

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-534828

(P2010-534828A)

(43) 公表日 平成22年11月11日 (2010.11.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/566 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/566	2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/50 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/50 Z N A Z	4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 4
<b>AO 1 K 67/027 (2006.01)</b>	AO 1 K 67/027	4 B O 6 5
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-517399 (P2010-517399)  
 (86) (22) 出願日 平成20年7月23日 (2008.7.23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年3月18日 (2010.3.18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/059668  
 (87) 国際公開番号 W02009/013319  
 (87) 国際公開日 平成21年1月29日 (2009.1.29)  
 (31) 優先権主張番号 60/961, 615  
 (32) 優先日 平成19年7月23日 (2007.7.23)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505184768  
 ビオエクセル エスピーエー  
 B i o X e l l S p A  
 イタリア 1-20132 ミラン ビア  
 オルゲッチナ 58  
 (74) 代理人 100097456  
 弁理士 石川 徹  
 (72) 発明者 マルクオ クオルオンナ  
 アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイ  
 ス サウス エウクリッド アベニュー 6  
 60 ボク 8118 スクール オブ  
 メドイシネ シー/オー ワシントン ユ  
 ニバーシティ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スクリーニング、療法及び診断

## (57) 【要約】

TREM-1リガンドが同定される。これは、TREM-1受容体に結合することが可能である様々な誘導体が、提供/同定されることを可能にする。TREM-1リガンド又は誘導体は、薬剤/候補薬剤のスクリーニングに使用されることができる。TREM-1リガンド/誘導体のTREM-1受容体への結合を遮断又は低下する物質は、敗血症、特に細菌又は真菌起源の敗血症の治療に有用であり得る。このリガンドに対する抗体は、敗血症、特に細菌又は真菌起源の敗血症の診断に有用であり得る。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

TREM-1リガンド又はその誘導体を提供する工程、並びに被験化合物が：

a) TREM-1受容体に対する若しくはその誘導体に対するリガンド若しくはその誘導体の結合；並びに/又は

b) TREM-1リガンドのTREM-1受容体への結合により調節された活性；に、影響を及ぼすかどうかを決定する工程を含む、方法。

**【請求項 2】**

前記TREM-1受容体又はその誘導体を発現する1種以上の細胞を使用する、請求項1記載の方法。

10

**【請求項 3】**

前記細胞が、好中球又は単球である、請求項2記載の方法。

**【請求項 4】**

前記細胞が、TREM-1受容体又はその誘導体を通常発現しないが、発現するように修飾されている細胞である、請求項2記載の方法。

**【請求項 5】**

前記化合物が、該結合又は活性を遮断又は減少させるかどうかを決定する工程を含む、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 6】**

前記被験化合物の存在に起因する結合又は活性の差異を定量する工程を含む、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

20

**【請求項 7】**

検出可能な標識を使用する、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 8】**

前記リガンド又はその誘導体が、抗体R33により結合されることが可能である、請求項1～7のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 9】**

前記リガンドが、CD177(例えば、アミノ酸1-437、若しくはアミノ酸22-437などのそれらの断片、特に図18のアミノ酸22-408により定義されている)であるか、又はTREM-1受容体に結合することが可能であるその誘導体である、請求項1～8のいずれか1項記載の方法。

30

**【請求項 10】**

前記リガンドの誘導体及び/又は前記受容体の誘導体が、可溶性である、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 11】**

前記リガンドの誘導体及び/又は前記受容体の誘導体が、多価である、請求項10記載の方法。

**【請求項 12】**

前記リガンドの誘導体が、足場に付着された複数のTREM-1受容体結合領域を含む、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。

40

**【請求項 13】**

前記受容体の誘導体が、足場に付着された複数のTREM-1リガンド結合領域を含む、請求項1～12のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 14】**

請求項1の工程b)を含む、請求項1～13のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 15】**

請求項1の工程b)に記された活性が、前炎症性サイトカイン若しくはケモカインの放出、サイトゾルCa<sup>2+</sup>動態化、又はタンパク質チロシン-リン酸化である、請求項14記載の方法。

**【請求項 16】**

50

前記活性が、レポーターシステムを用いてアッセイされる、請求項14又は15記載の方法。

【請求項 17】

前記レポーターシステムが、融合タンパク質を利用する、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

前記レポーターシステムが、細胞内カルシウムの変化を測定する、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

更なる分析のために関心対象の化合物を同定又は選択するための薬剤スクリーニングプログラムの一部として使用される、請求項1～18のいずれか1項記載の方法。

10

【請求項 20】

被験化合物が、TREM-1リガンド/誘導体のTREM-1受容体/誘導体への結合を低下させるかどうか、及び/又は該結合により調節される活性を低下させるかどうかの更なる分析のための関心対象であると結論づけられる、請求項1～19のいずれか1項記載の方法。

【請求項 21】

前記薬剤スクリーニングプログラムが、敗血症などの炎症障害の治療において有用である化合物のスクリーニングのためのものである、請求項19又は20記載の方法。

【請求項 22】

前記薬剤スクリーニングプログラムが、微生物性敗血症の治療において有用である化合物のスクリーニングのためのものである、請求項21記載の方法。

20

【請求項 23】

前記敗血症が、細菌性又は真菌性の敗血症である、請求項21記載の方法。

【請求項 24】

1種以上の前炎症性サイトカイン又はケモカインの放出により特徴付けられる障害を治療するための医薬品の製造における、TREM-1リガンドのTREM-1受容体への結合を遮断又は減少させることが可能である化合物の使用。

【請求項 25】

敗血症などの炎症障害を治療するための医薬品の製造における、TREM-1リガンドのTREM-1受容体への結合を遮断又は減少させることが可能である化合物の使用。

30

【請求項 26】

前記障害が、微生物性敗血症である、請求項25記載の使用。

【請求項 27】

前記障害が、細菌性又は真菌性の敗血症である、請求項25記載の使用。

【請求項 28】

前記化合物が、CD177に結合する、請求項24～27のいずれか1項記載の使用。

【請求項 29】

前記化合物が、抗体である、請求項24～28のいずれか1項記載の使用。

【請求項 30】

前記化合物が、CD177の可溶性型であるか、又はその可溶性誘導体である、請求項24～27のいずれか1項記載の使用。

40

【請求項 31】

前記化合物が、TREM-1受容体への結合に関して多価である、請求項30記載の使用。

【請求項 32】

前記化合物が、融合タンパク質である、請求項24～31のいずれか1項記載の使用。

【請求項 33】

前記融合タンパク質が、免疫グロブリンの少なくとも一部を含む、請求項32記載の使用。

【請求項 34】

前記融合タンパク質が、Fc受容体に結合しない、請求項33記載の使用。

【請求項 35】

50

1種以上の前炎症性サイトカイン又はケモカインの放出により特徴付けられる障害を治療するための医薬品の製造における、TREM-1リガンドの発現を遮断又は減少させる化合物の使用。

【請求項36】

敗血症などの炎症障害を治療するための医薬品の製造における、TREM-1リガンドの発現を遮断又は低下させる化合物の使用。

【請求項37】

前記障害が、微生物性敗血症である、請求項36記載の使用。

【請求項38】

前記障害が、細菌性又は真菌性の敗血症である、請求項36記載の使用。

10

【請求項39】

前記化合物が、CD177の発現を遮断又は低下させる、請求項35～38のいずれか1項記載の使用。

【請求項40】

前記化合物が、アンチセンス分子、RNAi分子又はリボザイムである、請求項35～39のいずれか1項記載の使用。

【請求項41】

前記化合物が、TREM-1リガンド転写のダウンレギュレーター又はTREM-1リガンド遺伝子の破壊因子である、請求項35～39のいずれか1項記載の使用。

【請求項42】

請求項24～41のいずれか1項記載の化合物及び医薬として許容し得る担体を含有する、医薬組成物。

20

【請求項43】

TREM-1受容体への結合又はTREM-1リガンドへの結合に関して多価である、化合物。

【請求項44】

足場に付着された、TREM-1リガンドの可溶性型、又はその可溶性誘導体を複数含む、請求項43記載の化合物。

【請求項45】

前記足場が、免疫グロブリンに由来する、請求項44記載の化合物。

【請求項46】

足場に付着された、複数のTREM-1受容体の可溶性型、又はそれらの可溶性誘導体を含む、請求項43記載の化合物。

30

【請求項47】

前記足場が、ストレプトアビジンに由来する、請求項46記載の化合物。

【請求項48】

前記動物が、野生型動物と比べ、TREM-1又はTREM-1リガンドの発現を低下するように遺伝子修飾されている、非ヒト動物。

【請求項49】

TREM-1リガンド又はTREM-1受容体についてノックアウトされている、請求項48記載の非ヒト動物。

40

【請求項50】

前記動物が、TREM-3の発現を低下するように遺伝子操作されている、請求項48又は49記載の非ヒト動物。

【請求項51】

TREM-1/TREM-3二重ノックアウト齧歯類である、請求項50記載の非ヒト動物。

【請求項52】

生物試料を得る工程、及びTREM-1リガンド又はTREM-1リガンドRNAに関して該試料を分析する工程を含む、方法。

【請求項53】

TREM-1リガンドを定量する工程、又はTREM-1リガンドのmRNA若しくはcDNAを定量する工

50

程を含む、請求項52記載の方法。

【請求項54】

前記レベルを、健常な個体から予想され得るものに相当する対照レベル又は範囲と比較する工程を含む、請求項53記載の方法。

【請求項55】

前記レベルを、1種以上の前炎症性サイトカイン又はケモカインの放出により特徴付けられる障害を持つ個体から予想され得るものに相当する対照レベル又は範囲と比較する工程を含む、請求項53又は54記載の方法。

【請求項56】

前記レベルを、敗血症などの炎症障害を持つ個体から予想され得るものに相当する対照レベル又は範囲と比較する工程を含む、請求項53又は54記載の方法。

【請求項57】

前記障害が、微生物性敗血症である、請求項56記載の方法。

【請求項58】

前記微生物性敗血症が、細菌性又は真菌性の敗血症である、請求項57記載の方法。

【請求項59】

TREM-1リガンドに対する抗体を使用する、請求項52～58のいずれか1項記載の方法。

【請求項60】

TREM-1リガンドのRNA又はcDNAにハイブリダイズする核酸分子を使用する、請求項52～58のいずれか1項記載の方法。

【請求項61】

前記方法が、TREM-1リガンドの可溶性型を分析するために使用され、該方法が、細胞外液を含む試料に対して実行される、請求項52～59のいずれか1項記載の方法。

【請求項62】

前記方法が、膜結合型TREM-1リガンドを分析するために使用され、該方法が、好中球及び/又は単球を含む試料に対して実行される、請求項52～60のいずれか1項記載の方法。

【請求項63】

生物試料を得る工程、及び該試料をTREM-1受容体の存在に関して分析する工程を含む方法であり、ここでTREM-1リガンドの可溶性型又はその可溶性変種が提供され、かつ該試料が、該可溶性型又は可溶性変種のTREM-1受容体への結合について分析される、前記方法。

【請求項64】

前記可溶性型又は可溶性変種が、CD177の可溶性型又は可溶性変種である、請求項63記載の方法。

【請求項65】

前記可溶性型又は可溶性変種が、請求項43～47のいずれか1項に記載された化合物である、請求項63又は64記載の方法。

【請求項66】

前記リガンドのTREM-1受容体への結合を妨害するか又はそのような結合の効率を低下させるためにTREM-1リガンドに結合する抗体。

【請求項67】

TREM-1リガンドには結合するが、敗血症性の好中球又は単球上の他のいずれの細胞表面タンパク質にも結合しない抗体。

【請求項68】

TREM-1リガンドに特異的である抗体。

【請求項69】

TREM-1受容体に結合するTREM-1リガンドの一部に特異的である抗体。

【請求項70】

野生型TREM-1リガンドと比べ、TREM-1リガンドの変異型に優先的に結合する抗体。

【請求項71】

TREM-1リガンドの変異型に特異的である抗体。

10

20

30

40

50

## 【請求項 7 2】

細胞の表面上にTREM-1リガンド又はその誘導体を提示する細胞に特異的である抗体。

## 【請求項 7 3】

前記TREM-1リガンドが、CD177である、請求項66～72のいずれか1項記載の抗体。

## 【請求項 7 4】

1種以上の前炎症性サイトカイン又はケモカインのインビボ放出により特徴付けられる障害を診断するためのキットであり、ここで該キットが、TREM-1リガンドへ若しくは該リガンドをコードしている核酸へ結合する化合物を備えているか、又はここで該キットが、TREM-1受容体に結合するTREM-1リガンド若しくはその誘導体を備えている、前記キット。

## 【請求項 7 5】

敗血症などの炎症障害を診断するためのキットであり、ここで該キットが、TREM-1リガンドへ若しくは該リガンドをコードしている核酸へ結合する化合物を備えているか、又はここで該キットが、TREM-1受容体に結合するTREM-1リガンド又はその誘導体を備えている、前記キット。

## 【請求項 7 6】

前記障害が、微生物性敗血症である、請求項75記載のキット。

## 【請求項 7 7】

前記敗血症が、細菌性又は真菌性の敗血症である、請求項76記載のキット。

## 【請求項 7 8】

結合を検出する手段を更に備えている、請求項74～77のいずれか1項記載のキット。

## 【請求項 7 9】

結合を定量する手段を更に備えている、請求項74～77のいずれか1項記載のキット。

## 【請求項 8 0】

前記障害が存在する場合に、可視できる変化を提供する指標を1種以上備えている、請求項74～79のいずれか1項記載のキット。

## 【請求項 8 1】

前記1種以上の指標が、色の変化又はマーキングの変化を提供する、請求項80記載のキット。

## 【請求項 8 2】

1種以上の対照を更に備えている、請求項74～81のいずれか1項記載のキット。

## 【請求項 8 3】

前記TREM-1リガンドに対する抗体を備えている、請求項74～82のいずれか1項記載のキット。

## 【請求項 8 4】

TREM-1 mRNA又はTREM-1 cDNAにハイブリダイズする核酸を備える、請求項74～82のいずれか1項記載のキット。

## 【請求項 8 5】

TREM-1リガンドの変異型の存在を同定するためのキットであり、ここで該キットが、該リガンドの野生型よりも該変異型により強力に結合する抗体を備えているか、又はここで該キットが、該野生型をコードしている核酸よりも該変異型をコードしている核酸へより強力にハイブリダイズする核酸を備えている、前記キット。

## 【請求項 8 6】

前記抗体が、前記TREM-1リガンドの変異型に特異的であるか、又はここで該化合物が、該TREM-1リガンドの変異型をコードしている核酸に特異的である、請求項85記載のキット。

## 【請求項 8 7】

前記TREM-1リガンドの野生型への結合又は該リガンドをコードしている核酸への結合との比較を可能にする対照を更に備えている、請求項85又は86記載のキット。

## 【請求項 8 8】

TREM-1リガンド又はその誘導体を提供する工程、及び非ヒト宿主において抗体を産生す

10

20

30

40

50

るためにこれを使用する工程を含む、抗-TREM-1リガンド抗体を得るための方法。

【請求項 89】

細胞の表面上にTREM-1リガンド又はその誘導体を提示する細胞を提供する工程、及び非ヒト宿主において抗体を産生するためにこれらを使用する工程を含む、抗-TREM-1リガンド抗体を得るための方法。

【請求項 90】

前記抗体を精製する工程を更に含む、請求項88又は89記載の方法。

【請求項 91】

a)TREM-1リガンド又はその誘導体を提供する工程；

b)非ヒト宿主において抗-TREM-1リガンド抗体を産生するB細胞を作出するために該リガンド又は誘導体を使用する工程；

c)ハイブリドーマを作製するために、該B細胞を腫瘍細胞と融合する工程：を含む、抗-TREM-1リガンド抗体を産生するハイブリドーマを得る方法。

【請求項 92】

前記TREM-1リガンド又は誘導体が、実質的に純粋型である、請求項88、90又は91のいずれか1項記載の方法。

【請求項 93】

前記TREM-1リガンドが、CD177である、請求項88～92のいずれか1項記載の方法。

【請求項 94】

抗-TREM-1リガンド抗体を作製するハイブリドーマであり、ここで該抗体が、請求項66～73のいずれか1項に記載されているものである、前記ハイブリドーマ。

【請求項 95】

キメラ抗体の鎖をコードしている核酸分子を1種以上提供する工程、及び好適な発現系において該キメラ抗体を発現する該核酸分子を1種以上使用する工程を含む、TREM-1リガンドに対するキメラ抗体を作製する方法。

【請求項 96】

前記発現系が、哺乳類の細胞培養物である、請求項95記載の方法。

【請求項 97】

添付されている実施例及び図面を参照し、実質的に本明細書において先に記載されている発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、炎症障害の診断及び治療に関する。これは、炎症障害、特に敗血症及び炎症性腸疾患(IBD)の治療において使用の可能性がある薬剤又は候補薬剤を同定するためのスクリーニング方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

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において同定された細胞表面分子である[Bouchonらの論文、J. Immunol., 164: 4991-4995 (2000)]。これは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、かつDAP12と称されるアダプタータンパク質の助けにより、下流のシグナル伝達経路を活性化する[Bouchonらの論文、前掲；Colonnaらの論文、J. Infect. Dis., 187 (補遺): S297-301 (2003)、Colonnaの論文、Nat. Rev. Immunol., 6: 445-453 (2003)；Nathanらの論文、Nat. Med., 7: 530-2 (2001)]。

【0003】

TREM-1による誘発は、前炎症性サイトカイン、ケモカイン、活性酸素種の生成を生じ、このことは好中球顆粒の急速な脱顆粒、及びファゴサイトーシスにつながる。TREM-1シグナル伝達の遮断は、コラーゲンが誘導した関節炎の発症を抑制することが示されている(Y. Murakamiにより下記で示された要約「自然免疫：シグナル伝達機序(Innate Immunity: Signaling Mechanisms)」、2008年2月、キーストーン、コロラド州)。更にLPSにより誘導

されたIL-12ファミリーサイトカインの抑制(dampening)によるTREM-1活性化は、インビボにおけるT細胞反応に影響を及ぼすことができ、それゆえ自然免疫応答においてのみではなく獲得免疫応答においても、TREM-1活性化のインビボでの役割を示唆している(Dower Kの論文、J. Immunol., 180: 3520-3534 (2008))。TREM-1結合(engagement)の妨げは、様々な前炎症性メディエーターの生成及び分泌の同時低下につながるもので、TREM-1は、慢性炎症障害の治療に関する興味深い標的を表している。実際、急性内毒素血症、ヘリコバクターピロリ感染症、肝肉芽腫、サルモネラ・エンテリカ(*Salmonella enterica*)感染症、感染性肺疾患、マールブルグウイルス及びエボラウイルス感染症、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、炎症性腸疾患並びに関節リウマチ、敗血症を含む、様々な炎症障害におけるTREM-1の役割が明らかにされている。

10

#### 【0004】

敗血症は、集中治療の方策を著しく消耗し、かつ依然集中治療室において絶えず存在する問題である。米国及び欧州の両方において、毎年患者400,000から500,000名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方の改善にも関わらず、罹患率及び死亡率は高いままである。死亡率は、合併症を伴わない敗血症の40%から、敗血症性ショック及び多臓器不全に罹患した患者における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、炎症及び血液のメディエーターの複雑なネットワークの理解が増すにつれて、合理的かつ新規の療法の開発が可能になるであろう。

#### 【0005】

感染後、自然免疫応答及び認識性(cognitive)は、特異性及び複雑性を作り上げる連続相を発達させ、最終的には感染物質のクリアランス及びホメオスタシスの回復を生じる。自然免疫応答は、防御の第一線として働き、かつToll-様受容体(TLR)などのパターン認識受容体の活性化時に開始される[Aderemらの論文、Nature, 406: 782-786 (2000)、及びThoma-Uszynskiらの論文、Science, 291: 1544-1549 (2001)]。活性化は、様々な病原体関連分子(microbial)パターン(PAMP)により引き起こされる[Medzhitovらの論文、N. Engl. J. Med., 343: 338-344 (2000)]。TLRの活性化は、TNF- $\alpha$  及びIL-1 $\beta$  などのようなサイトカインの大量の放出を誘発し、このことは、敗血症のような重度感染症の場合、組織損傷及び致命的ショックが起こるのを早め得る[Cohenらの論文、Nature, 420: 885-91 (2002) ; Hotchkissらの論文、N. Engl. J. Med., 348: 138-50 (2003)]。

20

#### 【0006】

別の受容体、とりわけ感染症に対する反応に関与したものは、「骨髄細胞に発現する誘発性受容体-1(TREM-1)」として公知である。これは、好中球及び単球サブセットの表面上に発現される最近発見された受容体ファミリーである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、微生物生成物の存在下で前炎症性サイトカインの合成を誘発することが報告されている。

30

#### 【0007】

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において同定されている細胞表面分子である[Bouchonらの論文、J. Immunol., 164: 4991-4995 (2000)]。これは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、かつDAP12と称されるアダプタータンパク質の助けにより、下流のシグナル伝達経路を活性化する[Bouchonらの論文、前掲 ; Colonnaらの論文、J. Infect. Dis., 187 (補遺): S297-301 (2003)、Colonnaの論文、Nat. Rev. Immunol., 6:445-453 (2003) ; Nathanらの論文、Nat. Med., 7:530-2 (2001)]。

40

#### 【0008】

Bouchonとその同僚らは、TREM-1の発現は、細胞培養物中及び感染した患者由来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*)などの細菌の存在下で、好中球及び単球上で大きくアップレギュレートされたことを示した[Bouchonらの論文、Nature, 410: 1103-1107 (2001)]。それとは大きく異なり、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などの非感染性炎症疾患の患者に由来した試料においては、TREM-1はアップレギュレーションされなかつ

50



た[Bouchonらの論文、Nature, 410: 1103-1107 (2001)]。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- $\alpha$ 及びGM-CSFの増幅された合成が、IL-10生成の阻害と一緒に存在する[Blehariskiらの論文、J. Immunol., 170: 3812-3818 (2003)]。LPS-誘導された敗血症性ショックのマウスモデルにおいて、TREM-1シグナル伝達を遮断するとその動物は死から保護され、このことはこの分子の重要な役割を更に強調している[Colonnaらの論文、J. Infect. Dis., 187 (補遺): S297-301 (2003)、Bouchonらの論文、Nature, 410: 1103-1107 (2001)]。

#### 【0009】

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明らかにしている[Bouchonらの論文、J. Immunol., 164: 4991-4995 (2000)]。TREM-1の発現は、ヒトにおける細菌及び真菌の両方の感染症に反応し、骨髄細胞上で増大される。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の発現の増大に関連している。更に「デコイ」受容体としての可溶性TREM-1/Ig融合タンパク質によるマウスの処置は、LPS又は大腸菌に起因した死亡からマウスを保護する。

#### 【0010】

1991年に、米国胸部疾患学会議(ACCP)及び米国救命医療学会(ASCCM)は、全身性炎症反応症候群(SIRS)及び敗血症の状態の診断及び治療を明確化すること、並びにこの分野の研究の理解を助けることを目的として、これらに関する定義を公開した(表1を参照されたい)。

#### 【0011】

#### 【表1】

**表1：全身性炎症反応症候群(SIRS)及び敗血症の定義**

SIRS：右の2項以上に該当：	1. 体温38℃超又は36℃未満 2. 心拍数90回/分超 3. 呼吸数20回/分超又はPaCO <sub>2</sub> が4.3kPa未満 4. 白血球数 $12 \times 10^9$ /L超もしくは $4 \times 10^9$ /L未満、又は未熟(桿状)型10%超
敗血症：	感染に起因したSIRS
重症敗血症：	臓器低循環の証拠を伴う敗血症
敗血症性ショック：	適切な輸液蘇生にもかかわらず低血圧(収縮期血圧<90mmHg)、又は血圧を維持するための昇圧薬/変力薬の要求を伴う、重症敗血症

#### 【0012】

生理学的変動のパターンは、外傷、熱傷、肺炎及び感染症を含む一連の傷害に反応した重症患者において示されている。これらは、炎症反応、白血球増加症又は重篤な白血球減少症、異常高熱又は低体温、頻拍及び頻呼吸を含み、かつ集合的に全身性炎症反応症候群(SIRS)と称されている。この定義は、感染症の存在に関わらずこれらの状態での炎症プロセスの重要性を強調している。用語「敗血症」は、感染症が疑われるか又は立証された場合には、SIRSが留保されている。

#### 【0013】

敗血症は、低酸素血症、乏尿症、乳酸アシドーシス又は脳機能の変化などの臓器の機能障害の徴候により証拠付けられる臓器低循環の根拠が存在する場合に、重症敗血症に更に階層化される。敗血症性ショックは、適切な輸液蘇生にもかかわらず収縮期血圧90mmHg未満として定義された低血圧が合併した重症敗血症である。敗血症及びSIRSは、損なわれた

臓器循環及び酸素添加に起因した、多臓器不全(MOF)と称される2つ以上の臓器の不全が合併されることがある。感染症の全身性作用に加え、肺炎及び熱傷などの重症炎症状態において、全身性炎症反応が生じることがある。

【0014】

集中治療室において、グラム陰性菌は、敗血症の50～60%に関与し、グラム陽性菌は該症例の更に35～40%を占めている。残りの症例は、余り一般的でない真菌、ウイルス及び原虫の原因によるものである。

【0015】

TREM-1受容体と、炎症及び敗血症におけるその役割については、かなり関心がもたれているが、TREM-1受容体に関するいかなる生物学的リガンドもこれまで同定されていない。

10

本発明者らは、今回大きな突破口をもたらした。

本発明者らは、TREM-1受容体のリガンドを同定し、かつこれが、敗血症患者由来の好中球及び単球上に発現されることを確認した。

【発明の概要】

【0016】

本発明の一実施態様に従い、TREM-1リガンド又はその誘導体を提供する工程、並びに被験化合物が：

a) TREM-1受容体に対する若しくはTREM-1結合領域を含むその誘導体に対するリガンド若しくはその誘導体の結合；並びに/又は

b) TREM-1リガンドのTREM-1受容体への結合により調節された活性：に影響を及ぼすかどうかを決定する工程を含む、スクリーニング方法が提供される。

20

【0017】

本方法は好ましくは、TREM-1関連した炎症障害、特に敗血症及び炎症性腸疾患(IBD)の治療において有用である化合物のスクリーニングのために使用される。

従って本方法は、薬剤/候補薬剤のスクリーニングに使用することができる。

ここで本方法は、被験化合物が、TREM-1リガンド/その誘導体のTREM-1受容体/誘導体への結合を遮断若しくは減少させるかどうか、又は該結合により媒介される活性を遮断又は減少させるかどうかを決定する工程を含むことが望ましい。

そうであるならば、この化合物は、TREM-1関連した炎症障害、特に敗血症及び炎症性腸疾患(IBD)の治療において潜在的に有用であると結論付けられる。

30

【0018】

好ましくは本方法は、病原体により媒介された敗血症の治療に有用な化合物のスクリーニングのために使用される。用語「病原体」は、本明細書において、ヒト又は非ヒト動物宿主の健康に有害であり得る感染性生物のいずれかを記載するために使用される。

以下に考察するように、本発明者らは、TREM-1リガンドは、病原体-媒介型敗血症の有用なマーカーであること、及び該リガンドは、病原体-媒介型敗血症の病原体が関与していないSIRS状態からの識別に使用することができることを示している。

【0019】

例えば敗血症は、微生物性感染症に起因することができる。

この感染症は、例えば細菌性、真菌性、原虫性又はウイルス性であってよい。

40

しかしより好ましくは、これは細菌性又は真菌性である。

好適なことに本方法は、TREM-1受容体又は少なくともTREM-1受容体のリガンド-結合部分を発現する細胞を使用する。

【0020】

(望ましいならば、TREM-1受容体の細胞内部分は、通常はTREM-1受容体と関係がない異種部分と交換されてよい。これは、ある種のレポーターベースのスクリーニングシステムにおいて有用である。実施例11において後に考察されたように、例えばCD3 の細胞質領域が使用されてよい。)

【0021】

これらの細胞は、天然にこの受容体を発現するものであり得る。従ってこれらは、好中

50

球又は単球であり得る。そのような細胞は、敗血症患者から得ることができる。あるいは、これらの細胞は、好中球又は単球である必要はないが、しかしTREM-1受容体を通常は発現しないが、TREM-1受容体又はそれらのTREM-1リガンド結合部分を発現するように修飾されている他の細胞であり得る。修飾は、当該技術分野において公知の技術により実行されてよい。例えば、これらの細胞は、TREM-1受容体又は少なくともこの受容体のリガンド結合部分及び好適なプロモーター(例えば誘導性又は構成性プロモーター)をコードしているベクターによりトランスフェクトされることができる。

【0022】

従って本細胞は、前述の受容体が通常発現される細胞に対して、異種細胞であり得る。しかしこれは、細胞と会合されるべきTREM-1受容体/それらのリガンド結合部分によってなお本質的ではない。

10

可溶性型が使用されてよい。多量体型も使用されてよい。

【0023】

例えば、ストレプトアビジン足場に連結された4つの可溶性型を含む四量体が、本明細書において以下により詳細に記載されたように使用されることができる。あるいは、IgG定常領域に融合されたTREM-1受容体細胞外ドメインを含む可溶性型が使用されることができる。そのような構築体は、WO/2004/081233の実施例1において開示されている(WO/2004/081233の完全な内容は引用により本明細書中に組み込まれている)。

【0024】

例えばアフィニティカラムにより、固定された形状の本受容体を提供することも可能である。

20

前述の型が、TREM-1リガンドに結合する能力を依然保持している限りは、これらは全て本受容体の誘導体と考えることができる。

結合は、定量的又は定性的に評価されてよい。

従って、例えば本方法は、被験化合物の非存在下でのTREM-1リガンド又は誘導体の、TREM-1受容体又は誘導体への結合の、被験化合物の存在下で生じる結合との差異を決定することを含むことができる。

あるいは定性的アッセイは、結合が生じたかどうかを簡単に決定することができる。

【0025】

結合を分析する技術は、当該技術分野において周知である。例えば、本結合は、ウェスタンブロット、放射性免疫測定、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」免疫測定、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線検定法、免疫蛍光測定、プロテインA免疫検定、免疫沈降アッセイ、免疫組織化学アッセイ、競合的又はサンドイッチELISA、放射免疫測定、ウェスタンブロットアッセイ、免疫組織学的アッセイ、免疫細胞化学アッセイ、ドットブロットアッセイ、蛍光偏光アッセイ、シンチレーション近接アッセイ、均質時間分解蛍光アッセイ、IAsys分析、又はBIACore分析などの技術を使用する、競合的免疫測定、非競合的アッセイシステムの使用により検出することができる。

30

【0026】

好適な技術は、検出可能な標識を使用し、かつ検出された標識の量の変化を測定する。

40

本発明者らは、CD177(時にはNB1又はPRV-1として公知)を、TREM-1リガンドとして同定した。

本発明者らは、CD177に対するモノクローナル抗体は、TREM-1リガンドを含む構築体の、TREM-1受容体を発現している敗血症性の好中球への結合を遮断することも示している。

CD177は、本発明に先行して周知であったが、これがTREM-1リガンドであることを示すものは存在しなかった。実際、TREM-1リガンドとの関連におけるCD177の考察は全くなかった。

【0027】

CD177は、自己免疫疾患に関連して考察されている。例えばStroneckらの論文(Transl Med., 2: 8 (2004))において、CD177は、新生児の同種免疫好中球減少症の症例を調べる間

50

に、最初にLalezariらにより記載された好中球膜糖タンパク質であることが記載されている[Lalezari P、Murphy GB、Allen FH Jr.の論文、「NB1、新生児好中球減少症の病理に関連した新規好中球特異抗原(NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia)」、J Clin. Invest., 50:1108-1115 (1971)]。場合によっては妊娠時に、母体は、胎盤を通過するよりも、胎児において好中球と反応するような好中球抗原に対する同種抗体を産生し、これは新生児に好中球減少症を引き起こす。そのような抗体により認識された1つの抗原は、Lalezariらにより「NB1」として記載されている。後にこの抗原は、ヒト好中球抗原-2a(HNA-2a)として再度命名され、かつこの抗原を保持する糖タンパク質(gp)は、NB1糖タンパク質と称された[Bux J、Bierling P、von dem Borne AEG Krらの文献、ISBT顆粒球抗原作業部会、「顆粒球同種抗原の命名法(Nomenclature of Granulocyte Alloantigens)」、Vox Sang., 77:251 (1999)]。

#### 【0028】

2001年に、Kisselとその同僚らは、NB1糖タンパク質をコードしている遺伝子を配列決定し、遺伝子NB1と称した[Kissel K、Santoso S、Hofmann C、Stroncek D、Bux J.の論文、「免疫好中球減少症の病理及び輸血反応に関連した好中球糖タンパク質NB1(CD177)の分子基礎(Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions)」、European Journal of Immunology, 31: 1301-1309 (2001)]。しかしこの遺伝子は、前年配列決定されたPRV-1と称される遺伝子と高度に相同であった。Temerinacとその同僚らは、2000年に、真正赤血球増加症患者由来の好中球において過剰発現された遺伝子を研究中に、PRV-1を同定しかつ配列決定した[Temerinac S、Klippel S、Strunck E、Roder S、Lubbert M、Lange W、Azemar M、Meinhardt G、Schaefer HE、Pahl HLの論文、「真正赤血球増加症において過剰発現されるuPAR受容体スーパーファミリーの新規メンバーPRV-1のクローニング(Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is over expressed in polycythemia rubra vera)」、Blood. 95: 2569-2576 (2000)]。NB1とPRV-1のコード領域は、アミノ酸変化を生じる4個のヌクレオチドのみにおいて異なり、Caruccio、Bettinottiとその同僚らは、PRV-1及びNB1は、単独の遺伝子の対立遺伝子であることを示した[Bettinotti MP、Olsen A、Stroncek Dの論文、「好中球抗原NB1、CD177をコードしている遺伝子のゲノム構造の同定のためのバイオインフォマティクスの使用(The Use of Bioinformatics to Identify the Genomic Structure of the Gene that Encodes Neutrophil Antigen NB1, CD177)」、Clinical Immunology. 102: 138-144 (2002) ; Caruccio L、Walkovich K、Bettinotti M、Schuller R、Stroncek D.の論文「CD177多型：高頻度の一塩基多型と好中球表面タンパク質発現の間の相関関係(CD177 polymorphisms: correlation between high frequency single nucleotide polymorphisms and neutrophil surface protein expression)」、Transfusion, 44: 77-82 (2004)]。PRV-1及びNB1は、現在同じ遺伝子の対立遺伝子であり、PRV-1は、健常な集団においてより一般的な対立遺伝子であると考えられている[Caruccio L、Bettinotti M、Fraser E、Director-Myska A、Arthur DC、Stroncek DFの論文、Blood, 102:661a (2003)]。

#### 【0029】

先に記したように、CD177の誘導体を本発明において使用できる。

用語「誘導体」は、変種、断片及び融合タンパク質を含む。

好適な誘導体は、生理的条件下で、TREM-1受容体に結合する。より好適には、これらは、インビボにおいて好中球又は単球上、特に敗血症性患者由来の好中球又は単球上に存在する他のどの細胞表面タンパク質にも結合しない。このことは、これらが、高度に特異性がある細胞-ベースの結合アッセイにおいて使用されることを可能にする。

#### 【0030】

最も好適には、誘導体は、それらの受容体が得られる種(例えばヒト(Homo sapiens))において通常認められる他のいずれのタンパク質にも結合しないという意味で、誘導体はTREM-1受容体に特異的である。

CD177の変種は、対立遺伝子変種を含む。対立遺伝子変種は、種内又は種間の対立遺伝

子変種であってよい。好適な変種は、哺乳類において生じる。より好適には、これらは、齧歯類(例えば、マウス、ラット)若しくはウサギ又はヒトにおいて生じる。

#### 【0031】

非対立遺伝子変種も含まれる。そのような分子は、組み換えDNA技術、自動合成、位置指定変異誘発などを用いて調製されることができる。そのような技術は、現在良く開発されている。

好適な変種は、図18に示されたアミノ酸配列と、又はCD177についてTREM-1受容体に結合するために必要とされる図18の配列の少なくとも一部と、少なくとも約60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は98%同一であるアミノ酸配列(又は少なくともそれらの一部)を有する。

10

#### 【0032】

この部分は、図18に示されたアミノ酸22~437に、特に22~408に対応する断片内であると予想される。従ってこのアミノ酸の一連なり又は(CD177受容体に依然結合するそれらの更により小さい部分)は、本発明において使用されることができ、かつ配列比較のためにも使用されることができる。図18に示されたアミノ酸配列1~22は、通常成熟タンパク質には存在しないであろう。アミノ酸408は、GPIアンカーへの結合に使用されるアミノ酸である。GPIアンカーを切断する酵素(例えばホスホリパーゼC)を使用し、22~408断片を可溶性型として放出することができる。他の可溶性型も可能であり、かつ以下により詳細に記載されるように、遺伝子操作により作製されることができる。

20

#### 【0033】

ふたつのペプチド/アミノ酸の配列の又はふたつの核酸配列の配列一致性の割合を決定するために、これらの配列は、最適な比較を目的として並置される(例えば、最適なアラインメントのために、ギャップが、第一及び第二のアミノ酸又は核酸の配列の一方又は両方に任意に導入されてよく、並びに非相同配列は、比較目的のためには無視されることができる。)

#### 【0034】

例えば、比較目的で並置される参照配列の長さは、該参照配列の長さの、例えば該参照配列の長さ全体の、少なくとも30%、好適には少なくとも40%、より好適には少なくとも50%、更により好適には少なくとも60%、及び更により好適には少なくとも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、好適には少なくとも40個、より好適には少なくとも50個、更により好適には少なくとも60個、及び更により好適には少なくとも70、80又は90個のアミノ酸残基が、例えば100個のアミノ酸残基などが並置される。)。その後対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置でアミノ酸残基又はヌクレオチドが比較される。第一の配列における位置が、第二配列における対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドにより占拠される場合、これらの分子は、その位置で同一である(本明細書において使用されるアミノ酸又は核酸の「同一性」は、アミノ酸又は核酸の「相同性」と同等である)。

30

#### 【0035】

ふたつの配列間の同一性の割合は、それらふたつの配列の最適なアラインメントのために導入される必要があるギャップ数、及び各ギャップの長さを考慮し、これらの配列により共有される同一な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割合の決定は、数学アルゴリズムを使用し達成することができる。

40

#### 【0036】

一実施態様において、ふたつのアミノ酸配列間の同一性の割合は、GCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>から入手可能)中のGAPプログラムに組み込まれているNeedleman - Wunschアルゴリズム(J. Mol. Biol., (48): 444-453 (1970))を使用し、Blossom 62行列又はPAM250行列のいずれか、及びギャップ重み16、14、12、10、8、6又は4、及びレングス重み1、2、3、4、5又は6を用いて決定される。

#### 【0037】

50

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の割合は、GCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>から入手可能)中のGAPプログラムを使用し、NWSgapdna.CMP行列、及びギャップ重み40、50、60、70又は80、及びレンジ重み1、2、3、4、5又は6を用い、決定される。別の実施態様において、ふたつのアミノ酸配列又はヌクレオチド配列間の同一性の割合は、ALIGNプログラム(2.0版)に組み込まれているE. Meyers - W. Millerアルゴリズム(CABIOS, 4:11-17 (1989))を使用し、PAM120重み残基テーブル、ギャップレンジペナルティ12、及びギャップペナルティ4を用い、決定される。本発明の核酸配列及びタンパク質配列は、例えば他のファミリーメンバー又は関連配列を同定するために公開されたデータベースに対する探索を実行するための「クエリー配列」として更に使用することができる。このような探索は、AltschulらのNBLASTプログラム及びXBLASTプログラム(2.0版)を使用し、実行することができる(J. Mol. Biol., 215: 403-10 (1990))。BLASTヌクレオチド探索は、本発明のNIP2b、NIP2cL、及びNIP2cS核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラムにより、スコア = 100、ワードレンジ = 12で実行することができる。BLASTタンパク質探索は、本発明のNIP2b、NIP2cL、及びNIP2cSタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワードレンジ = 3で実行することができる。比較を目的としてギャップ付きアライ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))に記載されたように利用することができる。BLASTプログラム及びGapped BLASTプログラムを利用する場合には、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>を参照されたい)。

10

20

#### 【0038】

当業者は、様々な変化は、依然そのポリペプチドの特性を保ちつつ、望ましい特性(受容体への結合など)を持つポリペプチドのアミノ酸配列を作製し得ることが多いことを十分に理解しているので、本発明における使用に関して広範な変種を対象とすることは当然妥当である。

#### 【0039】

そのような変化は、以下の(i)~(iv)項にまとめられている：

##### (i) 置換

当業者は、様々なアミノ酸は、同様の特性を有することが多く、そのためこれらはそのポリペプチドの望ましい特性を排除することなく(例えば望ましい活性の少なくとも20%、好適には少なくとも50%、より好適には少なくとも75%を維持するなど)、交換され得ることが多いことを知っている。

30

例えば、アミノ酸グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンはしばしば、互いに置換されることができる(脂肪族側鎖を有するアミノ酸)。これらの可能性のある置換の最も典型は、グリシン及びアラニンを互いに置換するために使用すること(これらは比較的短い側鎖を有する)、並びにバリン、ロイシン及びイソロイシンを互いに置換するために使用すること(これらは疎水性である比較的長い脂肪族側鎖を有する)である。

#### 【0040】

互いに置換されることが多い他のアミノ酸は、典型的には以下を含む：

40

フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン(芳香族側鎖を有するアミノ酸)；

リジン、アルギニン及びヒスチジン(塩基性側鎖を有するアミノ酸)；

アスパラギン酸及びグルタミン酸(酸性側鎖を有するアミノ酸)；

アスパラギン及びグルタミン(アミド側鎖を有するアミノ酸)；並びに

システイン及びメチオニン(含硫側鎖を有するアミノ酸)。

この性質の置換は、「保存的」又は「半保存的」アミノ酸置換と称されることが多い。好適にはこの変種は、10以下の置換(例えば、5以下、より好適には1又は2)を含むことができる。

#### 【0041】

##### (ii) 欠失

50

ポリペプチドの不必要部分又は望ましくない部分の欠失を作製することができる。これは、ポリペプチドのサイズを減少させるために有用であり得る。以下に考察するように、欠失は、ポリペプチドが通常は膜結合されている場合に、可溶性ポリペプチドを作製するためにも有用であり得る。

好適にはこの変種は、1又は2の欠失を含むことができ、その各々は、参照配列の長さの20%以下(10%以下など)である。

#### 【0042】

##### (iii)挿入

アミノ酸挿入も作製することができる。これは、該ポリペプチドの特性を変更するため(例えば、同定、精製又は発現を補助するため)に行ってもよい。

好適にはこの変種は、1又は2の挿入を含むことができ、その各々は、参照配列の長さの20%以下(10%以下など)である。

所与の配列に対しアミノ酸変化(置換、欠失及び/又は挿入のいずれか)を組み込んでいるポリペプチドは、任意の好適な技術を用い提供することができる。例えば、配列変化を組み込んでいる核酸配列は、位置指定変異誘発により提供することができる。これを使用し、そのアミノ酸配列における対応する変化を有するポリペプチドの発現が可能である。

##### (iv)前記の組合せ

当然1つ以上の欠失、挿入及び/又は置換を組合せることができる。

#### 【0043】

他の変種も含まれる。例えば、1種以上のアミノ酸アナログ(非天然のアミノ酸を含む)を含むポリペプチドが使用されてよい。従って本発明は、ミメトープ及びペプチド模倣物質を含む。用語「ミメトープ」及び「ペプチド模倣物質」は、本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の立体配座を模倣している他の化学構造と交換されている化合物をいう。ペプチド模倣物質の例は、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たペプチド性化合物(例えばJames, G. L.らの論文、Science, 260: 1937-1942(1993)参照)、及び「レトロ-インベルソ型」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「ペプチド模倣物質」は、天然のアミノ酸以外であって、ペプチド-含有化合物において、該ペプチドの機能と著しい程度に有害に干渉することなく、特定のアミノ酸の代替として高次構造的及び機能的に役立つ部分もいう。アミノ酸模倣物質の例は、D-アミノ酸を含む。1個以上のD-アミノ酸により置換されたペプチドは、周知のペプチド合成手法を用い作製することができる。追加の置換は、例えば、b-シアノアラニン、カナバニン、ジエンコール酸、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-メチルヒスチジンなどの官能基による変種側鎖を有するアミノ酸アナログを含む。ミメトープ及びペプチド模倣物質を調製する方法は、当該技術分野において公知である。

#### 【0044】

ここで断片に目を移すと、先に示したように、断片は、本スクリーニング方法において利用することができる。これらは、例えば抗体産生のため、結合試験のため；治療目的のため(以下に考察)などの、他の目的のためにも利用することができる。

断片は好適には、図18に示されたアミノ酸配列又はそれらの変種の少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90又は100個のアミノ酸を含む。

#### 【0045】

好適な断片は、可溶性型である。本明細書において用語「可溶性」は、膜結合されているポリペプチドから区別するために使用される。

一般にシグナル配列(図18においてイタリックで記されたアミノ酸1-22)は、存在しないであろう。

可溶性型は、先に考察されたように、GPIアンカーされたタンパク質の、好適な酵素による切断により作製することができる。あるいは、遺伝子操作技術を使用し、分泌されかつGPIアンカーを有さないタンパク質を提供することができる。

様々な長さの可溶性型を提供することができ、かつTREM-1リガンド又は変種の細胞外部分に由来することができる。

しかし好適には、TREM-1受容体結合部分は、結合試験により容易に決定することができるので、少なくともこれは存在する。

【0046】

先に記載された変種又は断片は、望ましい場合は、異種部分(すなわち、それらが通常現実には連結されない部分)と連結されてよい。好適にはこの連結は、共有結合を介しているが、しかし非共有的連結も、本発明の範囲内である。

従って例えば、融合タンパク質が提供されてよい。

【0047】

本発明は、融合タンパク質を包含し、TREM-1リガンド又はその誘導体(特に断片)を、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、好適にはその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)に、組み換え的に融合するか又は化学的に結合して(共有的及び非共有的結合の両方を含む)融合タンパク質が作出される。この融合は、必ずしも直接であることは必要ないが、しかしリンカー配列を介して生じることができる。

【0048】

一例において、融合は、様々な型の免疫グロブリンに由来する配列に対してである。例えば、インビボにおいてより可溶性かつ安定した融合ポリペプチド又はそれらの断片を作製するために、融合は、ヒトIgG1又はIgM分子の定常領域(例えば、ヒンジ、CH2ドメイン、及びCH3ドメイン)に対してであり得る(例えば、Hudson及びSouriausoの論文、*Nature Medicine*, 9(1):129-134 (2003)により記載されたように)。抗体断片の短い半減期も、「ペグ化」、すなわちポリエチレングリコールへの融合により、延長することができる(Leo ng, S. R.らの論文、*Cytokine*, 16:106-119(2001)を参照されたい)。WO 01/83525に開示されたようなそのような融合の一例において、Fcドメインは、生物学的活性のあるペプチドと融合されている。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的連結により、薬理活性のある化合物が生成される。ビヒクルへの連結は、そのペプチドの半減期を増大し、これは他方でインビボにおいて迅速に分解されることができる。

【0049】

あるいは、非古典的代替タンパク質足場を含む融合タンパク質を作製することができる(例えばNygren及びSkerraの論文、*J Immunol Methods*, 290 (1-2):3-28 (2004)又はWO03049684を参照されたい)。

そのような融合タンパク質は、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産生のための免疫原として使用することができる。

ひとつの特定の実施態様において、融合タンパク質は、インビボにおけるTREM-1リガンドとその受容体の間の相互作用を阻害するために、被験者へ投与することができる。

【0050】

シグナル配列へのN-末端シグナル配列融合は、望ましい場合に提供することができる。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の分泌配列(Stratagene社; ラホヤ, CA)は、真核細胞異種シグナル配列として利用可能である。原核細胞異種シグナル配列の例として、phoA分泌シグナル(Sambrookらの論文、前掲; 及び、「最新分子生物学プロトコール(*Current Protocols in Molecular Biology*)、1992年、Ausubelら編集、John Wiley & Sons社)及びプロテイン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、バキュロウイルス外被タンパク質のgp67分泌配列である(最新分子生物学プロトコール、1992年、Ausubelら編集、John Wiley & Sons社)。

【0051】

別の実施態様において、融合は、タグ配列、例えばヘキサ-ヒスチジンペプチドに対してであり、とりわけpQEベクター(QIAGEN社, 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)

10

20

30

40

50



において提供されるタグなどであり、その多くは市販されている。例えばGentzらの論文(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824 (1989))に記載されたように、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。他のペプチドタグの例は、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに相当している赤血球凝集素「HA」タグ(Wilsonらの論文、Cell, 37:767 (1984))、及び「flag」タグ(Knappikらの論文、Biotechniques, 17(4)754-761 (1994))である。これらのタグは、組み換えにより産生されたポリペプチドの精製に特に有用である。

#### 【0052】

融合タンパク質は、標準の組み換えDNA技術によるか、又は例えばペプチド合成装置の使用などによるタンパク質合成技術により、作製できる。例えば、融合タンパク質をコードしている核酸分子は、自動DNA合成装置を含む通常の技術により合成できる。あるいは、遺伝子断片のPCR増幅は、2つの連続する遺伝子断片の間に相補的突出を生じるアンカープライマーを用いて実行され、これは引き続きアニーリングされ、かつ再増幅され、キメラ遺伝子配列を生じることができる(例えば、最新分子生物学プロトコール、1992年、Ausubelら編集、John Wiley & Sons社を参照されたい)。融合タンパク質をコードしているヌクレオチド配列は、適切な発現ベクターに挿入できる。

#### 【0053】

好適な融合タンパク質は、それらがTREM-1受容体に結合することができる部分(又はリガンド)を複数有するという意味で多価である。

従って例えば複数の可溶性CD177リガンド(すなわち、CD177に特異的に結合することが可能なタンパク質)と一緒に結合されてよい。

これは、例えば可溶性型の多価の足場への連結により実現されることができる。免疫グロブリンなどの分子を使用し、都合の良い多量体の足場を提供することができる。

#### 【0054】

TREM-1リガンドコード領域のIgGのFc部分の変異型(Fc部分は、Fc受容体には結合しないように修飾されている)をコードしている領域との融合を基にした二量体が、実施例において考察されている。この二量体は、Fc領域の会合時に作製され、一旦該融合タンパク質ポリペプチドは、細胞培養培地へ分泌される。

しかし、免疫グロブリン-由来の足場の使用は必須ではない。この足場は、任意の望ましい構造により提供されてよい。

#### 【0055】

例えば、ストレプトアビジンを使用することができる。これは先に考察されたように、TREM-1受容体の四量体を提供するための足場として、本発明者らにより成功している。同様の技術を使用し、TREM-1リガンド又はその誘導体の四量体を提供することができる。

#### 【0056】

様々な多量体(例えば、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体など)が、異なる数のTREM-1リガンド/それらの誘導体を適切な足場への連結することにより提供できる。

いかなる種類の足場が使用される場合であっても、TREM-1受容体への結合と実質的に干渉しないことが望ましい。

#### 【0057】

好適な構造は、野生型TREM-1リガンドのように、少なくともTREM-1受容体へ結合することが可能なものである。より好適にはこれらは、TREM-1受容体に結合する可能性がより高い。

この構造が療法において使用される場合、この足場は、哺乳類(好適にはヒト)宿主における炎症を著しく増大しないことが望ましい。所定の種において既に存在するタンパク質は免疫応答を惹起する可能性がより少ないことを前提として、これらを好適な足場の基礎として使用することができる。

前述の記載から、様々な融合タンパク質を本発明において使用することができることは理解されるであろう。

#### 【0058】

しかしTREM-1リガンド、断片又は変種は、融合タンパク質の場合のように、別のポリペプチドには連結される必要はないが、表面に連結されることができる。

このことは、表面上への固定を可能にする。例えば、プレート、チップ、カラム、ビーズ、マトリックス、メンブレン、ウェルなどは、固定のための表面を提供するために使用されることが多い。固定の技術分野において周知であるように、リンカーを使用し、リガンド、断片又は変種を表面へ結合させることができる。

【0059】

固定された型は、精製、診断、スクリーニング(特にハイスループットスクリーニング)、特徴決定、貯蔵、操作の容易さなどを含む、多くの目的に使用されてよい。

多くの種類のTREM-1リガンド又は変種、断片、融合タンパク質などを含むその誘導体を、本発明において使用することができることは、先の記載から理解されるであろう。

【0060】

このリガンド又は誘導体は、「単離された」形状で提供されてよい。

本発明の目的のために「単離された」ポリペプチドは、該タンパク質が誘導される細胞若しくは組織給源由来の細胞物質若しくは他の夾雑ポリペプチドを実質的に含まないか、又は化学合成された場合に、化学物質前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含まないと考えられる。

【0061】

語句「細胞物質を実質的に含まない」とは、ポリペプチドが、単離される又は組み換えにより作出される細胞の細胞成分から分離されている、ポリペプチドの調製を含む。従って、実質的に細胞物質を含まないポリペプチド/タンパク質は、夾雑タンパク質を約50%、40%、30%、20%、10%、5%、2.5%、又は1%(乾燥重量%)未満有するポリペプチド/タンパク質の調製物を含む。

【0062】

このポリペプチドが組み換えにより産生される場合、これはまた、好適には、培養培地を実質的に含まない。すなわち培養培地は、タンパク質調製物の容積の約50%、40%、30%、20%、10%、又は5%未満を表す。このポリペプチドが化学合成により作製される場合、これは好適には、化学物質前駆体又は他の化学物質を実質的に含まないことが適している。すなわちこれは、該タンパク質の合成に關与している化学物質前駆体又は他の化学物質から分離される。従ってそのようなポリペプチド/タンパク質の調製物は、関心対象のポリペプチド断片以外の化学物質前駆体又は化合物を約50%、40%、30%、20%、10%、又は5%(乾燥重量)未満有する。

【0063】

当然本発明において使用するための他の物質も、単離された形状で提供されてよい。単離された形状は、構造/機能の分析、結合試験、スクリーニング、抗体の産生又は選択などに使用されてよい。これらは他のタンパク質との夾雑が相対的にごくわずかか又は夾雑していないという事実は、結果は夾雑により有害な影響をおそらく受けないということの意味する。

【0064】

ここで本発明の医学用途に目を移すと、本発明は、1種以上の前炎症性サイトカイン又はケモカインの放出により特徴付けられる障害を治療するための医薬品の製造における、TREM-1リガンドのTREM-1受容体への結合を遮断又は減少させる化合物の使用を含む。

【0065】

この障害は、TREM-1リガンドのTREM-1受容体への結合により媒介される任意の炎症障害(又は他の障害)であってよい。炎症障害の例は、急性及び慢性炎症障害、敗血症、急性内毒素血症、脳炎、炎症性腸疾患(IBD)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、アレルギー性炎症障害、喘息、肺線維症、肺炎、市中肺炎(CAP)、人工呼吸器関連肺炎(VAP)、急性呼吸器感染、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、感染性肺疾患、胸水、消化性潰瘍、ヘリコバクターピロリ感染、肝肉芽腫、関節炎、関節リウマチ、変形性関節症、炎症性骨溶解、潰瘍性大腸炎、乾癬、血管炎、自己免疫疾患、甲状腺炎、類鼻疽、(腸間膜)虚血性再灌流障害、フィロウイ

10

20

30

40

50

ルス感染症、尿道感染症、細菌性髄膜炎、サルモネラ・エンテリカ感染、マールブルグウイルス及びエボラウイルス感染症を含む(しかし、これらに限定されるものではない)。

【0066】

更にTREM-1シグナル伝達は、単球-血小板及び好中球-血小板の凝集が重要な役割を果たす疾患に関わりがある(Haselmayerらの論文、Blood, 110: 1029-1035 (2007))。例えば、循環白血球-血小板凝集、特に単球-血小板凝集は、アテローム性動脈硬化症病巣の形成を促進し、急性冠状動脈症候群、卒中、及び末梢血管障害において増加し、並びにこれは急性心筋梗塞の早期マーカーである。循環単球-血小板及び好中球-血小板凝集の増加は、以下を含む多くの他の状態においても報告されている：真性糖尿病、嚢胞性線維症、喘息、子癇前症、胎盤機能不全、片頭痛、ネフローゼ症候群、血液透析、鎌状赤血球症、全身性炎症反応症候群、敗血症性多臓器不全症候群、抗リン脂質症候群、全身性エリスマトーデス、関節リウマチ、炎症性腸疾患、骨髄増殖症候群、川崎病、及びアルツハイマー病(Michelson及びNewburgerの論文、Blood, 110:794-795 (2007))。

10

【0067】

しかし好ましくは該障害は、敗血症であり、かつ病原体により媒介される。

より好ましくは、これは、微生物に媒介された敗血症である。

最も好ましくは、これは、真菌又は細菌に媒介された敗血症である。

微生物により媒介される敗血症の例は、肺炎である。

あるいは該障害は、炎症性腸疾患であることが好ましい。

【0068】

20

本明細書において定義された用語「肺炎」は、TREM-1発現の増大が検出され得る、細菌感染症及び非細菌感染症(例えばブラストミセス・デルマチチジス(*Blastomyces dermatitidis*)、ヒストプラスマ・カプスラーツム(*Histoplasma capsulatum*)、コクシジオイデス属(*Coccidioides*)、スポロトリックス・シェンキイ(*Sporothrix schenckii*)、ニューモシステイス・カリニ(*Pneumocystis carinii*)、クリプトコッカス属(*Cryptococcus*)、アスペルギルス属(*Aspergillus*)、又はムコール属(*Mucor* sp.)による感染症)、原虫感染症又は寄生体感染症(例えば、トキソプラズマ(*Toxoplasma gondii*)、糞線虫(*Strongyloides stercoralis*)、回虫属(*Ascaris*)、鉤虫、イヌ糸状虫属(*Dirofilaria*)、肺吸虫属(*Paragonimus*)、又は赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)により引き起こされるもの)などの、細胞外病原体による感染により引き起こされる肺の炎症を意味する。

30

【0069】

肺炎は、「大葉性肺炎」(これは肺一葉において生じる)及び気管支肺炎(肺において不規則に位置する傾向がある)を含む。更に肺炎は、しばしば2つの範疇に分類され、これは最も可能性のある原因である生物の予測を助けることができる。この設定において「市中肺炎(院外で罹る肺炎)」は、ウイルス性呼吸器感染症に続くことが多い。これは、毎年成人400万人近くが罹患する。これはおそらく最も一般的な肺炎原因菌である肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)により引き起こされるであろう。他の生物、例えば非定型細菌と称される肺炎クラミジア又は肺炎マイコプラズマも、市中肺炎の一般的な原因である。病院内で罹る「病院内感染肺炎」は、院内肺炎と称されることが多い。入院患者は、特にグラム陰性菌及びブドウ球菌の攻撃を受けやすい。

40

【0070】

広範な化合物を、前述の障害の治療において使用することができる。

そのような化合物の一例は、抗体である。好適にはこの抗体は、TREM-1リガンド(又は適宜それらの変種、断片若しくは融合タンパク質)に結合する。

最も好適にはこれは、TREM-1受容体への結合に寄与するTREM-1リガンドの一部に結合する。

【0071】

この抗体は、モノクローナル性又はポリクローナル性であってよい。

ポリクローナル抗体は、免疫原としてTREM-1リガンド又は誘導体を動物へ注射する際に、好適な動物宿主(例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ又はサ

50

ル)におけるそれらの産生を刺激することにより生じることができる。必要ならば、本発明の物質と一緒に、アジュバントが投与されてよい。その後抗体は、本発明の物質へのそれらの結合特性によって、精製することができる。

【0072】

例えば前記免疫原は、CD177又はそれらの断片若しくは変種であってよい。あるいはこの免疫原は、TREM-1リガンドを発現している細胞、例えばCD177などのTREM-1リガンドを発現している好中球などであってよい。最も好適には本免疫原は、ヒト型のもの(例えば、ヒトCD177又はTREM-1リガンドを発現しているヒト細胞)である。

【0073】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマから作製することができる。これらは、不死化細胞株を形成するために、望ましい抗体を産生する動物由来の骨髓腫細胞及び脾細胞を融合することにより形成することができる。従って周知のKohler及びMilsteinの技術(Nature, 256, 52-55 (1975))又はこの技術の変法を使用することができる。

【0074】

特定のポリペプチドに結合するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を作製する技術は、現在当該技術分野において十分に開発されている。これらは、標準の免疫学の教本、例えばRoittらの著書「免疫学(Immunology)(第2版)」(1989)、Churchill Livingstone社(ロンドン)において考察されている。

【0075】

用語「抗体」は、抗体全体に加え、本発明のポリペプチドへ結合することが可能であるその誘導体を含むように、本明細書において使用される。従って本発明は、抗体断片及び合成構築物を含む。抗体断片及び合成構築物の例は、Dougallらの論文、Tibtech, 12: 372-379 (1994年9月)に示されている。

【0076】

抗体断片は、例えばFab、F(ab')<sub>2</sub>及びFv断片を含む。Fv断片は、単鎖Fv(scFv)分子として公知の合成構築物を産生するように、修飾されることができる。これは、V<sub>H</sub>領域及びV<sub>L</sub>領域に共有的に結合しているペプチドリinkerを含み、これは該分子の安定性に寄与している。使用することができる他の合成構築物は、CDRペプチドを含む。これらは、抗原-結合決定基を含む合成ペプチドである。ペプチド模倣物質も、使用されてよい。これらの分子は通常、CDRループの構造を模倣し、かつ抗原-相互作用側鎖を含む高次構造が制約された有機環である。

【0077】

合成構築物は、キメラ抗体を含む。ここでは抗体の1つ以上の部分は1種の動物(通常齧歯類)に由来し、かつ1つ以上の部分は別の動物(通常ヒト)に由来する。実践において、そのような抗体は、所望の融合タンパク質をコードしているDNAがクローニングされ、かつ好適な発現系に挿入されるような、組み換え技術法により作出される。好ましい発現系は、哺乳類細胞培養物(例えばCHO細胞)である。

【0078】

好ましいキメラ抗体は、ヒト化抗体であり、時にはCDR移植抗体として公知である。これらは、より古典的なキメラ抗体の代替である。ここでは非ヒト(通常齧歯類)抗体V-領域由来の相補性決定領域のみ、ヒトV領域のフレームワーク領域と組み合わせられる。これらの抗体は、可変領域の全体が非ヒト動物に由来しているより古いスタイルのキメラ抗体よりも、免疫原性が低いとみなされている。従って、望ましくない副作用は、おそらく少ない。

【0079】

完全ヒト抗体も、作製されることができる。倫理的理由のために、これらを直接ヒトから作製することは、望ましくない。しかしこれらは、ヒト免疫グロブリン配列から誘導された抗体ライブラリーを使用するファージディスプレイを含む技術において、当該技術分野において公知の様々な方法により作製することができる(米国特許第4,444,887号及び第4,716,111号;並びに、PCT公報WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654;

10

20

30

40

50

WO 96/34096 ; WO 96/33735 ; 及び、WO 91/10741を参照されたい)。ヒト抗体は、トランスジェニックマウスを用いて作製することもできる(Lonberg及びHuszarの論文、Int. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)を参照されたい)。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体を作製する本技術並びにそのような抗体を作製するためのプロトコルの詳細な考察に関しては、例えば、PCT公報WO 98/24893 ; WO 92/01047 ; WO 96/34096 ; WO 96/33735 ; 欧州特許第0 598 877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号を参照することとし ; これらはそれらの全体が引用により本明細書中に組み込まれている。加えて、Abgenix社(フリーモント, CA)、Medarex社(NJ)及びGenpharm社(サンノゼ, CA)などの会社は、前述の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することができる。選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「ガイド選別(guided selection)」と称される技術を用いて作製することができる。このアプローチにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えばマウス抗体が、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択をガイドするために使用される(Jespersenらの論文、Bio/technology, 12:899-903 (1988))。

10

#### 【0080】

当然、抗原結合に加えいくつかの望ましい特性を持つ分子を提供する追加の部分に伴う前述の抗体/構築体のいずれかを提供することは可能である。例えばこの部分は、検出可能な標識、インビボでの抗体の安定性/半減期を増大する化合物などであり得る。

#### 【0081】

脂質化のような修飾を使用し、抗体を安定化し、かつ取り込み及び組織透過(例えば脳への)を増強することができる。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。Leong, S. R.らの論文(Cytokine, 16:106-1 (2001))も参照することができる。ここで抗体断片の半減期は、「ペグ化」、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ことが説明されている。

20

#### 【0082】

前述の考察から明らかであるように、広範な抗体/構築体を使用して、TREM-1リガンドのTREM-1受容体への結合を遮断又は低下させることができる。

しかしモノクローナル抗体を使用することが適している(例えば抗体R33)。

30

#### 【0083】

本発明の態様は、抗-TREM-1リガンド抗体を得る方法であって、TREM-1リガンド又はその誘導体を提供する工程、及びこれを使用し、例えば非ヒト宿主(例えばウサギ又は、マウス若しくはラットなどの齧歯類)を、免疫原としてTREM-1リガンド又はその誘導体で免疫処置することにより、該非ヒト宿主において抗体を産生する工程を含む、前記方法 ; 同じく、抗-TREM-1リガンド抗体を得る方法であって細胞表面上にTREM-1リガンド又はその誘導体が存在する好中球などの細胞を提供する工程、及びこれらを使用し、例えば非ヒト宿主(例えばウサギ又は、マウス若しくはラットなどの齧歯類)を、免疫原としてTREM-1リガンド又はその誘導体がそれらの表面上に存在する好中球などの細胞で免疫処置することにより、該非ヒト宿主において抗体を産生する工程を含む、前記方法 ; を含む。

40

#### 【0084】

TREM-1リガンドのTREM-1受容体への結合を遮断又は低下する別の方法は、TREM-1リガンドの可溶性型又はそれらの可溶性変種、例えば先に記載されたような多量体を使用することである。

これは、TREM-1受容体に結合することができ、そのためこれは最早天然の膜結合型リガンドへの結合に関して物理的に利用可能ではないか、又は少なくともその利用可能性は低下している。これは、サイトカイン及びケモカインの前炎症性放出を妨害又は低下することができる。

#### 【0085】

これは、TREM-1リガンドのその受容体への結合を遮断することに頼るよりもむしろ、TR

50

EM-1リガンドの発現を遮断又は低下することも可能である。これは、転写を遮断若しくは低下するか、又は翻訳を遮断若しくは低下することにより、実現されることができる。

従って例えば、TREM-1リガンドの遺伝子の転写ブロッカー又はダウンレギュレーターが、提供されてよい。

【0086】

あるいは、TREM-1リガンドの遺伝子は、失活されてよい(例えば、遺伝子/プロモーターを破壊するための標的化された相同組換え技術の使用により)。

更なる代替において、アンチセンス分子が提供されてよい。これらは、TREM-1 RNAにハイブリダイズし、その結果それらの翻訳を妨害又は低下できる。好適なハイブリダイゼーションは特異的であり、その結果インビボにおいて好中球又は単球により天然に産生された異なるRNA分子への著しいハイブリダイゼーションは存在しない。

10

【0087】

望ましいならばハイブリダイゼーションを、インビトロにおいて試験することができる。従ってストリンジェントな条件が提供されることができ、かつ次にハイブリダイゼーションが生じたかどうかを決定することができる。好適なアンチセンス分子は、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする。

【0088】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の一例は、5×SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA(pH8.0)である予備洗浄液の使用、及び5×SSCを使用する55℃で一晩のハイブリダイゼーションの試みに関連している。しかし、多くの他の可能性が存在する。例えば、これらの一部は、WO98/45435の表1に列記されている(特にその表のA-Fに記された条件を参照し、より好適でないものはGからL又はMからRに列記されたものである)。ハイブリダイゼーション条件は、Sambrookらの文献の1.101-1.110頁及び11.45-11.61頁により詳細に考察されている[「分子クローニング(Molecular Cloning)第2版」, Cold Spring Harbor Laboratory Press社 (1989)]。

20

【0089】

アンチセンス分子は、好適なベヒクル(例えばリボソーム)により導入されることができる。これらは、例えば遺伝子銃技術を使用し、直接導入されることさえできる。あるいはインビボにおいてそのような分子を作製するベクターが提供されてよい。

【0090】

30

アンチセンス分子の代わりとして、RNA干渉(RNAi)に参加する2本鎖RNA分子も使用されてよい。ここで標的化されたRNAは、生理的に切断され、したがってRNAiの作用機序は、単純にRNAに結合することにより作用するアンチセンス分子のものとは極めて異なり、それはもはやそのようにしては翻訳について利用できない。2006年に、Andrew Fire及びCraig C. Melloは、線虫シーエレガンス(*C. elegans*)におけるRNA干渉に関する彼等の業績に対してノーベル医学生理学賞を同時受賞した[Fire A、Xu S、Montgomery M、Kostas S、Driver S、Mello Cの論文、「シーエレガンスにおける2本鎖RNAによる強力かつ特異的遺伝子干渉(Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*)」、*Nature*, 391 (6669): 806-11 (1998)]。その時以降、様々な著者が、遺伝子発現の低下/遮断のためのRNAiの実際の適用を考察している。関連論文は以下を含む: Dorsett, Y及びTuschl, Tの論文、「siRNA: 機能性ゲノムにおける適用及び治療薬としての可能性(siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics)」、*Nature Reviews*, 3, 318-329 (2004); Hannon, GJ及びRose, JJの論文、「RNA干渉によるヒトゲノムの可能性のある開錠(Unlocking the potential of the human genome with RNA interference)」、*Nature*, 431, 371-378 (2004); Soutschek, Jらの論文、「修飾されたsiRNAの全身投与による内在性遺伝子の治療的サイレンス化(Therapeutic silencing of an endogenous gene by systematic administration of modified siRNAs)」、*Nature*, 432, 173-178 (2004); Morrissey, DVらの論文、「化学修飾されたsiRNAの強力かつ持続性のインビボ抗-HBV活性(Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs)」、*Nat. Biotechnol.*, 23, 1002-1007 (2005); P

40

50

alliser, Dの論文、「致命的単純ヘルペスウイルス感染症からマウスを保護するsiRNA-ベースの殺微生物剤(An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus infection)」、Nature, 439, 89-94 (2006); 並びに、Zimmermann TSらの論文、「非ヒト霊長類におけるRNAi媒介した遺伝子サイレンス化(RNAi-mediated gene silencing in non-human primates)」、Nature, 441, 111-114 (2006)。

【0091】

リボザイムも、使用されてよい。これらは、酵素活性を有する1本鎖RNA分子(通常2本鎖ヘアピン領域を伴う)である。リボザイムは、標的RNA分子に結合しかつ切断するよう操作されることができる。これは、例えば、Citti及びRainaldiの論文において考察されている(「疾患遺伝子を制御するための治療道具としての合成ハンマーヘッドリボザイム(Synthetic hammerhead ribozymes as therapeutic tools to control disease genes)」、Current Gene Ther., 2005 Feb; 5(1):11-24)。

10

【0092】

本発明の医学的使用に関して、多くの様々な化合物を使用することができることは、前述の記載から理解されるであろう。実際、先に考察された化合物に加え、先に考察されたスクリーニング方法により同定された化合物も使用することができる。(用語「化合物」は、非限定的に使用され、かつ本明細書に記載された使用に適している任意の生物学的部分又は合成部分であり得る。)

【0093】

本化合物は、医薬として許容し得る希釈剤、担体又は賦形剤と一緒に、医薬組成物として投与されてよい。

20

本明細書において使用される語句「医薬として許容し得る希釈剤、担体又は賦形剤」は、医薬投与と適合性のある、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などのいずれか又は全てを含むことが意図されている。医薬活性物質に関するそ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。通常の媒体又は物質が、該活性化化合物と不適合である場合を除いて、本組成物におけるそれらの使用が意図されている。補助活性化化合物も、本組成物に混入することができる。

【0094】

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。そのような組成物は、追加の活性物質を更に含有することができる。従って本発明は、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、医薬として許容し得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更に含む。

30

【0095】

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、例えば静脈内、皮内、皮下、経皮(外用)、経粘膜、関節内、腹腔内、及び胸膜内などの非経口に加え、経口、吸入、及び経直腸の投与を含む。非経口、皮内、又は皮下適用に使用される液剤又は懸濁剤は、以下の成分を含有することができる：注射用水、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などの、無菌の希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの、抗菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの、抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などの、キレート剤；酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などの、緩衝液、及び塩化ナトリウム又はデキストロースなどの浸透圧調節剤。pHは、塩酸又は水酸化ナトリウムなどの、酸又は塩基により調節することができる。この非経口調製品は、アンプル、使い捨て注射器、又はガラス若しくはプラスチックで製造された反復投与用バイアル内に封入することができる。

40

【0096】

注射用途に適した医薬組成物は、無菌の注射用溶液又は分散液の用時調製のための、無菌の水溶性溶液(この場合水溶性)又は分散液及び無菌散剤を含む。静脈内投与に関して好適な担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL(商標)(BASF社; パルシパニー, NJ)又はリン酸緩衝食塩水(PBS)である。全ての場合において、本組成物は、無菌でなければならず

50

、かつ存在する注射器で容易に注射できる程度に流体であるべきである。これは、製造及び貯蔵の条件下で安定していなければならない。かつ細菌及び真菌などの微生物の夾雑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)、並びにそれらの好適な混合物を含む、溶媒又は分散媒であり得る。例えばレシチンなどのコーティングの使用により、分散剤の場合必要な粒子サイズの維持により、及び界面活性剤の使用により、適切な流動性を維持することができる。微生物の作用の防止は、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、本組成物中に、例えば糖質、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、塩化ナトリウムなどの等張化剤を含むことは典型であろう。注射用組成物の延長された吸収は、本組成物中に、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有することによりもたらすことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0097】

無菌注射用液は、活性化合物(例えばポリペプチド又は抗体)の必要量を、適切な溶媒中に、必要に応じ先に列挙された構成成分の1種又は組合せと共に混入し、引き続き濾過滅菌することにより調製することができる。一般に分散剤は、該活性化合物の、基本的分散媒及び先に列記されたものからの必要な他の成分を含む無菌のビヒクルへの混入により調製される。無菌の注射用液の調製のための無菌分散剤の場合、より好適な調製方法は、予め濾過滅菌されたそれらの溶液から、活性成分に加え追加の望ましい成分の分散剤を生じる、真空乾燥又は凍結乾燥である。

#### 【0098】

経口組成物は一般に、不活性希釈剤又は可食性担体を含有する。これらは、ゼラチンカプセル内に封入されるか、又は錠剤に圧縮されることができる。経口治療用投与の目的に関して、本活性化合物は、賦形剤と混入し、錠剤、トローチ剤、又はカプセル剤の形状で使用するすることができる。医薬として適合性がある結合剤、及び/又は佐剤を、本組成物の一部として含むことができる。これらの錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、下記構成成分のいずれか、又は同様の性質の化合物を含有することができる：微晶質セルロース、トラガカントガム又はゼラチンなどの、結合剤；デンプン又は乳糖などの、賦形剤；アルギン酸、プリモゲル(Primogel)、又はトウモロコシデンプンなどの、崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム又はステロート(Sterote)などの、滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素などの、流動促進剤；ショ糖又はサッカリンなどの、甘味剤；若しくは、ペパーミント、サリチル酸メチル、又はオレンジ香料などの、矯味矯臭剤。

#### 【0099】

吸入による投与に関して、本化合物は、例えば二酸化炭素などの気体のような好適な噴射剤を含有する加圧された容器又はディスペンサーからのエアゾールスプレーの形、又はネブライザーで送達される。

#### 【0100】

全身投与は、経粘膜又は経皮手段によることもできる。経粘膜又は経皮投与に関して、透過されるべき障壁に適した透過剤が、本製剤において使用される。このような透過剤は、一般に当該技術分野において公知であり、かつ例えば、経粘膜投与のための、界面活性剤、胆汁塩、及びフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻腔用スプレー又は坐剤の使用により実現することができる。経皮投与に関して、本活性化合物は、一般に当該技術分野において公知のように軟膏剤、膏薬、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、カカオバター及び他のグリセリドなどの通常の坐剤基剤と共に)、又は貯留浣腸の形で調製することもできる。

#### 【0101】

一実施態様において、本活性化合物は、インプラント及びマイクロカプセル化された送達システムを含む徐放製剤のように、体内からの迅速な排泄に対し該化合物を保護する担体と共に調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラ



ーゲン、ポリオルソエステル、及びポリ乳酸などの、生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。そのような製剤の調製方法は、当業者には明らかであろう。これらの物質は、Alza社及びNova Pharmaceuticals社から購入することもできる。リボソーム懸濁剤(ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体により感染細胞に標的化されたりリボソームを含有する)も、医薬として許容し得る担体として使用されることができる。これらは、例えば米国特許第4,522,811号に開示されたような、当業者に公知の方法に従い調製されることができる。

#### 【0102】

投与が容易でかつ均一用量の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。本明細書において使用される単位剤形は、治療される被験者への単一の用量として適した物理的に個別の単位をいい、各単位は、必要な医薬担体と会合して望ましい治療作用をもたらすように計算された予め決定された量の活性化化合物を含有する。本発明の単位剤形に関する仕様は、該活性化化合物の独自の特性及び実現されるべき特定の治療作用、並びに個体の治療のためにそのような活性化化合物を配合する技術における固有の制限により、指示されかつ直接左右される。

10

#### 【0103】

本明細書に定義されたように、ポリペプチドの治療的有効量(すなわち、有効用量)は、約0.001~30mg/kg体重、好適には約0.01~25mg/kg体重、より好適には約0.1~20mg/kg体重、及び更により好適には約1~10mg/kg、2~9mg/kg、3~8mg/kg、4~7mg/kg、又は5~6mg/kg体重の範囲が適している。

20

#### 【0104】

抗体に関して、好適な用量は、0.1mg/kg~100mg/kg体重(一般に10mg/kg~20mg/kg)である。この抗体が脳内において作用する場合、通常用量50mg/kg~100mg/kgが適している。一般に部分的ヒト抗体及び完全なヒト抗体は、ヒト体内において、他の抗体よりもより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頻度が可能であることが多い。

#### 【0105】

当然実際の用量は、医師により決定されるであろう。望ましいならば、低い初回量を使用し、かつ有益な作用が得られるまで、次第に増加することができる。副作用が発症する場合、この用量は、通常の臨床実践に従い減少させることができる。

30

#### 【0106】

本医薬組成物は、容器、パック、又はディスペンサー内に、投与に関する指示書と共に、含まれることができる。

本発明は、様々な診断用途も有する。

これは、1種以上の前炎症性サイトカイン又はケモカインの放出により特徴付けられる障害の診断において有用な情報を提供することができる方法工程を含む。

#### 【0107】

この障害は、医学使用に関して先に考察された障害のいずれかであってよい。

従って例えば本発明は、生物試料を得ること、及びTREM-1リガンド又はTREM-1リガンドmRNAについて該試料を分析することを含む方法を含む。

40

この試料は、全血、血清、血漿、尿の試料、血液の細胞画分、組織試料などであり得る。

#### 【0108】

この試料は、膜結合したTREM-1リガンドの分析が望ましい場合、細胞(好適には好中球及び/又は単球)を含む試料が適している。同様に細胞は、mRNAを分析することが望ましい場合に、通常使用されるであろう。

この試料は、可溶性TREM-1リガンドの分析が望ましい場合、細胞外液(例えば血清、血漿又は尿)を含む試料が適している。これは、その可溶性型は細胞外液へと流れ出すからである。

#### 【0109】

50

本試料は、通常、先に考察された障害のいずれかを有すると考えられる患者又はそれを有するリスクがある患者から採取される。

前記リガンド又は対応するmRNAの存在又は非存在は、単純に同定されてよい。それが健常な個体においては全く存在しないか、又は検出することが困難であるような非常に低いレベルでのみ存在する場合に、これは有用であり得る。

【0110】

しかし好適には本方法は、生物試料中のTREM-1リガンド又はTREM-1リガンドmRNAを定量する工程を含む。

これは、該リガンド又は対応するRNAのレベルを、健常な個体について予想されるものに対応する対照レベル又は範囲と比較する、陰性対照を更に含んでよい。

TREM-1リガンド又はTREM-1リガンドmRNAのレベルが、該対照のレベルを有意に上回る場合、これは、個体がおそらく該障害を有することの指標であり得る。

【0111】

これは、リガンド又は対応するmRNAのレベルを、該障害を有する個体から予想されるものに対応する対照レベル又は範囲と比較することを含む、陽性対照を含んでよい。

TREM-1リガンド又はTREM-1リガンドmRNAのレベルが、陽性対照のレベルに有意に近い場合、これは、個体がおそらく該障害を有することの指標であり得る。

【0112】

本方法は例えば、前記リガンドに対する抗体を使用することができる。

(ここで、該リガンドが同定されたことは、先に考察されたように、標準技術により抗体を産生するために使用されることができる)。

好適な抗体は、該リガンドに対し特異的である。これは、モノクローナル抗体(例えばR33)であってよい。

【0113】

本方法が、試料中のTREM-1 mRNAを検出する場合、TREM-1 mRNAとハイブリダイズする核酸分子を使用することができる(例えばプローブ又はプライマー)。

あるいは、このmRNAを使用してcDNAを作製し、このcDNAにハイブリダイズする核酸分子を使用することができる。望ましいならば、逆PCRのような増幅技術が使用されるが、これらは必須ではない。

【0114】

好適なことに、本核酸分子は、先に記載したように、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることが可能である。

診断において有用である更なる方法は、TREM-1受容体に結合するTREM-1リガンドの可溶性型又はそれらの可溶性変種を提供することである。これは、TREM-1受容体の検出、及び/又は試料中に存在する受容体の量の定量に使用されることができる。

【0115】

先に記載された方法に加え、本発明は診断キットも提供する。

これは、インビボにおける1種以上の前炎症性サイトカイン又はケモカインの放出により特徴付けられる障害を診断するためのキットを提供し、ここでこのキットは、TREM-1リガンド又は該リガンドをコードしているDNA若しくはRNAに結合する化合物を備えている。

あるいは本キットは、TREM-1受容体に結合するTREM-1リガンド又はそれらの変種(好適には可溶性型)を備えてよい。

【0116】

本化合物は、例えば、TREM-1リガンドに結合する抗体又はTREM-1 RNA若しくはDNAにハイブリダイズする核酸であってよい。

本キットは、好適には、この結合を検出及び/又は定量する手段を備えることを包含する。

この手段は、例えば、該障害が存在する場合に、可視できる変化を提供する1種以上の指標であってよい。この指標(類)は、例えば色の変化又はマーキングの変化を提供してよい。

10

20

30

40

50

## 【0117】

本キットはそれ自身、1種以上の対照を含んでよい。例えば、健常患者からの生物試料を含む対照を備えてよい。これらの試料は、先に考察したように、細胞(例えば好中球及び/又は単球)を含んでよい。

あるいはこれらは、無細胞であってよい。例えば血清、血漿又は尿試料は、TREM-1リガンドの可溶性型を調べるためのスクリーニングすることが望ましい場合に、提供される。

## 【0118】

これらの対照は、生理的試料である必要さえない。これらは単純に、健常な患者にとって予想される指標であってよい。このような指標は、指示書、包装、ラベルなどに提供されることができる。これらは、チャート、図、範囲などの形であってよい。

10

## 【0119】

本キットの成分は、密封されることができかつ無菌の形状であり得る様々な容器内に封入されてよい。これらの容器は、キットの包装内に、先に記載されたように被験体が障害を発症するリスクがあるかどうかの決定に関する指示書と共に入っていてよい。

## 【0120】

本発明は、前述のキットに加え、TREM-1リガンドの変異型の存在を同定するためのキットも含む。

用語「変異型」は、通常「野生型」として知られている、所定の種において実際に公知の最も一般的型から区別するように、本明細書において使用される。従って変異型をコードしている遺伝子の場合、これは、1個以上のコーディングヌクレオチドにより野生型をコードしている遺伝子と異なるであろう。ポリペプチドの場合、変異型は、1個以上のアミノ酸が異なることができる。従って変異型は、対立遺伝子変種を含む。

20

## 【0121】

そのようなキットは、例えば、該リガンドの野生型によりも変異型により強力に結合する抗体を備えることができるか、又は野生型をコードしている核酸へよりも、変異型をコードしている核酸により強力に結合する核酸を備えることができる。

望ましいならば、本キットは、野生型リガンドへの又は野生型リガンドをコードしている核酸への結合と比較される結合を可能にする対照を備えることができる。

## 【0122】

本抗体は、TREM-1リガンドの変異型に特異的であり得る。本核酸は、TREM-1リガンドの変異型をコードしている核酸に特異的であり得る(ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下)。

30

変異型は、野生型遺伝子を持つ個体よりも、特定の障害(特に本明細書において考察された障害)の傾向がより多い又はより少ない個体を同定することができるので、これらは興味深い。これらは、研究、細胞又は組織タイピング、法医学、診断などにおいても有用であり得る。

## 【0123】

本発明の更なる態様は、例えば動物モデルとしての使用のための、野生型動物と比べてTREM-1及び/又はTREM-1リガンドの低下した発現を有する非ヒト動物の態様である。好ましくはこれは、TREM-1及び/又はTREM-1リガンドの発現を有さない。本発明の更なる態様は、野生型動物と比べてTREM-3の低下した発現も有する、好ましくはTREM-3の発現を有さない、非ヒト動物である。

40

## 【0124】

このような動物は、野生型動物と比べ対照として有用である。これらは、先に記載されたスクリーニング方法により同定された物質の有効性を分析するために使用することができる。これらは、副作用を評価するためにも使用されることができる。

## 【0125】

好適な動物モデルの提供は、副作用、薬効などのスクリーニングに必要な試験動物の合計数を減らす上で有用であり得る。従ってこれらのモデルは、全体の罹患動物の減少において恩恵があり得る。

50

好ましくは、この非ヒト動物は、TREM-1リガンド又はTREM-1受容体が完全にノックアウトされている。従ってこれは、機能的TREM-1リガンド又は機能的TREM-1受容体を生成しない。

#### 【0126】

これは、TREM-1遺伝子の必須領域を欠失又は不活性化する組換え技術を用いて行うことができる。

その後繁殖技術を使用し、この修飾に関してホモ接合性であるマウス系統を作出することができる。

#### 【0127】

場合によっては、野生型に対し複数のノックアウトされた遺伝子、特にTREM-3を有するトランスジェニック動物が提供される。

以下に記載されるように、例えば、TREM-1 TREM-3二重ノックアウト齧歯類、特にマウス(TREM-1-3 -/-マウス)が提供されることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0128】

(背景及び実施例)

本発明はここで、添付図面を参照し、単に例証を目的として記載される：

【図1】図1(上側プレート)は、ヒト及びマウスのTREM遺伝子クラスターを示す。TREM遺伝子クラスターは、ヒト染色体6 p.21.1上、及びマウス染色体17C上に位置している。両方のクラスターは、Trem1、Trem2、Trem11(TLT-1をコードしている)及びTrem12(TLT-2をコードしている)をコードしている遺伝子を含む。Trem-1及びTrem-2は、ITAM-含有アダプターDAP12を介してシグナル伝達する。TLT1は、サイトゾル型ホスファターゼの動員のための細胞質ITIMを含む。TLT-2は、可能性のあるSH3結合モチーフ(+xPxP、ここで+はアルギニン、xは任意のアミノ酸、及びPはプロリンである)をコードしている。ヒトTREMクラスターは、NK細胞受容体NKp44をコードしているNcr2も含むが、マウスのNKp44ホモログは同定されていない。ふたつの追加のヒト遺伝子Trem13及びTrem14は、機能タンパク質をコードしているかどうかはまだわかっていない。マウスTREMクラスターは、Trem-3及びTrem-L4機能タンパク質をコードしている遺伝子を含む。Trem3は、ヒトにおいて偽遺伝子である。

#### 【0129】

【図2】図2(下側プレート)は、標準のDAP12シグナル伝達を示している。他の免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)-含有アダプタータンパク質同様、DAP12に会合されている受容体の架橋は、Srcキナーゼによる、細胞質ITAMモチーフのチロシンリン酸化につながる。これは、SYK(又はZAP70)の動員、それに続く足場となる分子LAT及び/又はNTALのリン酸化、並びにPI-3Kの活性化につながる。LAT/NTALは、いくつかのエフェクターを動員する：PLC $\gamma$ ；TECファミリーメンバー；Vavとの複合体でアダプターSLP76；Sosとの複合体でアダプターGrb2。PI-3Kは、PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>(PIP<sub>3</sub>)を生成し、これはPLC $\gamma$ 、TEC、Vavの細胞膜への動員に貢献する。これらの中間体シグナル伝達分子は全て、Akt、c-CBL、及びERKの動員/活性化、並びに細胞骨格リモデリング(アクチン)につながる。PLC $\gamma$ は、セカンドメッセンジャーDAG及びIP<sub>3</sub>を生成し、これらは、各々、PKC $\alpha$ の活性化及びカルシウム動員(Ca<sup>2+</sup>)につながる。

#### 【0130】

【図3】図3は、DAP12の活性化シグナル伝達対阻害シグナル伝達を比較している。このモデルにおいて、本発明者らは、高LPSを伴う敗血症又は単純(simple)内毒素血症は、TREM-1リガンドによる好中球上のTREM-1の多価の結合へつながり(右側)、様々なレベルでTLRのカスケードと相乗作用するシグナル伝達カスケードを生じることが提唱する。これは、増大したサイトカイン分泌を生じ、そしておそらくは細胞接着及び細胞生存を生じる。対照的に、D-ガラクトサミン-増強された内毒素血症などの非敗血症性状態は、TREM-2リガンドによるマクロファージ上のTREM-2の低い占拠を誘導し、このことはDAP12の部分的リン酸化、及びホスファターゼSHP-1若しくはTLRに対する細胞反応性を低下する他の阻害分子

10

20

30

40

50

の動員を生じる。

【0131】

【図4】図4は、DAP12シグナル伝達は、内毒素血症時に死亡率及び炎症性サイトカインレベルを増強することを示している。(A)内毒素血症後のWT及びDAP12-/-マウスの生存が、3種の異なる投与量5mg/kg、6.25mg/kg、及び10mg/kgで測定された。5及び6.25mg/kgの両方で、DAP12-/-マウスは、WTと比べ生存が改善された(ログランク検定により $p < 0.05$ )。10mg/kgでは、両系統が死亡した。(B)WT及びDAP12-/-マウスから、5mg/kg LPS注射の2、4又は24時間後に、血漿を採取した。2時間後に、WTマウスでは、TNF- $\alpha$  及びIL-10のレベルが上昇した(\* = マン・ホイットニー検定により、WTに対し $p < 0.05$ )。

【0132】

【図5】図5は、DAP12シグナル伝達は、細菌性敗血症時に死亡率及び炎症事象を増強することを示している。WT及びDAP12-/-マウスに、CLPを施し、並びに(A)生存及び(B)サイトカイン生成を評価した。DAP12-/-マウスは、WTと比べ、CLPに対し抵抗性である(ログランク検定により $p < 0.001$ )。WT及びDAP12-/-マウスから、CLPの6又は24時間後に、血漿を採取し、サイトカインレベルを測定した。本発明者らは、6時間後に、WT及びDAP12-/-マウスにおいて、同等のレベルのMCP-1、IL-6及びTNF- $\alpha$  を認めた。24時間後までに、WTマウスは、MCP-1、IL-6、TNF- $\alpha$  及びIL-10の有意に高いレベルを有した(マン・ホイットニー検定により $p < 0.05$ )。

【0133】

【図6】図6は、DAP12シグナル伝達は、細胞動員又は殺微生物活性に貢献しないことを示している。CLPの24時間後、腹腔洗浄により、腹腔滲出液を収集した。総細胞数(A)、細胞型の分布(B)、及び細菌負荷(C)を測定した。本発明者らは、WTマウスとDAP12-/-マウスの間に差を認めなかった。

【0134】

【図7】図7は、DAP12は、敗血症後のマクロファージによる生成を増強するが、無菌性腹膜炎では増強しないことを示している。(A)WT及びDAP12-/-マウスに、CLPを施し、24時間後に腹膜細胞を収集した。細胞を、エクスピボにおいて、LPS刺激( $1 \mu\text{g/ml}$ )あり又はなしで培養し、上清中のサイトカインのレベルを測定した。刺激がない場合、WT細胞(黒色バー)は、DAP12-/-細胞(斜線付きバー)と比べ、より多くのIL-6、MCP-1、TNF- $\alpha$  及びIL-10を生成した(マン・ホイットニー検定により $p < 0.05$ )。LPS刺激後、WT細胞は、増大した量のTNF- $\alpha$ 、MCP-1、及びIL-10を生成した。(B)細胞は、チオグリコレートブロスの腹腔内注射の72時間後にも収集し、エクスピボにおいて、LPSを含む(10、100又は1000ng/ml)か又は含まずに培養した(B)。WT細胞とDAP12-/-細胞の間に統計学的有意差は存在しなかったが、最大刺激されたDAP12-/-細胞により、IL-10が増加する傾向があった。

【0135】

【図8】図8は、インビトロにおけるLPSによる腹腔滲出液細胞(PES)の刺激後のERKリン酸化を示している。CLPの24時間後、PECを収集し、様々な時点でLPSで刺激し、細胞溶解液をSDS-PAGEにより分離し、かつホスホ-ERK1/2について免疫プロットングした。総ERKを、負荷対照として決定した。WTマウスは、刺激後30分で、DAP12-/-マウスよりも、有意により多くのリン酸化を示した。

【0136】

【図9】図9は、TREM-1/TREM-3欠損マウスの作出を図示している。

【図10】図10は、新たに作出された抗-TREM-3抗体で得られた染色結果を示している。TREM-3でトランスフェクトされたHEK293細胞(左側)又はトランスフェクトされないHEK293細胞を、mAb 87.1若しくはmAb 12.7のいずれか(黒色ヒストグラム)又は対照抗体(白色ヒストグラム)で染色した。両方の抗体は、TREM-3受容体の特異的に認識した。

【0137】

【図11】図11は、WT及びTREM-1/-3マウスの骨髄顆粒球のフローサイトメトリーの結果を示している。全骨髄を、抗-CD11b、抗-Ly6G-C(GR-1)、抗-TREM-1及び抗-TREM-3抗体で染色した。染色された細胞を、フローサイトメトリーにより分析した。全てのマウスは、

10

20

30

40

50

類似したCD11b+/Ly6G-C+顆粒球集団を示した(左側列)。WT顆粒球は、TREM-1及びTREM-3を発現したが(中央及び右側の列、上側パネル)、TREM-1/3-/-は発現しなかった。

【0138】

【図12】図12は、TREM-1/3-/-マウスの生存を示している。TREM-1/3+/+及びTREM-1/3-/-マウス(両方とも均一な70% C57BL/6/30% 12901aバックグラウンドを生じるよう並行繁殖から得た)に、CLP敗血症チャレンジを施した。マウスに、2×#25 CLP損傷を施し、生存をモニタリングした。TREM-1/3-/-マウスは、野生型(WT)と比べ、CLPに対し抵抗性があった。

【0139】

【図13】図13は、肺炎連鎖球菌又は緑膿菌チャレンジを使用する、肺敗血症マウスモデルの生存率(%)を示している。WTマウスに、気管支内注射により注入された肺炎連鎖球菌(99.55菌株 $2 \times 10^7$  CFU、左側パネル)又は緑膿菌(ATCC菌株27853の $2 \sim 4 \times 10^7$  CFU、右側パネル)を供した。偽マウスには、同じ容量の滅菌食塩水を注射した(n=9~10)。マウスを、生存に関して観察した。曲線は、90%の生存に関して滴定(titrated)された用量を表す。

10

【0140】

【図14】図14は、TREM-1リガンドは、敗血症又はPMA/イオノマイシンによるインビトロ活性化時に、好中球上に発現されることを示している。図14(A)は、TREM-1四量体構築体を示している。TREM-1エクトドメインのカルボキシ末端は、BirAタグ及び6-ヒスチジンタグに融合されている。BirA配列のビオチン化後、TREM-1モノマーは、PE-標識されたストレプトアビジンを用いて蛍光四量体に集成される。図14(B)は、血液から精製され、かつTREM-1四量体及び抗-CD16抗体により染色された好中球のFACS分析を提供する。TREM-1四量体は、敗血症性患者由来のCD16+好中球のサブセットに結合するが、健常ドナー由来の好中球には結合しない。TREM-1四量体結合の特異性の証明として、対照四量体(CD69)は、敗血症患者から得たヒト好中球への結合に失敗した。敗血症性患者の好中球は、健常ドナーの好中球と比べ、より低いレベルのCD16を発現することに注意。図14(C)は、PMA/Iにより活性化された好中球のFACS分析を示している。TREM-1四量体は、PMA/Iによる処理後、健常ドナーの好中球に結合するのに対し、これらは、刺激されない好中球には結合しない。対照四量体は、PMA/イオノマイシンで刺激された好中球には結合しない。

20

【0141】

【図15】図15は、敗血症性患者から単離された好中球のhTREM-1リガンド陽性亜集団のFACS分析を示している。これらの細胞は、全て循環血中成熟好中球上に発現されることがわかっているマーカーであるCD11b、CD10、CD66b、CD55及びCD35に関して陽性であった。健常ドナー由来の好中球は、同じく、これらのマーカーは発現するが、hTREM-1四量体には結合しない。

30

【0142】

【図16】図16は、モノクローナル抗体R33が、敗血症性好中球上のTREM-1四量体の結合を遮断することを示している。敗血症性患者から単離された好中球を、R33又はアイソタイプが合致した対照抗体(T2ctr)のいずれかと共にプレインキュベーションした。R33とのプレインキュベーションは、TREM-1四量体の結合を無効にしたのに対し、該アイソタイプ合致した対照は、四量体結合に影響を及ぼさなかった。従ってmAb R33は、この細胞表面のTREM-1リガンドを認識する。

40

【0143】

【図17】図17は、R33モノクローナル抗体を使用する、R33抗原発現に関する敗血症患者からのパフィコートcDNAライブラリーのスクリーニングの結果を示している。パネルA：ヒトパフィコートcDNAライブラリーから単離されたプラスミドで一過性にトランスフェクトされ、引き続きR33陽性細胞のFACS探索された、293細胞のFACS分析。これらの細胞は、R33で染色し、引き続きPEに複合されたヤギ抗ラットIgにより染色した。パネルB：プレートFから単離されたプラスミドによる293細胞トランスフェクション後の、R33陽性細胞の濃縮(149コロニー)。パネルC：プレートFからのR33陽性細胞の更なる濃縮。

50

## 【 0 1 4 4 】

【図 1 8】図18は、ヒトCD177アミノ酸配列を示す。シグナルペプチド(アミノ酸1-21)は、イタリックで示されている。GPI-アンカーでアミド化されたグリシンは、太字で示され、かつ下線が付けられている(アミノ酸408)。

【図 1 9】図19は、マウスCD177アミノ酸配列を示す。シグナルペプチド(アミノ酸1-21)は、イタリックで示されている。このマウス配列は、ヒト配列(リーダー配列を除く)のほぼ2倍の長さである。これはおそらく、図20に最良に図示されているように、この配列のふたつの部分が、互いに及びヒトCD177配列と高度の配列同一性を持つので、遺伝子重複事象に起因しているであろう。

## 【 0 1 4 5 】

【図 2 0】図20は、ヒトCD177アミノ酸配列と、マウス配列のふたつの部分の各々の間のアラインメントを示す。該ヒト配列は、該マウス配列の各部分と有意な配列同一性を有することを認めることができる。これは、マウスにおける遺伝子重複事象を示すことができる。

## 【 0 1 4 6 】

【図 2 1】図21Aは、図18に示されたヒトCD177アミノ酸配列をコードしているcDNAヌクレオチド配列を示している。図21Bは、図19に示されたマウスCD177アミノ酸配列をコードしているcDNAヌクレオチド配列を示している。

## 【 0 1 4 7 】

【図 2 2】図22は、TREM-1四量体は、敗血症性患者の好中球に結合するが、休止期好中球には結合しないことを示している。

【図 2 3】図23は、抗-mCD-177抗体Y176は、マウスの末梢血中の好中球及び単球サブセットに結合することを示している。

## 【 0 1 4 8 】

【図 2 4】図24Aは、TREM-1リガンドが、敗血症患者の末梢好中球上に特異的に発現されることを示す。TREM-1/IgMとヒトIgMで染色される幾何平均蛍光の間の比率(GMF比)が報告される。黒色四角は、ICUへ入院時点の患者を表している。黒色三角は、同じ患者の臨床的に回復した時点を表している。白色三角は、SIRS患者で感染の徴候のない患者を表している。黒色菱形は、健常個体を表している。各データ点は、独りの患者のGMF比を表している。水平バーは、平均GMF値を表している。統計解析は、クラスカル・ウォリス検定及びDunn's検定により行った。図24Bは、TREM-1リガンド発現は、敗血症からの回復後にダウンレギュレーションされることを示す。TREM-1リガンドの発現レベルを、ICUへの入院後間もなく及び臨床的に回復後に、敗血症患者において評価した。データは、hTREM-1/IgMで染色された細胞に対する対照hIgMで染色された細胞の幾何平均蛍光(GMF)間の比として表した。

【図 2 5】図25は、R33(抗-ヒトCD177)が、hCD177トランスフェクトされたHEK293細胞へのmTREM-1の結合を遮断することを示している。

【図 2 6】図26は、マウスCD177が、好中球及び単球上で発現されることを示している。

【図 2 7】図27は、mCD177へのmTREM-1の結合の証拠を提供する(実施例20の考察を参照されたい)。

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 1 4 9 】

実施例を詳細に考察する前に、TREM-1の機能及びその意義に関する更なる背景を提供することは有益である。これは以下のように行われる：

(実施例の背景)

(1. 敗血症におけるTREM-1の役割)

組織損傷又は微生物生成物に反応して、自然免疫系は、侵入している微生物を根絶することが課せられた炎症反応を開始する<sup>1-4</sup>。播種性感染又は広範な組織損傷の状況において、この免疫応答は、調節不能となり始め、全身の炎症反応及び代償性抗炎症反応を助長し得る<sup>5-9</sup>。この不適切な免疫活性化の臨床的帰結は、低血圧、臓器不全及び死を特徴と

10

20

30

40

50

する敗血症候群である<sup>5,7,9</sup>。敗血症時に免疫系を調節する努力は、限定された成功に直面し、かつ「魔法の弾丸」である敗血症メディエーターは、確定されないままである<sup>10,11</sup>。最近、本発明者らのグループは、好中球及び単球上に発現された分子である「骨髄細胞上に発現されたトリガー受容体1(TREM-1)」を発見した<sup>12</sup>。本発明者らは最初に、TREM-1がアゴニスト抗体と結合される場合に前炎症性サイトカインが放出されることを認めた<sup>13</sup>。引き続きの研究において、本発明者らは、TREM-1の遮断は、炎症を減弱し、かつ敗血症の臨床的に関連のある実験モデルにおいて死亡率を劇的に減少させることを発見した<sup>14</sup>。追加の研究は、TREM-1は、微生物生成物に対する反応を開始するためには、不要であることを認めたが、代わりにTREM-1のそのリガンドによる連結は、免疫応答の増幅を引き起こし、Toll様受容体(TLR)及びNod様受容体(NLR)と相乗作用し、誇張されたサイトカイン放出を引き起こすモデルを示唆している<sup>12,15,16</sup>。これらのデータは、TREM-1の調節が、敗血症時に免疫麻痺又は抗菌機能の阻害を引き起こすことなく炎症を軽減でき、かつ敗血症におけるTREM-1の役割の系統的試験を委任し得ることを示唆している。

10

20

30

40

50

#### 【0150】

#### (2. TREMファミリー)

TREM-1は、「骨髄細胞上に発現する誘発性受容体(TREM)」と称される、顆粒球(好中球)、単球/マクロファージ、樹状細胞(DC)、破骨細胞、及び小グリア細胞において発現された受容体ファミリーの基となるメンバーである<sup>12,17-19</sup>。TREMは、MHCとの連関においてヒト染色体6p21及びマウス染色体17C3にマッピングされた遺伝子クラスターによりコードされた免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーの膜貫通糖タンパク質である(図1)<sup>12,19,20</sup>。このTREM遺伝子クラスターは、活性化受容体及び阻害受容体の両方をコードしている。

#### 【0151】

TREM-1、TREM-2及びTREM-3活性化受容体は、V型の単独の細胞外Ig様ドメイン、帯電した残基(リジン)を伴う膜貫通領域、及び短い細胞質尾部を含む(図1)。TREM-3は、ヒトにおいては偽遺伝子としてのみ存在する(図1)。TREM-1、TREM-2及びTREM-3は、細胞表面発現、シグナル伝達及び機能のために、タンパク質アダプターDAP12と会合している(図2)。DAP12の細胞質ドメインは、免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を含み、これは、タンパク質チロシンキナーゼSyk及びZAP70のドッキング部位として機能する<sup>21-23</sup>。これらは、複数のアダプターの動員及びチロシンリン酸化、並びに下流のシグナル伝達メディエーターを促進し、このことは、細胞内Ca<sup>2+</sup>動員、アクチン細胞骨格の再編、転写因子の活性化につながり、そして最終的には細胞活性化につながる(図2)。

#### 【0152】

TREMクラスターは、TLT-1及びTLT-2と称される、少なくとも2つのTREM-関連タンパク質をコードしている他の遺伝子を含む。TLT-1は、血小板内において発現され、その細胞質尾部内に免疫受容体チロシン阻害モチーフ(ITIM)を含み、かつタンパク質チロシンホスファターゼを動員する<sup>24,25</sup>(図1)。TLT-2は、B細胞及びマクロファージにおいて発現され、その細胞質尾部内にプロリンが豊富な領域を含み、その機能は不明である<sup>25</sup>(図1)。追加のTREM-様遺伝子及び偽遺伝子は、TREMゲノム領域のコンピュータ解析により予測されている(図1)。TREMは、他のIg遺伝子スーパーファミリーメンバーとの限定された相同性を共有している。最も近いTREMの類縁体は、NKp44であり、これはTREM遺伝子に密接に関連された遺伝子によりコードされた活性化NK細胞受容体である<sup>27</sup>。TREMのより遠い類縁体は、CMRF-35ファミリーメンバーを含む<sup>28-31</sup>。多量体Ig受容体(pIgR)<sup>32</sup>も、TREMファミリーの細胞外領域と相同性を共有している。しかしTREM受容体、CMRF35又はNKp44のいずれも、Igには結合しない。実際これらの受容体全てに関するリガンドは、未だ不明である。

#### 【0153】

TREM類の中で、TREM-1及びTREM-2は、最も広範に特徴付けられている。TREM-2は、破骨細胞及び小グリア細胞において主に発現される<sup>12</sup>。TREM-2における遺伝子欠損は、重度の骨異常及び脳脱髄により特徴付けられるヒト疾患である那須-ハコラ病(NHD)を生じる<sup>33</sup>。TREM-2は、骨髄由来マクロファージ、チオグリコレート-誘起したマクロファージ



、あるいは活性化されたマクロファージにおいても発現され<sup>34, 35</sup>、微生物生成物に対するそれらのサイトカイン反応を調節する<sup>35, 36</sup>。TREM-1は、顆粒球(好中球)及び単球/マクロファージにおいて発現される。ヒトにおける予備試験は、TREM-1は、インビトロにおいてこれらの細胞を活性化し、かつインビボにおいて微生物感染時に全身性炎症反応及び敗血症に寄与することを示唆している。<sup>13, 14</sup>。

#### 【0154】

(3. TREM-1は炎症を増幅し、敗血症の病理に寄与する)

ヒトTREM-1は、血液好中球及び単球サブセットの上で発現される。正常組織において、TREM-1は、肺マクロファージ上に選択的に発現される。これらは、肺において長期生存するエフェクター細胞であり、病原体の認識及びクリアランス、アポトーシス細胞若しくは損傷を受けた細胞のファゴサイトーシス、並びに高分子の除去に特化されている。更にTREM-1は、グラム陽性菌及びグラム陰性菌に加え、真菌により感染されたヒト皮膚及びリンパ節において好中球性浸潤物及び類上皮細胞において高レベルで発現される<sup>14, 37</sup>。TREM-1発現の組織分布は、炎症における役割を示唆している。これと一致して、本発明者らは、ヒト顆粒球及び単球上のTREM-1のアゴニストmAbとの結合は、前炎症性ケモカイン及びサイトカインの生成を刺激することを示した。好中球に対する強力な化学誘引物質であるIL-8は、TREM-1の結合により強力に誘導された。単球走化性因子-1(MCP-1)、MCP-3及びマクロファージ炎症タンパク質1 (MIP-1)も誘導される。TREM-1誘発は、ミエロペルオキシダーゼの顆粒球放出を誘導するが、ファゴサイトーシスは誘導しない。更にTREM-1及びTLRは、炎症の誘導において互いに協力する。LPSに対する反応におけるTNF- $\alpha$ 及びIL-1 $\beta$ の単球分泌は、TREM-1 mAbが共刺激として使用される場合に顕著にアップレギュレートされ、これはTLRにより開始された炎症反応を増幅するTREM-1の能力を実証する<sup>13, 15</sup>。加えて、LPS及び他のTLRリガンドは、TREM-1発現をアップレギュレートし、その前炎症機能を強化する<sup>13, 15</sup>。

#### 【0155】

本発明者らは、インビボにおける炎症の増幅因子としてのTREM-1の役割について取り組むために、ヒトIgG1のFc部分に融合された組み換えマウス可溶性TREM-1 (mTREM-1-Fc)を作製した。このTREM-1-Fcは、TREM-1リガンド結合に関して内在性TREM-1と競合し、内在性TREM-1の生物学的活性を中和する。LPS-誘導した内毒素血症の動物モデルにおいて、mTREM-1-FcによるTREM-1シグナル伝達の遮断は、過敏反応及び死亡を減少させた<sup>14</sup>。生存大腸菌の腹腔内注射並びに盲腸結紮及び穿孔(CLP)を含む敗血症性ショックのモデルにおいて、TREM-1の遮断はまた、マウスをショック及び死亡から保護した<sup>14</sup>。

#### 【0156】

更にTREM-1の前炎症性の役割を裏付けると、TREM-1シグナル伝達アダプターであるDAP12を過剰発現しているトランスジェニックマウスは、多数の血液好中球に加え、肺における大規模なマクロファージ浸潤を顕在化し、かつLPS-誘導したショックを非常に受けやすい<sup>38</sup>。この表現型は、一部TREM-1/DAP12-依存型経路の構成的活性化により記載することができる。更にDAP12の過剰発現は、ザイモサンAにより誘起された肝性肉芽腫性炎症を増大したのに対し、TREM-1の遮断は、肉芽腫形成を減少させた<sup>39</sup>。まとめるとこれらの結果は、顆粒球及びマクロファージによる炎症反応の、特に微生物成分に対する反応の増幅におけるTREM-1の重要な役割を強調し、かつTREM-1を、敗血症性ショックなどの感染症に対する過度の炎症反応により引き起こされたヒト疾患における治療的介入のための可能性のある標的として関係づけている。

#### 【0157】

(4. 可溶性TREM-1模倣物質は炎症を調節する)

TREM-1の可溶性型(sTREM-1)は、敗血症の患者の血清中<sup>40</sup>に加え、敗血症性ショックの実験モデルに関与した動物の血清中<sup>41</sup>において同定されている。更に、sTREM-1は、肺炎患者の気管支肺泡洗浄液(BAL)中に検出された<sup>42</sup>。sTREM-1の起源に関してはふたつの可能性がある。ひとつの可能性は、sTREM-1は、表面に発現されたTREM-1のタンパク質分解性切断又は膜シェディングにより作製されている。あるいは、sTREM-1は、TREM-1の分泌型

をコードしているTREM-1 mRNAスプライシング変種のデノボ翻訳により作製されることができる。後者の仮説の裏付けにおいて、膜貫通領域をコードしているエキソン3を欠いている選択的TREM-1転写産物が報告されている<sup>43, 44</sup>。sTREM-1の生理的役割は、完全にはわかっていない。この分子は、表面提示されたTREM-1に即座に結合しないTREM-1リガンドを掃去し、これにより免疫応答を鈍くし、かつ炎症の設定における局所的な管理を提供する<sup>40</sup>。実際、免疫学的シグナル伝達及び炎症反応に重要である複数の受容体の可溶性型の制御放出が記載されている。これらは、IL-1受容体(IL-1デコイRII)<sup>45, 46</sup>、TNF- $\alpha$ 受容体<sup>47, 50</sup>、及びL-セレクトリン受容体<sup>51</sup>の可溶性型を含む。sTREM-1のモジュレーター機能と一致して、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(LP17、TDSRCVIGLYHPPLQVY)は、インビトロにおけるヒト単球によるサイトカイン生成を減弱し、かつ敗血症性動物を、インビボにおいて過敏反応及び死亡から保護した<sup>41</sup>。このペプチドは、単に敗血症の予防のみではなく、一旦前炎症性サイトカインの有害作用が開始された場合の敗血症の治療においても、有効であった。これらのデータは、sTREM-1ペプチドによるTREM-1のインビボ調節は、敗血症の治療に適した治療道具であり得ることを示唆している。

10

20

30

40

50

#### 【0158】

(5. TREM-1/DAP12シグナル伝達は、顆粒球及びマクロファージの炎症反応を促進する)

どのようにTREM-1は、炎症反応を誘起するのか？ヒトTREM-1膜貫通領域は、アダプターDAP12との会合が可能である帯電した残基(リジン)を含む<sup>52</sup>。DAP12は、細胞質免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を含む(図2)。DAP12-会合された受容体の結合は、SrcキナーゼによるITAMのチロシンリン酸化を誘導する。リン酸化されたITAMは、タンパク質チロシンキナーゼSyk及びZAP70を動員し、Vavとの複合体内のLAT、NTAL、Slp76、及びSosとの複合体内のGrb-2などの複数のアダプターのリン酸化を引き起こす。DAP12は、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3-K)、ホスホリパーゼC 1/2(PLC 1/2)、TECキナーゼ、c-Cbl、及び他の下流のシグナル伝達メディエーターの活性化も誘導する<sup>21-23</sup>。これらの細胞質メディエーターは、細胞内Ca<sup>2+</sup>動員、アクチン細胞骨格の再編成、細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)1/2及び転写因子の活性化を誘発し、最終的に細胞エフェクター機能の活性化を引き起こす(図2)。

#### 【0159】

DAP12-会合された受容体のライゲーションに対する細胞の反応を測定する研究は、DAP12シグナル伝達単独では、限定された炎症反応を誘発するのみであることを示唆している。しかしDAP12は、炎症を活性化する他のシグナル伝達経路と、特にTLRにより誘発されるシグナル伝達経路と、強力に相乗作用する。典型的にはTLRは、アダプターMyD88及びTRIFを介しシグナル伝達する(図3)。MyD88は、IRAK4、IRAK1及びTRAF6を動員し、シグナル伝達カスケードを開始し、最終的にはNF- $\kappa$ Bの活性化につながる<sup>4</sup>。TRIFは、TBK-1及びIKKを動員し、これらはIRF-3のリン酸化及びIFN- $\alpha$ の転写活性化を媒介する<sup>4</sup>。更にTLRは、MyD88-依存型及び非依存型経路を介しSrcチロシンキナーゼによりシグナル伝達する<sup>53</sup>。DAP12-媒介したシグナル伝達は、インビトロ及びインビボにおけるTLR-媒介した炎症反応を明らかに増強する。しかしこの相乗作用の機序は、あまりわかっていない。持続されたERK活性化は、転写複合体AP-1、特にc-Fosの活性化に必須であることが示されている<sup>54, 55</sup>。更に、DAP12-シグナル伝達は、持続した細胞内カルシウム動員を誘導し、これはCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン-依存型ホスファターゼカルシニューリンを活性化する<sup>56, 57</sup>。カルシニューリンは、転写因子である活性化T細胞核因子(NFAT)を脱リン酸化し、それらの核移行につながる<sup>56, 57</sup>。従って、DAP12-媒介したAP-1及びNFAT活性化は、TLRにより誘導されたNF- $\kappa$ B活性化と相乗作用し、炎症メディエーターをコードしている遺伝子の増強された転写活性化を生じる(図3)。最近同様のモデルが、破骨細胞において明らかにされ、ここではDAP12及び他のITAM-含有アダプターは、Ca<sup>2+</sup>シグナルを発生し、このことは、NF- $\kappa$ B受容体活性化因子(RANK)が破骨細胞形成の重要な転写因子であるNFATc1(NFAT2)を誘導することを可能にしている<sup>58</sup>。

#### 【0160】

顆粒球及びマクロファージの細胞表面上に発現された 1及び 2インテグリンも、細胞

-細胞相互作用及び細胞外マトリックスタンパク質への接着を媒介することにより、炎症に寄与している<sup>59,60</sup>。インテグリンの接着機能は、インテグリンの高次構造及び表面分布を修飾するケモカイン受容体により発生された細胞内シグナルによって決まる<sup>61</sup>。DAP12は、インテグリン活性化に貢献するVavリン酸化などの、細胞内シグナルを発生することも可能である(図3)。顆粒球及びマクロファージの前炎症反応は、IgG Fc、ホルミル-ペプチド、炎症性サイトカインIL-1及びTNF、CD40L及び他のTNF-スーパーファミリーのメンバーなどの追加の受容体を介して誘起される。DAP12-シグナル伝達のこれらの多様なシグナル伝達経路に対する影響は、研究されていない。

#### 【0161】

#### (6. TREM-1マウスモデルの構築：ヒトとマウスの遺伝子間の有意差)

DAP12は、TREMのみではなく、SIRP-1、CD200R、MDL-1、KIR、Ly49、NKG2C/Eなども含む、免疫受容体活性化ファミリーに会合された、膜貫通シグナル伝達アダプターである<sup>62</sup>。これらの受容体は、顆粒球(好中球)、マクロファージ、DC、破骨細胞、小グリア細胞及びNK細胞の表面上で発現される。インビボにおいて敗血症におけるTREM-1の機能を実証するためには、TREM-1ノックアウトマウスを開発することが必要である。しかしマウスの場合、おそらく遺伝子重複事象の結果、TREM-1遺伝子は、高度に相同な遺伝子TREM-3に隣接している。TREM-3は、わずかに4kbだけTREM-1から隔てられ、これはマウスマクロファージにおいて発現され、かつLPSに反応し強力にアップレギュレーションされる<sup>19</sup>。TREM-1同様、TREM-3は、DAP12を介して細胞活性化を促進する<sup>19</sup>。それらの配列相同性及び構造類似性を前提とすると、これらふたつの遺伝子産物は、マウスにおいて同様の又は重複する機能を有し、かつ同じリガンド又は密接に関係したリガンドを認識することができると推定することは妥当である。対照的にヒトにおいて、TREM-3は、偽遺伝子であり、これはタンパク質レベルで発現されず、従ってTREM-1とTREM-3の間に可能性のある重複は存在しない。従ってヒトにおけるTREM-1の遮断の作用をモデル化するために、本発明者らは、TREM-1/TREM-3二重ノックアウト(TREM-1/3-/-)マウスを作出した。本発明者らの結果は、TREM-1/3-/-マウスは、CLPに対しWTマウスよりもより抵抗性があることを示し、このことはTREM-1/3-DAP12シグナル伝達複合体は、真正敗血症の状況において炎症を増悪することを指摘している。

#### 【0162】

#### (7. DAP12シグナル伝達の活性化対障害：TREM-1とTREM-2の相反する役割)

Hamermanらは最近、細胞の活性化におけるDAP12の明らかにされた役割とは反対に、骨髓由来のマクロファージにおいてDAP12がTLR-媒介したサイトカイン生成を阻害することができること、及びLPSがTNF-増感剤D-ガラクトサミンと同時に投与される場合、DAP12-/-マウスは、WTマウスよりもLPSに対しより感受性が良いことを報告した<sup>63</sup>。従ってこれらの結果は、LPSに対するTLR反応の調節におけるDAP12の阻害的役割を逆説的に示唆している。本発明者らのデータ及び参考文献<sup>64</sup>において、本発明者らは、細菌が誘導した炎症の生理学的モデルにおいて、DAP12-/-マウスは、WTマウスよりも、CLPに対しより抵抗性があることを明らかにしている。更に敗血症性マウスから回収されたDAP12-/-腹腔滲出液細胞(PEC)は、野生型PECよりもより少ないサイトカインを生成した。これらの結果は、少なくとも細菌感染の存在下での、DAP12の前炎症性機能を確認している。本発明者らは更に、TREM-1/3-/-マウスは、WTと比べ、CLPに対し抵抗性であることを認め、このことは、TREM-1/3-DAP12がインビボにおける炎症反応に著しく貢献していることを示唆している。

#### 【0163】

最近Hamermanら<sup>36</sup>及び本発明者らのグループ<sup>35</sup>の新たな研究が、(TREM-1/3とは対照的に)TREM-2を、低濃度LPSによる骨髓由来マクロファージのインビトロ刺激時の、並びに同じくおそらくD-ガラクトサミンで増強された内毒素血症における、DAP12の阻害作用を媒介する受容体として同定した。Hamermanらは、インビトロでのトランスフェクションシステムを使用し、TREM-2発現の低分子干渉RNA(siRNA)-媒介した阻害は、マクロファージのTLRアゴニストに対する反応を増大させること、及びこのTREM-2の機能は、完全なITAMを必要とすることを発見した<sup>36</sup>。本発明者らのグループによる研究は、TREM2-/-マウス由来の

マクロファージは、WTマウス由来のもの比べ、増大したTLR-媒介型サイトカイン反応を有すること、並びにこの作用は、DAP12<sup>-/-</sup>マウスにおいて先に認められた増加したサイトカイン生成を完全に記載することを認め、野生型(WT)マウス及びTREM2<sup>-/-</sup>マウスの分析から同じ結論を引き出した<sup>35</sup>。まとめるとこれらのデータは、マクロファージに対するDAP12の阻害作用を媒介するものとして、TREM-2を最終的に同定している。

#### 【0164】

これらのデータは、単純内毒素血症、対、D-ガラクトサミン-増強された内毒素血症におけるDAP12の役割に関するデータの見かけ上の矛盾を解決している。本発明者らは、DAP12の活性化作用、対、阻害作用は、TREM-1、対、TREM-2の関与、並びにこれらの受容体のそれらのリガンド(類)に対するアフィニティ又はアビディティの差異を反映していると仮定している。単純内毒素血症及びCLPの場合、高投与量のLPS(投与量範囲5~10mg/kg)及び真正細菌感染は、高アフィニティTREM-1リガンドの発現及び完全なTREM-1/DAP12リン酸化を誘導し、これは顆粒球及び単球の活性化、並びに炎症反応の大きさの増大につながる(図3)。D-ガラクトサミン-増強された内毒素血症の場合、低投与量のLPS(20~100ng、単純内毒素血症の1/1000)は、低いアビディティのTREM-2リガンド(類)を誘導し、これは阻害性TREM-2シグナル伝達を誘発し、炎症反応を減弱し、かつ生存を改善する(図3)。このモデルの裏付けにおいて、最近のデータは、TREM-2<sup>35</sup>及び推定低アフィニティTREM-2リガンド<sup>36</sup>の両方が、マクロファージの表面に発現されていることを明らかにしており、このことはTREM-2は、マクロファージへ強力な(tonic)阻害シグナルを提供することができることを示唆している。阻害性シグナル伝達は、不完全なDAP12リン酸化、及び結果としての阻害の主要なサイトゾルメディエーターであるタンパク質チロシンホスファターゼSHP-1の動員により媒介されることができ<sup>65, 66</sup>。

#### 【実施例】

#### 【0165】

##### (実施例1)

(DAP12シグナル伝達は炎症及び内毒素血症の死亡率に寄与する)

顆粒球及び単球上のDAP12-会合された受容体TREM-1の抗体連結は、炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ 及びIL-8のLPS-誘導した放出を増幅することが先に示されている<sup>13, 15</sup>。インビボにおいて、DAP12-会合された受容体TREM-1の遮断は、低下した炎症及び内毒素血症又は敗血症性腹膜炎からの生存の増大に関連付けられた<sup>14</sup>。これらの知見は、炎症反応増幅におけるTREM-1及びその会合されたアダプターDAP12の役割は、病原体及びそれらの成分により誘導されることを示唆している。この仮説を裏付けるために、本発明者らは、炎症の生理学的関連モデルにおけるDAP12の機能を理解しようと努めた。この目的のために、本発明者らは、内毒素血症及びCLPにより誘導された敗血症性ショックへのDAP12の寄与を測定した。

#### 【0166】

DAP12は、エンドトキシンに対するインビボ反応に貢献するかどうかを決定するために、本発明者らは、WTマウス及びDAP12<sup>-/-</sup>マウスに、LPSの腹腔内注射を施し、それらの生存をモニタリングした。DAP12<sup>-/-</sup>マウスは、エンドトキシン投与量5mg/kg及び6.25mg/kgに忍容性があり、これらの投与量は、WTマウスにおいては死亡率60~100%を生じた(図4A)。しかしDAP12<sup>-/-</sup>マウスは、投与量10mg/kgでは死亡した(図4A)ので、これらのマウスはエンドトキシンに対し完全に不応性ではなかった。従ってDAP12シグナル伝達は、内毒素血症に寄与するが、これはLPSに対する反応には不要である。

#### 【0167】

エンドトキシンは、マクロファージのTNF- $\alpha$ 及び他の前炎症性サイトカインの生成を誘導することにより、ショックを引き起こす<sup>67</sup>。DAP12シグナル伝達は、サイトカイン生成を増加することにより内毒素血症を増悪するかどうかを決定するために、本発明者らは、5mg/kgエンドトキシンで処置したマウスにおいて、サイトカインレベルを測定した。炎症性サイトカインのレベルは、内毒素血症の1~3時間でピークに達することが示されている<sup>68</sup>。本発明者らは、LPSの注射後2時間で、WT及びDAP12<sup>-/-</sup>の両マウスは、循環TNF- $\alpha$ 、IL

-6、MCP-1及びIL-10レベルが上昇したことを認めた。DAP12-/-マウスと比べ、WT動物は、有意に高いレベルのTNF- $\alpha$ 及びIL-10を有した。4時間後までに、TNF- $\alpha$ 及びIL-10は、WTマウスにおいて低下し、それらのレベルは、DAP12-/-動物と同等であった(図4B)。

本発明者らは、DAP12シグナル伝達は、炎症性サイトカイン生成を迅速に増大することができる結論付ける。

#### 【0168】

(実施例2)

(敗血症性腹膜炎からの死亡率及び炎症は、DAP12により増大される)

エンドトキシンからの死亡率は、炎症及びサイトカインの過剰生成により媒介されるのに対し、真正敗血症の生存は、炎症反応の減弱に加え、細菌制御の実現が必要である<sup>69</sup>。敗血症の生存におけるDAP12の役割を決定するために、本発明者らは、WT及びDAP12-/-マウスに、細菌性腹膜炎の臨床関連モデルであるCLPを施した。本発明者らは、DAP12-/-マウスは、CLPに対し高い抵抗性があることを認めた(WT、n = 20、生存なし；DAP12-/-、n = 19、60%生存；図5A)。

#### 【0169】

敗血症は、ショックに寄与する高い循環サイトカインレベルに関連している<sup>69</sup>。DAP12が、敗血症時のサイトカイン生成に寄与するかどうかを決定するために、本発明者らは、CLPの6及び24時間後に、WT及びDAP12-/-マウスの血清中のサイトカインレベルを測定した。6時間後に、WT及びDAP12-/-マウスは、IL-6、MCP-1及びTNF- $\alpha$ の測定可能な血清レベルを有したが、これら2群間に差異はなかった。6時間から24時間の間に、WT血清サイトカインレベルは劇的に増加し、その結果敗血症発症後24時間までに、WTマウスは、DAP12-/-マウスよりも、有意に高いレベルのIL-6、MCP-1、TNF- $\alpha$ 及びIL-10を有した(図5B)。これらのデータは、DAP12シグナル伝達は、敗血症時のサイトカイン生成に寄与することを明らかにしている。

#### 【0170】

DAP12-/-動物と比べてWTマウスの増加した敗血症死亡率を媒介する他のDAP12-制御因子が存在するかどうかを決定するために、本発明者らは、これらのマウス由来の血漿タンパク質を、二次元ディファレンスゲル電気泳動(2D DIGE)を用い比較した<sup>70</sup>。血漿は、WT及びDAP12-/-マウスから、CLPの24時間後に単離し、血漿タンパク質を、等電点及びサイズにより分解した。これらふたつの遺伝子型間で、個々のゲルの特色の相対存在量を比較し、かつ4つの独立した実験において有意差がある特色を、単離し、かつ質量分析により同定した。本発明者らは、13種のゲルの特色において、7種の示差的に制御されたタンパク質を同定した(一部のタンパク質は、複数のゲル特色で示された)。データは、DAP12-/-、対、WTの平均蛍光の変化の倍率として表した(表I)。

#### 【0171】

この偏りが無い方式で同定されたタンパク質は、急性相反応物として先に記載された。陽性急性相タンパク質(炎症に反応して増加することがわかっているタンパク質、すなわち、アポリポタンパクA-IV<sup>71</sup>、ヘモベキシン<sup>72</sup>、及び補体成分3<sup>72</sup>)は、同定されたタンパク質7種中3種を占めた。陰性急性相タンパク質(炎症で減少させることがわかっているもの)は、7種のタンパク質中の4種を占めた(主要尿中タンパク質<sup>73</sup>、抗トロンビンIII<sup>74</sup>、ゲルソリン<sup>75</sup>、及びMHC Q10<sup>76</sup>)。個別のタンパク質各々に関して、急性相反応は、DAP12-/-マウスにおいて減弱された。これは、より低いレベルの陽性急性相タンパク質及びより高いレベルの陰性急性相タンパク質として示された。

まとめると、これらのデータは、DAP12-/-マウスにおける低下した血漿サイトカインレベル及び低下した急性相反応を示し、これは炎症誘発におけるDAP12の役割を明らかにしている。

#### 【0172】

(実施例3)

(DAP12は、細胞動員又は細菌死滅に不要である)

本発明者らは、DAP12の非存在は、腹膜炎に対する細胞反応の減少も生じると仮定した

。この問題点に対処するために、本発明者らは、敗血症時に腹膜に動員された細胞の数及び種類を測定した。本発明者らは、敗血症の発症後24時間で、WT及びDAP12<sup>-/-</sup>マウスの腹膜において、細胞数は等しいことを認めた(図6A)。これらの細胞上の表面マーカーを分析することにより、本発明者らは、WT及びDAP12<sup>-/-</sup>の両マウスにおいて、細胞の50~60%は、マクロファージ(CD11b<sup>+</sup>GR1<sup>lo</sup>として定義された)であり、及び30~40%は顆粒球(CD11b<sup>+</sup>GR1<sup>hi</sup>として定義された)であることを認めた(図6B)。DAP12の非存在は、敗血症時に腹膜への細胞の動員を変更するようには見えなかった。本発明者らは、DAP12-シグナル伝達の非存在下で細菌の制御が欠損されるかどうかも調べた。DAP12は細菌の制御を媒介するかどうかを決定するために、本発明者らは、24時間の時点の腹膜内の細菌負荷を測定した。本発明者らは、WT及びDAP12<sup>-/-</sup>マウスの間の腹膜感染において有意差がないことを認め(図6C)、これはDAP12が敗血症時の腹膜感染の制御には不要であることを明らかにしている。

10

【0173】

【表2】

**表1. DAP12<sup>-/-</sup>マウス対WTマウスにおける敗血症により誘導された示差的血漿タンパク質**

陽性急性相反応物	変化の倍率	p値
アポリポタンパク質A-IV	-1.56	0.05
ヘモペキシン	-3.68	0.024
補体成分3	-3.17	0.0005
陰性急性相反応物	変化の倍率	p値
アンチトロンビン	1.69	0.0047
ゲルソリン	1.72	0.0018
主要尿中タンパク質	3.49	0.006
MHC Q10α鎖	2.13	0.04

20

CLPの24時間後のWT及びDAP12<sup>-/-</sup>マウス由来の血漿のプロテオミクス分析は、7種の示差的に制御されたタンパク質を同定した。同定されたタンパク質は、急性相反応物として先に説明しており、敗血症時の急性相反応の誘導におけるDAP12に関する役割を明示する。平均蛍光強度。

30

【0174】

(実施例4)

(DAP12-シグナル伝達は、敗血症性マウスから得た腹腔滲出液細胞のインビトロサイトカイン生成及びERKシグナル伝達を増強する)

本発明者らの結果は、インビボDAP12-シグナル伝達は、サイトカイン生成を増強することを示す。これらの知見の細胞の基礎を調べるために、本発明者らは、敗血症により誘導された腹腔滲出液細胞によるサイトカイン生成を測定した。腹膜細胞は、腹腔洗浄液から単離し、かつLPS刺激の有無のいずれかで、エキスピボにおいてサイトカインを生成するそれらの能力について試験した。本発明者らは、CLP後にWT及びDAP12<sup>-/-</sup>の両方の腹膜から単離された細胞は、いかなる追加刺激も存在せずにサイトカインを生成したことを認めた(図7A)。しかしWTマウスから単離された細胞は、DAP12<sup>-/-</sup>マウスから単離された細胞と比べ、より多くのMCP-1、TNF- $\alpha$ 及びIL-10を生成した。これらの細胞を抗生物質の存在下で培養したが、本発明者らは、このサイトカイン分泌は、端的に敗血症性腹腔洗浄液から持ち越された細菌生成物による刺激を反映しているか、又はこのサイトカイン生成は、インビボにおいて先の刺激により誘導された活性化を反映しているかを、決定することはできなかった。TLRを介した刺激を標準化し、かつ微生物生成物の示差的持ち越しの可能性

40

50

を排除するために、本発明者らは、細胞をLPS 1  $\mu$ g/mlで処理し、これはWT及びDAP12<sup>-/-</sup>細胞によるサイトカイン生成の最大刺激及び増大を生じた。これらの条件下で、本発明者らは、WT細胞は、サイトカイン生成が、DAP12<sup>-/-</sup>細胞よりも、有意により効果的であることを認めた(図7A)。驚くことに、WT及びDAP12<sup>-/-</sup>マウスからのチオグリコレート-誘起した腹腔渗出液細胞によるエクスピボサイトカイン生成を比較した場合、本発明者らは、IL-10、IL-6、MCP-1又はTNF- $\alpha$ において統計学的有意差を認めなかった(図7B)が、しかしこれらはDAP12<sup>-/-</sup>細胞により、IL-10生成を増大する傾向が存在した。本発明者らは、DAP12-シグナル伝達は、敗血症性腹膜炎によりインビボにおいて刺激されたPECにおいてのみサイトカイン生成を増大すると結論付ける。

【0175】

本発明者らは、敗血症性腹膜炎が誘導したPECにおけるサイトカイン生成のDAP12-媒介した増加の基礎となるシグナル伝達経路を更に調べた。この目的のために、PECを、CLPの24時間後に収集し、かつ様々な時点でLPSにより刺激した。細胞溶解液を、SDS-PAGEにより分離し、かつホスホ-ERK1/2について免疫プロットングし、その後総ERK2について再度プロットングした(図8)。WTマウスは、刺激後30及び60分で、増大したERKリン酸化を示した。これらのデータは、DAP12シグナル伝達は、LPS-媒介型ERK活性化を増大させることを実証する。

【0176】

これらの研究は明白に、DAP12が、炎症増加による敗血症性腹膜炎からの死亡に寄与することを実証する。びまん性腹膜炎及び内毒素血症のモデルにおいて、細胞を腹膜に動員するため、又は抗微生物薬反応を媒介するためには、DAP12は不要である。本発明者らは、DAP12シグナル伝達は、炎症性サイトカイン生成を増幅することにより、炎症反応を増悪させることを認めた。

【0177】

(実施例5)

(TREM-1/TREM-3二重欠損(TREM1/3<sup>-/-</sup>)マウスは、WTマウスよりもCLPに対する影響を受けにくい)

本発明者らのデータ(図4-7)は、炎症促進におけるDAP12シグナル伝達の役割を明らかに確立している。しかし、マウスにおけるDAP12の非存在は、炎症細胞上に発現された複数の細胞表面受容体のシグナル伝達に影響を及ぼすことができる。これらは、TREM-1のみではなく、SIRP<sup>177,78</sup>、CD200R<sup>79-82</sup>、IREM2<sup>83</sup>、MDL-1<sup>84</sup>、及び他のもの<sup>62</sup>も含む。従ってDAP12<sup>-/-</sup>マウスは、インビボにおけるTREM-1の特異的機能を特定するために使用することはできない。インビボにおけるTREM-1の機能を取り扱うためには、ノックアウトモデルの作出が必須である。

【0178】

このマウスにおいて、TREM-1遺伝子は、非常に類似した遺伝子TREM-3に隣接しており<sup>19</sup>、これはおそらくTREM-1と重複する機能を有することができかつ同じリガンド又は密接に関連したリガンドを認識することができるタンパク質をコードしているであろう。対照的にヒトにおいては、TREM-3は偽遺伝子である。従ってインビボにおけるヒトTREMシステムを最良にモデル化するために、本発明者らは、TREM-1-TREM-3二重ノックアウトマウス(TREM-1-3<sup>-/-</sup>)を作出した。

【0179】

このTREM-1-3標的化構築体は、TREM-1のDAP12への会合に必要である膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインをコードしているエキソン3及び4、並びにTREM-3のリーダー配列をコードしているTREM-3のエキソン1を欠失するようにデザインされた(図9)。本発明者らは、この構築体を、E14.1 ES細胞に電気穿孔し、正確に標的化されたクローンをC57BL/6胚盤胞に注入し、キメラを得、CMVプロモーター下でCreを発現するトランスジェニックマウスを繁殖させた<sup>85</sup>。キメラは、欠失されたネオマイシン耐性遺伝子を伴うTREM-1-3変異を伝達した。TREM-1/3<sup>-/+</sup>マウスと相互交配することにより、本発明者らは、この欠失についてホモ接合性のマウスを作出した。

10

20

30

40

50

## 【0180】

本発明者らのマウスにおけるTREM-1/3発現の欠如を明らかにするために、本発明者らは、TREM-1/3-/-マウス及びWT同腹仔から、血液及び骨髄顆粒球を調製し、これらを抗-mTREM-1 mAb(50D1)<sup>14</sup>、及び本発明者らが最近作製した抗-mTREM-3 mAbで染色した(図10)。フローサイトメトリー分析は、WT顆粒球は高レベルのTREM-1及びTREM-3を発現したが、TREM-1及びTREM-3は両方ともTREM-1/3-/-顆粒球上には完全に存在しなかったことを明らかにした(図11)。この可能性を取り扱うために、TREM-1/3-/-マウスを、C57BL/6バックグラウンドに戻し交配し、その後そのゲノムの>70%がC57BL6系統に由来する場合に、相互交配した(SSLTPタイピングにより測定)。このマウスの遺伝的バックグラウンドの考察は、その中で遺伝子座が標的化されているES細胞は、マウス129/Ola系統に由来する点、及びマウスの129系統におけるDAP12シグナル伝達において特徴付けられない欠損が存在する点で重要である<sup>86</sup>。

10

## 【0181】

敗血症生存に対するTREM-1/3の役割を決定するために、本発明者らは、TREM-1/3+/+マウスとTREM-1/3-/-マウス(両方とも均一に70% C57BL/6/30% 129Olaバックグラウンドを生じるよう並行繁殖して得る)のCLP敗血症チャレンジに対する反応を比較し;生存を14日間モニタリングした。試験は、敗血症生存に対する発情周期の交絡作用を避けるために、雄のマウスに限定した。本発明者らは、TREM-1/3-/-マウスは、WTと比べ、CLPに対し抵抗性があることを認めた(図12)。

20

## 【0182】

本発明者らのデータは、TREM-1/3シグナル伝達の抑止は、CLPのこのマウスモデルにおける保護を提供することを明らかにしており、これはTREM-1シグナル伝達の遮断は、CLPにおいて恩恵があるという本発明者らの先行して公表されたデータを立証している。70% C57BL/6マウスは、それらのWT対応マウスよりもCLPに対しより抵抗性があり、このことは、TREMシグナル伝達の調節が、敗血症において恩恵があり得ることを示している。

## 【0183】

これらのノックアウトマウスが純粋なC57BL/6バックグラウンドを基にしているとするならば、本発明者らは、TREM-1/3-/-の表現型保護が更により実質的であると予想する。単独の受容体が欠失されたマウス系統を作出し、更に分析することができる。

30

## 【0184】

(実施例6)

(肺敗血症マウスモデルの確立)

先に本発明者らは、TREM-1の遮断は、盲腸結紮及び穿刺(CLP)が誘導した敗血症後の生存を改善することができることを示した。CLPは、腹部敗血症の臨床関連モデルであり、内在性細菌に続発する複数グラム陰性菌の敗血症の病理を再現している。しかし腹部起源の敗血症は、本臨床疾患のごく一部分のみを構成している。米国においては、臨床の敗血症の50%よりも多くが市中感染又は院内感染のいずれかの病原体による原発性肺感染症から広がる。更にヒトTREM-1は、肺胞マクロファージにおいて強力に発現され<sup>37</sup>、かつ肺感染症に対する宿主反応において重要な機能を有することができる。この臨床状態のより良いモデル化のために、本発明者らは、単独の臨床上の関連病原体による感染により開始される肺敗血症のモデルを採用した。先にDr. CoopersmithとDr. Hotchkissは、肺炎緑膿菌からのグラム陰性菌敗血症モデルを発表した<sup>87-89</sup>。最近このモデルは、肺炎連鎖球菌からのグラム陽性菌敗血症に拡大されている。両方のモデルにおいて、細菌接種材料は、WTマウスにおいて死亡率90%をもたらすことが力価判定されている。図13は、これら2つの敗血症モデルの生存曲線を示している(左側パネルは、肺炎連鎖球菌モデルであり、及び右側パネルは、緑膿菌モデルである)。

40

## 【0185】

(実施例7)

(ヒトTREM-1-リガンド(類)は活性化された好中球上で発現される)

現在まで、いくつかの研究室において、TREM-1のリガンドを同定しようとする努力は成

50



果が得られていない。本発明者らの見解では、これはおそらく迅速な解離速度(off rate)と組合せられた低アフィニティ受容体-リガンド相互作用のためであろう。この現象は、自然免疫の文献において記載されている。例えば、NK受容体NKG2Dは、マイクロモルからナノモルまで変動するアフィニティを持つ複数のリガンドを有する<sup>90</sup>。免疫受容体の低アフィニティリガンドを同定するために、本発明者らは、新規方式を開発した。様々な四量体及び多量体の構築体を設計し、多価性によるより高い受容体-リガンドアフィニティ及びより好ましい解離速度を作出した<sup>91-94</sup>。この目的のために、本発明者らは、四量体TREM-1構築体を作製した。ヒトTREM-1エクトドメインをコードしているcDNAを、関心対象のタンパク質のカルボキシ末端にBirAタグ及び6-ヒスチジンタグを取り込んでいる(図14)細菌性発現ベクターPet28(ワシントン医科大学のDaved Fremontのご厚意により提供)へクローニングした。BirA配列を、組み換えピオチンリガーゼにより効率的にピオチン化した。ポリヒスチジンタグを使用し、ニッケルセファロースクロマトグラフィーにより、この組み換えタンパク質を精製することができる。このタンパク質(TREM-1エクトドメイン-BirA-6H)を、細菌性封入体から精製し、リフォールディングし、かつその後のFPLCを利用し単離した。引き続きこのタンパク質をピオチン化した。取り込まれなかったピオチンは、FPLCにより除去した。ピオチン化されたTREM-1を次に、フィコエリトリン(PE)に結合されたストレプトアビジンと共にインキュベーションした。ストレプトアビジンは、4つの異なる高アフィニティ( $10^{-12}$ M)のピオチン-結合部位を含むので、ピオチン化されたTREM-1エクトドメイン及びPE-ストレプトアビジンは、PE-標識された四量体を形成する。得られた分子hTREM-1四量体は、中心のPEに結合されたストレプトアビジン分子の上に提示された4つのhTREM-1エクトドメインを有する。

10

20

#### 【0186】

本発明者らは、このPE-標識された四量体性TREM-1を使用し、現存する細胞株(30種を上回るヒト及びマウス系統を試験した)及び末梢血単核細胞(PBMC)、マウスのリンパ節、脾臓及び腹膜の細胞をフローサイトメトリーによりスクリーニングした。本発明者らの先のデータはTREM-1は炎症シグナルの増幅において重要であることを示していたので、本発明者らは、Barnes Jewish Hospitalの集中治療室(ICU)の敗血症患者から得られた細胞を試験した。施設内倫理委員会(IRB)からこれらの患者試料をスクリーニングすることの承認が得られた後、これらは、ICU患者及びICUスタッフの採取した血液を好適であると同定した。好中球を、フィコール勾配とそれに続くデキストラン濃縮を用いて、単離した<sup>95</sup>。微量遠心分離により迅速な単離を実行することについては大きな注意を払い、細胞は人為的活性化を避けるために、4℃で維持した<sup>96</sup>。患者は、疑わしい感染の存在及び血圧を維持するための血管収縮薬の必要性を基に選択した。血液を採取し、次に好中球を更なる分析に使用した。同時に、対照好中球を外來の志願者から得、結合実験のために患者試料と平行して処理した。このhTREM-1四量体構築体は、敗血症性患者からの好中球サブセットには結合したが、健常志願者からの好中球には結合しなかった(図14)。これらのデータは、推定されるTREM-1リガンドは、敗血症性患者の好中球上に発現されることを示唆している。hTREM-1四量体結合の特異性を確認するために、対照四量体(CD69)及びSA-PE単独を結合アッセイにおいて使用し、両方とも、敗血症患者から得たヒト好中球に結合することには失敗した(図14)。

30

40

#### 【0187】

hTREM-1四量体に結合した好中球の亜集団は、細胞系統マーカーに対するmAbを用い、特徴付けた。この亜集団は、受容体の好中球性パターンと一致するCD56<sup>-</sup>、CD3<sup>-</sup>、CD19<sup>-</sup>、及びCD16<sup>high</sup>であった。更なる分析は、この好中球の亜集団が全て循環血中成熟好中球上で発現されることがわかっているマーカーであるCD11b、CD10、CD66b、CD55、及びCD11cについて陽性であることを明らかにした<sup>96</sup>(図15)。この集団は、加えて明白にCD35(補体受容体1)陽性であり、CD35受容体は、好中球発達の桿状核球及び分葉核球段階で出現する抗原であることが報告されている<sup>97</sup>ので、これらの細胞は、成熟し分葉核化された好中球であり、ストレスに反応して骨髓から早期に放出された未熟な顆粒球ではないことを示している。CD16レベルは、炎症及び感染症の状況において異常に低いことが先に報告されてい

50

る<sup>98</sup>。これらの研究と一致して、CD16(Fc 受容体III)レベルは、敗血症性患者の好中球において、対照と比べ減少した(図14)。興味深いことに、TREM-1リガンドについて陽性の好中球の割合は、患者間で、約25%から最高90%まで変動した。この時点でこの変動性の病因は不明であるが、しかし好中球活性化の異なる状態、患者間の遺伝的差異、又は様々な翻訳後タンパク質修飾を表しているであろう。TREM-1リガンドの同定は、遺伝的変動性の更なる分析を可能にしている。このような変動性は、敗血症の発生数及び転帰の両方において注目されている。

#### 【0188】

(実施例8)

(PMA/イオノマイシンは推定hTREM-1リガンドをアップレギュレートする)

インビトロ刺激により処理された好中球は、この推定リガンドをアップレギュレートするかどうかを評価するために、対照好中球を試験した。

血液を、臨床試験委員会プロトコルに従い、Barnes Hospitalの集中治療室において、敗血症性患者から採取した。好中球を、標準プロトコルにより単離した。簡単に述べると、血液を、2倍量のPBSで希釈し、その後50mlのコニカル内でフィコール15ml上に積層した。このチューブを、1400rpmで30分間回転した。その後赤血球と混合された好中球を、3%デキストラン溶液を用い更に分離した。次に好中球が濃縮された層を収集し、赤血球に、0.2%NaClを30秒間、引き続き同量の1.6%NaClを用い、低張溶血を施した。その後好中球をベレット化し、冷PBS中に再浮遊させた。

#### 【0189】

血液からの単離後、好中球を、fMLP、TNF- $\alpha$ 、LPS、IL-1、及びPMA/イオノマイシンを含む、様々な刺激で処理した。これらの物質は全てヒト好中球を刺激し、一部は好中球顆粒の優先的脱顆粒を引き起こすので、これらを選択した。好中球は、特異的、アズールアフィニティ、ゼラチナーゼ、及び分泌小胞を含む、いくつかの独特な型の顆粒を有する。各顆粒型は、特徴的タンパク質を含む。一旦顆粒がエキソサイトーシスされたならば、動態化された顆粒の膜は、細胞膜の一部であり続け、その結果先の細胞内に分子を提示する<sup>99</sup>。これは、好中球が、刺激時に迅速に新規受容体を提示する機序である。本発明者らは、様々な化合物で細胞を刺激することにより、本リガンドは、活性化時にデノボで合成されるか、又は顆粒内で予め形成されるかどうかを確かめたいと考えた。

#### 【0190】

対照好中球を前述の化合物で刺激した場合、PMA/イオノマイシンで処理した細胞のみが、ヒトTREM-1に結合した(図14)。PMA/イオノマイシンは、好中球の総顆粒含量の50%以上がエキソサイトーシスされるような強力な活性化を提供する(カルシウム流入及びプロテインキナーゼC活性化により)ことが先に示されている<sup>100</sup>。これらの条件下で、ほぼ全ての好中球集団が、hTREM-1四量体結合について陽性となり始めた。この結合は、PMA/イオノマイシンへの曝露のわずか3分後に最初に検出された。これらのデータは、hTREM-1リガンドの少なくとも一部は、予め形成されており、かつ適当な刺激後、好中球はこのリガンドをその表面に移行させ、そこでその後の四量体結合に利用可能となることを示している。最大hTREM-1四量体結合は、PMA/イオノマイシン曝露後30~45分で生じるので、このアップレギュレーションの一部の成分は翻訳レベルで駆動されるかどうかは不明である。本発明者らは、この時点では、予め形成されたりリガンドの細胞質での位置に関するいかなる推論もすることができない。これらのデータをまとめると、hTREM-1のリガンドは、敗血症患者における好中球の垂集団及びPMA/イオノマイシンで活性化された好中球の上に発現されることを示している。これらのデータは、炎症及び敗血症の進展におけるTREM-1シグナル伝達の役割とも一致している。実際、TREM-1受容体は、好中球及び単球上で構成的に発現されるので、これは、炎症の状況において動的であるリガンド発現であろうと予想される。リガンド発現の制御は、最初の炎症誘発に続く敗血症の進展において重要な役割を果たすであろう。

#### 【0191】

(実施例9)

10

20

30

40

50

(TREM-1-リガンドを遮断する抗体の産生)

推定リガンドを同定するために、抗-ヒト好中球抗体を作製した。ラットを、敗血症性患者から単離したリガンド陽性好中球で免疫処置した。3回免疫処置した後、ラットを屠殺し、それらの脾臓を、マウスSP2/0マウス骨髓腫細胞と融合させた。得られたハイブリドーマを、以下の抗体の産生についてスクリーニングした：a)PMA/イオノマイシンで刺激された好中球又は敗血症性患者の好中球へ結合する抗体；b)対照好中球へ広範に結合しない抗体；c)TREM-1-トランスフェクトされた細胞に結合しない抗体；d)活性化された好中球へのTREM-1四量体結合を無効化した抗体。このスクリーニング手順の後、R33と称されるmAb(IgG2a)を同定した。R33により認識されるこの抗原は、敗血症性患者からの好中球及びPMA/イオノマイシンで前処理された好中球においてアップレギュレーションされた。重要なことに、敗血症性患者からの好中球のmAb R33と一緒にブレインキュベーションは、TREM-1四量体結合を無効化したのに対し、アイソタイプが合致した対照mAbと一緒にブレインキュベーションは、四量体結合と干渉しなかった(図16)。これらのデータを基に、本発明者らは、R33抗原は、TREM-1のリガンドであると結論付けた。

【0192】

(実施例10)

(敗血症性患者好中球からのcDNA発現ライブラリーの構築及びTREM-1リガンドを同定するためのこのライブラリーの使用)

敗血症の判定基準に合致するICU内の敗血症性患者のパフィコートからの総細胞RNAを調製した。これらの患者の大半は、R33抗原結合活性に加え、TREM-1四量体結合についてスクリーニングした(図22は、TREM-1四量体は、敗血症性患者の好中球には結合するが、休止期好中球には結合しないことを示している)。

【0193】

RNAを精製するために、本発明者らは、「損傷に対する炎症及び宿主反応、大規模共同研究プログラム」<sup>101</sup>の一部として、Dr. Perren Cobbsの研究室において先に立証されたプロトコルを利用した。簡単に述べると、試料は、生成の2時間以内に処理した。血液を、900 × gで10分間回転し、ブレーキをかけずに停止した。次に血清を除去し、-80 で貯蔵した。その細胞ペレットを、EL緩衝液(InVitrogen社)中で再浮遊させ、氷上で15分間インキュベーションした。このインキュベーション後、細胞を収集し、この工程を繰り返した。試料が赤血球を含まなくなった時点で、RNA貯蔵用緩衝液を添加し、試料を-80 で凍結した。その後総細胞RNAを、InVitrogen社のRNAEASYキットを用いて単離した。このRNAの品質を、Agilentバイオアナライザーにより評価した。適量の高品質RNAが精製されたならば、これらの試料をプールし、OpenBiosystemsにより、特注の増幅されないcDNAライブラリーを、本発明者らの使用のために構築した。

【0194】

次に本発明者らは、前述の精製されたcDNAを、哺乳類293細胞にトランスフェクトし、かつこれらの細胞を蛍光セルソーターを用いて選別した。本発明者らは、選別された1000万個から約10万個の細胞を収集した(図17、パネルA)。本発明者らは、これらの細胞から、Hirt緩衝液を用いプラスミドDNAを単離した。このDNAを、大腸菌に形質転換した。形質転換された細菌を、アンピシリン選択を用いて播種した。1個のコロニーが可視化されたならば、これらのコロニーをレプリカプレート法に供した。本発明者らは、24個の個別のプレートからプラスミドを収集しかつ精製し、それらの複製を4 で貯蔵した。リポフェクタミン(InVitrogen社)を用い、これらのプラスミドのプールを、293細胞の個別のウェルにトランスフェクトした。24時間後、細胞を各ウェルから収穫し、mAb R33及び好適な二次複合抗体で染色した。その後これらの細胞に、FACS分析を施した(図17)。2つの陽性プレートF(図17、パネルB)及びHを同定した。プレートFは、約149個の個別のコロニーを有した。これらのコロニーを、4つのプールに分け、プラスミドDNAを単離した。このDNAの293細胞へのトランスフェクト後、FACS染色によるスクリーニングの別のラウンドを実行した。このプロセスを通じて、R33抗原は、最終的には単独のコロニーに絞りこまれた(図17、パネルC)。これは、好中球及び単球のサブセット上に発現される分子であるCD177

を発現することがわかった。

【0195】

この分子のアミノ酸配列は、図18に示している。ここで、この分子はGPIアンカーを有することを認めることができる。同じく、TREM-1受容体への結合に参与している細胞外部分も有する。そのcDNA配列は、図21Aに示されている。

GPI連結されたタンパク質は、しばしば細胞表面からシェディングされ、かつ血漿及び血清中において可溶性タンパク質として認められる。このことは、本タンパク質ファミリーのメンバーの場合であることが示されている。例えば、Klippelらの論文(Blood, 100, No 7, 2441-2448 [2002])は、PRV-1に関するこの現象を報告している。

【0196】

(実施例11)

(TREM-1リガンドの可溶性型の生成及びそれらの分析)

前記リガンドの可溶性型を作製することができ、かつTREM-1を発現している細胞について結合アッセイを実行するために有用である。これは、IgGのFc部分の変異型(Fc受容体に結合しない)をコードしている本発明者らの研究室の構築体を用いて実現することができる。TREM-1リガンド遺伝子は、Fcとインフレーションで融合されることができる。このプラスミドは、哺乳類細胞にトランスフェクトされることができる。このタンパク質産物は、Fc相互作用により二量体形成する培地へ分泌されるであろう。得られるタンパク質産物は、2つのリガンドヘッドを持つFc融合タンパク質であろう。この分子を分泌する細胞の上清を収集し、この分子を、プロテインGカラムを用いて精製することができる。この構築体は、受容体及びリガンドの両方向での結合、すなわち可溶性TREM-1が表面発現されたR33抗原に結合し、かつ可溶性R33抗原が表面発現されたTREM-1に結合することの評価において有用である。本発明者らの研究室は、この戦略を使用し、これまでにいくつかのリガンド受容体相互作用を特徴付けている<sup>13, 14, 114</sup>。

【0197】

次に可溶性TREM-1リガンドFcタンパク質を、天然にTREM-1を発現する細胞(好中球及び単球)に加え、TREM-1コードしているプラスミドによりトランスフェクトされた細胞の両方と共にインキュベーションすることができる。Fc融合タンパク質の結合は、PEに複合された抗ヒトFc及びFACS分析を用いて、検出することができる。ヒトTREM-1四量体の、TREM-1リガンドでトランスフェクトされた細胞株へ結合する能力を評価することができる逆の実験も、実行することができる。TREM-1リガンドは、cDNAライブラリープラスミドから増幅され、かつpcDNA3ベクターにサブクローニングされることができる。このベクターは、ネオマイシン選択を含み、安定した哺乳類のトランスフェクタントの生成が可能である。このプラスミドは、293細胞にトランスフェクトされ、かつ抗生物質選択下に配置される。その後耐性細胞を、R33抗体による染色について、FACSで分析することができる。高発現している安定したトランスフェクタントをクローニングし、その後TREM-1四量体分子に加え、本発明者らの研究室で先に作製したTREM-1 Fc分子との結合アッセイにおいて使用することができる。

【0198】

CD3 の細胞質領域に融合されたTREM-1分子を発現するT細胞ハイブリドーマレポーター細胞株を構築した。TREM-1分子が、機能的様式で結合されている場合、ZAP70は、CD3 に動員され、かつ一連の細胞内リン酸化事象は、PLC $\gamma$ の活性化及び増大した細胞内カルシウムに繋がる。このレポーター細胞は、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードしている配列に融合されたNFATプロモーターをコードしているプラスミドを含む。NFATは、細胞内カルシウム動態化により活性化される。これは、TREM-1を発現しているGFPレポーターの推定リガンドとの同時インキュベーションを可能にし、その後これらの細胞を、FACSにより、GFP発現について分析する。本発明者らの研究室及び他の研究室は、このシステムを用い、他の受容体リガンド相互作用の生物学的関連性を確認した<sup>115</sup>。この機能アッセイシステムは、TREM-1/TREM-1リガンド相互作用の生物学的関連性の別の測定として使用することができる。

10

20

30

40

50

## 【0199】

前述の可溶性TREM-1リガンド分子に加え、無関係の対照Fc融合タンパク質を、新たに単離されたヒト好中球及び単球と共にインキュベーションすることができる。炎症の代理マーカーとして、IL-1、IL-8及びMPO活性を、好中球において測定する。好中球に対するR33抗原結合の作用に加え、ファゴサイトーシスも評価する。単球において、TNF、IL-8、及びMCP-1の分泌を測定し、これらの分子に対するTREM-1結合の作用を評価することができる。本発明者らは、これらの前炎症性サイトカインの分泌を生じる結合を予想する。

## 【0200】

野生型及びTREM1/3欠損マウスを使用し、可溶性TREM-1リガンドのマウス敗血症に対する影響を評価することができる。生存、血清サイトカイン生成、腹膜浸潤並びに局所的及び全身の細菌負荷を、これらのマウスにおいて評価することができる。本発明者らは、ノックアウトマウスにおける過剰なTREM-1リガンドは、生存に対し影響を有さないのに対し、過剰なTREM-1リガンドは、刺激性である場合、野生型マウスのサイトカイン生成及び死亡率を増大するはずであると予測している。

## 【0201】

本発明者らは、TREM-1リガンドの結合は、前炎症性サイトカイン生成を誘発することを予想する。インビボにおいて、本発明者らは、可溶性TREM-1リガンドの投与は、野生型マウスにおいてCLP後の増大したサイトカイン生成及び増加した死亡率を生じるのに対し、ノックアウトマウスはこの分子による影響を受けないと予想する。

## 【0202】

(実施例12)

(敗血症のマーカーとしてのTREM-1リガンド)

本試験に含まれる患者は、臨床的に疑わしい感染症を呈しかつ全身性炎症反応症候群(SIRS)の少なくとも2つの判定基準[Bone RC、Sibbald WJ及びSprung CLの文献、「敗血症及び臓器不全に関するACCP-SCCM統一見解会議(The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure)」、Chest, 101:1481-3 (1992)]を満たした26名の新規入院患者であった。これらの患者は、以下のようにレトロスペクティブに分類した：12名の敗血症及び14名のSIRS。4名の健常個人を、対照として含んだ。TREM-1リガンド発現を、2つの時点で評価した：1)急性相、ICUへの入院直後(体温 $>38^{\circ}\text{C}$ 、心拍数 $>90/\text{分}$ 、WBC数 $>12 \times 10^9/\text{l}$ )；及び、2)回復期、退院時に相当(前記臨床パラメータの正常化)。登録時の臨床特徴は、敗血症患者とそうでない患者の間に有意差はなかった：敗血症及びSIRSで、各々、男性数8名(66%)及び9名(69%)；年齢48.6歳及び58.5歳。

## 【0203】

血流感染は、敗血症患者12名全員において微生物学的に証明された(5名グラム陽性菌、5名グラム陰性菌、1名複数感染、1名カンジダ・アルビカンス(*C. albicans*)感染)。TREM-1リガンド発現は、敗血症患者においてのみ検出されたが、SIRS患者においては検出されなかった(図24A)。健常被験者由来の末梢血顆粒球は、検出可能なレベルのTREM-1リガンドを発現しなかった(図24A)。TREM-1リガンドの発現レベルと血流から単離された微生物菌株又はいずれか他の臨床的若しくは生物学的特色の間に、相関関係は認められなかった。本発明者らは、TREM-1リガンドの発現レベルと敗血症患者の臨床状態の間の関係を更に評価した。分析された敗血症患者全員において、TREM-1リガンドの発現レベルは、ICUからの退室時に低下していた(図24B)。患者1名において、TREM-1リガンドの2回目の測定は、その患者が敗血症性ショックで死亡したために、実施することができなかった。更に2名の患者において、全身性細菌感染と記載されたにもかかわらず、TREM-1リガンド発現は、ICUへの入院時に検出されなかった。このことは、高い細胞死亡率を伴う不適切な血液試料が研究室に送付されたという事実に起因するであろう。

## 【0204】

本発明者らの結果は、TREM-1リガンド発現は、敗血症患者からの末梢血好中球上で広範に検出されるが、非微生物起源のSIRS患者では検出されず、従ってこれは敗血症の有用なマーカーを表していることを示している。可溶性TREM-1の血漿レベルの測定も、敗血症を

SIRSから識別する上でその診断の正確さを示している[Gibot S、Kolopp-Sarda MN、Bene MCらの論文、Ann Intern Med, 141:9-15 (2004)]。実際、敗血症研究の進歩は、重度の罹患患者の高度に不均質な群中で、より均質な患者のサブセットを線引きするために、並びに提唱された療法の標的である特定の生物学的異常を有する患者を確定するために、入手可能なマーカーよりもより良いマーカーを必要としている。本発明者らのデータは、TREM-1リガンドは、敗血症を有し、その結果特定の療法に対し反応するであろう患者の確定診断の確立において情報を提供し；有益な転帰を経験する確率が比較的高い患者を確定するために、敗血症の重症度を定量化し；どのように患者が介入に反応するかを決定するために、療法に対する反応を測定する、敗血症の存在及び重症度を推定するための、有用な診断マーカーを提示し得ることを示唆している。

10

#### 【0205】

更にTREM-1リガンドは、敗血症における重要なメディエーターであり、かつ敗血症患者において特異的に発現される。介入は、TREM-1を標的化するのみではなく、適した時点で投与されなければならないので、敗血症での炎症反応の進展時のTREM-1リガンド発現の分析は、敗血症の有効療法において根本的に重要なことである。

#### 【0206】

(実施例13)

(TREM-1リガンドのその受容体への結合を妨害/減少させる化合物のスクリーニングをどのように実行できるかを示す第一の実施例)

293細胞単独又はマウスCD177でトランスフェクトされた293細胞を、様々な濃度の被験化合物と共に30分間氷上でプレインキュベーションし、次に可溶性マウスTREM-1分子(100 µg/ml)と共に45分間氷上でインキュベーションし、その後細胞を、FACS緩衝液(PBS、2% BCS)で洗浄し、抗ヒトFCγ2bと共に20分間氷上でインキュベーションし、FACS緩衝液で1回洗浄し、ストレプトアビジンAPCと共に20分間インキュベーションし、その後FACS緩衝液で洗浄し、直ぐに細胞を分析した。死滅した細胞は除外した。ヒストグラムの左側へのシフトは、本被験化合物が、TREM-1分子のCD177への結合を阻害していることを示している。

20

#### 【0207】

(実施例14)

(TREM-1リガンドのその受容体への結合を妨害/減少させる化合物のスクリーニングをどのように実行できるかを示す第二の実施例)

CD3 の細胞質領域に融合されたTREM-1分子を発現するT細胞ハイブリドーマレポーター細胞株を構築した。このTREM-1分子が、機能的な方法で結合されたならば、ZAP70はCD3 に動員され、かつ一連の細胞内リン酸化事象は、PLCγの活性化及び増加した細胞内カルシウムの増加をもたらす。このレポーター細胞は、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードしている配列に融合されたNFATプロモーターをコードしているプラスミドを含む。NFATは、細胞内カルシウム動態化により活性化される。これは、TREM-1を発現するGFPレポーターを、可溶性型か又はトランスフェクトされた細胞株により発現されるかのいずれかのCD177と、様々な濃度の被験化合物の存在又は非存在下で、同時インキュベーションすることを可能にし、その後これらの細胞をGFP発現についてFACSにより分析する。CD177によるTREM-1レポーター細胞株の活性化の阻害は、本被験化合物はTREM-1に結合することを示している。前記システムは、様々なレポーターシステム、例えばlacZなどを使用することにより、変更することができる。

30

40

#### 【0208】

(実施例15)

(TREM-1リガンドの同定を基にした敗血症患者の診断的スクリーニングをどのように実行できるかを示す実施例)

TREM-1リガンド(例えばCD177)又はそれらのTREM-1リガンド結合部分を、純粋な形で得ることができる。

これは次に、動物に接種され、モノクローナル抗体を産生する一連のハイブリドーマを

50

作製するために使用することができる。

その後TREM-1リガンドのTREM-1受容体への結合を遮断又は低下させるものを同定するために、これらの抗体を、本発明のスクリーニング手順を用いてスクリーニングすることができる。

#### 【0209】

このような抗体は次に、敗血症(特に微生物起源の、例えば細菌又は真菌起源の)を診断するための診断試験において使用することができる。

望ましいならば、健常患者由来の好中球又は単球を基にした対照を、使用することができる。

これらの抗体が、該対照よりも有意により高い程度にまで敗血症のリスクがあると考えられる患者に結合する場合、これは敗血症の指標である。

この試験は、微生物起源の敗血症と非微生物由来のSIRSの間も識別することができる。後者の場合(前者とは異なり)、これらの抗体の、患者から得た好中球又は単球への実質的結合は存在しない。

#### 【0210】

(実施例16)

(TREM-1リガンドのその受容体への結合を特異的に遮断する抗体をどのように同定し、敗血症の治療において使用できるかを示す実施例)

TREM-1リガンドに対するモノクローナル抗体を、実施例13-14に説明されたように作製しかつスクリーニングすることができる。

TREM-1のその受容体への結合をうまく遮断するものとしてスクリーニングにより同定された抗体は、その後更なる試験に使用することができる。

例えば、これらは、微生物性敗血症患者からの末梢血中好中球に結合するが、非微生物起源のSIRS患者のそれには結合しないかどうかを調べるために使用することができる(実施例12を参照されたい)。

本試験において成功する抗体は、安全性試験及び可能性のある最終的な臨床試験を含む更なる分析のために選択することができる。

#### 【0211】

臨床試験は、該抗体の微生物性敗血症の患者群における結果を、非微生物起源の患者群の結果と比較することにより実行することができる。本試験は、いずれの群でも大きい副作用が存在せず、微生物性敗血症の患者群の状態において、非微生物起源のSIRSの患者群と比較して改善が存在する場合に、うまくいくであろう。例えば、プラセボが投与される微生物性敗血症患者、プラセボが投与される非微生物起源のSIRS患者、プラセボが投与される健常志願者の群、及び該抗体が投与される健常志願者の群のような、好適な対照群も使用することができる。

#### 【0212】

本抗体は、交差反応性を低下させる形で提供されることができる。先に考察されたように、例えばこれらは「ヒト化」か、又は「完全ヒト」であってもよい。これらは、無菌の医薬組成物中で、インビボにおけるその半減期を延長することを補助する1種以上の物質と一緒に提供されることができる(例えば先に考察されたようにペグ化が使用されることができる)。これらは、任意の好適な経路により投与されることができるが、好ましくは注射用組成物として提供される。

#### 【0213】

用量範囲は、先に示されているが、当然、ヒトへの投与前の動物試験の結果により最適化することができる。ある用量で副作用が発生する場合は、当然この用量は適宜減少されなければならない。

#### 【0214】

(実施例17)

(非-ヒトTREM-1リガンドに対する抗体を提供する実施例)

当然CD177及び他のTREM-1リガンド(例えばPRV-1)の種内及び種間変種が存在する。様々

10

20

30

40

50

な変種に対する抗体は、精製、診断、治療、組織タイピング、競合試験、特異性の評価などにおいて有用であり得る。

ヒトにより発現されたCD177に対するモノクローナル抗体(R33)は、既に考察されている。

本実施例は、マウスCD177に対する抗体の作製を例示している。

#### 【0215】

マウスCD177は、BLAST相同性探索を用いて同定した。特異的プライマーを作製し、マウスcDNAからCD177配列を増幅するために使用した。得られた断片を、発現ベクターpCDNA6にサブクローニングした。このプラスミドを、293細胞にトランスフェクトし、かつ安定して高度に発現している細胞を、高効率セルソーターを用いて単離した。次にこれらの細胞を利用し、ラットを免疫処置した。引き続きそのラットのリンパ節を、SP2/0細胞に融合し、次にHAT選択し、個別の抗体産生クローンを単離し、組み換えマウスCD177分子への結合に関してスクリーニングした。40個の陽性クローンを同定した。これらの抗体の1つを次に精製し、かつビオチン化し(Y176)、CD177がマウスにおいて発現される場所を確認するために使用した。骨髓を採取し、Fcブロック(FcBlocking)上清と共にインキュベーションした。20分間室温でインキュベーションした後、ビオチン化されたY176(次にストレプトアビジンAPC)、抗CD11b-FITC及び抗GR1-PEを使用し、CD177陽性集団を特徴決定した。骨髓の試験は、CD177が炎症性単球及び好中球上で発現されることを明らかにした。

10

#### 【0216】

20

(実施例18)

(R33(抗-ヒトCD177)は、mTREM-1のhCD177トランスフェクトされたHEK293細胞への結合を遮断する)

ヒトCD177完全長でトランスフェクトされたHEK293細胞を、図25に示したように、細胞蛍光分析により分析した。灰色ヒストグラムは、アイソタイプ対照MAbの存在下での、可溶性マウスTREM1/IgGによる染色を表している。点線のヒストグラムは、R33 MAbの存在下での、可溶性マウスTREM1/IgGによる染色を表している。対照可溶性マウスTLT/IgGによる染色は、白色ヒストグラムにより表されている。

このデータは、R33 MAbは、可溶性マウスTREM1/IgGのCD177-トランスフェクトされた細胞への結合を特異的に遮断することを示している。

30

#### 【0217】

(実施例19)

(マウスCD177は好中球及び単球上で発現される)

マウス末梢血を、細胞蛍光分析により分析した。これらの結果は、図26に示している。

左側：ドットプロットは、マウス末梢血中の単核細胞の前方分散対サイズ分散を表している。物理的パラメータを基に、異なるサブセットを同定する3つのゲートを構築した：a)リンパ球、b)単球、c)好中球。

右側：右側の3つのパネルは、これらの細胞のY176 MAbによる染色を示している。

このデータは、Y176 MAbは、末梢遮断(peripheral block)の好中球及び単球上のそのエピトープを特異的に認識するが、リンパ球上のものは認識しないことを示している。

40

#### 【0218】

(実施例20)

(マウスのTREM-1可溶性分子は、マウスのCD177でトランスフェクトされた293細胞に結合する)

293細胞単独又はマウスCD177でトランスフェクトされた293細胞を、可溶性マウスTREM-1分子(100 µg/ml)と共に45分間氷上でインキュベーションし、その後細胞を、FACS緩衝液(PBS、2%BCS)で洗浄し、抗ヒトFCビオチンと共に20分間氷上でインキュベーションし、その後FACS緩衝液で1回洗浄し、ストレプトアビジンAPCと共に20分間インキュベーションし、次にFACS緩衝液で洗浄し、直ぐに細胞を分析した。死滅した細胞は除去した。

#### 【0219】

50



結果は図27に示している。このヒストグラムにおいて、293/マウスCD177トランスフェクトされた細胞へ結合しているマウスTREM-1可溶性分子は、点線で示されるのに対し、293単独へ結合しているマウスTREM-1可溶性分子は、実線で示されている。

これは、mTREM-1は、293細胞上に発現されたmCD177に結合することの証拠を提供している。

【 0 2 2 0 】

(参考文献)

1. Beutler B., 「Toll-様受容体シグナル伝達における影響、問題点及び可能性(Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling)」, Nature, 2004; 430:257-263. 10
2. Pasare C, Medzhitov R., 「Toll-様受容体：宿主抵抗の免疫耐性との釣り合い(Toll-like receptors: balancing host resistance with immune tolerance)」, Curr Opin Immunol., 2003; 15:677-682.
3. Akira S., 「Toll受容体ファミリー：構造及び機能(Toll receptor families: structure and function)」, Semin Immunol., 2004; 16:1-2.
4. Takeda K, Akira S., 「TLRシグナル伝達経路(TLR signaling pathways)」, Semin Immunol., 2004; 16:3-9.
5. Cohen J., 「敗血症の免疫病理(The immunopathogenesis of sepsis)」, Nature, 2002; 420:885-891.
6. Murphy TJ, Paterson HM, Mannick JA, Lederer JA, 「損傷、敗血症及びToll-様受容体反応の調節(Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptor responses)」, J Leukoc Biol., 2004; 75:400-407. 20
7. Beutis MA, Abraham E, 「市中感染肺炎及び敗血症(Community-acquired pneumonia and sepsis)」, Clin Chest Med., 2005; 26:19-28.
8. Ayala A, Chung CS, Grutkoski PS, Song GY, 「免疫消散の機序(Mechanisms of immune resolution)」, Crit Care Med., 2003; 31:S558-571.
9. Hotchkiss RS, Karl IE, 「敗血症の病態生理学及び治療(The pathophysiology and treatment of sepsis)」, N Engl J Med., 2003;348:138-150.
10. Minnich DJ, Moldawer LL, 「重症敗血症治療のための抗-サイトカイン療法及び抗炎症療法：進歩と落とし穴(Anti-cytokine and anti-inflammatory therapies for the treatment of severe sepsis: progress and pitfalls)」, Proc Nutr Soc., 2004; 63:437-441. 30
11. Opal SM, Cross AS, 「重症敗血症の臨床試験：過去の失敗と今後の可能性(Clinical trials for severe sepsis. Past failures, and future hopes)」, Infect Dis Clin North Am., 1999; 13:285-297, vii.
12. Colonna M, 「免疫系及びそれを越えるTREM(TREMs in the immune system and beyond)」, Nat Rev Immunol., 2003; 3:445-453.
13. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M, 「最先端：好中球及び単球上に発現される新規受容体TREM-1により誘発される炎症反応(Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes)」, J Immunol. 2000; 164:4991 -4995. 40
14. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M, 「炎症を増幅しかつ敗血症性ショックの重要なメディエーターであるTREM-1(TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock)」, Nature, 2001 ; 410:1103-1107.
15. Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti Cらの文献, 「早期及び獲得免疫応答時の宿主防御における骨髄細胞に発現する誘発性受容体-1の役割(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. 2003; 170:3812-3818.
16. Netea MG, Azam T, Ferwerda G, Girardin SE, Kim SH, Dinarello CA, 「NACHT-LRR (NLR)パターン認識受容体により誘導されたシグナルを増幅する骨髄細胞に発現する誘発 50

- 性受容体-1(TREM-1)(Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) amplifies the signals induced by the NACHT-LRR (NLR) pattern recognition receptors)」、J Leukoc Biol., 2006.
17. Klesney-Tait J、Turnbull IR、Colonna M、「TREM受容体ファミリー及びシグナル統合(The TREM receptor family and signal integration)」、Nat Immunol., 2006; 印刷中.
18. Daws MR、Lanier LL、Seaman WE、Ryan JC、「新規マウス骨髄DAP12-関連受容体ファミリーのクローニング及び特徴決定(Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family)」、Eur J Immunol., 2001; 31:783-791.
19. Chung DH、Seaman WE、Daws MR、「マウスマクロファージ上の活性化受容体TREM-3の特徴決定: マウス染色体17上の単独Igドメイン受容体ファミリーの定義(Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17)」、Eur J Immunol., 2002; 32:59-66. 10
20. Allcock RJ、Barrow AD、Forbes S、Beck S、Trowsdale J、「活性化及び阻害の両単独IgVドメイン受容体をコードし、かつNKp44を含む、6p21.1のヒトTREM遺伝子クラスター(The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44)」、Eur J Immunol., 2003; 33:567-577.
21. Vivier E、Nunes JA、Vely F、「ナチュラルキラー細胞シグナル伝達経路(Natural killer cell signaling pathways)」、Science, 2004; 306:1517-1519. 20
22. Lanier LL、「ナチュラルキラー細胞受容体シグナル伝達(Natural killer cell receptor signalling)」、Curr Opin Immunol., 2003; 15:308-314.
23. McVicar DW、Burshtyn DN、「キラー免疫グロブリン-様受容体及びLy49による細胞内シグナル伝達(Intracellular signalling by the killer immunoglobulin-like receptors and Ly49)」、Sci STKE. 2001; 2001:RE1.
24. Washington AV、Schubert RL、Quigley Lらの文献、「巨核球及び血小板の $\alpha$ -顆粒のみに認められるTREMファミリーメンバーTLT-1(A TREM family member, TLT-1, is found exclusively in the  $\alpha$ -granules of megakaryocytes and platelets)」、Blood, 2004; 104:1042-1047. 30
25. Washington AV、Quigley L、McVicar DW、「TREMクラスター内の推定阻害受容体であるTREM-様転写産物(TLT)-1の最初の特徴決定(Initial characterization of TREM-like transcript (TLT)-1: a putative inhibitory receptor within the TREM cluster)」、Blood, 2002; 100:3822-3824.
26. King RG、Herrin BR、Justement LB、「骨髄/顆粒球系及びBリンパ系細胞上に発現され、かつ炎症に対する反応においてアップレギュレートされるTrem-様転写産物2(Trem-like transcript 2 is expressed on cells of the myeloid/granuloid and B lymphoid lineage and is up-regulated in response to inflammation)」、J Immunol., 2006; 176:6012-6021.
27. Cantoni C、Bottino C、Vitale Mらの文献、「免疫グロブリンスーパーファミリーの新規メンバーである、活性化されたヒトナチュラルキラー細胞による腫瘍細胞溶解に関与した誘発性受容体NKp44(NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily)」、J Exp Med., 1999; 189:787-796. 40
28. Jackson DG、Hart DN、Starling G、Bell JL、「多量体免疫グロブリン受容体と相同の免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーの新規メンバーの分子クローニング(Molecular cloning of a novel member of the immunoglobulin gene superfamily homologous to the polymeric immunoglobulin receptor)」、Eur J Immunol., 1992; 22:1157-1163.
29. Green BJ、Clark GJ、Hart DN、「多量体Ig受容体に類似したドメインにより二次性白血球膜分子を認識するCMRF-35 mAb(The CMRF-35 mAb recognizes a second leukocyte 50

- membrane molecule with a domain similar to the poly Ig receptor)」、Int Immunol., 1998; 10:891-899.
30. Speckman RA、Wright Daw JA、Helms Cらの文献、「乾癬易罹患性に連関されたヒト染色体17q25領域にマッピングされた新規免疫グロブリンスーパーファミリー遺伝子クラスター(Novel immunoglobulin superfamily gene cluster, mapping to a region of human chromosome 17q25, linked to psoriasis susceptibility)」、Hum Genet., 2003; 112:34-41.
31. Chung DH、Humphrey MB、Nakamura MC、Ginzinger DG、Seaman WE、Daws MR、「破骨細胞形成を阻害することができる新規マウス骨髄受容体CMRF-35-様分子-1(CMRF-35-like molecule-1, a novel mouse myeloid receptor, can inhibit osteoclast formation)」10、J Immunol., 2003; 171 :6541-6548.
32. Raghavan M、Bjorkman PJ、「Fc受容体及び免疫グロブリンとのそれらの相互作用(Fc receptors and their interactions with immunoglobulins)」、Annu Rev Cell Dev Biol. 1996; 12:181-220.
33. Paloneva J、Manninen T、Christman Gらの文献、「同一疾患表現型を生じる受容体シグナル伝達複合体の異なるサブユニットをコードしている2つの遺伝子における変異(Mutations in Two Genes Encoding Different Subunits of a Receptor Signalling Complex Result in an Identical Disease Phenotype)」、Am J Hum Genet., 2002; 71 :3.
34. Humphrey MB、Daws MR、Spusta SCらの文献、「破骨細胞の分化及び機能を制御するDAP12-会合した受容体TREM2(TREM2, a DAP12-associated receptor, regulates osteoclast differentiation and function)」20、J Bone Miner Res., 2006; 21 :237-245.
35. Turnbull IR、Gilfillan S、Cella Mらの文献、「最先端：マクロファージ活性化を減弱するTREM-2(Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation)」、J Immunol., 2006; 177:3520-3524.
36. Hamerman JA、Jarjoura JR、Humphrey MB、Nakamura MC、Seaman WE、Lanier LL、「最先端：骨髄細胞に発現する誘発性受容体(TREM)-2及びDAP12によるマクロファージにおけるTLR及びFcR反応の阻害(Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12)」、J Immunol., 2006; 177:2051-2055.
37. Collonna M、Facchetti F、「TREM-1(骨髄細胞に発現する誘発性受容体)：急性炎症反応における新たなプレーヤー(TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses)」30、J Infect Dis., 2003; 187 補遺 2:S397-401.
38. Lucas M、Daniel L、Tomasello Eらの文献、「KARAP/DAP12-トランスジェニックマウスにおける重症炎症症候群及びリンパ球性免疫不全(Massive inflammatory syndrome and lymphocytic immunodeficiency in KARAP/DAP12-transgenic mice)」、Eur J Immunol. 2002; 32:2653-2663.
39. Nochi H、Aoki N、Oikawa Kらの文献、「DAP12又はTREM-1-Ig分子の導入遺伝子発現による肝性肉芽腫反応の調節(Modulation of hepatic granulomatous responses by transgene expression of DAP12 or TREM-1-Ig molecules)」40、Am J Pathol. 2003; 162:1191 -1201.
40. Gibot S、Cravoisy A、Kolopp-Sarda MNらの文献、「敗血症時のsTREM(可溶性骨髄細胞に発現する誘発性受容体)-1、プロカルシトニン、及びC-反応性タンパク質血漿濃度の時間経過(Time-course of sTREM (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells)-1, procalcitonin, and C-reactive protein plasma concentrations during sepsis)」、Crit Care Med., 2005; 33:792-796.
41. Gibot S、Kolopp-Sarda MN、Bene MCらの文献、「マウス敗血症の炎症反応を調節する骨髄細胞に発現する誘発性受容体-1の可溶性型(A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis)」、J Exp Med., 2004; 200:1419-1426.

42. Gibot S, Cravoisy A, Levy B, Bene MC, Faure G, Bollaert PE, 「可溶性骨髄細胞に発現する誘発性受容体及び肺炎の診断(Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia)」、*N Engl J Med.*, 2004; 350:451-458.
43. Gingras MC, Lapillonne H, Margolin JF, 「骨髄発達の成熟段階に関連したTREM-1、MDL-1、及びDAP12発現(TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development)」、*Mol Immunol.*, 2002; 38:817-824.
44. Begum NA, Ishii K, Kurita-Taniguchi Mらの文献、「ヒトマクロファージのディフ  
ァレンシャルディスプレイ及びcDNAサブトラクションにより同定されたウシ型結核菌BCG  
細胞壁特異的示差的に発現された遺伝子(Mycobacterium bovis BCG cell wall-specific  
differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtr  
action in human macrophages)」、*Infect Immun.*, 2004; 72:937-948. 10
45. Bourke E, Cassetti A, Villa A, Fadlon E, Colotta F, Mantovani A, 「ヒト好中  
球においてII型IL-1デコイ受容体により掃去されるIL-1 (IL-1 beta scavenging by the  
type II IL-1 decoy receptor in human neutrophils)」、*J Immunol.* 2003; 170:5999-  
6005.
46. Muller B, Peri G, Doni Aらの文献、「重体の敗血症患者におけるII型IL-1デコイ受  
容体の高循環レベル：高デコイ受容体レベルの糖質コルチコイド投与との関係(High circ  
ulating levels of the IL-1 type II decoy receptor in critically ill patients wit  
h sepsis: association of high decoy receptor levels with glucocorticoid administ  
ration)」、*J Leukoc Biol.*, 2002; 72:643-649. 20
47. McGeehan GM, Becherer JD, Bast RC, Jr.らの文献、「メタロプロテイナーゼ阻害因  
子による腫瘍壊死因子- プロセシングの調節(Regulation of tumour necrosis factor-a  
lpha processing by a metalloproteinase inhibitor)」、*Nature*, 1994; 370:558-561.
48. Mohler KM, Sleath PR, Fitzner JNらの文献、「腫瘍壊死因子プロセシングの阻害因  
子による致死量のエンドトキシンに対する保護(Protection against a lethal dose of e  
ndotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing)」、*Nature*, 1994;  
370:218-220.
49. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou Mらの文献、「メタロプロテイナーゼによる  
腫瘍壊死因子- 前駆体のプロセシング(Processing of tumour necrosis factor-alpha p  
recursor by metalloproteinases)」、*Nature*, 1994; 370:555-557. 30
50. Mullberg J, Durie FH, Otten-Evans Cらの文献、「IL-6受容体及びp60 TNF受容体の  
シェディングを遮断するメタロプロテアーゼ阻害因子(A metalloprotease inhibitor blo  
cks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor)」、*J Immunol.*, 1995;  
155:5198-5205.
51. Walcheck B, Kahn J, Fisher JMらの文献、「インビトロにおけるL-セレクトインシェ  
ディングの阻害により変更された好中球ローリング(Neutrophil rolling altered by inh  
ibition of L-selectin shedding in vitro)」、*Nature*, 1996; 380:720-723.
52. Bouchon A, Hernandez-Munain C, Cella M, Colonna M, 「CCケモカイン受容体7の発  
現及びヒト樹状細胞の成熟を制御するDAP12-媒介経路(A DAP12-mediated pathway regula  
tes expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cell  
s)」、*J Exp Med.*, 2001; 194:1111-1122. 40
53. Hazeki K, Masuda N, Funami Kらの文献、「MyD88-依存型及び-非依存型経路を介し  
たパキシリンのToll-様受容体-媒介型チロシンリン酸化(Toll-like receptor-mediated t  
yrosine phosphorylation of paxillin via MyD88-dependent and -independent pathway  
s)」、*Eur J Immunol.*, 2003; 33:740-747.
54. Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J, 「即時型遺伝子産物によるER  
Kシグナル持続期間の分子解釈(Molecular interpretation of ERK signal duration by i  
mmmediate early gene products)」、*Nat Cell Biol.* 2002; 4:556-564.
55. Assoian RK, 「シグナル伝達の常識(Common sense signalling)」、*Nat Cell Biol.*,  
2002; 4:E187. 50

56. Hogan PG、Chen L、Nardone J、Rao A、「カルシウム、カルシニューリン及びNFATによる転写制御(Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT)」、*Genes Dev.*, 2003; 17:2205-2232.
57. Crabtree GR、Olson EN、「NFATシグナル伝達：細胞の社会生活の振り付け(NFAT signalling: choreographing the social lives of cells)」、*Cell*, 2002; 109 補遺:S67-79.
58. Koga T、Inui M、Inoue Kらの文献、「骨ホメオスタシスに関してRANKLと協力するITAMモチーフにより媒介された共刺激シグナル(Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis)」、*Nature*, 2004; 428:758-763. 10
59. Ley K、「ローリング好中球による炎症シグナルの統合(Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils)」、*Immunol Rev.* 2002; 186:8-18.
60. Williams MA、Solomkin JS、「ヒト好中球機能におけるインテグリン-媒介型シグナル伝達(Integrin-mediated signalling in human neutrophil functioning)」、*J Leukoc Biol.*, 1999; 65:725-736.
61. Laudanna C、Kim JY、Constantin G、Butcher E、「ケモカインによる急速白血球インテグリン活性化(Rapid leukocyte integrin activation by chemokines)」、*Immunol Rev.* 2002; 186:37-46.
62. Lanier LL、Bakker AB、「リンパ系細胞及び骨髄系細胞機能におけるITAM-有する膜貫通アダプターDAP12(The ITAM-bearing transmembrane adaptor DAP12 in lymphoid and myeloid cell function)」、*Immunol Today.* 2000; 21 :611-614. 20
63. Hamerman JA、Tchao NK、Lowell CA、Lanier LL、「シグナル伝達アダプターDAP12の非存在下で増強されたToll-様受容体反応(Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signalling adaptor DAP12)」、*Nat Immunol.* 2005; 6:579-586.
64. Turnbull IR、McDunn JE、Takai T、Townsend RR、Cobb JP、Colonna M、「炎症を増幅しかつ内毒素血症及び敗血症性腹膜炎の死亡率を増加するDAP12(KARAP)(DAP12 (KARAP) amplifies inflammation and increases mortality from endotoxemia and septic peritonitis)」、*J Exp Med.*, 2005; 202:363-369.
65. Hamerman JA、Lanier LL、「ITAM-有する受容体による免疫応答の阻害(Inhibition of immune responses by ITAM-bearing receptors)」、*Sci STKE.*, 2006; 2006: re 1 30
66. Turnbull IR、Colonna M、「DAP12の機能の活性化及び阻害(Activating and inhibitory functions of DAP12)」、*Nat Rev Immunol.*, 2006; 印刷中
67. Beutler B、Milsark IW、Cerami AC、「エンドトキシンの致死作用からマウスを保護するカケクチン/腫瘍壊死因子に対する受動免疫(Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin)」、*Science*, 1985; 229:869-871.
68. Beutler BA、Milsark IW、Cerami A、「カケクチン/腫瘍壊死因子：インビボにおける生成、分布及び代謝の運命(Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo)」、*J Immunol.* 1985; 135:3972-3977.
69. Newcomb D、Bolgos G、Green L、Remick DG、「マウス敗血症の転帰に影響する抗生物質治療：罹患率増加のメディエーター(Antibiotic treatment influences outcome in murine sepsis: mediators of increased morbidity)」、*Shock*, 1998; 10:110-117. 40
70. Unlu M、Morgan ME、Minden JS、「ディファレンスゲル電気泳動：タンパク質抽出物の変化を検出する単独ゲル法(Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts)」、*Electrophoresis*, 1997; 18:2071-2077.
71. Tu GF、De Jong F、Apostolopoulos Jらの文献、「ラットアポリポタンパクmRNAレベルに対する急性炎症の作用(Effect of acute inflammation on rat apolipoprotein mRNA levels)」、*Inflammation*, 1987; 11:241-251.
72. Gabay C、Kushner I、「炎症に対する急性相タンパク質及び他の全身反応(Acute-phase 50

- se proteins and other systemic responses to inflammation)」、N Engl J Med. 1999; 340:448-454.
73. Gervois P、Kleemann R、Pilon Aらの文献、「ペルオキシソーム増殖因子-活性化受容体- アクチベーターのフェノフィブラートによるインビボ長期治療後のIL-6-誘導型急性相反応遺伝子発現の全体的抑制(Global suppression of IL-6-induced acute phase response gene expression after chronic in vivo treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate)」、J Biol Chem., 2004; 279:16154-16160.
74. Niessen RW、Lamping RJ、Jansen PMらの文献、「HepG2細胞及びヒトにおける試験で確立された負の急性相タンパク質として作用する抗トロンビン(Antithrombin acts as a negative acute phase protein as established with studies on HepG2 cells and in baboons)」、Thromb Haemost., 1997; 78:1088-1092. 10
75. Mounzer KC、Moncure M、Smith YR、Dinubile MJ、「重度外傷後の患者の臨床転帰に対する入院時の血漿ゲルソリンレベルの関係(Relationship of admission plasma gelsolin levels to clinical outcomes in patients after major trauma)」、Am J Respir Crit Care Med., 1999; 160:1673-1681.
76. Lew AM、Maloy WL、Coligan JE、「マウス可溶性クラスI分子(Q10)発現の特徴(Characteristics of the expression of the murine soluble class I molecule (Q10))」、J Immunol., 1986; 136:254-258.
77. Dietrich J、Cella M、Seiffert M、Buhring HJ、Colonna M、「最先端：骨髄細胞で発現されたDAP12-関連活性化受容体であるシグナル-調節タンパク質 1(Cutting edge: signal-regulatory protein beta 1 is a DAP12-associated activating receptor expressed in myeloid cells)」、J Immunol., 2000; 164:9-12. 20
78. Tomasello E、Cant C、Buhring HJらの文献、「シグナル-調節タンパク質 とKARAP/DAP-12の関係(Association of signal-regulatory proteins beta with KARAP/DAP-12)」、Eur J Immunol., 2000; 30:2147-2156.
79. Barclay AN、Wright GJ、Brooke G、Brown MH、「骨髄細胞の制御におけるCD200及び膜タンパク質相互作用(CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells)」、Trends Immunol., 2002; 23:285-290.
80. Wright GJ、Cherwinski H、Foster-Cuevas Mらの文献、「マウス及びヒトにおけるCD 200受容体ファミリーの特徴決定並びにそれらのCD200との相互作用(Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200)」、J Immunol., 2003; 171 :3034-3046. 30
81. Gorczynski RM、Chen Z、Clark DAらの文献、「免疫調節分子CD200Rファミリーにおける構造的及び機能的異種性並びに胎児-母体境界におけるそれらの発現(Structural and functional heterogeneity in the CD200R family of immunoregulatory molecules and their expression at the feto-maternal interface)」、Am J Reprod Immunol., 2004; 52:147-163.
82. Gorczynski R、Chen Z、Kai Y、Lee L、Wong S、Marsden PA、「免疫調節分子CD200Rファミリーの全てのメンバーのリガンドであるCD200(CD200 is a ligand for all members of the CD200R family of immunoregulatory molecules)」、J Immunol., 2004; 172:7744-7749. 40
83. Aguilar H、Alvarez-Errico D、Garcia-Montero AC、Orfao A、Sayos J、Lopez-Botet M、「単球系列に限定された新規免疫受容体の分子特徴決定(Molecular characterization of a novel immune receptor restricted to the monocytic lineage)」、J Immunol. 2004; 173:6703-6711.
84. Bakker AB、Baker E、Sutherland GR、Phillips JH、Lanier LL、「骨髄細胞活性化に関連した細胞表面受容体である骨髄DAP12-会合レクチン(MDL)-1(Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of myeloid cells)」、Proc Natl Acad Sci USA, 1999; 96:9792-9796. 50

85. Schwenk F, Baron U, Rajewsky K, 「生殖細胞における欠失を含む loxP-隣接遺伝子セグメントの偏在性欠失に関する cre-トランスジェニックマウス系列(A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells)」, Nucleic Acids Res., 1995; 23:5080-5081.
86. McVicar DW, Winkler-Pickett R, Taylor LSらの文献、「マウス129系統における異常なDAP12シグナル伝達：遺伝子-標的化されたマウスの分析の意味(Aberrant DAP12 signalling in the 129 strain of mice: implications for the analysis of gene-targeted mice)」, J Immunol., 2002; 169:1721-1728.
87. Coopersmith CM, Stromberg PE, Davis CGらの文献、「腸増殖を低下し、かつ腸管上皮の細胞周期の停止を誘導する肺炎緑膿菌による敗血症(Sepsis from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia decreases intestinal proliferation and induces gut epithelial cell cycle arrest)」, Crit Care Med. 2003;31 :1630-1637. 10
88. Coopersmith CM, Amiot DM, 2nd, Stromberg PEらの文献、「肺炎緑膿菌による敗血症マウスモデルにおいて生存を改善しかつ炎症プロファイルを変更する抗生物質(Antibiotics improve survival and alter the inflammatory profile in a murine model of sepsis from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia)」, Shock, 2003; 19:408-414.
89. Hotchkiss RS, Dunne WM, Swanson PEらの文献、「肺炎緑膿菌におけるアポトーシスの役割(Role of apoptosis in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia)」, Science, 2001; 294:1783.
90. Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Kinder J, Ho EL, Fremont DH, Yokoyama WM, 「異種結合挙動を提示するマウスNKG2Dのリガンド(Ligands for murine NKG2D display heterogeneous binding behavior)」, Eur J Immunol. 2002; 32:597-605. 20
91. Trautenecker A, Luke W, Karjalainen K, 「1型ヒト免疫不全ウイルスを中和する可溶性CD4分子(Soluble CD4 molecules neutralize human immunodeficiency virus type 1)」, Nature, 1988; 331:84-86.
92. Altman JD, Moss PA, Goulder PJらの文献、「抗原-特異性Tリンパ球の表現型分析(Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes)」, Science, 1996; 274:94-96.
93. Wright GJ, Puklavec MJ, Willis ACらの文献、「機能制御に關与するマクロファージ上の新規受容体を認識するリンパ系細胞/神経細胞表面OX2糖タンパク質(Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function)」, Immunity, 2000; 13:233-242. 30
94. Arthos J, Cicala C, Steenbeke TDらの文献、「12量体CD4-Ig融合タンパク質の生化学及び生物学的特徴：治療及びワクチン戦略の意味(Biochemical and biological characterization of a dodecameric CD4-Ig fusion protein: implications for therapeutic and vaccine strategies)」, J Biol Chem., 2002; 277:11456-11464.
95. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W編集の「最新免疫学プロトコール(Current Protocols in Immunology)」, 第2版、John Wiley & Sons社中のClark RA, Nauseef WMの文献「その他のヒトリンパ系細胞及び非リンパ系細胞の調製及び機能分析(Preparation and functional analysis of other human lymphoid and non lymphoid cells)」;1999; 7.23.21-27.23.17. 40
96. Elghetany MT, 「正常な好中球発達時の表面抗原変化：決定的総説(Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review)」, Blood Cells Mol Dis., 2002; 28:260-274.
97. Ahearn JM, Fearon DT, 「補体受容体CR1(CD35)及びCR2(CD21)の構造及び機能(Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21))」, Adv Immunol. 1989; 46:183-219.
98. Kabutomori O, Iwatani Y, Koh T, Fushimi R, Amino N, 「『毒性』好中球上のIgG-Fc受容体III(CD16)密度の減少(Decrease in the density of IgG-Fc receptor III (CD16) on 'toxic' neutrophils)」, Acta Haematol. 1993; 89:163-164. 50

99. Borregaard N、Cowland JB、「ヒト好中球性多形核白血球の顆粒(Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte)」、*Blood*, 1997; 89:3503-3521.
100. Wright DG、Bralove DA、Gallin JI、「ヒト好中球顆粒の示差的動員、ホルボルミリスチン酸酢酸及びイオノホアA23187の作用(The differential mobilization of human neutrophil granules. Effects of phorbol myristate acetate and ionophore A23187)」、*Am J Pathol.*, 1977; 87:237-284.
101. Calvano SE、Xiao W、Richards DRらの文献、「ヒト全身炎症のネットワークベースの分析(A network-based analysis of systemic inflammation in humans)」、*Nature*, 2005; 437:1032-1037.
102. Remick DG、Newcomb DE、Bolgos GL、Call DR、「敗血症の2つのモデル：リボ多糖、対、盲腸結紮穿刺の死亡率及び炎症反応の比較(Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture)」、*Shock*, 2000; 13:110-116.
103. Cella M、Fujikawa K、Tassi Iらの文献、「DAP10-及びITAM-媒介型NK細胞の細胞傷害性におけるVavタンパク質の示差的要件(Differential requirements for Vav proteins in DAP10- and ITAM-mediated NK cell cytotoxicity)」、*J Exp Med.*, 2004; 200:817-823.
104. Avraham H、Park SY、Schinkmann K、Avraham S、「RAFTK/Pyk2-媒介型細胞シグナル伝達(RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling)」、*Cell Signal*, 2000; 12:123-133.
105. Burrridge K、Wennerberg K、「中央を占めるRho及びRac(Rho and Rac take center stage)」、*Cell*. 2004; 116:167-179.
106. Bokoch GM、「p21-活性化キナーゼの生物学(Biology of the p21-activated kinases)」、*Annu Rev Biochem.* 2003; 72:743-781.
107. Tassi I、Presti R、Kim S、Yokoyama WM、Gilfillan S、Colonna M、「マウスのNK細胞活性化受容体の重要なシグナル伝達メディエーターPLCγ2(PLCγ2 is a critical signalling mediator for murine NK cell activating receptors)」、*J Immunol.*, 2005; 印刷中
108. Gilfillan S、Ho EL、Cella M、Yokoyama WM、Colonna M、「NK細胞活性化及び共刺激を誘発する2つの異なるアダプターを動員するNKG2D(NKG2D recruits two distinct adaptors to trigger NK cell activation and costimulation)」、*Nat Immunol.*, 2002; 3:1150-1155.
109. Downward J、「PI3-キナーゼAkt及び細胞生存(PI3-kinase, Akt and cell survival)」、*Semin Cell Dev Biol.* 2004; 15:177-182.
110. Radsak MP、Salih HR、Rammensee HG、Schild H、「好中球炎症反応における骨髓細胞に発現する誘発性受容体-1：活性化及び生存の示差的制御(Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival)」、*J Immunol.*, 2004; 172:4956-4963.
111. Cella M、Buonsanti C、Strader C、Kondo T、Salmaggi A、Colonna M、「TREM-2-欠損個体における損なわれた破骨細胞分化(Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals)」、*J Exp Med.*, 2003; 198:645-651.
112. Dietrich J、Cella M、Colonna M、「TCRシグナル伝達及びアクチン細胞骨格再編を阻害するIg-様転写産物2(ILT2)/白血球Ig-様受容体1(LIR1)(Ig-like transcript 2 (ILT2)/leukocyte Ig-like receptor 1 (LIR1) inhibits TCR signalling and actin cytoskeleton reorganization)」、*J Immunol.*, 2001; 166:2514-2521.
113. Sacconi S、Pantano S、Natoli G、「増大したNF-κB動員の炎症遺伝子のp38-依存型マーキング(p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-κB recruitment)」、*Nat Immunol.*, 2002; 3:69-75.
114. Piccio L、Vermi W、Boles KSらの文献、「T細胞増殖を共刺激するヒトT細胞の抗原-提示細胞へのSIRPα-2-CD47相互作用を介した接着(Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells via SIRPα-2-CD47 interaction)」、*J Exp Med.*, 2004; 192:111-121.



en-presenting cells through SIRP{beta}2-CD47 interaction costimulates T cell proliferation)」、Blood, 2004.

115. Iizuka K、Naidenko OV、Plougastel BF、Fremont DH、Yokoyama WM、「ナチュラルキラー細胞受容体のNKRP1ファミリーのための遺伝子連結されたC型レクチン-関連リガンド(Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKRP1 family of natural killer cell receptors)」、Nat Immunol. 2003;4:801-807.

116. Nakajima H、Cella M、Langen H、Friedlein A、Clonna M、「ヒトNK細胞認識における相互作用の活性化: 2B4-CD48の役割(Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48)」、Eur J Immunol. 1999; 29:1676-1683.

117. Feizi T、「自然免疫における糖質媒介型認識システム(Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity)」、Immunol Rev., 2000; 173:79-88.

118. Feizi T、Stoll MS、Yuen CT、Chai W、Lawson AM、「新規糖脂質: オリゴ糖の構造、抗原性及び機能の探索(Neoglycolipids: probes of oligosaccharide structure, antigenicity, and function)」、Methods Enzymol., 1994; 230:484-519.

119. Yamashita K、Ohkura T、Tachibana Y、Takasaki S、Kobata A、「ベビーハムスター腎細胞から放出されたオリゴ糖及びヒドラジノ分解によるそれらのポリオーマ形質転換体の比較試験(Comparative study of the oligosaccharides released from baby hamster kidney cells and their polyoma transformant by hydrazinolysis)」、J Biol Chem., 1984; 259:10834-10840.

120. Patel TP、Parekh RB、「ヒドラジノ分解による糖タンパク質からのオリゴ糖の放出(Release of oligosaccharides from glycoproteins by hydrazinolysis)」、Methods Enzymol., 1994; 230:57-66.

121. Townsend RR、Hardy M、Olechno JD、Carter SR、「糖質のクロマトグラフィー(Chromatography of carbohydrates)」、Nature, 1988; 335:379-380.

122. Bredemeyer AJ、Lewis RM、Malone JPらの文献、「プロテアーゼ基質発見のためのプロテオミクス的アプローチ(A proteomic approach for the discovery of protease substrates)」、Proc Natl Acad Sci USA., 2004; 101:11785-11790.

123. Y. Murakami、「自然免疫: シグナル伝達機構(Innate Immunity: Signalling Mechanisms)」、2008年2月、キーストーン、コロラド州.

124. Dower Kらの文献、「TREM-1活性化に対する自然免疫応答: 重複、分岐進化、並びに細菌リポ多糖との陽性及び陰性クロストーク(Innate Immune Responses to TREM-1 Activation: Overlap, Divergence, and Positive and Negative Cross-Talk with Bacterial Lipopolysaccharide)」、J. Immunol., 2008; 180:3520-3534.

125. Haselmayerらの文献、「好中球活性化を増強する血小板上のTREM-1リガンド発現(TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation)」、Blood, 2007; 110:1029-1035.

126. Michelson及びNewburger、「血小板及び白血球: 凝集の知識(Platelets and leukocytes: aggregate knowledge)」、Blood, 2007; 110:794-795

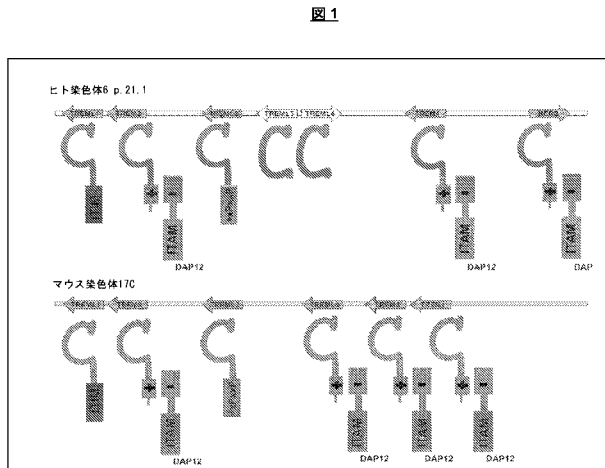
#### 【 0 2 2 1 】

前述の本発明は、理解を明確にする目的で、図示及び実施例により一部詳細に記載されているが、当業者には、本発明の内容を考慮し、添付された請求項の精神又は範囲から逸脱しない限りは、それらにある種の変更及び修飾を行うことができることは容易に明らかであろう。

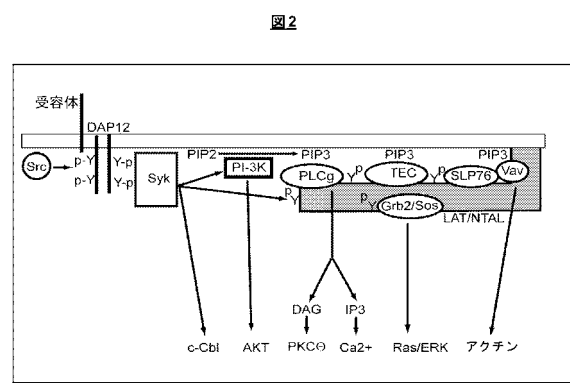
特許及び特許出願を含む本出願において言及された全ての参考文献は、各個別の刊行物又は特許出願が、具体的かつ個別に引用により組み込まれていることを指摘されるように可能な限り完全に引用により本明細書中に組み込まれている。

本明細書及びそれに続く請求項を通じ、文脈が別に必要としない限りは、用語「らを含む(comprise)」及び変形「を含む(comprises)」及び「含んでいる(comprising)」は、言及された整数、段階、整数群又は段階群を包含するが、いずれか他の整数、段階、整数群又は段階群を排除することを意味するものではないことは、理解されるであろう。

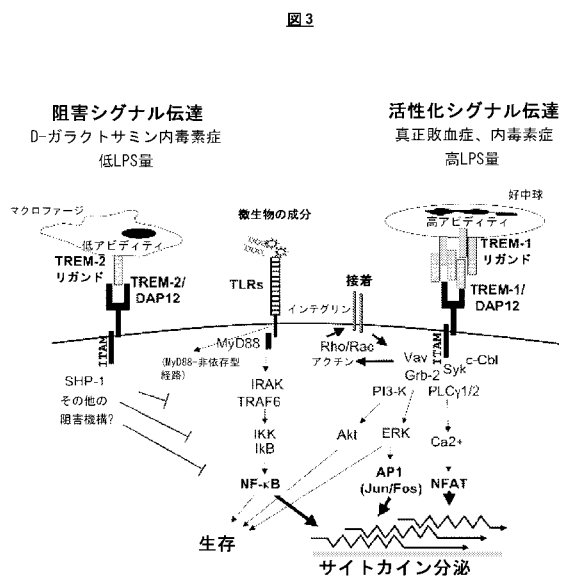
【 図 1 】



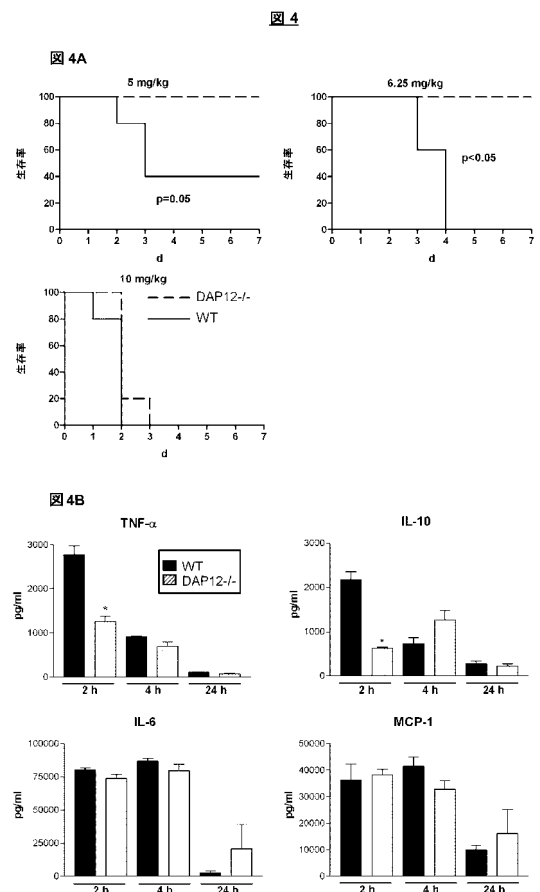
【 図 2 】



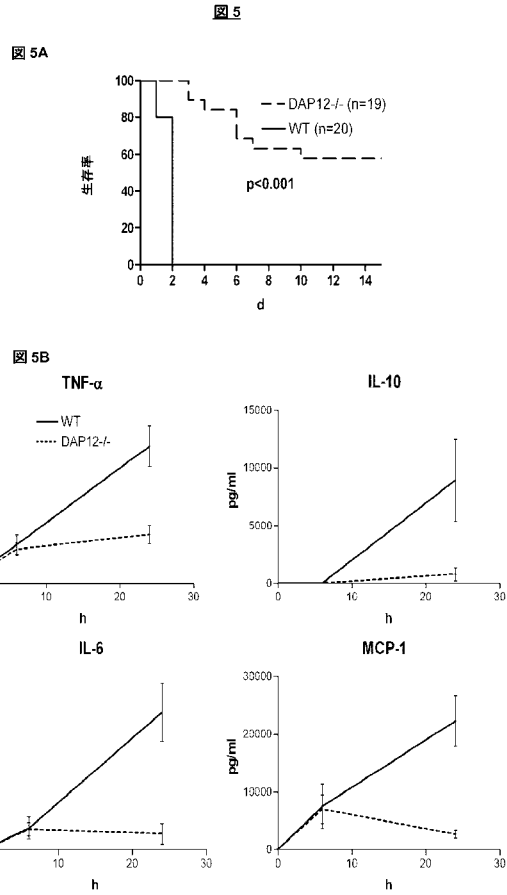
【 図 3 】



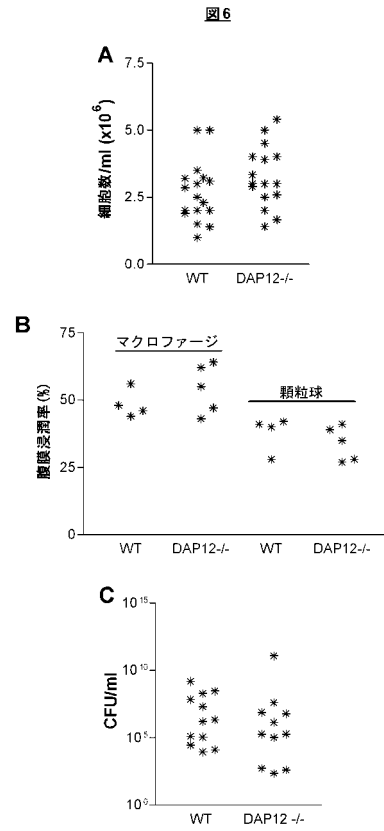
【 図 4 A - B 】



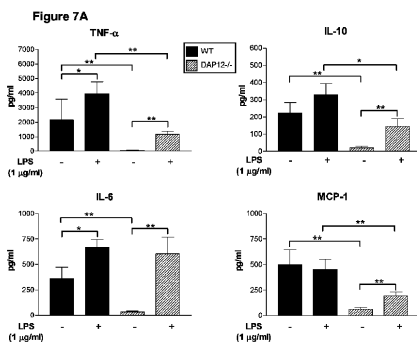
【図 5】



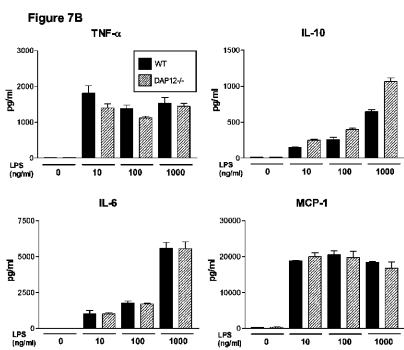
【図 6】



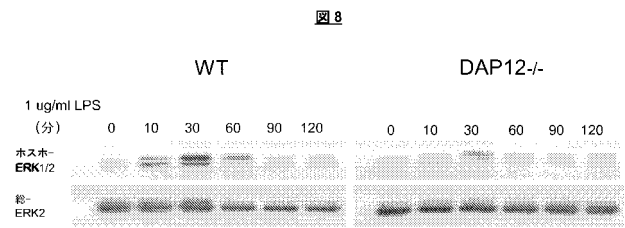
【図 7 A】



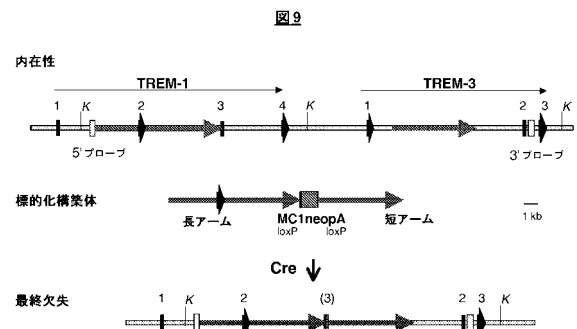
【図 7 B】



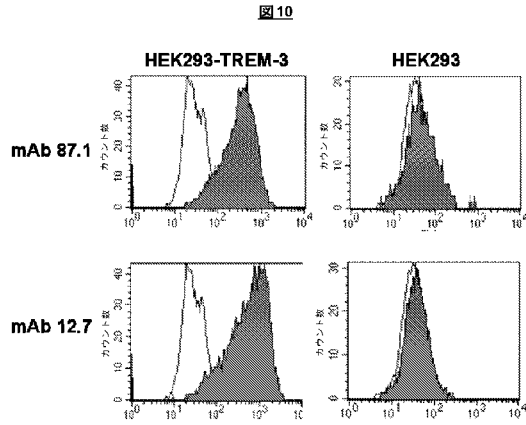
【図 8】



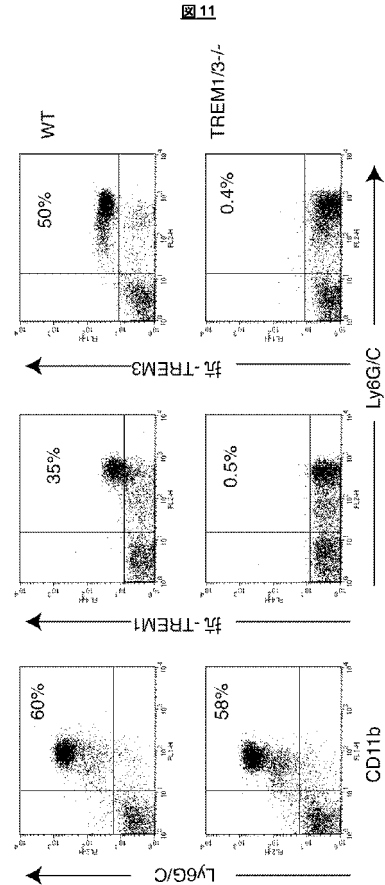
【図 9】



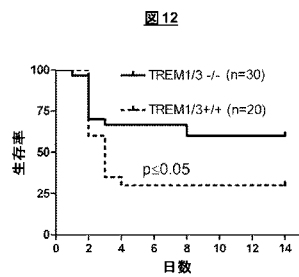
【図 10】



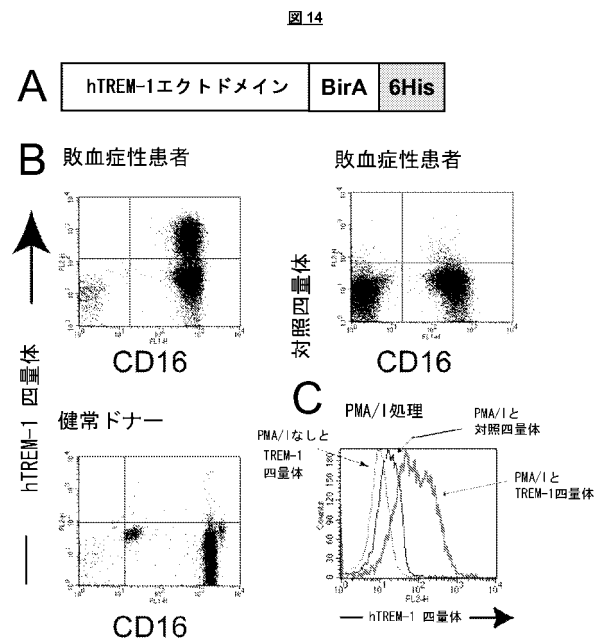
【図 11】



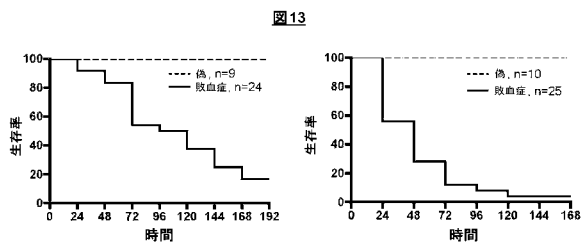
【図 12】



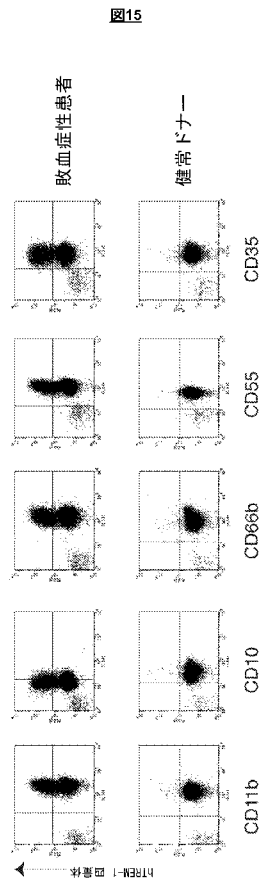
【図 14】



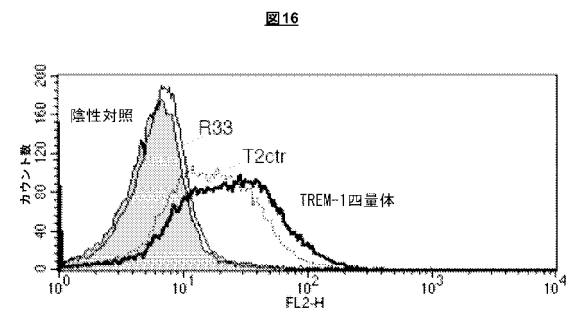
【図 13】



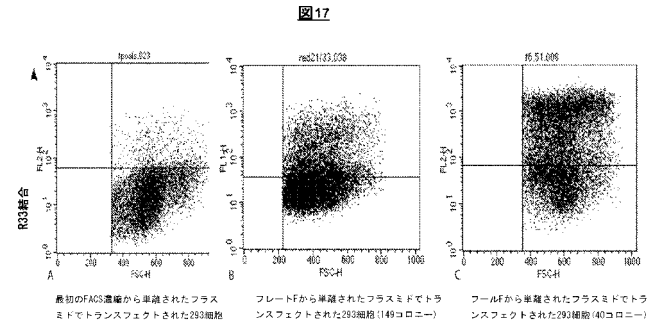
【 図 1 5 】



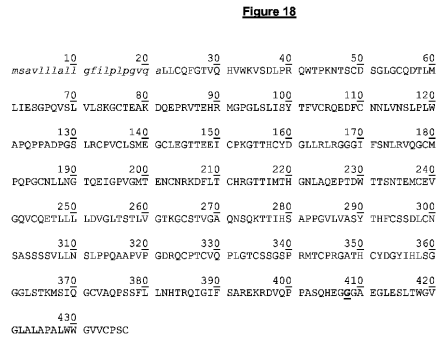
【 図 1 6 】



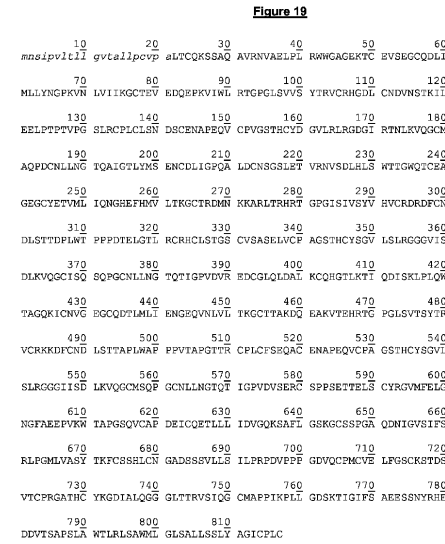
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



## 【図 20】

		<b>図 20</b>	
ヒト	17	PGVQALLCQFGTVQHVWVNDLP-RQWTPKNTSCDSGLGQCDTINLIESGPVSLVLSKG	75
マウス	397	LDALKCQKGLTKTIQDISKLPQWTAGG-KICHVYGSCQDITMLIENGQVNLVLTKG	
マウス	17	PCVFPALTQKSSAQAVRNVAELPLRWGAGERTCEVSEGCQDLINLLYNGPKVNLVLIKG	76
ヒト	76	CTEAKDQEPFVTEHRNGPGLSLISYTFVCRQEDDFCHNLVNSLPKRAFQF-PADPGSLRCP	134
マウス	454	CTTAKDQEPKVTERTGPGLSVTSYTRVCRKKDFCHLSTTAPKRAPPVTAPEPTR-CF	
マウス	77	CTEVEDQEPKVIWLRTPGSLVSVSYTRVCRHGLDCHD-VNSTKILEELPTPTVPGSLRCP	135
ヒト	135	VCLSNREGCLGTEEBICPKGITHCYDGLRLRGGGIFSNLRVQCMFPQGCNLLNGTQEI	194
マウス	517	LCFSEQAC-ENAFEPQVCPAGSTHCYSGVLSLRGGGIIISDLKVQCMSPQGCNLLNGTQTI	
マウス	136	LCLSNIDSC-ENAFEPQVCPVGSTHCYDGLRLRGGGIRTNLKVQCMAPDCNLLNGTQAI	194
ヒト	195	GPVGMTECN-NRKDFLT--CHRGTTINHGHLAQEPTDWTSTNTEMCVEVQVQCEMLLLID	252
マウス	576	GPVVDVSERCSPFSETTELSCYRGVMFELNGFAEEPVKATAPGSQVCAPDEICQETLLIID	
マウス	195	GTLYMSENCDLIGPQALD-CNSGSLETVRHVSDLHLSWTI--GWQTCEAGEGCYETVHLIQ	252
ヒト	253	VGLTSTIVETKGCSTVGAQNSQKTIHSAPPGVLVASYTHFCSSDLNCSASSSSVLLNSL	312
マウス	636	VGQKSAFLSKGCSRPQADNIQVSIFFRLPGLVASYTKFCSSHLNAGDSSVLLSL	
マウス	253	NGHEFHMVLTKG-TRDMNKARLTHRTGPGISIVSYVHVCRDRDFCNDLSTTDLPLWTP	311
ヒト	313	EPQAAVPVGDRCQPTCVPLGTCSSSGSPRMTCPRGATHCYDGYIHLGGGLSTKMSIQGC	372
マウス	696	EPDPVPPPGDVQCPMCELVFGSCKS-TDSVTCPRGATHCYKGDIALQGGGLTTRVSIQGC	
マウス	312	PPDTE--LGLTRCRHCLS-TGSCVYAS-ELVCPAGSTHCYSGVLSLRGGGVISDLKVQGC	367
ヒト	373	V--AQPSFFLLNHRTQIGFISAREKRDVQPPASHEGGGAEGLSLET	417
マウス	755	MAPFKPLLDGDSKTIIGFSAEE	
マウス	368	ISQSQPGCNLLNGTQITGIPVDVREDCGLQLDALCKQHGTIKTIQDIS	414

## 【図 21A (i)】

Figure 21A(i)

10	20	30	40	50	60
ATGAGCGCGG	TATTACTGCT	GGCCCTCCCTG	GGGTTCATCC	TOCCACTGCC	AGGAGTGCAG
70	80	90	100	110	120
CGCCTGCTCT	GCCAGTTTGG	GACAGTTCAG	CATGTGTGGG	AGGTGTCCGA	CCTGCCCCCG
130	140	150	160	170	180
CAATGACACC	CTAAGAACAC	CAGCTGCGAC	AGCGGCTTGG	GGTSCCAGGA	CACTGTGATG
190	200	210	220	230	240
CTCAITGAGA	GCGGAGCCCA	AGTAGCCCTG	GTCTCTCCCA	AGGGCTGCAC	GGAGGCCAAG
250	260	270	280	290	300
GACCAGGAGC	CCCGGCTCAC	TGAGCACCGG	ATGGGCCCGG	GGCTCTCCCT	GAITCCTTAC
310	320	330	340	350	360
ACCTTGTGTT	GCGCGCAGGA	GGACTTCTGC	AACAACCTCG	TTAACTCCCT	CCCGCTTTGG
370	380	390	400	410	420
GCCCAACAGC	CCCAACAGCA	CCAGGATCC	TTGAGGTGCG	CMGTCTGCTT	GTCTATGGA
430	440	450	460	470	480
GGCTGTCTGG	AGGGACACAC	AGAAGATATC	TGCCCAAGG	GGACACACAC	CTGTATGATG
490	500	510	520	530	540
GGCTCTCTCA	GGCTCAGGG	AGGAGGCATC	TTCTCCAATC	TGAGACTCCA	GGGATGCATG
550	560	570	580	590	600
CCCCAGCCAG	GTTCGAACCT	GCTCAATGGG	ACACAGGAA	TTGGGCCCTT	GGCTATGATG
610	620	630	640	650	660
GAGAACTGCA	ATAGGAAGA	TTTTCTGACC	TGTCTAGGG	GGACACACAT	TAIGACACAC
670	680	690	700	710	720
GGAACTTTGG	CTCAAGAAC	CACCTGATTG	ACCACATCGA	ATACCSAGAT	GTGCGAGGTG
730	740	750	760	770	780
GGGCAAGGTT	GTACAGAGAC	GCTGCTGCTC	ATAGATGTAG	GACTCACATC	AACCTGGGTG
790	800	810	820	830	840
GGGACAAAAG	GCTGACAGCC	TGTTGGGGCT	CAAAATTCCT	AGAGACACAC	CATCACTCA
850	860	870	880	890	900
GCCCTCCCTG	GGTCTCTGTT	GGCTCTCTAT	ACCCACTTCT	GCTCTCTCGA	CCTGTCAAT
910	920	930	940	950	960
AGTGCCAGCA	GCAGCAGGCT	TCTGTGAAAC	TCCCTCCCTC	CTCAAGCTGC	CCCTGTCCCA
970	980	990	1000	1010	1020
GGAGACCGGC	AGTGTCTTAC	CTGTGTGCA	CCCTCTGAG	CTCTTCTCAG	TGGCTCCCTC
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CGAATGACCT	GCCCAAGGGG	CGCCACTCAT	TGTTATGATG	GSTACATCCA	TCTCTCAGGA
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GGTGSGTGT	CCACCAAAAT	GAGCATTCAG	GGCTGGGTGG	CCCAACCTTC	CAGCTTCTTG

## 【図 21A (ii)】

Figure 21A(ii)

1150	1160	1170	1180	1190	1200
TTGAACACCA	CCAGACAAAT	CGGATCTTCT	TCTGCGGCTG	AGAGCGGTGA	TGTGACGCTT
1210	1220	1230	1240	1250	1260
CCTGCTCTCT	AGCATGAGGG	AGGTGGGCTT	GAGGGCCTGG	AGTCTCTCAC	TTGGGGGGTG
1270	1280	1290	1300	1310	
GGGCTGGCAC	TGGCCCCCAGC	GCTGTGGTGG	GGAGTGGTTT	GCCCTCTCTG	CTAA

## 【図 21B (i)】

Figure 21B(i)

10	20	30	40	50	60
ATGAATCTTA	TACCAGTGCT	GACCCCTCTC	GGGTGCACGG	CCTTCTGACC	CTGTGTCCCA
70	80	90	100	110	120
GCTCTGACCT	GCCAGAAAAG	CAGCGACACG	GCTGTGAGGA	ATGTGSCAGA	GCTGCCCTCC
130	140	150	160	170	180
AGGTGTGGGG	GAGCTGTGGA	GAAAACCTGG	GAGGTGTAGC	AGAGTTGATA	
190	200	210	220	230	240
ATGCTCTCTG	ATAATGGACC	CAGGTGCACG	TTGGTGTATC	TCAGAGGCTG	CACCGAGGTT
250	260	270	280	290	300
GAGGACCAAG	AGCCGAGAGT	GATCTGCTCT	AGGACAGGCT	CTGGGCTCTC	TGTGGTGTCT
310	320	330	340	350	360
TACACCGGTG	TGTGTCCGCA	TGGTGACCTC	TGCAATGATG	TGAACAGCAC	TAAGATCCCT
370	380	390	400	410	420
GAGGAGGTAC	CTACACCCAC	AGTTCCAGGG	TCCCTTGGCT	GCCCACTCTG	CCTTTCTAAT
430	440	450	460	470	480
GACAGCTGTG	AGAATGCACC	GGAGCAGGTC	TGCCCTGTGG	GAAGCACACA	CTGCTACGAT
490	500	510	520	530	540
GGAGTCTCTA	GGCTCAGGGG	AGATGSCATC	AGGACCAATC	TCAGGTGSCA	GGGTGCAITG
550	560	570	580	590	600
GCCAGCCAG	ACTGCAACCT	GCCTAAATGG	ACCCAGCGCA	TTGGGAGCTT	GTATATGAGC
610	620	630	640	650	660
GAAACCTGTG	ATCTTATAGG	TCCACAGGCT	CTGGATGTGC	ATAGTGGAGG	CTTGGAACT
670	680	690	700	710	720
GTGAGGAATG	TATCAGATCT	GCACCTTGAGC	TGGCAGACTG	GCTGGCAAAC	CTGTGAGGCT
730	740	750	760	770	780
GGCAGGGGTT	GTTATGAATC	AGTGATGCTA	ATACAAATGT	GACATGAATT	TCACATGGTT
790	800	810	820	830	840
CTCACTAAGG	GATGTACTAG	GCATATGAC	AAAAAGGCTC	GGCTCACCCG	GCATAGAACA
850	860	870	880	890	900
GCCCGAGGGA	TCCTCATCTG	CTCCTACCTG	CATGTGTGCT	GCGACAGGGA	CTTCTGTAAT
910	920	930	940	950	960
GACCTGCTTA	CAACAGACCC	TCCTTGAGCT	CCCGCCCTCT	ACACAGACCT	AGGACCCCTG
970	980	990	1000	1010	1020
CGTGCGGAGC	ACTGCTTCTC	AACCGGAGG	TGTGTGAGTG	CATCTGAGCT	GGTGTGCCCT
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GCAGGACAGC	CACACTGTCTA	CAGTGGAGTC	CTCAGCTTCA	GCGGAGGAGG	GGTCACTTCT
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GATCTGAGGG	TACAGGGATG	CATATGCGAG	TCCCGAGCAG	GATGCAACCT	GCTCAACGGT

## 【図 21B (ii)】

Figure 21B(ii)

1150	1160	1170	1180	1190	1200
ACCCAGACAA	TCGMAACCTG	GGATGTGCTG	GAGGACTGCG	GTCTCTCAGT	AGATGCTCTG
1210	1220	1230	1240	1250	1260
AAATGCGAGC	ATGGGAGGCT	GAAGACATCC	CAGGATATAT	CGAAGCTGCC	TCCTCAGGTG
1270	1280	1290	1300	1310	1320
ACGGCTGGCC	AGAAATCTGT	TAATGTGGGT	GAGGCTGGCC	AGAGACATCT	GAITGTGATA
1330	1340	1350	1360	1370	1380
GAGAACGGAG	AGCAGGTGAA	CTTGGTTCTC	ACGAAAGGCT	GCATCTACCG	AAGAGACCAA
1390	1400	1410	1420	1430	1440
GAGGCCAAAG	TCACGAGGCA	CAGAACTGGA	CCAGGGCTGT	CTGTCACTCT	CTACACCCGA
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GTGTGCCGTA	AAAAAGACTT	CTGCAATGAC	CTGTCTACCA	CAGGCCCTCT	CTGGGCTCCA
1510	1520	1530	1540	1550	1560
CCTCCAGTGA	CAGGCCCAGG	GACCACCTCG	TGCCCTCTCT	GCTTTTCTGA	ACAAGCCTGT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
GAGAAATGCA	CGGACAGGCT	CTGCCCTCCA	GGCAGCACAC	ACTGCTACAG	TGGATCTCTC
1630	1640	1650	1660	1670	1680
AGCCTCAGGG	GAGGAGGGAT	CATCTCTGAT	CTGAAGGTGG	AGGGCTGTAT	GTCCACGCCA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
GGATGCNAAC	TGCTCAACGG	TACCCAGACA	ATCGGACCGG	TGGATGTGAG	CGAGGCGTGC
1750	1760	1770	1780	1790	1800
AGTCTTCCGT	CAGAAACAA	AGAGTTGTCC	TGTTACAGGG	GTGTGATGTT	TGAGCTTGGC
1810	1820	1830	1840	1850	1860
AATGGCTTTG	CGGAGGACCT	TGTCAAGTGG	ACGGCACCCG	GGTCTCAGGT	GTGTGACCTT
1870	1880	1890	1900	1910	1920
GATGAGATTT	GTCAAGAGAC	GCTGCTGCTC	ATAGACGTAG	GACAAAAATC	AGCCTTCCCT
1930	1940	1950	1960	1970	1980
GGGAGTAAAG	GCTCAGCAG	TCCCTGGGCC	CAGGACAAAT	TGCTGTCTCT	CATATTCTCC
1990	2000	2010	2020	2030	2040
CGCTCTCCCT	GGATCTGTGG	AGCTCTCTAT	ACCAAAATCT	GTCTCTCCCA	CTGTGCTCAAT
2050	2060	2070	2080	2090	2100
GGAGCCGACA	GCAGCAGTGT	CCTTTAAGC	ATCCTCCCTC	GTCCAGATGT	TCCTCCCCCA
2110	2120	2130	2140	2150	2160
GGAGATGTGC	AGTGCCCAAT	GTGTGTGAGG	TTATTGTGAT	CCTGCAGAGC	CACCTGACCT
2170	2180	2190	2200	2210	2220
GTACCTGCGC	CTAGGGGTGC	CACCTCACTGT	TATAAAGGTG	ACATTGCACAT	ACNGGAGAGT

## 【図 2 1 B ( i i i )】

Figure 21B(iii)

```

2230      2240      2250      2260      2270      2280
GGACTGACTA CCAGAGTGAG CATTGAGGGG TGCATGGCCC CACCTATCAA ACCTTACTTG

2290      2300      2310      2320      2330      2340
GGTGACTCCR AAACAATCGG TATCTTCTCG GCAGAGAGAG GCTCTACTTA TGCACATGAG

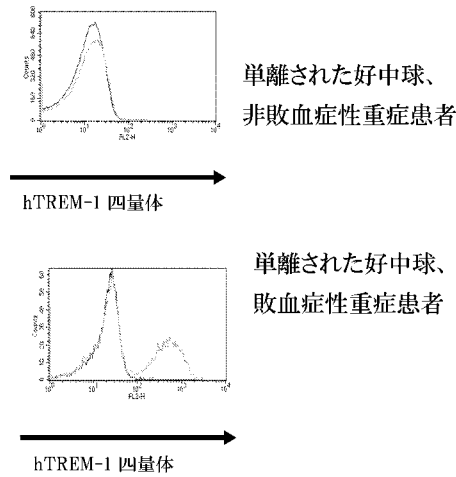
2350      2360      2370      2380      2390      2400
GAATGATGTA CTCTGGCCCC TTCCCTGGCC TGCACCTTAC GGTATATCGC CTGGATGTIA

2410      2420      2430      2440      2450
GGGCTATCGG CTCCTCTCAG CTCCTTGTAT GCTGGGATCT GTCCTCTCTG CTGA

```

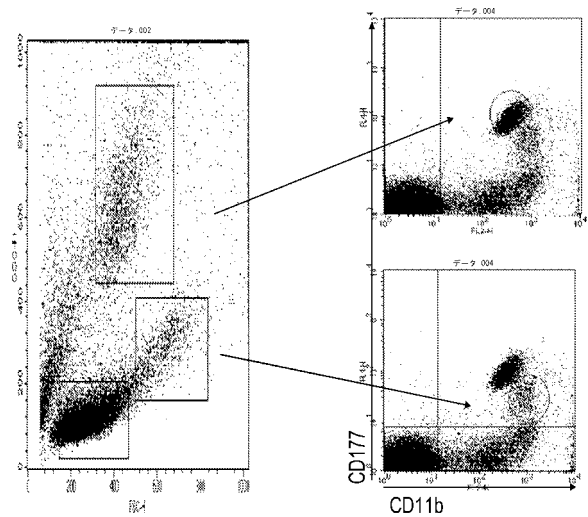
## 【図 2 2】

図 22



## 【図 2 3】

図 23



## 【図 2 4 A - B】

図 24

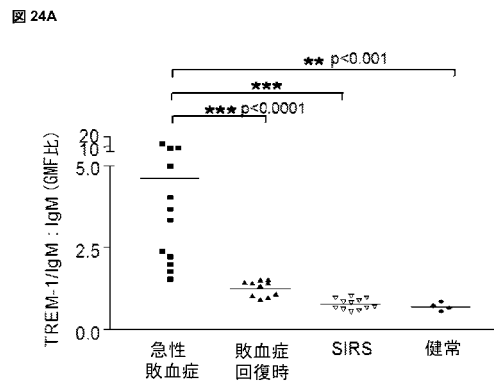
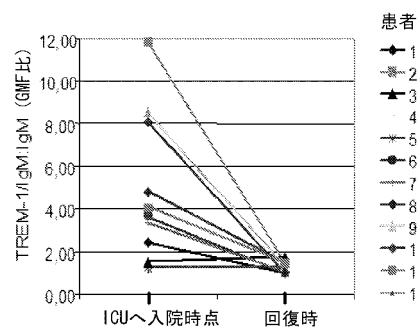
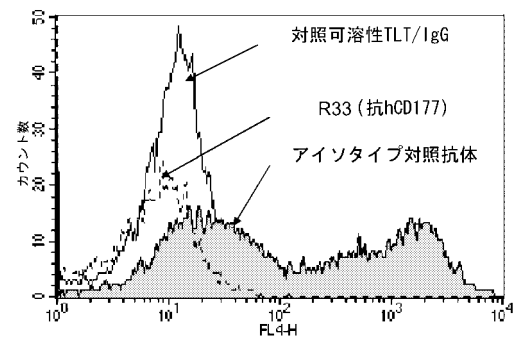


図 24B

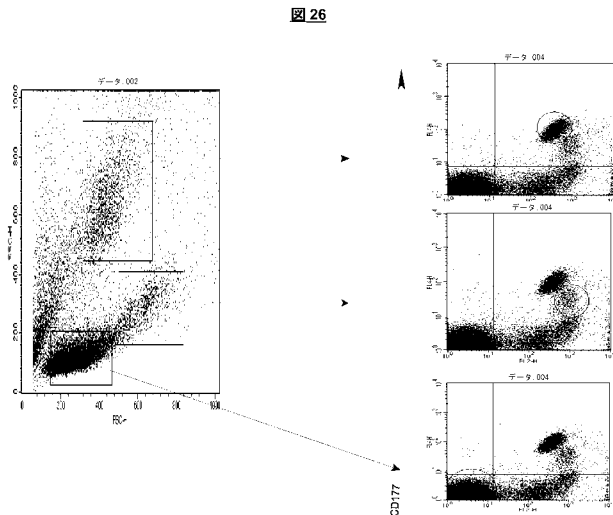


## 【図 2 5】

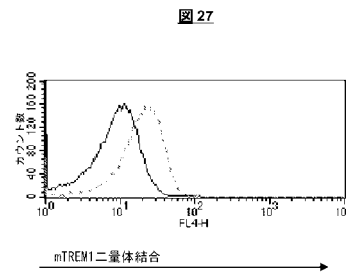
図 25



【図 26】



【図 27】



## 【手続補正書】

【提出日】平成22年6月21日(2010.6.21)

## 【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 4 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 4 5】

【図 20】図20は、ヒトCD177アミノ酸配列と、マウス配列のふたつの部分の各々の間のアラインメントを示す。該ヒト配列は、該マウス配列の各部分と有意な配列同一性を有することを認めることができる。これは、マウスにおける遺伝子重複事象を示すことができる。図20において、上段の配列はヒトCD177アミノ酸配列（配列番号1）のアミノ酸残基17～417位に対応し、中段の配列はマウスCD177アミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸残基397～773位に対応し、下段の配列はマウスCD177アミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸残基17～414位に対応する。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 5 7】

## (4. 可溶性TREM-1模倣物質は炎症を調節する)

TREM-1の可溶性型(sTREM-1)は、敗血症の患者の血清中<sup>40</sup>に加え、敗血症性ショックの実験モデルに関与した動物の血清中<sup>41</sup>において同定されている。更に、sTREM-1は、肺炎患者の気管支肺胞洗浄液(BAL)中に検出された<sup>42</sup>。sTREM-1の起源に関してはふたつの可能



性がある。ひとつの可能性は、sTREM-1は、表面に発現されたTREM-1のタンパク質分解性切断又は膜シェディングにより作製されている。あるいは、sTREM-1は、TREM-1の分泌型をコードしているTREM-1 mRNAスプライシング変種のデノボ翻訳により作製されることができる。後者の仮説の裏付けにおいて、膜貫通領域をコードしているエキソン3を欠いている選択的TREM-1転写産物が報告されている<sup>43, 44</sup>。sTREM-1の生理的役割は、完全にはわかっていない。この分子は、表面提示されたTREM-1に即座に結合しないTREM-1リガンドを掃去し、これにより免疫応答を鈍くし、かつ炎症の設定における局所的管理を提供する<sup>40</sup>。実際、免疫学的シグナル伝達及び炎症反応に重要である複数の受容体の可溶性型の制御放出が記載されている。これらは、IL-1受容体(IL-1デコイRII)<sup>45, 46</sup>、TNF- 受容体<sup>47, 50</sup>、及びL-セレクトリン受容体<sup>51</sup>の可溶性型を含む。sTREM-1のモジュレーター機能と一致して、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(LP17、TDSRCV IGLYHPPLQVY (配列番号5))は、インビトロにおけるヒト単球によるサイトカイン生成を減弱し、かつ敗血症性動物を、インビボにおいて過敏反応及び死亡から保護した<sup>41</sup>。このペプチドは、単に敗血症の予防のみではなく、一旦前炎症性サイトカインの有害作用が開始された場合の敗血症の治療においても、有効であった。これらのデータは、sTREM-1ペプチドによるTREM-1のインビボ調節は、敗血症の治療に適した治療道具であり得ることを示唆している。

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図18

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図18】

**図18**

```

      10      20      30      40      50      60
msavllllall gfilplpgvq aLLCQFGTVQ HVWKVSDLPR QWTPKNTSCD SGLGCQDTLM

      70      80      90      100     110     120
LIESGPQVSL VLSKGCTEAK DQEPRVTEHR MGPGLSLISY TFVCRQEDFC NNLVNSLPLW

      130     140     150     160     170     180
APQPPADPGS LRCPVCLSM EGCLEGTTEEI CPKGTTHCYD GLLRLRGGGI FSNLRVQGCM

      190     200     210     220     230     240
PQPGCNLLNG TQEIGPVGMT ENCNRKDFLT CHRGTTIMTH GNLAQEPTDW TTSNTEMCEV

      250     260     270     280     290     300
GQVCQETLLL LDVGLTSTLV GTKGCSTVGA QNSQKTTIHS APPGVLVASY THFCSSDLCN

      310     320     330     340     350     360
SASSSSVLLN SLPPQAAPVP GDRQCPTCVQ PLGTCSSGSP RMTCPRGATH CYDGYIHLSG

      370     380     390     400     410     420
GGLSTKMSIQ GCVAQPSSFL LNHTRQIGIF SAREKRDVQP PASQHEGGA EGLESLTWGV

      430
GLALAPALWW GVVCPSC (配列番号1)

```

【手続補正4】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図19

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 19】

**図 19**

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
<i>mnsipvltll</i>	<i>gvtallpcvp</i>	<i>aLTCQKSSAQ</i>	<i>AVRNVAELPL</i>	<i>RWWGAGEKTC</i>	<i>EVSEGCQDLI</i>
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
<i>MLLYNGPKVN</i>	<i>LVIKIGCTEV</i>	<i>EDQEPKVIWL</i>	<i>RTGPGLSVVS</i>	<i>YTRVCRHGD</i>	<i>CNDVNSTKIL</i>
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
<i>EELPTPTVPG</i>	<i>SLRCPLCLSN</i>	<i>DSCENAPEQV</i>	<i>CPVGSTHCYD</i>	<i>GVLRLRGDGI</i>	<i>RTNLKVQGCM</i>
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
<i>AQPDCNLLNG</i>	<i>TQAIGTLYMS</i>	<i>ENCDLIGPQA</i>	<i>LDCNSGSLET</i>	<i>VRNVSDLHLS</i>	<i>WTTGWQTCEA</i>
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
<i>GEGCYETVML</i>	<i>IQNGHEFHMV</i>	<i>LTKGCTRDMN</i>	<i>KKARLTRHRT</i>	<i>GPGISIVSYV</i>	<i>HVCRDRDFCN</i>
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
<i>DLSTTDPLWT</i>	<i>PPPDTELGT</i>	<i>RCRHCLSTGS</i>	<i>CVSASELVCP</i>	<i>AGSTHCYSGV</i>	<i>LSLRGGGVIS</i>
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
<i>DLKVQGCISQ</i>	<i>SQPGCNLLNG</i>	<i>TQTIGPVDVR</i>	<i>EDCGLQLDAL</i>	<i>KCQHGTCLKTI</i>	<i>QDISKLPLQW</i>
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	<u>480</u>
<i>TAGQKICNVG</i>	<i>EGCQDTLMLI</i>	<i>ENGEQVNLVL</i>	<i>TKGCTTAKDQ</i>	<i>EAKVTEHRTG</i>	<i>PGLSVTSYTR</i>
<u>490</u>	<u>500</u>	<u>510</u>	<u>520</u>	<u>530</u>	<u>540</u>
<i>VCRKKDFCND</i>	<i>LSTTAPLWAP</i>	<i>PPVTAPGTTR</i>	<i>CPLCFSEQAC</i>	<i>ENAPEQVCPA</i>	<i>GSTHCYSGVL</i>
<u>550</u>	<u>560</u>	<u>570</u>	<u>580</u>	<u>590</u>	<u>600</u>
<i>SLRGGGIISD</i>	<i>LKVQGCMSQP</i>	<i>GCNLLNGTQT</i>	<i>IGPVDVSERC</i>	<i>SPPSETTELS</i>	<i>CYRGVMFELG</i>
<u>610</u>	<u>620</u>	<u>630</u>	<u>640</u>	<u>650</u>	<u>660</u>
<i>NGFAEEPVKW</i>	<i>TAPGSQVCAP</i>	<i>DEICQETLLL</i>	<i>IDVGQKSAFL</i>	<i>GSKGCSSPGA</i>	<i>QDNIGVSIFS</i>
<u>670</u>	<u>680</u>	<u>690</u>	<u>700</u>	<u>710</u>	<u>720</u>
<i>RLPGMLVASI</i>	<i>TKFCSSHLN</i>	<i>GADSSSVLLS</i>	<i>ILPRPDVPPP</i>	<i>GDVQCPMCVE</i>	<i>LFGSCKSTD</i>
<u>730</u>	<u>740</u>	<u>750</u>	<u>760</u>	<u>770</u>	<u>780</u>
<i>VTCPRGATHC</i>	<i>YKGDIALQGG</i>	<i>GLTTRVSIQG</i>	<i>CMAPIKPLL</i>	<i>GDSKTIGIFS</i>	<i>AEESSNYRHE</i>
<u>790</u>	<u>800</u>	<u>810</u>			
<i>DDVTSAPSLA</i>	<i>WTLRLSAWML</i>	<i>GLSALLSSLY</i>	<i>AGICPLC</i>	<u>(配列番号 2)</u>	

【手続補正 5】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 2 1 A ( i i )

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【図 2 1 A ( i i )】

**図 21A(ii)**

1150	1160	1170	1180	1190	1200
TTGAACCACA	CCAGACAAAT	CGGGATCTTC	TCTGCGCGTG	AGAAGCGTGA	TGTGCAGCCT
1210	1220	1230	1240	1250	1260
CCTGCCCTCTC	AGCATGAGGG	AGGTGGGGCT	GAGGGCCTGG	AGTCTCTCAC	TTGGGGGGTG
1270	1280	1290	1300	1310	
GGGCTGGCAC	TGGCCCCAGC	GCTGTGGTGG	GGAGTGGTTT	GCCCTTCCTG	CTAA (配列番号 3)

## 【手続補正 6】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 2 1 B ( i i i )

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 2 1 B ( i i i )】

**図 21B(iii)**

2230	2240	2250	2260	2270	2280
GGACTGACTA	CCAGAGTGAG	CATTCAGGGG	TGCATGGCCC	CACCTATCAA	ACCTTTACTG
2290	2300	2310	2320	2330	2340
GGTGACTCCA	AAACAATCGG	TATCTTCTCG	GCAGAGGAGA	GCTCTAACTA	TCGACATGAG
2350	2360	2370	2380	2390	2400
GATGATGTTA	CCTCGGCCCC	TTCCCTGGCC	TGGACCTTAC	GGCTATCGGC	CTGGATGTTA
2410	2420	2430	2440	2450	
GGGCTATCGG	CTCTTCTCAG	CTCTTTGTAT	GCTGGGATCT	GTCCTCTCTG	CTGA (配列番号 4)

## 【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2010534828000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/059668

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
G01N

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BOUCHON A ET AL: "TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, UK, vol. 410, no. 6832, 26 April 2001 (2001-04-26), pages 1103-1107, XP002285055 ISSN: 0028-0836 the whole document  ----- -/-	1-97

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

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

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October 2008

Date of mailing of the international search report

07/11/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno de Vega, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/059668

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	COLONNA M ET AL: "TREM-1 (TRIGGERING RECEPTOR EXPRESSED ON MYELOID CELLS): A NEW PLAYER IN ACUTE INFLAMMATORY RESPONSES" JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, CHICAGO, IL, vol. 187, no. SUPPL. 02, 15 June 2003 (2003-06-15), pages S397-S401, XP008033778 ISSN: 0022-1899 the whole document	1-97
X	US 2003/165875 A1 (COLONNA, M. ET BOUCHON, A.) 4 September 2003 (2003-09-04)	63
Y	claims 1-32	1-97
Y	GIBOT S ET AL: "A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, JP, vol. 200, no. 11, 6 December 2004 (2004-12-06), pages 1419-1426, XP002355335 ISSN: 0022-1007 the whole document	1-97
X	WO 2004/081233 A (BIOXELL S.P.A.) 23 September 2004 (2004-09-23)	1-7, 10, 11, 14-27, 29-38, 40-43, 52-63, 65-72, 74-92, 94-97
Y	page 2, line 17 - page 10, line 35; claims 1-32	1-97
X	WONG-BAEZA I ET AL: "Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) is regulated post-transcriptionally and its ligand is present in the sera of some septic patients." CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY SEP 2006, vol. 145, no. 3, September 2006 (2006-09), pages 448-455, XP009107241 ISSN: 0009-9104	43, 52-63, 66-69
Y	the whole document	1-97

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/059668

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003165875 A1	04-09-2003	US 2005260670 A1	24-11-2005
WO 2004081233 A	23-09-2004	AU 2004219885 A1	23-09-2004
		CA 2518058 A1	23-09-2004
		EP 1601797 A1	07-12-2005
		JP 2006520593 T	14-09-2006
		US 2006183125 A1	17-08-2006

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C 0 8 6
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531 A	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
	A 6 1 K 31/7105	
	A 6 1 K 39/395 N	

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

(72)発明者 ジェウリア クレスネイ - タイト

アメリカ合衆国 5 2 2 4 2 - 1 0 8 1 アイオワ州 アイオワ シティ シー 3 4 - 1 2 ジー  
エイチ ハウキンス ドライブ 2 0 0 クリトイカル クアルエ アンド オククウパトイオ  
ナル メドイシネ ドイビション オブ プルモナリ ロイ アンド ルシルレ クアルベル コ  
ルレゲ オブ メドイシネ シーノオー ユニバーシティ オブ アイオワ

(72)発明者 パオラ パニナ

イタリア国 I - 2 0 1 3 2 ミラン ピア オルゲッチナ 5 8 シーノオー ビオケルル エ  
スピーエー

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA12 CA20 CB01 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03  
4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ42 QQ53 QQ79 QQ96 QR08 QR32  
QR55 QR62 QR77 QR80 QS24 QS25 QS34 QX02  
4B064 AG27 AG31 CA20 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA90X AA90Y AB07 AC14 BA01 BA08 CA24 CA25 CA44 CA46  
4C084 AA13 AA17 NA14 ZB352  
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB44 CC02 CC22 CC23 DD88 EE01  
GG01  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB35  
4H045 AA11 BA10 CA40 DA50 DA76 EA29 EA50 FA74