for example by acting as an antagonist of the activity of the TREM-1 receptor.

Typically the indication for polypeptides of the invention is sepsis or septic-shock.

The term "substantial sequence identity", when used in connection with peptides/amino acid sequences, refers to peptides/amino acid sequences which are substantially identical to or similar in sequence, giving rise to a homology in conformation and thus to similar biological activity. The term is not intended to imply a common evolution of the sequences.

Typically, peptides/amino acid sequences having "substantial sequence identity" are sequences that are at least 50%, more preferably at least 80%, identical in sequence, at least over any regions known to be involved in the desired activity. Most preferably, no more than five residues, other than at the termini, are different. Preferably, the divergence in sequence, at least in the aforementioned regions, is in the form of "conservative modifications"

To determine the percent sequence identity of two peptides/ amino acid sequences or of two nucleic acid sequences, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in one or both of a first and a second amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment and non-homologous sequences can be disregarded for comparison purposes). For example, the length of a reference sequence aligned for comparison purposes is at least 30%, preferably at least 40%, more preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, and even more preferably at least 70%, 80%, or 90% of the length of the reference sequence (e.g., when aligning a second sequence to the first amino acid sequence which has for example 100 amino acid residues, at least 30, preferably at least 40, more preferably at least 50, even more preferably at least 60, and even more preferably at least 70, 80 or 90 amino acid residues are aligned).

The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position (as used herein amino acid or nucleic acid "identity" is equivalent to amino acid or nucleic acid "homology"). The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences, taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences. The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. In one embodiment, the percent identity between two amino acid sequences is determined using the Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at <http://www.gcg.com>), using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6 or 4, and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5 or 6. In another embodiment, the percent identity between two nucleotide sequences is determined using the GAP program in the GCG software package (available at <http://www.gcg.com>), using a NWSgapdna.CMP matrix and a gap weight of 40, 50, 60, 70, or 80, and a

length weight of 1, 2, 3, 4, 5 or 6. In another embodiment, the percent identity between two amino acid or nucleotide sequences is determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4: 11-17 (1989)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12, and a gap penalty of 4. The nucleic acid and protein sequences of the present invention can further be used as a "query sequence" to perform a search against public databases to identify, for example, other family members or related sequences. Such searches can be performed using the NBLAST and XBLAST programs (version 2.0) of Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10. BLAST nucleotide searches can be performed with the NBLAST program, score = 100, wordlength = 12 to obtain nucleotide sequences homologous to NIP2b, NIP2cL, and NIP2cS nucleic acid molecules of the invention. BLAST protein searches can be performed with the XBLAST program, score = 50, wordlength = 3 to obtain amino acid sequences homologous to NIP2b, NIP2cL, and NIP2cS protein molecules of the invention. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (e.g., XBLAST and NBLAST) can be used. See <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

The terms "protein" and "polypeptide" are used interchangeably herein. The term "peptide" is used herein to refer to a chain of two or more amino acids or amino acid analogues (including non-naturally occurring amino acids), with adjacent amino acids joined by peptide (-NHCO-) bonds. Thus, the peptides of the invention include oligopeptides, polypeptides, proteins, mimetopes and peptidomimetics. Methods for preparing mimetopes and peptidomimetics are known in the art.

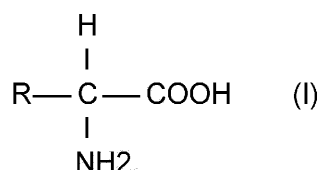
The terms "mimetope" and "peptidomimetic" are used interchangeably herein. A "mimetope" of a compound X refers to a compound in which chemical structures of X necessary for functional activity of X have been replaced with other chemical structures which mimic the conformation of X. Examples of peptidomimetics include peptidic compounds in which the peptide backbone is substituted with one or more benzodiazepine molecules (see e.g., James, G.L. et al. (1993) Science 260: 1937-1942) and "retro-inverso" peptides (see U.S. Patent No. 4,522,752 to Sisto). The terms "mimetope" and "peptidomimetic" also refer to a moiety, other than a naturally occurring amino acid, that conformationally and functionally serves as a substitute for a particular amino acid in a peptide-containing compound without adversely interfering to a significant extent with the function of the peptide. Examples of amino acid mimetics include D-amino acids. Peptides substituted with one or more D-amino acids may be made using well known peptide synthesis procedures. Additional substitutions include amino acid analogues having variant side chains with functional groups, for example, β -cyanoalanine, canavanine, djenkolic acid, norleucine, 3-phosphoserine, homoserine, dihydroxyphenylalanine, 5-hydroxytryptophan, 1-methylhistidine, or 3-methylhistidine.

As used herein an "analogue" of a compound X refers to a compound which retains chemical structures of X necessary for functional activity of X, yet which also contains certain chemical structures which differ from X. An example of an analogue of a naturally-occurring peptide is a peptide which includes one or more non-naturally-occurring amino acids. The term "analogue" is also intended to include modified mimetopes and/or peptidomimetics, modified peptides and polypeptides, and allelic variants of peptides and polypeptides. Analogues of a pe

ptide will therefore produce a peptide analogue that is substantially homologous or, in other words, has substantial sequence identity to the original peptide.

The term "amino acid" includes its art recognized meaning and broadly encompasses compounds of formula I:

【化 1】



Preferred amino acids include the naturally occurring amino acids, as well as synthetic derivatives, and amino acids derived from proteins, e.g., proteins such as casein, i.e., casamino acids, or enzymatic or chemical digests of, e.g., yeast, an animal product, e.g., a meat digest, or a plant product, e.g., soy protein, cottonseed protein, or a corn steep liquor (see, e.g., Traders' Guide to Fermentation Media, Traders Protein, Memphis, TN (1988), Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Sinauer Associates, Sunderland, MA (1989), and Product Data Sheet for Corn Steep Liquor, Grain Processing Corp., IO).

The term "naturally occurring amino acid" includes any of the 20 amino acid residues which commonly comprise most polypeptides in living systems, rarer amino acids found in fibrous proteins (e.g., 4-hydroxyproline, 5-hydroxylysine, -N-methyllysine, 3-methylhistidine, desmosine, isodesmosine), and naturally occurring amino acids not found in proteins (e.g., -alanine, -aminobutyric acid, homocysteine, homoserine, citrulline, ornithine, canavanine, djenkolic acid and -cyanoalanine).

The term "side chain of a naturally occurring amino acid" is intended to include the side chain of any of the naturally occurring amino acids, as represented by R in formula I. One skilled in the art will understand that the structure of formula I is intended to encompass amino acids such as proline where the side chain is a cyclic or heterocyclic structure (e.g., in proline R group and the amino group form a five-membered heterocyclic ring. Similarly, the compound of formula I above is intended to encompass amino acids such as proline wherein in formula I, e.g., R₃ and R₄ form a heterocyclic ring.

The term "homologue," as used herein refers to any member of a series of peptides or polypeptides having a common biological activity, including antigenicity/immunogenicity and inflammation regulatory activity, and/or structural domain and having sufficient amino acid as defined herein. Such homologues can be from either the same or different species of animals.

The term "variant" as used herein refers either to a naturally occurring allelic variation of a given peptide or a recombinantly prepared variation of a given peptide or protein in which one or more amino acid residues have been modified by amino acid substitution, addition, or deletion.

The term "derivative" as used herein refers to a variation of given peptide or protein that are otherwise modified, i.e., by covalent attachment of any type of molecule, preferably having bioactivity, to the peptide or protein, including non-naturally occurring amino acids.

Preferably, such homologues, variants and derivatives are capable of treating of sepsis, septic shock or sepsis-like conditions, or are active in experimental models of sepsis, septic shock or sepsis-like conditions, for example by acting as antagonists of the activity of the TREM-1 receptor.

An "isolated" or "purified" peptide or protein is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the protein is derived, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized.

The language "substantially free of cellular material" includes preparations of a polypeptide/protein in which the polypeptide/protein is separated from cellular components of the cells from which it is isolated or recombinantly produced. Thus, a polypeptide/protein that is substantially free of cellular material includes preparations of the polypeptide/protein having less than about 30%, 20%, 10%, 5%, 2.5% or 1%, (by dry weight) of contaminating protein. When the polypeptide/protein is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, i.e., culture medium represents less than about 20%, 10% or 5% of the volume of the protein preparation. When polypeptide/protein is produced by chemical synthesis, it is preferably substantially free of chemical precursors or other chemicals, i.e., it is separated from chemical precursors or other chemicals which are involved in the synthesis of the protein. Accordingly, such preparations of the polypeptide/protein have less than about 30%, 20%, 10%, 5% (by dry weight) of chemical precursors or compounds other than polypeptide/protein fragment of interest. In a preferred embodiment of the present invention, polypeptides/proteins are isolated or purified.

In addition to the polypeptides described above, polypeptides of the invention also encompass those polypeptides having a common biological activity and/or structural domain and having sufficient amino acid identity (homologues) as defined herein. These homologues can be from either the same or different species of animal, preferably from mammals, more preferably from rodents, such as mouse and rat, and most preferably from human. Preferably, they exhibit at least one structural and/or functional feature of TREM-1, and are preferably, capable of treating sepsis, septic shock or sepsis-like conditions, for example by acting as antagonists of the activity of the TREM-1 receptor. Such modifications include amino acid substitution, deletion, and/or insertion. Amino acid modifications can be made by any method known in the art and various methods are available to and routine for those skilled in the art.

Additionally, in making amino acid substitutions, generally the amino acid residue to be substituted can be a conservative amino acid substitution (i.e. "substituted conservatively"), for example, a polar residue is substituted with a polar residue, a hydrophilic residue with a hydrophilic residue, hydrophobic residue with a hydrophobic residue, a positively charged residue with a positively charged residue, or a negatively charged residue with a negatively charged residue. Moreover, generally, the amino acid residue to be modified is not highly or completely conserved across species and/or is critical to maintain the biological activities of the peptide and/or the protein it derives from.

Peptides of the invention may be directly synthesised in any convenient way. Generally the reactive groups present (for example amino, thiol and/or carboxyl) will be protected during overall synthesis. A proportion of the peptides of the invention, i. e. those wherein the comprised amino acids are genetically coded amino acids, will be capable of being expressed in prokaryotic and eukaryotic hosts by expression systems well known to the man skilled in the art. Methods for the isolation and purification of e. g. microbially expressed peptides are also well known. Polynucleotides which encode these peptides of the invention constitute further aspects of the present invention. As used herein, "polynucleotide" includes any sequence of nucleotides, whether or not the sequence is continuous, and whether or not the sequence is encoded by a gene.

peptide" refers to a polymer of deoxyribonucleotides or ribonucleotides, in the form of a separate fragment or as a component of a larger construct, e. g. an expression vector such as a plasmid. Polynucleotide sequences of the invention include DNA, RNA and cDNA sequences. Due to the degeneracy of the genetic code, of course more than one polynucleotide is capable of encoding a particular peptide according to the invention. When a bacterial host is chosen for expression of a peptide, it may be necessary to take steps to protect the host from the expressed anti-bacterial peptide. Such techniques are known in the art and include the use of a bacterial strain which is resistant to the particular peptide being expressed or the expression of a fusion peptide with sections at one or both ends which disable the antibiotic activity of the peptide according to the invention. In the latter case, the peptide can be cleaved after harvesting to produce the active peptide. If the peptide incorporates a chemical modification then the activity/stability of the expressed peptide may be low, and is only modulated by post-synthetic chemical modification.

Furthermore, the invention also encompasses derivatives of the polypeptides of the invention. For example, but not by way of limitation, derivatives may include peptides or proteins that have been modified, e.g., by glycosylation, acetylation, pegylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to a cellular ligand or other protein, etc. Any of numerous chemical modifications may be carried out by known techniques, including, but not limited to, specific chemical cleavage, acetylation, formylation, etc. Additionally, the derivative may contain one or more non-classical amino acids. Those skilled in the art will be aware of various methods for modifying peptides to increase potency, prolong activity and/or increase half-life. In one example (W00210195) the modification is made via coupling through an amide bond with at least one conformationally rigid substituent, either at the N-terminal of the peptide, the C-terminal of the peptide, or on a free amino or carboxyl group along the peptide chain. Other examples of peptide modifications with similar effects are described, for example, in W02004029081, W003086444, W003049684, W00145746, W00103723 and W09101743.

The invention further provides antibodies that comprise a peptide or polypeptide of the invention or that mimic the activity of peptides or polypeptides of the invention. Such antibodies include, but are not limited to: polyclonal, monoclonal, bi-specific, multi-specific, human, humanized, chimeric antibodies, single chain antibodies, Fab fragments, F(ab')₂ fragments, disulfide-linked Fvs and fragments containing either a VL or VH domain or even a complementary determining region (CDR) that specifically binds to a polypeptide of the invention.

In another embodiment, antibodies can also be generated using various phage display methods known in the art. Techniques to recombinantly produce Fab, Fab' and F(ab')₂ fragments can also be employed using methods known in the art such as those disclosed in PCT publication W0 92/22324; Mullinax, et al., BioTechniques, 12(6):864-869, 1992; and Sawai, et al., 1995, AJRI 34:26-34; and Better, et al., 1988, Science 240: 1041-1043 (each of which is incorporated by reference in its entirety). Examples of techniques that can be used to produce single-chain Fvs and antibodies include those described in U.S. Patent Nos. 4,946,778 and 5,258,498; Huston, et al., 1991, Methods in Enzymology 203: 46-88; Shu, et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7995-7999; and Skerra, et al., 1988, Science 240: 1038-1040. For some uses, including in vivo use of antibodies in humans and in vitro detection assays, it may be preferable to use chimeric, humanized, o

human antibodies. A chimeric antibody is a molecule in which different portions of the antibody are derived from different animal species, such as antibodies having a variable region derived from a murine monoclonal antibody and a constant region derived from a human immunoglobulin. Methods for producing chimeric antibodies are known in the art. See, e.g., Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi, et al., 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies, et al., 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; U.S. Patent Nos. 5,807,715; 4,816,567; and 4,816,397; which are incorporated herein by reference in their entireties. Humanized antibodies are antibody molecules from non-human species that bind the desired antigen having one or more complementarity determining regions (CDRs) from the non-human species and framework regions from a human immunoglobulin molecule or in the case of the present invention, one or more CDRs derived from a TREM-1 protein. As known in the art, framework residues in the human framework regions can be substituted with the corresponding residue from the CDR donor antibody to alter, preferably improve, antigen binding. These framework substitutions are identified by methods well known in the art, e.g., by modelling of the interactions of the CDR and framework residues to identify framework residues important for antigen binding and sequence comparison to identify unusual framework residues at particular positions. See, e.g., Queen, et al., U.S. Patent No. 5,585,089; Riechmann, et al., 1988, *Nature* 332:323, 1988, which are incorporated herein by reference in their entireties. Antibodies can be humanized using a variety of techniques known in the art including, for example, CDR-grafting (EP 239,400; PCT publication WO 91/09967; U.S. Patent Nos. 5,225,539; 5,530,101 and 5,585,089), veneering or resurfacing (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5): 489-498; Studnicka, et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6): 805-814; Roguska, et al., 1994 *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 91:969-973, and chain shuffling (U.S. Patent No. 5,565,332), all of which are hereby incorporated by reference in their entireties.

Completely human antibodies are particularly desirable for therapeutic treatment of human patients. Human antibodies can be made by a variety of methods known in the art including phage display methods described above using antibody libraries derived from human immunoglobulin sequences. See U.S. Patent Nos. 4,444,887 and 4,716,111; and PCT publications WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; and WO 91/10741, each of which is incorporated herein by reference in its entirety. Human antibodies can also be produced using transgenic mice (see Lonberg and Huszar (1995), *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). For a detailed discussion of this technology for producing human antibodies and human monoclonal antibodies and protocols for producing such antibodies, see, e.g., PCT publications WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; European Patent No. 0 598 877; U.S. Patent Nos. 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; and 5,939,598; which are incorporated by reference herein in their entireties. In addition, companies such as Abgenix, Inc. (Freemont, CA), Medarex (NJ) and Genpharm (San Jose, CA) can be engaged to provide human antibodies directed against a selected antigen using technology similar to that described above. Completely human antibodies which recognize a selected epitope can be generated using a technique referred to as "guided selection." In this approach a selected non-human monoclonal antibody, e.g., a mouse antibody, is used to guide the selection of a completely human antibody recognizing the same epitope. (Jespersen et al., 1988, *Bio/technology* 12:899-903). Antibodies fused or conjugated to heterologous polyp

peptides may be used in in vitro immunoassays and in purification methods (e.g., affinity chromatography) well known in the art. See, e.g., PCT publication Number WO 93/21232; EP 439,095; Naramura, et al., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99; U.S. Patent 5,474,981; Gillies, et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1428-1432; and Fell, et al., 1991, J. Immunol. 146:2446-2452, which are incorporated herein by reference in their entireties.

In another aspect, the present invention provides methods for identifying a compound or ligand that binds to or modulates the activity of a polypeptide of the invention. Such a method comprises measuring a biological activity of the polypeptide in the presence or absence of a test compound and identifying test compounds that alter (increase or decrease) the biological activity of the polypeptide.

In one embodiment, the invention provides a fusion protein comprising a bioactive molecule and one or more domains of a polypeptide of the invention or fragment thereof. In particular, the present invention provides fusion proteins comprising a bioactive molecule recombinantly fused or chemically conjugated (including both covalent and non-covalent conjugations) to one or more domains of a polypeptide of the invention or fragments thereof.

The present invention further encompasses fusion proteins in which the polypeptides of the invention or fragments thereof, are recombinantly fused or chemically conjugated (including both covalent and non-covalent conjugations) to heterologous polypeptides (i.e., an unrelated polypeptide or portion thereof, preferably at least 10, at least 20, at least 30, at least 40, at least 50, at least 60, at least 70, at least 80, at least 90 or at least 100 amino acids of the polypeptide) to generate fusion proteins. The fusion does not necessarily need to be direct, but may occur through linker sequences.

In one example, a fusion protein in which a polypeptide of the invention or a fragment thereof can be fused to sequences derived from various types of immunoglobulins. For example, a polypeptide of the invention can be fused to a constant region (e.g., hinge, CH2, and CH3 domains) of human IgG1 or IgM molecule, (for example, as described by Hudson & Souriauso (2003) Nature Medicine 9(1): 129134) so as to make the fused polypeptides or fragments thereof more soluble and stable in vivo. The short half-life of antibody fragments can also be extended by 'pegylation', that is, a fusion to polyethylene glycol (see Leong, S.R. et al. (2001) Cytokine 16: 106-119). In one example of such fusions, described in W00183525, Fc domains are fused with biologically active peptides. A pharmacologically active compound is produced by covalently linking an Fc domain to at least one amino acid of a selected peptide. Linkage to the vehicle increases the half-life of the peptide, which otherwise could be quickly degraded in vivo.

Alternatively, non-classical alternative protein scaffolds (for example see Nygren & Skerra (2004) J Immunol Methods 290(1-2): 3-28 or W003049684) can be used to incorporate, and replicate the properties of, the peptides of the invention, for example by inserting peptide sequences derived from TREM-1 CDR2 or CDR3 into a protein framework to support conformationally variable loops having structural/functional similarities to CDR2 or CDR3 in a fixed spatial arrangement.

Such fusion proteins or scaffold based proteins can be used as an immunogen for the production of specific antibodies which recognize the polypeptides of the invention or fragments thereof. In another preferred embodiment, such fusion proteins or scaffold based proteins can be administered to a subject so as to inhibit interactions between a ligand and its receptors in vivo. Such inhibit

ion of the interaction will block or suppress certain cellular responses involved in sepsis and septic shock.

In one aspect, the fusion protein comprises a polypeptide of the invention which is fused to a heterologous signal sequence at its N-terminus. Various signal sequences are commercially available. For example, the secretory sequences of melittin and human placental alkaline phosphatase (Stratagene; La Jolla, CA) are available as eukaryotic heterologous signal sequences. As examples of prokaryotic heterologous signal sequences, the *phoA* secretory signal (Sambrook, et al., supra; and Current Protocols in Molecular Biology, 1992, Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons) and the protein A secretory signal (Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ) can be listed. Another example is the gp67 secretory sequence of the baculovirus envelope protein (Current Protocols in Molecular Biology, 1992, Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons).

In another embodiment, a polypeptide of the invention can be fused to tag sequences, e.g., a hexa-histidine peptide, such as the tag provided in a pQE vector (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), among others, many of which are commercially available. As described in Gentz, et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, for instance, hexa-histidine provides for convenient purification of the fusion protein. Other examples of peptide tags are the hemagglutinin "HA" tag, which corresponds to an epitope derived from the influenza hemagglutinin protein (Wilson, et al., 1984, Cell 37: 767) and the "flag" tag (Knappik, et al., 1994, Biotechniques 17(4): 754-761). These tags are especially useful for purification of recombinantly produced polypeptides of the invention.

Fusion proteins can be produced by standard recombinant DNA techniques or by protein synthetic techniques, e.g., by use of a peptide synthesizer. For example, a nucleic acid molecule encoding a fusion protein can be synthesized by conventional techniques including automated DNA synthesizers. Alternatively, PCR amplification of gene fragments can be carried out using anchor primers which give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments which can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence (see, e.g., Current Protocols in Molecular Biology, 1992, Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons). The nucleotide sequence coding for a fusion protein can be inserted into an appropriate expression vector, i.e., a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted protein-coding sequence. Various host-vector systems and selection systems are known. In a specific embodiment, the expression of a fusion protein is regulated by a constitutive promoter. In another embodiment, the expression of a fusion protein is regulated by an inducible promoter. In accordance with these embodiments, the promoter may be a tissue-specific promoter. Expression vectors containing inserts of a gene encoding a fusion protein can be identified by three general approaches: (a) nucleic acid hybridization, (b) presence or absence of "marker" gene functions, and (c) expression of inserted sequences. In the first approach, the presence of a gene encoding a fusion protein in an expression vector can be detected by nucleic acid hybridization using probes comprising sequences that are homologous to an inserted gene encoding the fusion protein. In the second approach, the recombinant vector/host system can be identified and selected based upon the presence or absence of certain "marker" gene functions (e.g., thymidine kinase activity, resistance to antibiotics, transformation phenotype, occlusion body formation in baculovirus, etc.) caused by the insertion of a nucleo

tide sequence encoding a fusion protein in the vector. For example, if the nucleotide sequence encoding the fusion protein is inserted within the marker gene sequence of the vector, recombinants containing the gene encoding the fusion protein insert can be identified by the absence of the marker gene function. In the third approach, recombinant expression vectors can be identified by assaying the gene product (i.e., fusion protein) expressed by the recombinant. Such assays can be based, for example, on the physical or functional properties of the fusion protein in in vitro assay systems, e.g., binding with anti-fusion protein antibody. For longhighyield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines which stably express the fusion protein may be engineered. Rather than using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements (e.g., promoter, enhancer, sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.), and a selectable marker. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 12 days in an enriched medium, and then are switched to a selective medium. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines. This method may advantageously be used to engineer cell lines that express the differentially expressed or pathway gene protein. Such engineered cell lines may be particularly useful in screening and evaluation of compounds that affect the endogenous activity of the differentially expressed or pathway gene protein.

Once a fusion protein of the invention has been produced by recombinant expression, it may be purified by any method known in the art for purification of a protein, for example, by chromatography (e.g., ion exchange, affinity, particularly by affinity for the specific antibody, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique for the purification of proteins.

The present invention also provides methods for treating a subject suffering from sepsis, septic shock or a sepsis-like condition by administering a peptide or polypeptide of the invention. In another embodiment, the modulator may be an antibody which mimics the activity of a polypeptide of the invention. In particular, the invention provides a method of treating or ameliorating sepsis, septic shock or a sepsis-like condition in a subject, comprising: administering a therapeutically effective amount of a peptide or polypeptide of any one of the preceding claims to a subject. In such methods, the peptide or polypeptide administered can have substantial sequence identity to sequence SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19, is SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19, or an active fragment, analogue or derivative of SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19 or has at least about 80% sequence identity to SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19.

In one aspect, the invention provides a method for preventing sepsis, septic shock or sepsis-like conditions, by administering to the subject a peptide or polypeptide of the invention. Subjects at risk of sepsis or septic shock can be identified by, for example, any diagnostic or prognostic assays as known in the art (for particularly suitable methods of diagnosis, see WO2004081233, Gibot et al. (2004) *Ann Intern Med.* 141(1): 9-15 and Gibot et al. (2004) *N Engl J Med.* 350(5): 451-8. The prophylactic agents described herein, for example, can be used to treat a subject at risk of developing disorders such as those previously

discussed. The methods of the invention are applicable to mammals, for example humans, non human primates, sheep, pigs, cows, horses, goats, dogs, cats and rodents, such as mouse and rat. Generally, the methods of the invention are to be used with human subjects.

Furthermore, the invention provides a pharmaceutical composition comprising a polypeptide of the present invention or an antibody or fragments thereof that mimics a polypeptide of the invention. The peptides, polypeptides and antibodies (also referred to herein as "active compounds") of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration. Such compositions typically comprise the peptide, protein, or antibody and a pharmaceutically acceptable carrier.

As used herein the language "pharmaceutically acceptable diluent, carrier or excipient" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

The invention includes methods for preparing pharmaceutical compositions containing a peptide or polypeptide of the invention. Such compositions can further include additional active agents. Thus, the invention further includes methods for preparing a pharmaceutical composition by formulating a pharmaceutically acceptable carrier with a peptide or polypeptide of the invention and one or more additional active compounds.

A pharmaceutical composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, e.g., intravenous, intradermal, subcutaneous, transdermal (topical), transmucosal, intra-articular, intraperitoneal, and intrapleural, as well as oral, inhalation, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor ELTM (BASF; Parsippany, NJ) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy injectability with a syringe exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethano

l, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (e.g., a polypeptide or antibody) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle which contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying which yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient, such as starch or lactose; a disintegrating agent, such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant, such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant, such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent, such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent, such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring.

For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from a pressurized container or dispenser which contains a suitable propellant, e.g., a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer.

Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for transmucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. For transdermal administration, the active compounds are formulated into ointments, salves, gels or creams as generally known in the art. The compounds can also be prepared in the form of suppositories (e.g., with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

In one embodiment, the active compounds are prepared with carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a con

trolled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Patent No. 4,522,811.

It is especially advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of individuals.

As defined herein, a therapeutically effective amount of protein or polypeptide (i.e., an effective dosage) ranges from about 0.001 to 30 mg/kg body weight, preferably about 0.01 to 25 mg/kg body weight, more preferably about 0.1 to 20 mg/kg body weight, and even more preferably about 1 to 10 mg/kg, 2 to 9 mg/kg, 3 to 8 mg/kg, 4 to 7 mg/kg or 5 to 6 mg/kg body weight.

For antibodies, the preferred dosage is 0.1 mg/kg to 100 mg/kg of body weight (generally 10 mg/kg to 20 mg/kg). If the antibody is to act in the brain, a dosage of 50 mg/kg to 100 mg/kg is usually appropriate. Generally, partially human antibodies and fully human antibodies have a longer half-life within the human body than other antibodies. Accordingly, lower dosages and less frequent administration is often possible. Modifications such as lipidation can be used to stabilize antibodies and to enhance uptake and tissue penetration (e.g., into the brain). A method for lipidation of antibodies is described by Cruikshank, et al., 1997, J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 14 :193).

The pharmaceutical compositions can be included in a container, pack or dispenser together with instructions for administration.

The invention further provides a kit containing a peptide or polypeptide of the invention of the present invention, or an antibody or fragments thereof mimicking a polypeptide of the invention, preferably with instructions for use, for example in the treatment of sepsis, septic shock or sepsis-like conditions.

The invention provides a method for identifying (or screening) modulators, i.e., candidate or test compounds or agents (e.g., peptides, peptidomimetics, small molecules or other drugs) which mimic a polypeptide of the invention or have a stimulatory or inhibitory effect on, for example, activity of a polypeptide of the invention. In particular, the invention provides a method of screening compounds or compositions to treat sepsis, septic shock or sepsis-like conditions, comprising: providing a TREM-1 peptide; contacting an animal in a cecal ligation and puncture model (or using other assay as described herein or known in the art) with the TREM-1 peptide; determining if there was a modulation in the sep

sis, for example wherein an increase in survival indicates that the TREM-1 peptide may be useful for treating sepsis, septic shock or sepsis-like conditions.

The invention further pertains to novel agents identified by the above-described screening assays and uses thereof for treatments as described herein.

All publications, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as though fully set forth.

Preferred features of each aspect of the invention are applicable to each other aspect, *mutatis mutandis*.

The present invention will now be described with reference to the following non-limiting examples, with reference to the figures, in which:

Figure 1A. Figure 1A shows a sequence alignment of TREM-1 and TREM-2 family members. Human TREM-1 was aligned with mouse TREM-1 and human and mouse TREM-2 using version 1.74 of CLUSTAL W. Secondary structure assignments correspond to the published human TREM-1 structure (arrows for β -strands and cylinder for α helices) (Radaev et al. (2003) Structure (Camb) Dec.; 11(12): 1527-35). Residues involved in homo-heterodimer formation are shown in white on black background. Cysteine making disulfide bonds conserved for V-type Ig fold are in bold. Gaps are indicated with (-), identical residues with (*), similar with (: or .). An extended region of similarities between human and mouse TREM1 sequences is shown in boxes on grey background. TREM-1 peptide sequences used in the Examples herein are indicated underlined.

Figure 1B. Figure 1B shows a ribbon diagram of the published TREM-1 homodimeric structure (Kelker, et al. (2004) J Mol Biol. Sep. 24; 342(4): 1237-48). Postulated binding sites that comprise the antibody equivalent Complementarity Determining Regions (CDRs) are in red.

Figure 2. Figure 2 shows that administration of TREM-1 peptides, 1 hour before LPS, reduces death induced by endotoxaemia. BALB/c mice (10 per group) were injected intraperitoneally with 200 μ g LPS. The TREM-1 peptides P1, P2, P3, or P5 (200 μ l of a 300 μ M solution per mouse) were injected intraperitoneally 1 hour before LPS. Viability of mice was monitored twice a day for 7 days. Statistical analysis was performed by Logrank test. Data from control mice represent cumulative survival curves from two independent experiments performed under identical conditions.

Figure 3. Figure 3 shows that TREM-1 peptide P1 is able to effectively reduce death induced by endotoxaemia when injected at 4 hours after LPS. BALB/c mice (10 per group) were injected intraperitoneally with 200 μ g LPS. TREM-1 peptide P1, 200 μ l of a 300 μ M solution per mouse was injected intraperitoneally 1 hour before or 4 hours after LPS. Viability of mice was monitored twice a day for 7 days. Statistical analysis was performed with the Logrank test. Data from control mice represent cumulative survival curves from two independent experiments performed under identical conditions.

Figure 4. Figure 4 shows that administration of TREM-1 peptides, 4 hours after LPS, reduces death induced by endotoxaemia. BALB/c mice (10 per group) were injected intraperitoneally with 200 μ g LPS. P1 peptide, 200 μ l of a 150, 300 and 600 μ M per mouse (dots) or P3, 200 μ l of a 600 μ M solution per mouse (filled squares) were injected intraperitoneally 4 hours after LPS. Viability of mice was monitored twice a day for 7 days. Statistical analysis was performed with t

he Logrank test.

Figure 5. Figure 5 shows that TREM-1 peptide P1 protects against cecal ligation and puncture (CLP). CLP was induced in C57BL/6 mice (15 per group) as described in Materials and Methods. P1 peptide (empty dots) or P3 peptide (filled squares) (200 μ l of a 600 μ M solution per mouse) were injected intraperitoneally 5 and 24 hours after CLP induction. Viability of mice was monitored twice a day for 10 days. Statistical analysis was performed with the Logrank test.

Figure 6. Figure 6 shows that P1, P2 and P5 peptides, but not P3 peptide, inhibit the binding of soluble TREM-1/IgG1 to TREM-1 Ligand positive peritoneal exudate cells. Cytofluorimetric analysis of peritoneal exudate cells with 200 ng of mouse TREM-1/hIgG1 in the presence of 200 μ l of a 500 μ M solution per mouse (thin line), 200 μ l of a 100 μ M solution per mouse (dotted line) or absence (thick line) of the peptides is shown. The grey histogram represents immunostaining with human IgG1 as a control.

Figure 7A. Figure 7A shows the release of sTREM-1 from cultured monocytes after stimulation with LPS with and without proteases inhibitor. LPS stimulation induced the appearance of a 27-kD protein that was specifically recognized by an anti-TREM-1 mAb (inset). sTREM-1 levels in the conditioned culture medium were measured by reflectance of immunodots. Data are shown as mean $\pm$ SD (n = 3).

Figure 7B. Figure 7B shows expression of TREM-1 mRNA in monocytes. Cultured monocytes were stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 0, 1 and 16 hours as indicated.

LPS induced TREM-1 mRNA production within 1 hour.

Figure 8A. Figure 8A shows the release of cytokines and sTREM-1 from cultured monocytes. For cell activation, primary monocytes were cultured in 24-well flat-bottom tissue culture plates in the presence of LPS (1 μ g/mL). In some experiments this stimulus was provided in combination with P5 (10 to 100 ng/mL), control peptide (10 to 100 ng/mL) or rIL-10 (500 U/mL). To activate monocytes through TREM-1, an agonist anti-TREM-1 mAb (10 μ g/mL) was added as indicated. Cell-free supernatants were analysed for production of TNF- α , IL-1 β and sTREM-1 by ELISA or immunodot. All experiments were performed in triplicate and data are expressed as means (SEM).

- a: Media
- b: P5 10 ng/mL
- c: Anti-TREM-1
- d: LPS
- e: LPS + Anti-TREM-1
- f: LPS + P5 10 ng/mL
- g: LPS + P5 50 ng/mL
- h: LPS + P5 100 ng/mL
- i: LPS + IL10

Figure 8B. Figure 8B shows the effect of P5 on NF κ B activation. Monocytes were cultured for 24 hours in the presence of E.coli LPS (0111:B4, 1 μ g/mL), anti-TREM-1 mAb (10 μ g/mL) and / or P5 (100 ng/mL) as indicated and the levels of NF κ B p50 and p65 were determined using an ELISA-based assay. Experiments were performed in triplicate and data are expressed as means of optical densities (SEM).

Figure 9. Figure 9 shows accumulation of sTREM-1 in serum of LPS-treated mice.

Male Balb/C mice (20 to 23 g) were treated with LPS (LD₅₀, intraperitoneally).

Serum was assayed for sTREM-1 by immunodot. Serum sTREM-1 was readily detectable 1 hour after LPS administration and was maintained at a plateau level from 4 to 6 hours.

Figure 10A. Figure 10A shows that P5 pre-treatment protects against LPS lethality in mice. Male Balb/C mice (20 to 23 g) were randomly grouped (10 mice per group) and treated with an LD₁₀₀ of LPS. P5 (50 µg or 100 µg) or control vector was administered 60 min before LPS.

Figure 10B. Figure 10B shows that delayed administration of P5 protects LPS lethality in mice. Male Balb/C mice (20 to 23 g) were randomly grouped (8 mice per group) and treated with an LD₁₀₀ of LPS. P5 (75 µg) or control vector was administered 4 or 6 hours after LPS as indicated.

Figure 10C. Figure 10C shows that administration of agonist TREM-1 mAb is lethal to mice. Male Balb/C mice (20 to 23 g) were randomly grouped (8 mice per group) and treated with a combination of an LD₅₀ of LPS + control vector, LD₅₀ of LPS + anti-TREM-1 mAb (5 µg) or LD₁₀₀ of LPS + control vector as indicated. Control vector and anti-TREM-1 mAb were administered 1 hour after LPS injection.

Figure 11A. Figure 11A shows that P5 partially protects mice from CLP-induced lethality. Male Balb/C mice (20 to 23 g) were randomly grouped and treated with normal saline (n = 14) or the control peptide (n = 14, 100 µg) or with P5 (100 µg) in a single infection at H0 (n = 18), H + 4 (n = 18) or H + 24 (n = 18). The last group of mice (n = 18) was treated with repeated injections of P5 (100 µg) at H + 4, H + 8 and H + 24.

Figure 11B. Figure 11B shows the dose effect of P5 on survival. Mice (n = 15 per group) were treated with a single injection of normal saline or 10 µg, 20 µg, 50 µg, 100 µg or 200 µg of P5 at H0 after the CLP and monitored for survival.

Figure 12. Figure 12 shows that P5 has no effect on bacterial counts during CLP. Mice (5 per group) were killed under anaesthesia at 24 hours after CLP. Bacterial counts in peritoneal lavage fluid and blood were determined and results are expressed as CFU per mL of blood and CFU per mouse for the peritoneal lavage.

Figure 13. Figure 13 shows TNF-α and IL-1β plasma concentration evolution after LPS (15 mg/kg) administration in rats.

* p < 0.05 P5-treated vs Control animals

§ p < 0.05 P5-treated vs P1-treated animals

Figure 14. Figure 14 shows Nitrite/Nitrate concentrations evolution after LPS (15 mg/kg) administration in rats.

* p < 0.05 P5-treated vs Control and P1-treated animals

Figure 15. Figure 15 shows mean arterial pressure evolution during caecal ligation and puncture-induced peritonitis in rats.

* p < 0.05 vs Control animals

Figure 16. Figure 16 shows TNF-α plasma concentration evolution during caecal ligation and puncture-induced peritonitis in rats.

* p < 0.05 P5-treated vs Control animals

§ p < 0.05 P1-treated vs Control animals

§ p < 0.05 P5 vs P1-treated animals

Figure 17. Figure 17 shows Nitrite/Nitrate concentration evolution during caecal ligation and puncture-induced peritonitis in rats.

* p < 0.05 P5 and P1-treated vs Control animals

(Example 1): TREM-1 peptides protect mice from death by septic shock

TREM-1 peptides matching the following criteria were synthesized: i) highest homology between human and mouse TREM-1 and lowest homology with TREM-2. ii) peptides spanning the Complementarity Determining Regions (CDRs) of TREM-1.

According to the published crystal structure of TREM-1, and in analogy with antibodies, these residues are likely to be involved in cognate ligand recognition (Radaev et al. (2003) Structure (Camb) Dec.; 11(12): 1527-35 & Kelker, et al. (2004) J Mol Biol. Sep 24; 342(4): 1237-48) (see Figure 1). One peptide (P1) was designed in the CDR2 region and three peptides (P2, P4 and P5) in the CDR3 region. A fourth peptide (P3) was designed in the neck region connecting the V-type immunoglobulin (Ig)-like domain (Ig-V) to the trans-membrane domain. No peptide was designed in the CDR1 region due to high sequence homology between TREM-1 and TREM-2.

Thus, the following peptides of the TREM-1 protein were ordered from and were synthesized and purified by the Protein and Peptide Chemistry Facility, Institute of Biochemistry, University of Lausanne:

P1	(CDR2 67-89)	LVVTQRPFTRPSEVHMGKFTLKH	[SEQ ID NO:3]
P2	(CDR3 114-136)	VIYHPPNDPVVLFHPVRLVVTGK	[SEQ ID NO:4]
P3	(neck region 168-184)	TTTRSLPKPTAVVSSPG	[SEQ ID NO:5]
P4	(CDR3 103-123)	LQVTDSGLYRCVIYHPPNDPV	[SEQ ID NO:6]
P5	(CDR3 103-119):	LQVTDSGLYRCVIYHPP	[SEQ ID NO:7]
P1sc*	(P1 scrambled seq.)	LTPKHGQRSTHVTKFRVFEPVML	[SEQ ID NO:8]
P5sc*	(P5 scrambled seq.)	TDSRCVIGLYHPPLQVY	[SEQ ID NO:9]

*This is a control peptide and indeed does not protect.

In the experiments of this example, the peptides were administered in a volume of 200 μ l of the solution molarity indicated. To assess the ability of TREM1-peptides to protect mice from LPS-induced endotoxaemia, the Inventors administered peptides P1, P2, P3 and P5 (300 μ M) 1 hour before a lethal dose of lipopolysaccharide (LPS) (Figure 2). Lethality was monitored over time and compared with animals that had received control injections of vehicle alone. P5 injection confers maximal protection, with 90 % of the animals still alive 7 days after LPS injection, as compared with 10 % of control mice ($p < 0.001$). 60 % of the P1-treated mice and 50 % of the P2 treated mice survived endotoxaemia as compared with 10 % of control mice ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively). Interestingly, all P3-treated mice died within 4 days after LPS injection. These results indicate that peptides containing sequences of the extracellular portion of TREM-1 corresponding to the putative ligand binding site (CDR2 and CDR3) can protect mice from lethal shock.

In order to investigate whether TREM-1 peptide treatment could be delayed until after the administration of LPS, the Inventors injected the peptides at 4 hours after LPS injection. Only in the case of P1, this delayed treatment conferred significant protection against a lethal dose of LPS (Figure 3). 80 % of the mice injected with P1 4 hours after LPS survived endotoxaemia compared to 60 % of mice treated 1 h before LPS and 10 % of mice treated with vehicle alone ($p < 0.001$ and $p < 0.01$ respectively). Thus, P1 is effective even when injected after the outbreak of endotoxaemia. No late death occurred over one week, indicating that P1 did not merely delay the onset of LPS lethality, but provided lasting protection. P1 administration conferred maximal protection (80 %) when administered at 600 μ M ($p < 0.01$) and the level of protection dropped to 50 % at 300 μ M ($p < 0.05$) and further down to 30 % at 150 μ M as compared to 20% of control mice, indicating a dose dependent effect of P1 (Figure 4). The Inventors then investigated whether P1 protects against septic shock in the "CLP" model (Cecal Ligation and Puncture is a widely used experimental model of sepsis). Mice treated with two doses of P1 at 5 and 24 hours after CLP were protected from death as c

ompared to control treated mice ($p = 0.0791$) although the difference was not statistically significant. 40 % of the mice injected with P1 at 5 days after CLP survived compared to 5 % of mice treated with P3 peptide. At 10 days after CLP, the treated mice were still alive, indicating that P1 did not merely delayed mortality, but provided lasting protection (Figure 5).

(Example 2): TREM-1 peptide P1 inhibits binding of soluble mouse TREM-1/IgG to TREM-1 ligand positive cells

Among TREM-1 derived peptides tested in CLP, peptides P1, P2 and P5 demonstrate a protective activity. A possible mechanism of action could be the ability of TREM-1 derived peptide to interfere with TREM-1/TREM-1 ligand interaction. To address this question the Inventors performed competition experiments on TREM-1 ligand positive cells: PEC (Peritoneal Exudate Cells) from CLP treated mice.

Peritoneal exudate cells (PEC) or peripheral blood cells from mice suffering from a caecal ligation and puncture (CLP)-induced peritonitis were subjected to flow cytometry analysis after incubation with a soluble mouse TREM-1/IgG1 chimera or with a control IgG1. Binding was then revealed using a FITC-stained anti-human IgG1 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA). Cells were double stained with a PE-conjugated anti-GR1 or anti-Ly-6G (BD Bioscience, Milano, Italy). Competition with TREM-1 peptides was performed by pre-incubating cells with the indicated concentrations of peptides for 45 minutes on ice before adding mTREM-1-IgG1. In order to increase the sensitivity some staining were also performed using tetramerized TREM-1/IgG1 generated as follows: for each staining sample 8 μ g of mTREM-1/IgG1 or control IgG1 were complexed with Protein A Alexa 488-conjugate (Molecular Probes, Brussels, Belgium) at a 4:1 molar ratio for 30 minutes in a PBS/BSA 0.5% buffer, at room temperature in the dark. Additional human IgG1 (10 μ g) was added to the solution in order to completely block the non-specific binding sites of protein A antibody.

As shown in Figure 6, the P1 peptide, derived from the CDR2 region of mTREM-1, and the P2 and P5 peptides spanning the CDR3 region inhibit TREM-1 interaction with its ligand in a dose dependent manner. Conversely the P3 peptide, derived from the neck region of TREM-1 connecting the IgG like portion to the transmembrane domain was ineffective.

(Example 3): Additional studies on the modulation of the inflammatory response in murine sepsis by TREM-1 peptide P5

(Methods)

(Preparation of monocytes from peripheral blood)

Ten mL of peripheral blood samples were collected on EDTA-K from 5 healthy volunteer donors originating from laboratory staff. After dilution in RPMI (Life Technologies, Grand Island, NY) v/v, blood was centrifuged for 30 min at room temperature over a Ficoll gradient (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) to isolate PBMC. The cells recovered above the gradient were washed and counted. In order to deplete the suspensions of lymphocytes, cells were then plated in 24-well flat-bottom tissue culture plates (Corning, Corning, NY) at a concentration of 5×10^6 /mL and allowed to adhere during 2 hours at 37°C. The resulting lymphocyte suspension was discarded and the adhering monocytic cells were maintained in a 5 % CO2 incubator at 37°C in complete medium (RPMI 1640, 0.1 mM sodium pyruvate, 2 mM Penicillin, 50 μ g/mL Streptomycin; Life Technologies) supplemented with 10 % FCS (Invitrogen, Cergy, France).

(TREM-1 peptide)

Using the human TREM-1 sequence in Gen-Bank, accession #AF287008 and the mouse TREM-1 sequence #AF241219, a peptide "P5" (LQVTDSGLYRCVIYHPP; [SEQ ID NO: 7]); was chemically synthesized as a C-terminally amidated peptide (Pepscan Systems, Lelystad, The Netherlands). The correct peptide was obtained in greater than 99% yield and with measured mass of 1961 Da versus a calculated mass of 1962 Da and was homogeneous after preparative purification, as confirmed by mass spectrometry and analytic reversed phase-high performance liquid chromatography. A peptide "P5sc" containing the same amino-acids than P5 but in a different sequence order (TDSRCVIGLYHPPLQVY; [SEQ ID NO:9]) was similarly synthesized and served as 'control peptide'.

(In vitro stimulation of monocytes)

For activation, monocytes were cultured in the presence of E.coli LPS (0111: B4, 1 µg/mL, Sigma-Aldrich, La Verpilliere, France). Cell viability was assessed by trypan blue exclusion and by measuring lactate dehydrogenase release. In some experiments, this stimulus was given in combination with TNF-α (5 to 100 ng/mL, R&D Systems, Lille, France), IL-1β (5 to 100 ng/mL, R&D Systems), rIFN-γ (up to 100 U/mL, R&D Systems), rIL-10 (500 U/ml, R&D Systems) or up to 100 ng/mL of P5 or control peptide.

In order to activate monocytes through TREM-1, an anti-TREM-1 agonist monoclonal antibody (R&D Systems) was added as follows: flat-bottom plates were precoated with 10 µg/mL anti-TREM-1 per well. After thorough washing in phosphate buffered saline (PBS), the monocyte suspensions were added at a similar concentration as above. Some experiments were performed in the presence of protease inhibitors (PMSF and Protease Cocktail Inhibitor; Invitrogen). Cell-free supernatants were assayed for the production of TNF-α and IL-1β by ELISA according to the recommendations of the manufacturer (BD Biosciences, San Diego, USA). To address the effect of P5 on NF-κB activity in monocytes, an ELISA-based assay was performed (BD Mercury™ Transfactor Kit, BD Biosciences). Monocytes were cultured for 24 hours in the presence of E.coli LPS (0111:B4, 1 µg/mL), and / or an agonist anti-TREM-1 monoclonal antibody (10 µg/mL), and / or P5 (100 ng/mL). Whole-cell extracts were then prepared and levels of NF-κB p50 and p65 were determined according to the recommendations of the manufacturer. All experiments were performed in triplicate and data are expressed as means (SEM).

(Identification and quantitation of sTREM-1 release)

Primary monocytes suspensions were cultured as described above. The cells were treated with E.coli LPS (0111:B4, 1 µg/mL) for 24 hours at 37°C. Cell-conditioned medium was submitted to Western-blotting using an anti-TREM-1 monoclonal antibody (R&D Systems) in order to confirm the presence of 27 kDa material recognized by anti-TREM-1. Soluble TREM-1 levels were measured by assessing the optical intensity of bands on immunodots by means of a reflectance scanner and the Quantity One Quantitation Software (Bio-Rad, Cergy, France) as reported elsewhere (18). Soluble TREM-1 concentration from each sample was determined by comparing the optical densities of the samples with reference to standard curves generated with purified TREM-1. All measurements were performed in triplicate. The sensitivity of this technique allows the detection of sTREM-1 levels as low as 5 pg/mL.

(TREM-1 RT-PCR)

Total mRNA was extracted from primary monocytes cultured in the presence of LPS using a TRIzol reagent (Invitrogen), and reverse transcribed using Superscript RT II (Invitrogen) to generate cDNA. RT-PCR conditions then used for all

reactions were 94°C, 30 s/65°C, 30 s/68°C, 1 min for 30 cycles. Amplification was performed with 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 2.0 U Taq polymerase, and 20 pM 5' and 3' oligonucleotide primers (Proligos, Paris, France).

The sequences of the 5' and 3' primer pairs used were the following:

for TREM-1 (17)

TTGTCTCAGAACTCCGAGCTGC; [SEQ ID NO:10]

and

GAGACATCGGCAGTTGACTTGG; [SEQ ID NO:11]

for TREM-1sv (19)

GGACGGAGAGATGCCCAAGACC; [SEQ ID NO:12]

and

ACCAGCCAGGAGAATGACAATG; [SEQ ID NO:13]

for β -actin (used as housekeeping amplicon)

GGACGACATGGAGAAGATCTGG; [SEQ ID NO:14]

and

ATAGTAATGTCACGCACGATTTCC; [SEQ ID NO:15]

PCR products were run on agarose gels and visualized by ethidium bromide staining.

(LPS-induced endotoxemia in mice)

After approval by the local ethical committee, male Balb/C mice (20 to 23g) were randomly grouped and treated with E.coli LPS intraperitoneally (i.p.) in combination with P5 (in 500 μ l normal saline) or control vector before or after LPS challenge. In some experiments, 5 μ g of an anti TREM-1 monoclonal antibody was administered i.p. one hour after LPS injection. The viability of mice was examined every hour, or animals were sacrificed at regular intervals. Serum samples were collected by cardiac puncture and assayed for TNF- α and IL-1 β by ELISA (BD Biosciences), and for sTREM-1 levels by immunodot.

(CLP polymicrobial sepsis model)

Male Balb/C mice (7 to 9 weeks, 20 to 23g) were anaesthetized by i.p. administration of ketamine and xylazine in 0.2 mL sterile pyrogen-free saline. The caecum was exposed through a 1.0 cm abdominal midline incision and subjected to a ligation of the distal half followed by two punctures with a G21 needle. A small amount of stool was expelled from the punctures to ensure patency. The caecum was replaced into the peritoneal cavity and the abdominal incision closed in two layers. After surgery all mice were injected s.c. with 0.5 ml of physiologic saline solution for fluid resuscitation and s.c. every 12 h with 1.25 mg (i.e. 50 μ g/g) of imipenem. The animals were randomly grouped and treated with normal saline (n = 14), the control peptide (n = 14, 100 μ g) or P5 (100 μ g) in a single injection at H0 (n = 18), H + 4 (n = 18) or H + 24 (n = 18). The last group of mice (n = 18) was treated with repeated injections of P5 (100 μ g) at H + 4, H + 8 and H + 24. All treatments were diluted into 500 μ l of normal saline and

administered i.p. The Inventors next sought to determine the effect of various doses of P5. For this purpose, mice (n = 15 per group) were treated with a single injection of normal saline or 10 μ g, 20 μ g, 50 μ g, 100 μ g or 200 μ g of P5 at H0 after the CLP and monitored for survival. Five additional animals per group were killed under anaesthesia 24 hours after CLP for the determination of bacterial count and cytokines levels. Peritoneal lavage fluid was obtained using 2mL RPMI 1640 (Life Technologies) and blood was collected by cardiac puncture. Co

Concentrations of TNF- α and IL-1 β in the serum were determined by ELISA (BD Biosciences). For the assessment of bacterial counts, blood and peritoneal lavage fluid were plated in serial log dilutions on tryptic soy supplemented with 5% sheep blood agar plates. After plating, tryptic soy agar plates were incubated at 37°C aerobically for 24 hours, and anaerobically for 48 hours. Results are expressed as CFU per mL of blood and CFU per mouse for the peritoneal lavage.

(Statistical analyses)

Serum sTREM-1 and cytokines levels were expressed as mean ($\pm$ SD). The protection against LPS lethality by P5 was assessed by comparison of survival curves using the Log-Rank test. All statistical analyses were completed with Statview software (Abacus Concepts, Berkeley CA) and a two-tailed $P < 0.05$ was considered significant.

(Results)

(A soluble form of TREM-1 is released from cultured human monocytes after stimulation with E.coli LPS)

To identify the potential release of sTREM-1 in vitro, the Inventors stimulated human monocytes with LPS and analyzed the conditioned culture medium by SDSPAGE. LPS stimulation induced the appearance of a 27-kDa protein in a time-dependent manner (Figure 7A). Western blotting analysis revealed that this protein was specifically recognized by a monoclonal antibody directed against the extra-cellular domain of TREM-1 (Figure 7A). Cell viability was unaffected at LPS concentrations that induced the presence of sTREM-1 in conditioned medium, indicating that TREM-1 release was not due to cell death. Similarly, treatment of monocytes with protease inhibitors did not affect TREM-1 release (Figure 7A). TREM-1 mRNA levels were increased upon LPS treatment (Figure 7B) whereas TREM-1sv mRNA levels remained undetectable. This suggests that TREM-1 release is likely to be linked to an increased transcription of the gene and unrelated to TREM-1sv expression.

Stimulation of monocytes for 16 hours with TNF- α (5 to 100 ng/mL) or IL-1 β (5 to 100 ng/mL) induced very small TREM-1 release in a cytokine dose-dependent manner. Stimulation with IFN- γ did not induce TREM-1 release, even at concentrations of up to 100 U/mL.

(LPS associated release of pro-inflammatory cytokines is attenuated by P5)

Significant TNF- α and IL-1 β production was observed in the supernatant of monocytes cultured with LPS. TNF- α and IL-1 β production was even higher for cells cultured with both TREM-1 mAb and LPS as compared with those cultured with mAb or LPS alone (Figure 8A).

The inducible release of pro-inflammatory cytokines was significantly lower after LPS stimulation when the medium was supplemented with P5 or IL-10. P5 reduced, in a concentration-dependent manner, the TNF- α and IL-1 β production from cells cultured with LPS or with LPS and mAb and simultaneously increased the release of sTREM-1 from cells cultured with LPS. The control peptide displayed no action on cytokines or sTREM-1 release (data not shown). In striking contrast, IL-10 totally inhibited the release of both TREM-1 and inflammatory cytokines (Figure 8A). Both LPS and TREM-1 mAb induced a strong activation of monocyte NF- κ B p50 and p65 and combined administration of LPS and TREM-1 mAb lead to a synergistic effect. P5 inhibited the NF- κ B activation induced by the engagement of TREM-1 but did not alter the effect of LPS (Figure 8B).

(Serum sTREM-1 levels of LPS-treated mice are increased)

In order to determine whether sTREM-1 was released systemically during

ndotoxemia in mice, the Inventors measured serum sTREM-1 levels after LPS administration. Serum sTREM-1 was readily detectable 1 hour after administration of a n LD50 dose of LPS and was maintained at peak plateau levels from 4 to 6 hours a fter LPS treatment (Figure 9).

(TREM-1 peptide "P5" protects endotoxemic mice from lethality)

Mice treated by a single dose of P5 60 min before a lethal dose (LD100) of LPS were prevented from death in a dose-dependent manner (Figure 10A). In order to investigate whether P5 treatment could be delayed until after the administration of LPS, the Inventors injected P5 beginning 4 or 6 hours after LPS injection. This delayed treatment up to 4 hours conferred significant protection against a LD100 dose of LPS (Figure 10B). No late death occurred over one week, indicating that P5 did not merely delay the onset of LPS lethality, but provided lasting protection. Control mice all developed lethargy, piloerection, and diarrhoea before death. By contrast, P5-treated mice remained well groomed and active, had no diarrhoea, and were lively. To clarify the mechanism by which P5 protected mice from LPS lethality, the Inventors determined the serum levels of TNF- α , IL-1 β and sTREM-1 of endotoxemic mice at 2 and 4 hours. As compared to controls, pre-treatment by 100 μ g of P5 reduced cytokines levels by 30 % and increased sTREM-1 levels by 2 fold as shown in Table 4:

【表 4】

Table 4. Serum concentrations of TNF- α , IL-1 β and sTREM-1 in endotoxemic mice.

	TNF- α (ng/mL)		IL-1 β (ng/mL)		sTREM-1 (ng/mL)	
	H2	H4	H2	H4	H2	H4
Control	3.3 $\pm$ 1.0	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.2	249 $\pm$ 48	139 $\pm$ 8
P5 (100 μ g)	2.4 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2	475 $\pm$ 37	243 $\pm$ 28

(Engagement of TREM-1 is lethal to mice)

To further highlight the role of TREM-1 engagement in LPS-mediated mortality, mice were treated with agonist anti-TREM-1 mAb in combination with the administration of an LD50 dose of LPS. This induced a significant increase in mortality rate from 50 % to 100 % (Figure 10C).

(P5 protects mice from CLP-induced lethality)

To investigate the role of P5 in a more relevant model of septic shock, the Inventors performed CLP experiments (Figure 11A). The control groups comprised mice injected with normal saline or with the control peptide. In this model of polymicrobial sepsis, P5 still conferred a significant protection against lethality even when administered as late as 24 hours after the onset of sepsis. Interestingly, repeated injections of P5 had the more favourable effect on survival ($P < 0.01$). There was a dose response effect of P5 on survival (Figure 11B) and cytokine production (Table 5). P5 had no effect on bacterial clearance (Figure 12).

【表 5】

Table 5. Serum concentrations of TNF- α , IL-1 β and sTREM-1 at 24 hours after CLP.

	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	sTREM-1 (ng/mL)
Control peptide	105 $\pm$ 12	841 $\pm$ 204	52 $\pm$ 3
Control saline	118 $\pm$ 8	792 $\pm$ 198	35 $\pm$ 5
P5 10 μ g	110 $\pm$ 11	356 $\pm$ 62	43 $\pm$ 8
P5 20 μ g	89 $\pm$ 10	324 $\pm$ 58	58 $\pm$ 8
P5 50 μ g	24 $\pm$ 6	57 $\pm$ 11	93 $\pm$ 10
P5 100 μ g	20 $\pm$ 3	31 $\pm$ 3	118 $\pm$ 12
P5 200 μ g	21 $\pm$ 7	37 $\pm$ 8	158 $\pm$ 13

Sepsis exemplifies a complex clinical syndrome that results from a harmful or damaging host response to severe infection. Sepsis develops when the initial, appropriate host response to systemic infection becomes amplified, and then dysregulated (4, 5). Neutrophils and monocyte/macrophages exposed to LPS, for instance, are activated and release such pro-inflammatory cytokines as TNF- α and IL-1 β . Excessive production of these cytokines is widely believed to contribute to the multi-organ failure that is seen in septic patients (20-23).

TREM-1 is a recently identified molecule involved in monocytic activation and inflammatory response (12, 14). It belongs to a family related to NK cell receptors that activate downstream signalling events. The expression of TREM-1 on PNNs and monocytes/macrophages has been shown to be inducible by LPS (16, 17).

As described herein, the Inventors demonstrate that a soluble form of TREM-1 was released from cultured human monocytes after stimulation with E.coli LPS. Such a soluble form was also detectable in the serum of endotoxemic mice as early as 1 hour after LPS challenge. This is consistent with the implication of TREM-1 in the very early phases of the innate immune response to infection (14, 15, 24). The mechanism by which sTREM-1 is released is not clearly elucidated but seems to be related to an increased transcription of the TREM-1 gene. Nevertheless, although incubation with a protease inhibitor cocktail does not alter the sTREM-1 release, cleavage of the surface TREM-1 from the membrane cannot be totally excluded. Interestingly, stimulation of human monocytes with such pro-inflammatory cytokines as TNF- α , IL-1 β or IFN- γ induced very small sTREM-1 release unless LPS was added as a co-stimulus. The expression of an alternative mRNA TREM-1 splice variant (TREM-1sv) has been detected in monocytes that might translate into a soluble receptor (18) upon stimulation with cell wall fraction of *Mycobacterium bovis* BCG but not LPS (25). This was confirmed in this study as i) LPS did not increase the level of mRNA TREM-1sv in monocytes and ii) only a 27-kDa protein was released by monocytes upon LPS stimulation and not the 17.5-kDa variant.

Although its natural ligand has not been identified (13, 14), engagement of TREM-1 on monocytes with an agonist monoclonal antibody resulted in a further enhancement of pro-inflammatory cytokines production, while P5 induced a decrease of these syntheses in a concentration-dependent manner, and IL-10 completely suppressed it.

Inflammatory cytokines, and especially TNF- α , are considered to be deleterious, yet they also possess beneficial effects in sepsis (5) as shown by the fatal issue of peritonitis in animals with impaired TNF- α responses (9-11). Moreover, in clinical trials, the inhibition of TNF- α increased mortality (8). Finally, the role of TNF- α in the clearance of infection has been highlighted by the finding that sepsis is a frequent complication in rheumatoid arthritis patients treated with TNF- α antagonists (26).

The mechanism by which P5 modulates cytokine production is not yet clear. P5 comprises the complementary determining region (CDR)-3 and the 'F' β strand of the extra-cellular domain of TREM-1. The latter contains a tyrosine residue mediating dimerization. Radaev et al postulated that TREM-1 captures its ligand with its CDR-equivalent loop regions (27). P5 could thus impair TREM-1 dimerization and/or compete with the natural ligand of TREM-1. Moreover, the increase of sTREM-1 release from monocytes mediated by P5 could prevent the engagement of membrane TREM-1, sTREM-1 acting as a decoy receptor, as in the TNF- α system (28, 29).

Activation of the transcription factor NF- κ B is a critical step in monocyte inflammatory cytokine production after exposure to bacterial stimuli such as LPS (30, 31). Among the various NF- κ B/Rel dimers, the p65/p50 heterodimer is the prototypical form of LPS-inducible NF- κ B in monocytes (32). P5 abolishes the p65/p50 NF- κ B over-activation induced by the engagement of TREM-1. This might at least partially explain the effects of P5 on cytokine production and the protection from lethality shown here to occur when the peptide was injected one hour before LPS-induced septic shock, or even up to 4 hours after.

Endotoxemia is simple to achieve experimentally, but imperfectly suited to reproduce human sepsis, while polymicrobial sepsis induced by CLP is a more complex but better model, including the use of fluid resuscitation and antibiotics. The latter was thus also used in this study, and confirmed the dose-dependent protection provided by P5, even when administered as late as 24 hours after the onset of sepsis. The favourable effect of P5 was however unrelated to an enhanced bacterial clearance.

One difficulty in the use of immunomodulatory therapies is that it is not possible to predict the development of sepsis, and, thus, patients receiving those treatments frequently already have well-established sepsis (6). Since P5 appeared to be effective even when injected after the outbreak of sepsis, it could thus constitute a realistic treatment (24, 33).

By contrast, engagement of TREM-1 by an agonist anti-TREM-1 monoclonal antibody mediated a dramatic increase of mortality rate in LPS-challenged mice: this further underscores the detrimental effect of TREM-1 engagement during septic shock.

Experimental septic shock reproduces human sepsis only in part. Indeed, our group recently showed that significant levels of sTREM-1 were released in the serum of critically ill patients with sepsis patients (34), the highest levels being observed in patients who survived. This is consistent with our experimental findings indicating that the more important sTREM-1 release, the more favourable is the outcome, and thus sustains, at least theoretically, the potential value of soluble TREM peptides as post-onset sepsis therapy.

TREM-1 appears to be a crucial player in the immediate immune response triggered by infection. In the early phase of infection, neutrophils and monocytes initiate the inflammatory response owing to the engagement of pattern recogni

tion receptors by microbial products (3, 4). At the same time, bacterial products induce the up-regulation and the release of sTREM-1. Upon recognition of an unknown ligand, TREM-1 activates signalling pathways which amplify these inflammatory responses, notably in monocytes/macrophages. The modulation of TREM-1 signalling reduces, although without complete inhibition, cytokine production and protects septic animals from hyper-responsiveness and death. Modulation of TREM-1 engagement with such a peptide as P5 might be a suitable therapeutic tool for the treatment of sepsis, particularly because it seems to be active even after the onset of sepsis following infectious aggression.

(Example 4): Haemodynamic studies in LPS treated and septic rats treated with P1 and P5

The role of TREM-1 peptides in further models of septic shock, was investigated by performing LPS and CLP (caecal ligation and puncture) experiments in rats.

(Materials and Methods)

(LPS-induced Endotoxemia)

Animals were randomly grouped (n = 10 - 20) and treated with *Escherichia coli* LPS (0111: B4, Sigma-Aldrich, Lyon, France) i.p. in combination with the TREM-1 or scrambled peptides.

(CLP Polymicrobial Sepsis Model)

The procedure has been described in details elsewhere (see Mansart, A. et al. Shock 19: 38-44 (2003)). Briefly, rats (n = 6 - 10 per group) were anesthetized by i.p. administration of ketamine (150 mg/kg). The caecum was exposed through a 3.0-cm abdominal midline incision and subjected to a ligation of the distal half followed by two punctures with a G21 needle. A small amount of stool was expelled from the punctures to ensure potency. The caecum was replaced into the peritoneal cavity and the abdominal incision closed in two layers. After surgery, all rats were injected s.c. with 50 mL/kg of normal saline solution for fluid resuscitation. TREM-1 or scrambled peptides were then administered as above.

(Haemodynamic Measurements in rats)

Immediately after LPS administration as well as 16 hours after CLP, arterial BP (systolic, diastolic, and mean), heart rate, abdominal aortic blood flow and mesenteric blood flow were recorded using a procedure described elsewhere (see Mansart, A. et al. Shock 19:38-44 (2003)). Briefly, the left carotid artery and the left jugular vein were cannulated with PE-50 tubing. Arterial BP was continuously monitored by a pressure transducer and an amplifier-recorder system (IOX EMKA Technologies, Paris, France). Perivascular probes (Transonic Systems, Ithaca, NY) wrapped up the upper abdominal aorta and mesenteric artery, allowed to monitor their respective flows by means of a flowmeter (Transonic Systems).

After the last measurement (4th hour during LPS experiments and 24th hour after CLP), animals were sacrificed by an overdose of sodium thiopental i.v.

(Biological Measurements)

Blood was sequentially withdrawn from the left carotid artery. Arterial lactate concentrations and blood gases analyses were performed on an automatic blood gas analyser (ABL 735, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Concentrations of TNF- α and IL-1 β in the plasma were determined by an ELISA test (Biosource, Nivelles, Belgium) according to the recommendations of the manufacturer. Plasma concentrations of nitrates/nitrites were measured using the Griess reaction (R&D Systems, Abingdon, UK).

(Statistical analyses)

Results are expressed as mean $\pm$ SD. Between-group comparisons were performed using Student's t tests. All statistical analyses were completed with Statview software (Abacus Concepts, CA) and a two-tailed $P < 0.05$ was considered significant.

(Results)

(Endotoxemia model)

Following LPS administration, arterial pressures, aortic and mesenteric blood flows dropped rapidly in control animals (scrambled peptides treated rats) while the heart rate remained unchanged (Table 6). The decrease of arterial pressures and aortic blood flow was delayed until the second hour in TREM-1 peptide treated animals with significantly higher values by that time than in control animals. There was no difference between P1 and P5 treated groups. By contrast, none of these two peptides had any effect on the decrease of the mesenteric blood flow (Table 6).

Arterial pH remained constant over time until the fourth hour after LPS injection where it severely dropped in the control group only (Table 6). The significant arterial lactate level elevation present in control animals after the third hour was abolished by the TREM-1 peptides (Table 6). There was no difference between P1 and P5 with regard to pH, arterial bicarbonate and lactate concentrations.

As expected, a peak of TNF- α plasmatic concentration was induced by LPS between 30 minutes and 1 hour after injection followed by a progressive decline thereafter (Figure 13A). P1 peptide injection had no effect on this production, while P5 attenuated TNF- α production by $\sim 30\%$.

P1 delayed the IL-1 β peak until the third hour after LPS injection, but without attenuation. By contrast, P5 strongly reduced IL-1 β release (Figure 13B).

Nitrite/nitrate concentrations increased rapidly after LPS administration in control and P1 treated animals but remained stable upon P5 treatment (Figure 14).

【表 6】

Table 6. Hemodynamic parameters during LPS-induced endotoxemia

		Heart Rate (bpm)	MAP (mmHg)	Aortic blood flow (mL/min)	Mesenteric blood flow (mL/min)	pH	Lactate (mmol/L)
Control	H0	486±13	123±21	45±7	13.6±3.4	7.31±0.03	3.3±0.8
	H1	522±16	103±25	25±8 ^a	9.6±3.3	7.28±0.03	4.2±0.3
	H2	516±13	98±23	12±5 ^{a,b}	8.0±3.7	7.29±0.03	5.9±0.6
	H3	490±20	78±8 ^{a,b}	8±3 ^{a,b}	5.8±1.1	7.26±0.01	7.9±1.8 ^{a,b}
	H4	510±18	67±9 ^{a,b}	6±1 ^{a,b}	4.1±0.8	7.03±0.10 ^{a,b}	11.5±0.7 ^{a,b}
P1	H0	464±25	116±10	49±11	12.0±3.7	7.32±0.04	2.7±0.1
	H1	492±26	119±14	39±12 ^a	10.5±1.7	7.29±0.04	4.9±1.1
	H2	492±26	113±21	26±14 ^a	7.7±2.7	7.30±0.01	5.0±0.9
	H3	480±30	97±29 ^a	22±8 ^a	5.0±1.0	7.26±0.06	5.7±0.7 ^a
	H4	480±20	92±7 ^a	16±6 ^a	4.8±0.9	7.26±0.08 ^a	7.9±1.7 ^a
P5	H0	474±49	115±16	48±9	12.8±6.4	7.33±0.04	3.4±1.5
	H1	498±26	99±22	32±8	11.4±2.7	7.28±0.06	5.4±1.4
	H2	510±42	101±18	23±4 ^b	9.2±1.9	7.32±0.07	5.5±1.6
	H3	517±62	93±21 ^b	20±7 ^b	6.0±0.8	7.29±0.11	5.9±1.7 ^b
	H4	510±26	89±10 ^b	15±6 ^b	5.0±1.0	7.28±0.12 ^b	7.4±1.8 ^b

^a p<0.05 P1 vs Controls^b p<0.05 P5 vs Controls

(CLP Model)

As the severity of the Inventors' model was at its highest 16 to 20 hours after the completion of the CLP, the Inventors chose to investigate animals by the 16th hour. Importantly, there were no deaths before this time point. Although all animals were fluid resuscitated, none received antibiotics in order to strictly consider the role of the peptides.

There was a dramatic decline in arterial pressure in the control animals over time, and by H24 systolic, diastolic and mean arterial pressures were 58 ± 7 mmHg, 25 ± 4 mmHg and 38 ± 2 mmHg respectively. This decrease was almost totally abolished with P1 or P5 treatment with no significant difference between H16 and H24 (Figure 15). There was no difference between P1 and P5 treated rats.

TREM-1 peptides also prevented the aortic and mesenteric blood flows decrease observed in control animals (Table 7). The protective effect on mesenteric blood flow alterations was even higher under P5 treatment. The relative preservation of blood flows was not related to an increased heart rate, since the latter was rather slower than in control animals (Table 7).

The progressive metabolic acidosis that developed in control rats was attenuated by the P1 peptide, and almost abrogated by P5. The same protective trend was observed for arterial lactate elevation with a more pronounced effect of P5 (Table 7).

【表 7】

Table 7. Hemodynamic and selected biochemical parameters during CLP polymicrobial sepsis

		Heart Rate (bpm)	Aortic blood flow (mL/min)	Mesenteric blood flow (mL/min)	pH	Bicarbonate (mmol/L)	Lactate (mmol/L)
Control	H16	516±44 ^{a,b}	38±10	10.6±3.0 ^b	7.31±0.07 ^b	16.9±2.7	4.7±1.5 ^b
	H20	543±35 ^{a,b}	19±11 ^{a,b}	4.3±1.5 ^b	7.23±0.05 ^{a,b}	12.0±5.6 ^{a,b}	8.5±1.4 ^{a,b}
	H24	480±20	14±9 ^{a,b}	2.5±0.7 ^b	7.17±0.01 ^{a,b}	10.3±3.3 ^a	10.8±1.9 ^{a,b}
P1	H16	462±16 ^a	41±12	13.5±7.2	7.32±0.04	16.8±4.4	4.9±0.4
	H20	480±30 ^a	28±17 ^a	5.3±3.0 ^c	7.31±0.18 ^a	16.0±5.4 ^b	5.3±1.1 ^{a,c}
	H24	420±30	22±16 ^a	4.5±2.1 ^c	7.24±0.06 ^{a,c}	11.2±0.8 ^c	6.8±0.9 ^{a,c}
P5	H16	460±17 ^b	41±14	15.3±3.5 ^b	7.35±0.01 ^b	18.6±2.0	3.3±0.4 ^b
	H20	500±17 ^b	31±5 ^b	11.0±6.9 ^{b,c}	7.34±0.01 ^b	18.0±0.9 ^a	3.6±0.9 ^{b,c}
	H24	510±20	28±8 ^b	8.5±3.5 ^{b,c}	7.36±0.01 ^{b,c}	17.1±0.9 ^{a,c}	4.9±1.1 ^{b,c}

^a p<0.05 P1 vs Controls

^b p<0.05 P5 vs Controls

^c p<0.05 P5 vs P1

Both P1 and P5 induced a decrease in TNF- α production, again with a stronger effect of P5. By H20, plasmatic TNF- α was almost undetectable under P5 treatment whereas it remained elevated in the other groups of animals (Figure 16).

Nitrite/nitrate concentrations were increased in control animals but remained at a low level in both TREM-1 peptides treated groups (Figure 17).

A protective action of both P5 and P1 on hemodynamics was thus observed in septic rats. Both arterial pressure and blood flows were preserved, independently of heart rate. Moreover, modulation of TREM-1 signalling reduced, although not completely, cytokine production and protected septic animals from hyper-responsiveness. The fact that the cytokine production was not totally inhibited is a crucial point. Indeed, although inflammatory cytokines such as TNF- α are considered deleterious, they also display beneficial effects in sepsis as underlined by the fatal issue of peritonitis models in animals with impaired TNF- α res

ponses.

The activation of iNOS observed during septic shock leads to the production of large amount of NO that partly explains some of the peripheral vascular disorders (notably vasodilation and hypotension). On the myocardium itself, most of the action of NO is mediated by an activation of the soluble guanylate-cyclase responsible for the production of cGMP which impairs the effect of cytosolic calcium on contraction. Cyclic GMP is also able to stimulate the activity of some phosphodiesterases. The subsequent decrease of intra-cellular cAMP levels could explain the ability of NO to attenuate the effects of beta adrenergic stimulation. The preservation of arterial pressure could therefore be partly explained by a lessened production of NO, as reflected by the lower concentrations of plasma nitrite/nitrate in TREM-1 peptides treated animals.

The decrease in inflammatory cytokine production could partly explain the effect noted on blood flows. Indeed, although the list of potential cytokine mediators of myocardial depression is long, TNF- α and IL-1 β have been shown to be good candidates. Both these latter cytokines depressed myocardial contractility in vitro or ex vivo. Moreover, the neutralization or removal of TNF- α or IL-1 β from human septic serum partly abrogates the myocardial depressant effect in vitro and in vivo. Although P1 and P5 had an identical action on blood flows and arterial pressure during endotoxemia, their action on cytokine production differed with only a slight effect of P1 on plasma TNF- α and IL-1 β concentrations. The protective role of the TREM-1 peptides could therefore be only partly related to their action on cytokine release, or involve redundant pathways.

The modulation of the TREM-1 pathway by the use of small synthetic peptides had beneficial effects on haemodynamic parameters during experimental septic shock in rats, along with an attenuation of inflammatory cytokine production.

In summary, these data show that TREM-1 peptides 1) efficiently protect subject animals from sepsis-related hemodynamic deterioration; 2) attenuate the development of lactic acidosis; 3) modulate the production of such pro-inflammatory cytokines as TNF- α and IL-1 β and 4) decrease the generation of nitric oxide. Thus TREM-1 peptides are potentially useful for the restoration of haemodynamic parameters in patients with sepsis, septic shock or sepsis-like conditions.

(References)

1. Aderem, A, and R.J. Ulevitch, R.J. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-786.
2. Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, O. Takeuchi, M.T. Ochoa, P.A. Engele, P.A. Sieling, P.F. Barnes, M. Rollinghoff, P.L. Bolcskei, and M. Wagner. 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-like receptors. *Science* 291: 1544-1549.
3. Medzhitov, R., and C Jr. Janeway. 2000. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343: 338-344.
4. Cohen, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885-91.
5. Hotchkiss, R.S., and I.E. Karl. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 348: 138-50.
6. Vincent, J.L., Q. Sun, and M.J. Dubois. 2002. Clinical trials of immunomodulatory therapies in severe sepsis and septic shock. *Clin. Infect. Dis.* 34: 1084-1093.
7. Riedemann, N.C., R.F. Guo, and P. Ward. 2003. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat. Med.* 9: 517-524.
8. Fisher, C.J.Jr., J.M. Agosti, S.M. Opal, S.F. Lowry, R.A. Balk, J.C. Sadoff,

- E. Abraham, R.M. Schein, and E. Benjamin. 1996. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med* 334: 1697-702.
9. Echtenacher, B., W. Falk, D.N. Mannel, and P.H. Krammer. 1990. Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J. Immunol.* 145: 3762-3766.
10. Echtenacher, B., K. Weigl, N. Lehn, and D.N. Mannel. 2001. Tumor necrosis factor-dependent adhesions as a major protective mechanism early in septic peritonitis in mice. *Infect. Immun.* 69: 3550-5.
11. Eskandari, M.K., G. Bolgos, C. Miller, D.T. Nguyen, L.E. DeForge, and D.G. Remick. 1992. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J. Immunol.* 148: 2724-30.
12. Bouchon, A., J. Dietrich, and M. Colonna. 2000. Inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J. Immunol.* 164: 4991-4995.
13. Colonna, M., and F. Facchetti. 2003. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J. Infect. Dis.* 187 (Suppl): S297-301.
14. Colonna, M. 2003. TREMs in the immune system and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 445-453.
15. Nathan, C., and A. Ding. 2001. TREM-1: a new regulator of innate immunity in sepsis syndrome. *Nat. Med.* 7: 530-2.
16. Bouchon, A., F. Facchetti, M.A. Weigand, and M. Colonna. 2001. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 410: 1103-1107.
17. Bleharski, J.R., V. Kiessler, C. Buonsanti, P.A. Sieling, S. Stenger, M. Colonna, and R.L. Modlin. 2003. A role for Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J. Immunol.* 170: 3812-3818.
18. Gibot, S., A. Cravoisy, B. Levy, M.C. Bn, G. Faure, and P.E. Bollaert. 2004. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 350: 451-8.
19. Gingras, M.C., H. Lapillonne, and J.F. Margolin. 2001. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol. Immunol.* 38: 817-24.
20. Dinarello, C.A. 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112 (suppl): S21-9.
21. Bone, R.C., R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, W.A. Knauss, R.M. Schein, and W.J. Sibbald. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644-55.
22. Warren, H.S. 1997. Strategies for the treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 336: 952-3.
23. Stone, R. 1994. Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science* 264: 365-7.
24. Cohen, J. 2001. TREM-1 in sepsis. *Lancet* 358: 776-8.
25. Begun, N.A., K. Ishii, M. Kurita-Taniguchi, M. Tanabe, M. Kobayashi, Y. Moriwaki, M. Matsumoto, Y. Fukumori, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 2004. Myc

obacterium bovis BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages. *Infect. Immun.* 12: 937-48.

26. Keane, J., S. Gershon, R.P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W.D. Schwiertman, J.N. Siegel, and M.M. Braun. 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N. Engl. J. Med.* 345: 1098-104.

27. Radaev, S., M. Kattah, B. Rostro, M. Colonna, and P. Sun. 2003. Crystal structure of the human myeloid cell activating receptor TREM-1. *Structure* 11: 1527-35.

28. Lantz, M., U. Gullberg, and E. Nilsson. 1990. Characterization in vitro of a human tumor necrosis factor binding protein. A soluble form of tumor necrosis factor receptor. *J. Clin. Invest.* 86: 1396-1401.

29. van Zee, K.J., T. Kohno, and E. Fischer. 1992. Tumor necrosis soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4845-4853.

30. Collart, M.A., P. Baeuerle, and P. Vassalli. 1990. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages. Involvement of four NFB motifs and constitutive and inducible form of NFB. *Mol. Cell Biol.* 10: 1498-506.

31. Hiscott, J.M., J.J. Garoufalidis, A. Roulston, I. Kwan, N. Pepin, J. Lacoste, H. Nguyen, G. Bensi, and M. Fenton. 1993. Characterization of a functional NFB site in the human IL-1 β promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol. Cell Biol.* 13: 6231-40.

32. Urban, M.B., R. Schreck, and P.A. Baeuerle. 1991. NFB contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit. *EMBO J.* 10: 1817-25.

33. Lolis, E., and R. Bucala. 2003. Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2: 635-45.

34. Gibot, S., M.N. Kolopp-Sarda, M.C. Bn, A. Cravoisy, B. Levy, G. Faure, and P.E. Bollaert. 2004. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann. Intern. Med.* 141: 9-15.

(CLAIMS)

1. A polypeptide comprising one or more sequences derived from CDR2 or CDR3 of a TREM-1 protein, characterised by the ability to treat, ameliorate, or lessen the symptoms of sepsis, septic shock or sepsis-like conditions.

2. A polypeptide according to claim 1 wherein said polypeptide comprises fewer than 30 contiguous amino acids of said TREM-1 protein.

3. A TREM-1 polypeptide having anti-sepsis or anti-septic shock activity which consists of (i) a contiguous sequence of 15-25 amino acids corresponding to a native TREM-1 protein sequence which includes at least 3 amino acids from the CDR2 or CDR3 sequences; or (ii) such a sequence in which one or more amino acids are substituted conservatively with another amino acid provided, however that at least 3 amino acids from the CDR2 or CDR3 sequences are not substituted; or (iii) a sequence of (i) or (ii) linked at one or both of its N and C termini to a heterologous polypeptide.

4. A polypeptide according to claim 3 wherein the native TREM-1 protein sequence is the human sequence identified as SEQ ID No 1 and the CDR2 and CDR3 sequences are RPSKNS and QPPKE respectively.

5. A polypeptide according to claim 4 wherein the at least 3 amino acids from

m the CDR2 or CDR3 sequences are QPP.

6. A polypeptide according to claim 4 wherein the at least 3 amino acids from the CDR2 or CDR3 sequences are QPPK.

7. A polypeptide according to claim 4 wherein the at least 3 amino acids from the CDR2 or CDR3 sequences are QPPKE.

8. A polypeptide according to claim 4 wherein the at least 3 amino acids from the CDR2 or CDR3 sequences are RPSKNS.

9. A polypeptide according to claim 3 wherein the native TREM-1 protein sequence is the mouse sequence identified as SEQ ID NO: 2 and the CDR2 and CDR3 sequences are RPFTRP and HPPND respectively.

10. A polypeptide according to claim 9 wherein the at least 3 amino acids from the CDR2 or CDR3 sequences are HPP.

11. A polypeptide according to claim 9 wherein the at least 3 amino acids from the CDR2 or CDR3 sequences are HPPN.

12. A polypeptide according to claim 9 wherein the at least 3 amino acids from the CDR2 or CDR3 sequences are HPPND.

13. A polypeptide according to claim 9 wherein the at least 3 amino acids from the CDR2 or CDR3 sequences are RPFTRP.

14. A polypeptide according to any of the preceding claims wherein said polypeptide is characterised by the ability to treat, ameliorate, or lessen the symptoms of sepsis, septic shock or sepsis-like conditions.

15. A polypeptide having substantial sequence identity to sequence any one of SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19 and characterised by the ability to treat, ameliorate, or lessen the symptoms of sepsis, septic shock or sepsis-like conditions

16. A polypeptide of sequence SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19, its active fragments, analogues, and derivatives, and characterised by the ability to treat, ameliorate, or lessen the symptoms of sepsis, septic shock or sepsis-like conditions.

17. A polypeptide having at least 80% sequence identity to the sequence SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19 and characterised by the ability to treat sepsis, septic shock or sepsis-like conditions and having at least two consecutive amino acids derived from CDR2 or CDR3 of a TREM-1 protein.

18. A polypeptide having at least 80% sequence identity to the sequence SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19 and characterised by the ability to treat sepsis, septic shock or sepsis-like conditions, wherein the peptide has at least three consecutive amino acids derived from CDR2 or CDR3 of a TREM-1 protein.

19. An isolated polynucleotide capable of encoding a polypeptide having substantial sequence identity to the sequence SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19 and characterised by the ability to treat sepsis, septic shock or sepsis-like conditions.

20. A vector which contains a polynucleotide capable of encoding a polypeptide having at least about 80% sequence identity to the sequence SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19 and characterised by the ability to treat sepsis, septic shock or sepsis-like conditions.

21. A polypeptide according to any one of claims 15 to 20 wherein said polypeptide comprises less than 30 contiguous amino acids of a native TREM-1 protein.

22. A composition comprising a peptide or polypeptide of any one of the preceding claims.

23. The peptide or polypeptide of any one of the preceding claims for use in

therapy.

24. The peptide or polypeptide of any one of the preceding claims for use in therapy in the treatment of sepsis, septic shock or sepsis-like conditions.

25. Use of the peptide or polypeptide of any one of the preceding claims in the manufacture of a medicament for the treatment of sepsis, septic shock or sepsis-like conditions.

26. A method of treating or ameliorating sepsis, septic shock or sepsis-like conditions in a subject, comprising:

administering a therapeutically effective amount of a peptide or polypeptide of any one of the preceding claims to a subject.

27. The method of claim 26 where in said peptide or polypeptide has substantial sequence identity to sequence SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19.

28. The method of claim 26, wherein said peptide or polypeptide is SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19 or an active fragment, analogue or derivative of SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19.

29. The method of claim 26, wherein said peptide or polypeptide has at least about 80% sequence identity to SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 or 19.

30. A method of screening compounds or compositions to treat sepsis, septic shock or sepsis-like conditions, comprising:

providing a TREM-1 peptide or TREM-1 polypeptide;

contacting an animal in a cecal ligation and puncture model with the TREM-1 peptide;

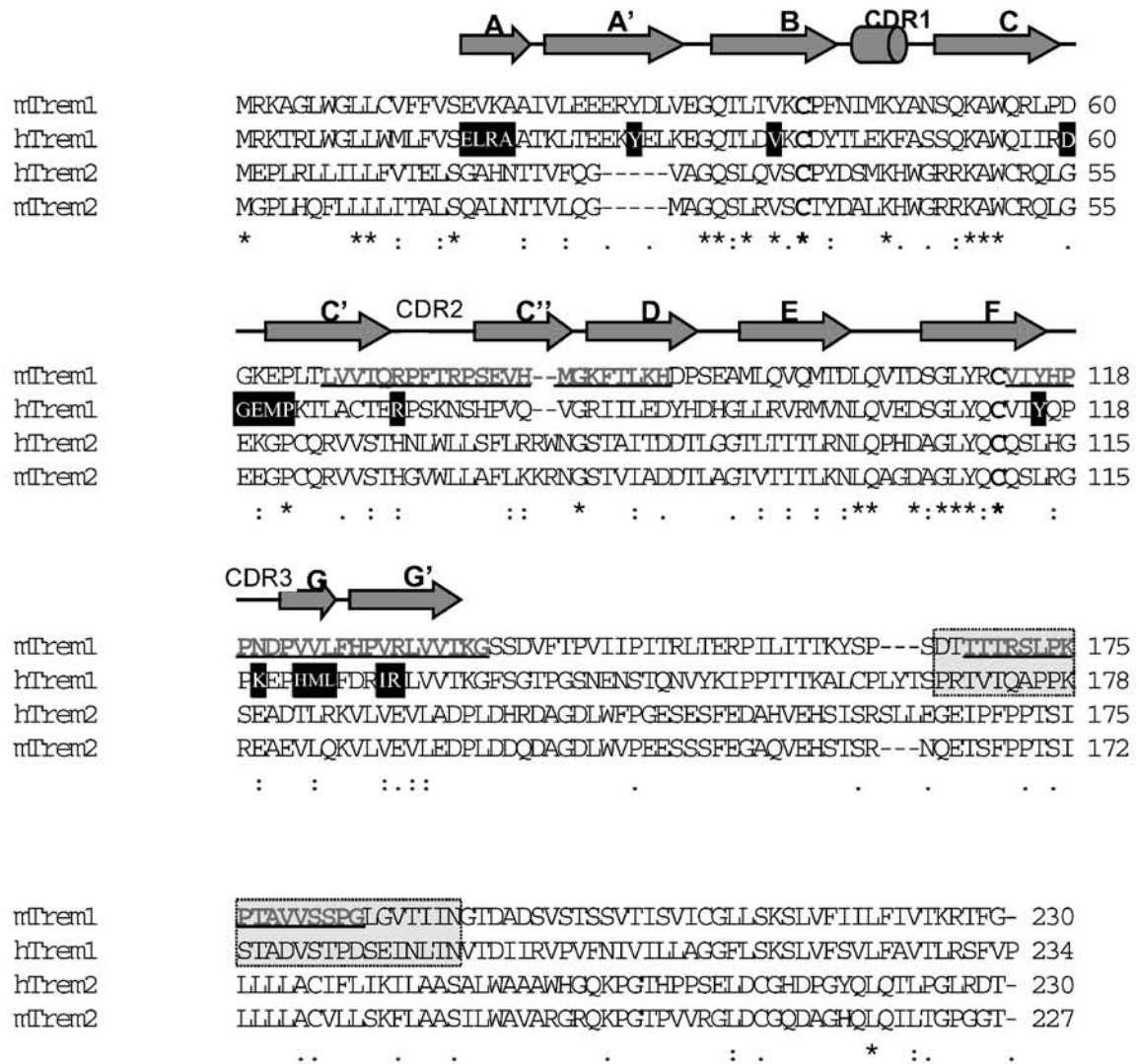
determining if there was a modulation in the sepsis, wherein an increase in survival indicates that the TREM-1 peptide may be useful for treating sepsis, septic shock or sepsis-like conditions.

31. A polypeptide, vector use, method or composition according to any one of the preceding claims wherein the indication is sepsis or septic-shock.

An object of the present invention is to provide a method and a composition for the treatment of infectious disease, in particular, sepsis and septic shock or for the treatment of sepsis-like conditions.

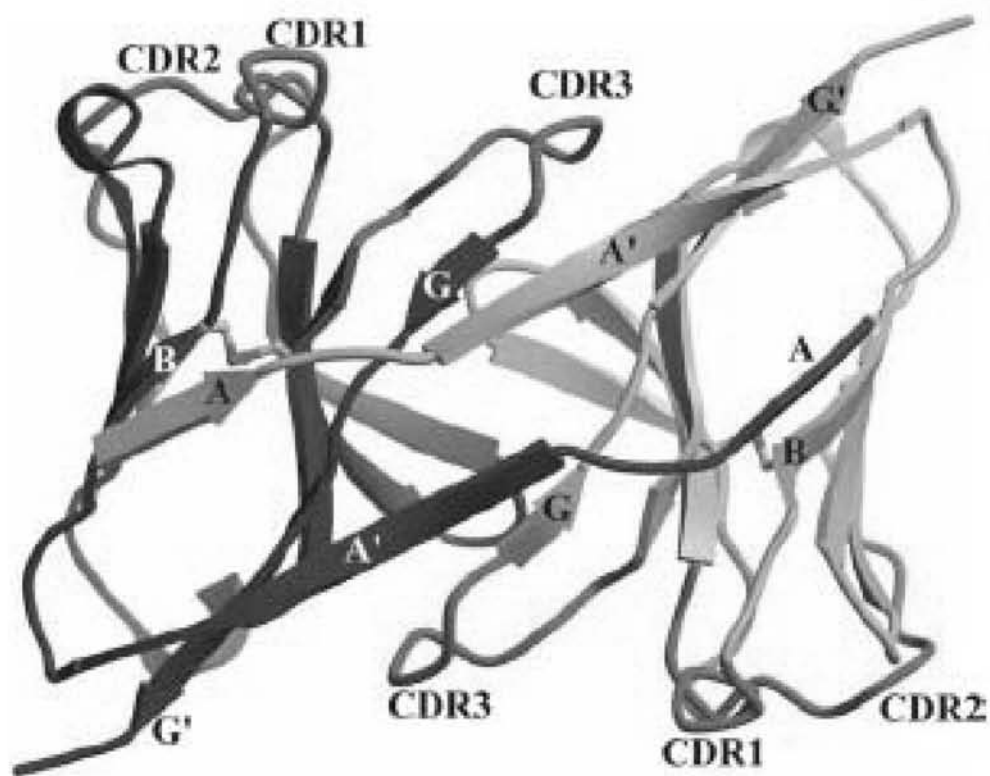
【図 1 A】

Figure 1A



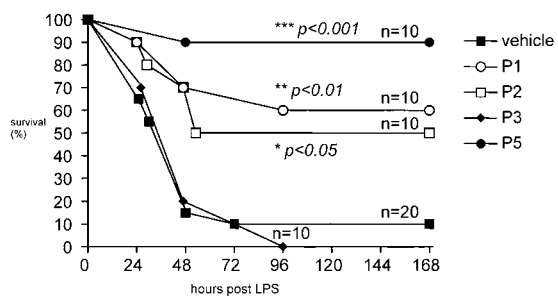
【図 1 B】

Figure 1B



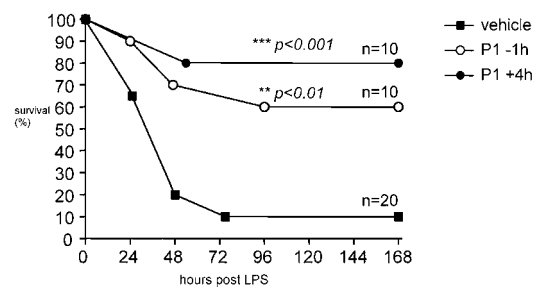
【 図 2 】

Figure 2



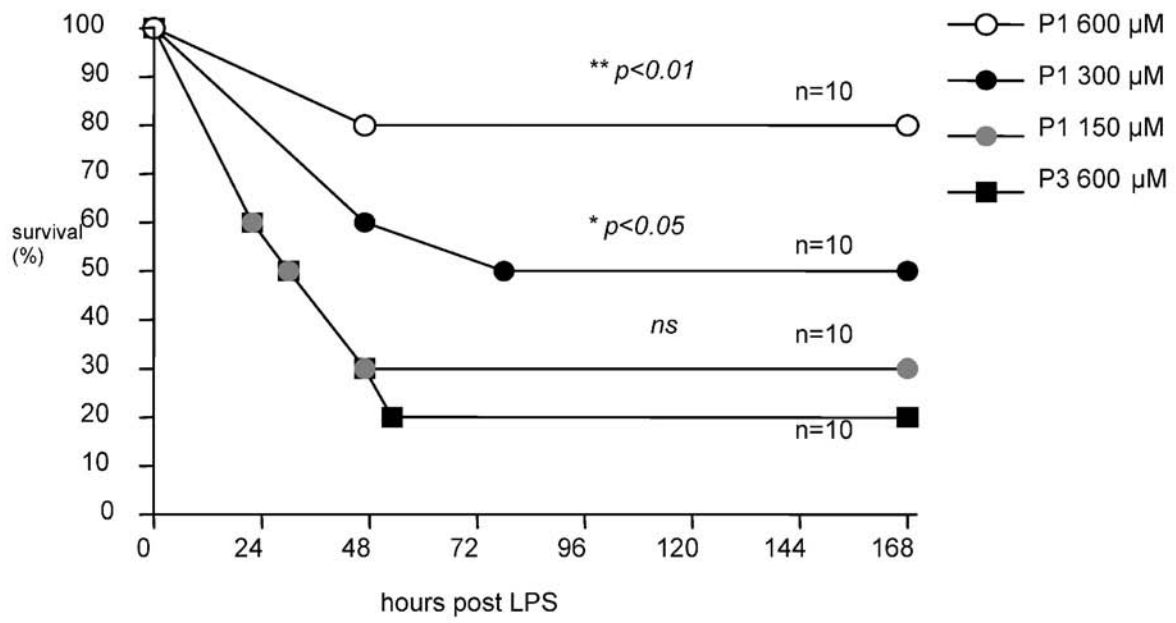
【 図 3 】

Figure 3



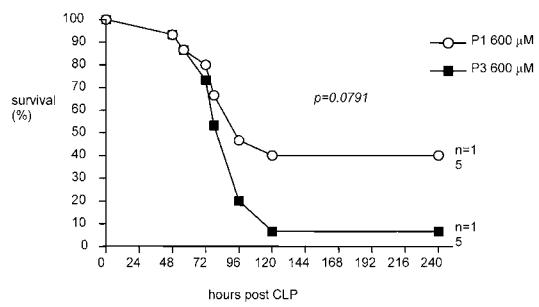
【 図 4 】

Figure 4



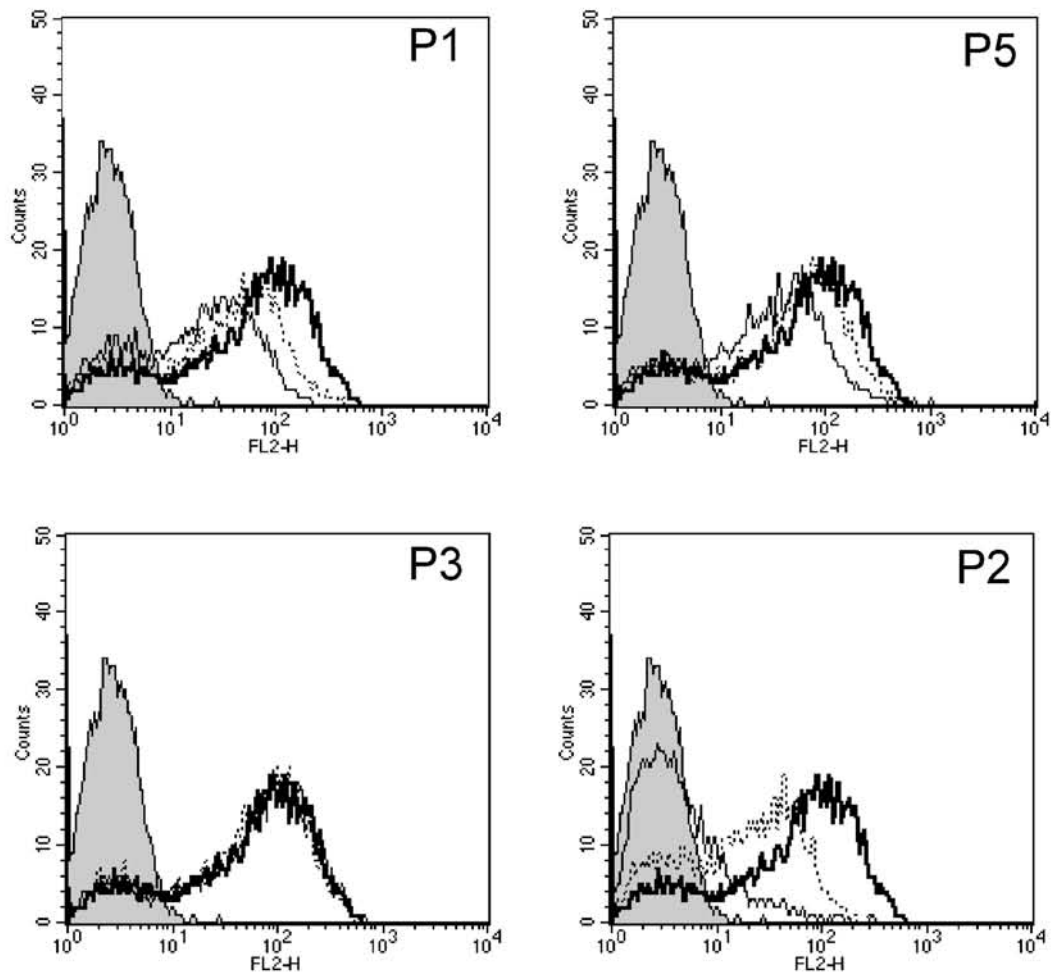
【図 5】

Figure 5



【図 6】

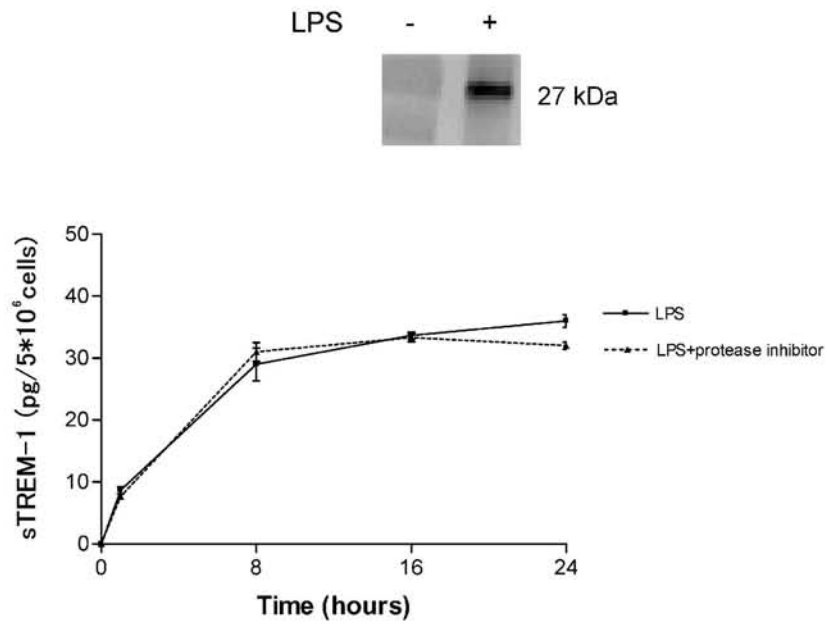
Figure 6



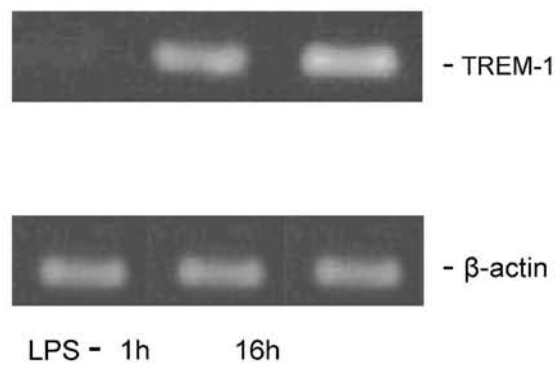
【 図 7 】

Figure 7

A

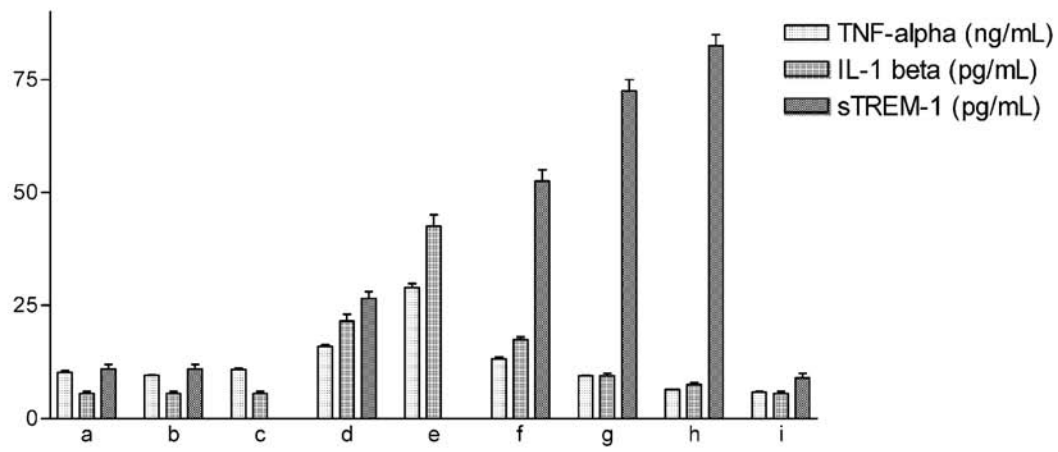


B



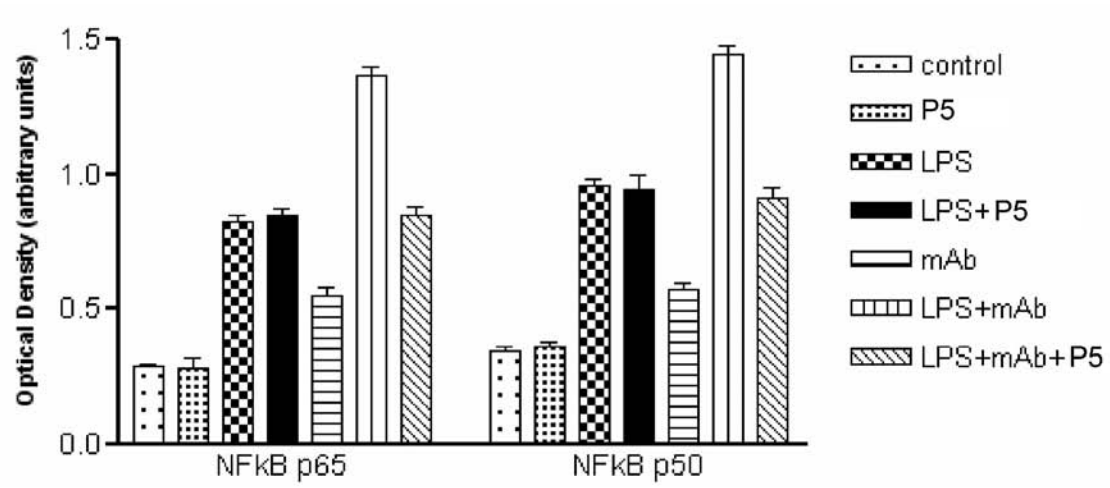
【図 8 A】

Figure 8A



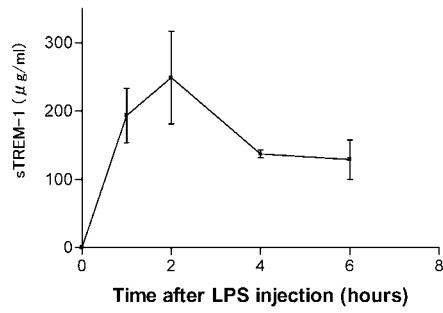
【図 8 B】

Figure 8B



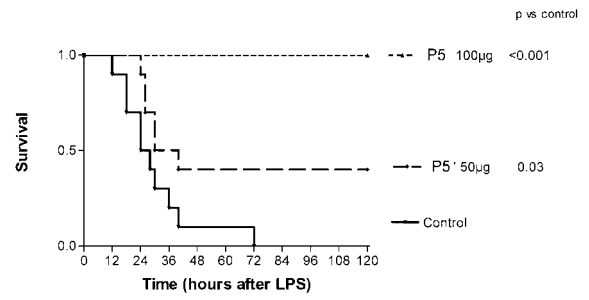
【図 9】

Figure 9



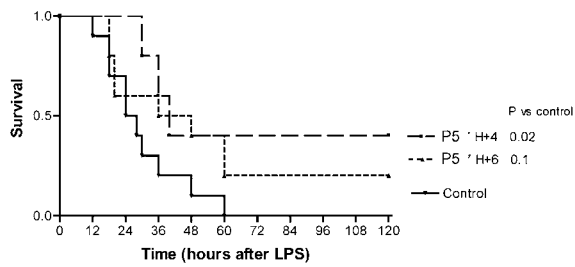
【図 10 A】

Figure 10A



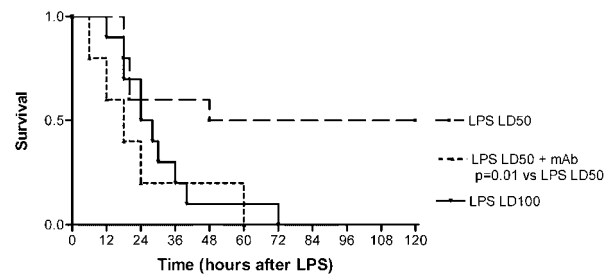
【図 10 B】

Figure 10B



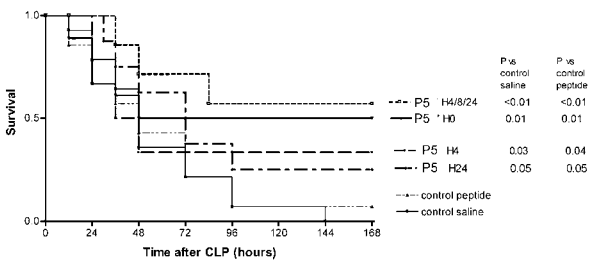
【図 10 C】

Figure 10C



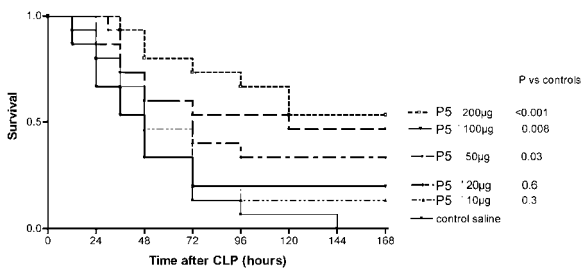
【図 1 1 A】

Figure 11A



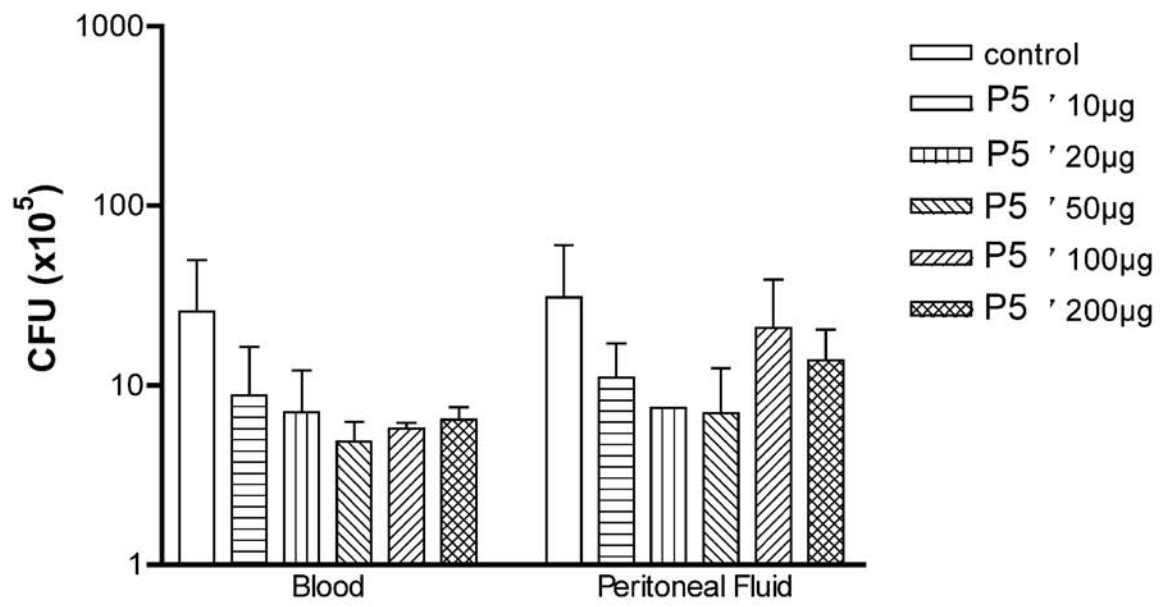
【図 1 1 B】

Figure 11B



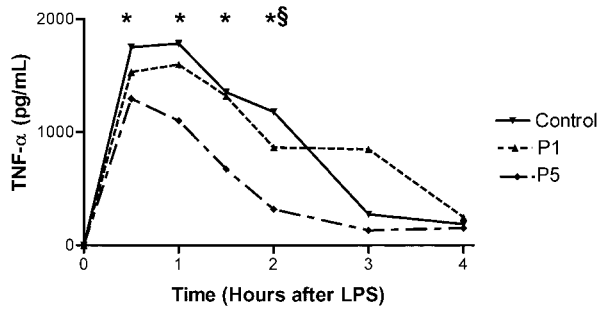
【図 12】

Figure 12



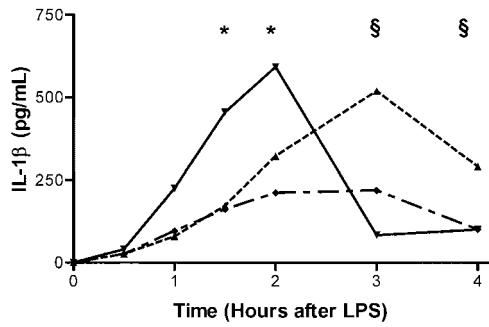
【図 13 A】

Figure 13A



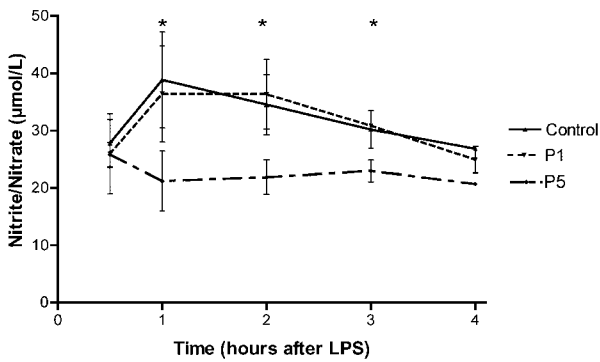
【図 13 B】

Figure 13B



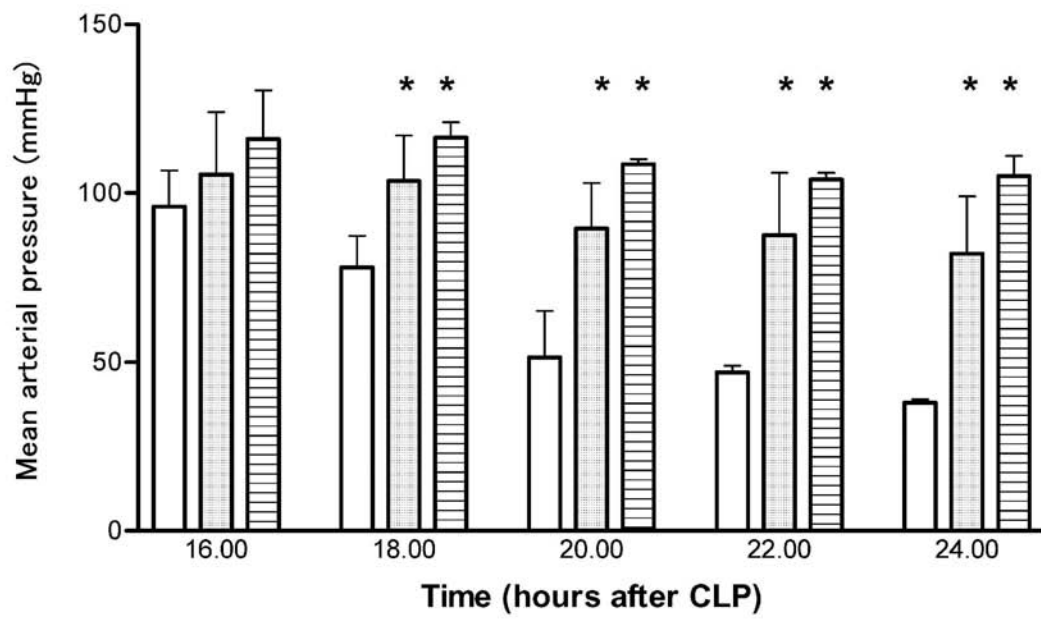
【図 14】

Figure 14



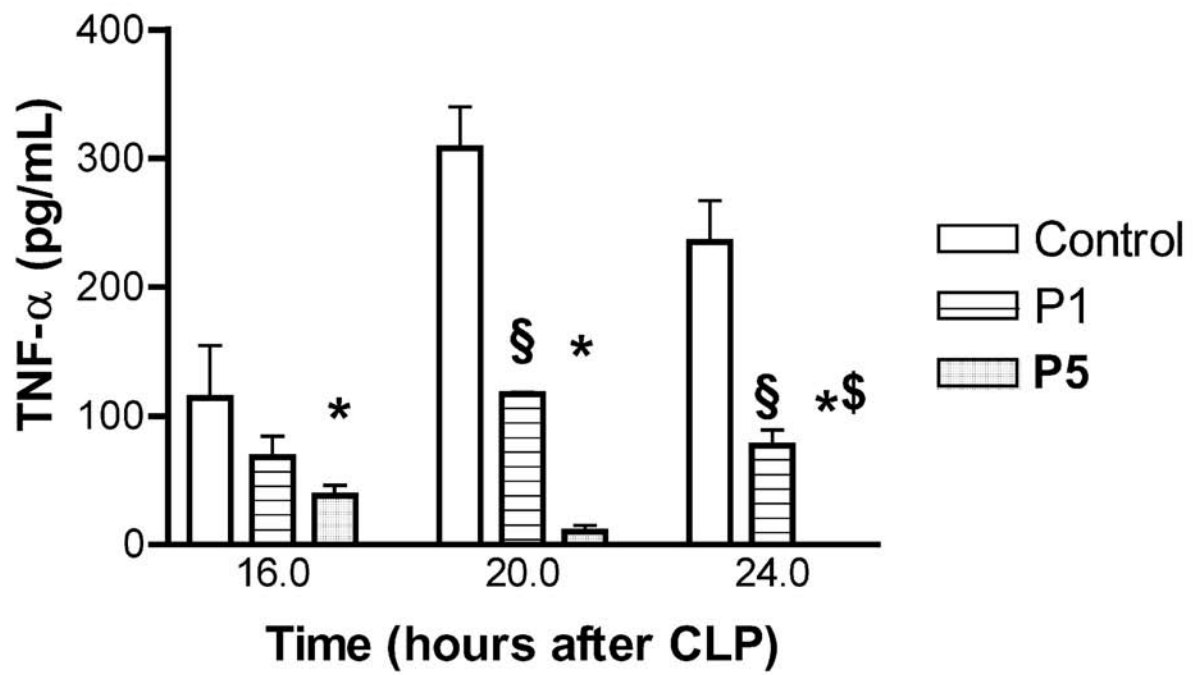
【図 15】

Figure 15



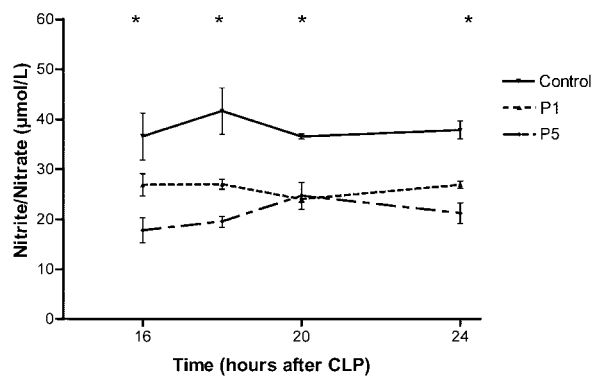
【図 16】

Figure 16



【図 17】

Figure 17



【配列表】

[2006149365000001.app](#)