

(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2015-533485

(P2015-533485A)

(43) 公表日 平成27年11月26日(2015.11.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 ZNAA	2G045
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00	4B024
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18	4C084
<b>C07K 16/46 (2006.01)</b>	C07K 16/46	4C085
<b>C07K 14/46 (2006.01)</b>	C07K 14/46	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-530449 (P2015-530449)	(71) 出願人	514070764 ヴェストファーリッシュ ヴィルヘルム- ユニバーシテート ミュンスター ドイツ国 ミュンスター シュロスブラッ ツ 2
(86) (22) 出願日	平成25年9月10日 (2013.9.10)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月9日 (2015.3.9)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/068757	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02014/037588	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成26年3月13日 (2014.3.13)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	12183736.3		
(32) 優先日	平成24年9月10日 (2012.9.10)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性状態の予防、処置、および診断のための方法および化合物

## (57) 【要約】

ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置63~79または73~85に対応する領域であるエピトープに対する特異性を有する抗体を提供する。ヒトタンパク質S100A8のアミノ酸位置55~71に対応する領域であるエピトープに対する特異性を有する抗体もさらに提供する。炎症性障害の処置または診断におけるそのような抗体の使用もさらに提供する。S100A9の該エピトープまたはS100A8の該エピトープの一方に対応するペプチドとTLR4受容体との間の複合体の形成を阻害することができる化合物を同定するインビトロ方法であって、複合体形成に影響を与えると推測される化合物を該ペプチドおよび該TLR4受容体と接触させる、インビトロ方法も提供する。S100A8タンパク質とS100A9タンパク質との間の複合体の安定性を増加させることができる化合物を同定するインビトロ方法であって、複合体形成に影響を与えると推測される化合物の存在下で2種の該タンパク質を接触させる、インビトロ方法もさらに提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

脊椎動物S100A9タンパク質のエピトープに対する結合特異性を有する免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーであって、該エピトープが、(i) Uniprot/Swissprotアクセッション番号P06702のヒトタンパク質S100A9 (SEQ ID NO:77) のアミノ酸位置63からアミノ酸位置79までのアミノ酸配列に、または(ii) Uniprot/Swissprotアクセッション番号P06702のヒトタンパク質S100A9 (SEQ ID NO:77) のアミノ酸位置73からアミノ酸位置85までのアミノ酸配列に対応する領域のアミノ酸配列を有する、免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナー。

## 【請求項2】

前記アミノ酸配列が、配列

MEDLDTNADKQLSFEEF (SEQ ID NO: 1),

MEDLDTNEDKQLSFEEF (SEQ ID NO: 14), MEDLDTNVDKQLSFEEF (SEQ ID NO:

15), MEDLDTNLDKQLSFEEF (SEQ ID NO: 16), MEDLDTNGDKQLNFEEF (SEQ ID

NO: 17), LEDLDTNADKQLTFEEF (SEQ ID NO: 18), LEDLDTNVDKQLS FEEF (SEQ

ID NO: 19), LEDLDTNEDKQLSFEEF (SEQ ID NO: 20), MEDLDTN GDKELNFEEF

(SEQ ID NO: 21), MEDLDTNEDKELSFEEY (SEQ ID NO: 22),

LEDLDTNGDKQLNFEEF (SEQ ID NO: 23), MEDLDTNQDNQLSFEEC (SEQ ID NO:

24), MEDLDTNLDQQLSFEEL (SEQ ID NO: 25), MQDLDTNQDQQLSFEEV (SEQ ID

NO: 26), MEDLDTNQDKQLSFEEF (SEQ ID NO: 27), MQELDTNQ NGQVDFKEF

(SEQ ID NO: 28), FEETDLNKDKELTFEEF (SEQ ID NO: 29), QLSFEEFIMLMAR

(SEQ ID NO: 3), QLSFEEFIVLMAR (SEQ ID NO: 30), QLSFEEFIMLVAR (SEQ ID

NO: 31), QLTFFEEFIMLMGR (SEQ ID NO: 32), QLSFEEFIMLVIR (SEQ ID NO: 33),

QLSFEEFIIIVAR (SEQ ID NO: 34), QLSFEELTMLLAR (SEQ ID NO: 35),

QLSFEEVIMLIFAR (SEQ ID NO: 36), QLSFEEFSILMAK (SEQ ID NO: 37),

QLSFEEFSMLVAK (SEQ ID NO: 38), QLSFEECMMLMAK (SEQ ID NO: 39),

QLSFEECMMLMGK (SEQ ID NO: 40), ELSFEEYIVLVAK (SEQ ID NO: 41),

QLSFEEFVILMAR (SEQ ID NO: 42), QLNFEESILVGR (SEQ ID NO: 43), および

QVDFKEFSMMMAR (SEQ ID NO: 44)

のうちの一つである、請求項1に記載の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナー。

## 【請求項3】

脊椎動物S100A8タンパク質のエピトープに対する結合特異性を有する免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーであって、該エピトープが、Uniprot/Swissprotアクセッション番号P05109のヒトタンパク質S100A8 (SEQ ID NO:78) のアミノ酸位置55からアミノ酸位置71までのアミノ酸配列に対応する領域のアミノ酸配列を有する、免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナー。

## 【請求項4】

前記アミノ酸配列が、配列

10

20

30

40

FKELDINTDGAVNFQEF (SEQ ID NO: 5),  
 FKELDINTDGAINFQEF (SEQ ID NO: 45), FKELDINS DGAINFQEF (SEQ ID NO: 46),  
 FKELDINEDGAVNFQEF (SEQ ID NO: 47), FKELDINKDGAVNFEEF (SEQ ID NO:  
 48), FKELDINS DGASN FQEF (SEQ ID NO: 49), FKELDVNS DGAINFEEF (SEQ ID  
 NO: 50), FKQFDINEDGAVNFQEF (SEQ ID NO: 51), FRQLDINEDGAVNFQEF (SEQ  
 ID NO: 52), FKELDINQDNAVNFEEF (SEQ ID NO: 53), FNELDINS DNAINFQEF  
 (SEQ ID NO: 54), FKELDINQDGGINFEEF (SEQ ID NO: 55), FKELDVNS DSAINFEEF  
 (SEQ ID NO: 56), FKELDVNS DNAINFEEF (SEQ ID NO: 57),  
 FQELDVNS DGAINFEEF (SEQ ID NO: 58), FRELDINS DNAINFEEF (SEQ ID NO: 59),  
 FKELDFTADGAINFEEF (SEQ ID NO: 60), FKELDINQD GINLEEF (SEQ ID NO:  
 61), FKELDINQDGFINFEEF (SEQ ID NO: 62),およびFKELDS NKDQQINFEEF (SEQ ID  
 NO: 63)

10

のうちの一つである、請求項3に記載の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナ  
 ー。

【請求項5】

20

炎症に関連した状態を処置する方法において使用するための、請求項1~4のいずれか一  
 項に記載の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナー。

【請求項6】

前記状態が、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、乾癬性関節炎、免疫再構築症候群 (IRIS)、敗血症、全身性炎症反応症候群 (SIRS)、肺炎、骨髓炎、自己炎症性症候群、高垂鉛血症、全身性炎症、アテローム性動脈硬化症、急性冠症候群、心筋梗塞、糖尿病、炎症性皮膚疾患、乾癬、炎症性腸疾患、血管炎、同種移植片拒絶、糸球体腎炎、全身性エリテマトーデス、腭炎、癌、皮膚筋炎および多発性筋炎、多発性硬化症、アレルギー、感染症、肺炎症、急性肺傷害 (ALI) およびその最も重篤な型、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) から選択される、請求項5に記載の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナー。

30

【請求項7】

1種または複数種の請求項1に記載の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーと、請求項3に記載の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーとの組み合わせ

【請求項8】

単一の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーに含まれており、該免疫グロブリンまたは該タンパク質性結合パートナーが、少なくとも1つの結合二重特異性 (dual binding specificity) を有する、請求項7に記載の組み合わせ。

【請求項9】

炎症に関連した状態を処置する方法において使用するための、請求項7または8に記載の組み合わせ。

40

【請求項10】

前記状態が、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、乾癬性関節炎、免疫再構築症候群 (IRIS)、敗血症、全身性炎症反応症候群 (SIRS)、肺炎、骨髓炎、自己炎症性症候群、高垂鉛血症、全身性炎症、アテローム性動脈硬化症、急性冠症候群、心筋梗塞、糖尿病、炎症性皮膚疾患、乾癬、炎症性腸疾患、血管炎、同種移植片拒絶、糸球体腎炎、全身性エリテマトーデス、腭炎、癌、皮膚筋炎および多発性筋炎、多発性硬化症、アレルギー、感染症、肺炎症、急性肺傷害 (ALI) およびその最も重篤な型、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) から選択される、請求項9に記載の組み合わせ。

【請求項11】

50

炎症性障害に罹患している対象を処置する方法であって、請求項1に記載の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーおよび請求項3に記載の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーのうちの少なくとも一つを該対象へ投与する工程を含む、方法。

【請求項 1 2】

前記対象が哺乳動物である、請求項11に記載の方法。

【請求項 1 3】

$X_3EX_2X_3X_1X_1X_1X_1X_1X_1X_5X_1X_1X_6X_2X_1X_1$  (SEQ ID NO: 6)

の配列を含む単離されたペプチドまたはペプチド模倣体であって、 $X_1$ が、任意のアミノ酸を表し、 $X_2$ が、カルボン酸基を保有している側鎖を有するアミノ酸を表し、 $X_3$ が非極性アミノ酸を表し、 $X_5$ がD、N、E、またはQを表し、 $X_6$ が芳香族アミノ酸を表し、該ペプチドがカルシウム結合タンパク質と異なる、単離されたペプチドまたはペプチド模倣体。

10

【請求項 1 4】

SEQ ID NO:6の配列が、(a)

$MEX_2X_3DX_1NX_1DX_1QX_1X_1FEX_2X_1$  (SEQ ID NO: 7)

の配列もしくははその相同体；または(b)

$MEDX_3DX_3NX_1DX_1QX_3X_1FEEX_1$  (SEQ ID NO: 8)

の配列もしくははその相同体である、請求項13に記載の単離されたペプチドまたはペプチド模倣体。

20

【請求項 1 5】

SEQ ID NO:6の配列から本質的になる、請求項13または14に記載の単離されたペプチドまたはペプチド模倣体。

【請求項 1 6】

$X_5X_1X_1X_6X_2X_1X_1X_1X_3X_3X_3X_3X_1$  (SEQ ID NO: 9)

の配列を含む単離されたペプチドまたはペプチド模倣体であって、 $X_1$ が、任意のアミノ酸を表し、 $X_2$ が、カルボン酸基を保有している側鎖を有するアミノ酸を表し、 $X_3$ が非極性アミノ酸を表し、 $X_5$ がD、N、E、またはQを表し、かつ $X_6$ が芳香族アミノ酸を表し、該ペプチドがカルシウム結合タンパク質と異なる、単離されたペプチドまたはペプチド模倣体。

30

【請求項 1 7】

(a) SEQ ID NO:6の配列が、

$QX_1X_1FEX_2X_1X_1X_3X_3X_3X_3X_7$  (SEQ ID NO: 10)

の配列もしくははその相同体であり、 $X_7$ がRもしくはKを表すか、または(b) SEQ ID NO:6の配列が、

$QX_3X_1FEEX_1X_1MLMX_3X_7$  (SEQ ID NO: 11)

の配列もしくははその相同体であるか、または(c) SEQ ID NO:9の配列から本質的になる、請求項16に記載の単離されたペプチドまたはペプチド模倣体。

【請求項 1 8】

$X_6X_8X_5X_3X_1X_1X_1X_1X_1X_1X_1X_1NX_3X_5X_1X_6$  (SEQ ID NO: 12)

の配列またはその相同体を含む単離されたペプチドまたはペプチド模倣体であって、 $X_1$ が、任意のアミノ酸を表し、 $X_3$ が非極性アミノ酸を表し、 $X_5$ がD、N、E、またはQを表し、 $X_6$ が芳香族アミノ酸を表し、 $X_8$ が極性アミノ酸を表し、該ペプチドがカルシウム結合タンパク質と異なる、単離されたペプチドまたはペプチド模倣体。

40

【請求項 1 9】

SEQ ID NO:6の配列が、

$FX_8EX_3DX_1NX_1DX_9X_1X_{10}NX_{11}X_5EF$  (SEQ ID NO: 13)

の配列またはその相同体であり、 $X_9$ が極性アミノ酸またはGを表し、 $X_{10}$ がI、V、S、またはLを表し、 $X_{11}$ がFまたはLを表す、請求項18に記載の単離されたペプチドまたはペプチド模倣体。

50

## 【請求項 2 0】

SEQ ID NO:5の配列またはその相同体を含む単離されたペプチドまたはペプチド模倣体であって、該ペプチドがカルシウム結合タンパク質と異なる、単離されたペプチドまたはペプチド模倣体。

## 【請求項 2 1】

SEQ ID NO:1の配列またはその相同体から本質的になる、請求項20に記載の単離されたペプチドまたはペプチド模倣体。

## 【請求項 2 2】

請求項13に記載の単離されたペプチドもしくはペプチド模倣体または請求項16に記載の単離されたペプチドもしくはペプチド模倣体と、請求項18に記載の単離されたペプチドまたはペプチド模倣体との組み合わせであって、SEQ ID NO:6または9の配列を含む該ペプチド模倣体、およびSEQ ID NO:12の配列を含む該ペプチド模倣体が、単一の鎖に含まれている、組み合わせ。

10

## 【請求項 2 3】

SEQ ID NO:6の配列またはSEQ ID NO:9の配列を含む前記ペプチド、およびSEQ ID NO:12の配列またはその相同体を含む前記ペプチドが、単一のペプチド鎖に含まれている、請求項22に記載の組み合わせ。

## 【請求項 2 4】

(a) SEQ ID NO:6のペプチドをコードする配列、(b) SEQ ID NO:9のペプチドをコードする配列、および(c) SEQ ID NO:12のペプチドをコードする配列のうちの一つまたはその相同体を含む、単離された核酸分子であって、コードされた該ペプチドが全長配列カルシウム結合タンパク質と異なる、単離された核酸分子。

20

## 【請求項 2 5】

SEQ ID NO:6の配列、SEQ ID NO:9のペプチドをコードする配列、およびSEQ ID NO:12のペプチドをコードする配列のうちの一つまたはその相同体ならびに任意で発現カセットから本質的になる、請求項24に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 2 6】

ベクターに含まれている、請求項24または25に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 2 7】

以下の工程を含む、(i) SEQ ID NO:6または9のアミノ酸配列および(ii) SEQ ID NO:12のアミノ酸配列のうちの一つを含むペプチドと、TLR4受容体またはその機能的断片との間の複合体の形成を減少させることができるかまたは阻害することができる化合物を同定するインビトロ方法であって、該TLR4受容体の機能的断片が、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:3のそれぞれのための結合部位を含む、インビトロ方法：

30

(a) 該ペプチドと、該TLR4受容体またはその機能的断片と、該複合体形成に影響を与えると推測される化合物とを、互いに接触させる工程、ならびに

(b) 該ペプチドと該TLR4受容体またはその機能的断片との間の複合体の形成を検出する工程。

## 【請求項 2 8】

SEQ ID NO:6もしくは9のアミノ酸配列を含む前記ペプチドがS100A9タンパク質であり、かつ/または、SEQ ID NO:12のアミノ酸配列を含む前記ペプチドがS100A8タンパク質である、請求項27に記載の方法。

40

## 【請求項 2 9】

S100A8タンパク質またはその機能的断片と、S100A9タンパク質またはその機能的断片との間の複合体の安定性を増加させることができる化合物を同定するインビトロ方法であって、

(a) 該S100A8タンパク質またはその機能的断片と、該S100A9タンパク質またはその機能的断片と、複合体形成に影響を与えると推測される化合物とを、互いに接触させる工程、および

(b) 該S100A8タンパク質またはその機能的断片と該S100A9タンパク質またはその機能

50

的断片との間の複合体の形成を検出する工程を含む、インビトロ方法。

【請求項30】

前記S100A8タンパク質の機能的断片および/または前記S100A9タンパク質の機能的断片が、EFハンドIおよびEFハンドIIのうちの少なくとも一つを含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記S100A8タンパク質またはその機能的断片と、前記S100A9タンパク質またはその機能的断片と、前記複合体形成に影響を与えると推測される化合物とを、カルシウム、亜鉛、または銅の塩の存在下で互いに接触させる、請求項29または30に記載の方法。

10

【請求項32】

前記S100A8タンパク質またはその機能的断片と前記S100A9タンパク質またはその機能的断片との間のヘテロ四量体複合体の形成を検出し、かつ、S100A8タンパク質またはその機能的断片とS100A9タンパク質またはその機能的断片との間のヘテロ四量体複合体の安定性を増加させることができる化合物を同定する方法である、請求項29～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

前記複合体の形成を対照測定と比較する工程をさらに含む、請求項27～32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

前記対照測定が、複合体形成に影響を与えると推測される化合物の非存在下で、前記タンパク質S100A8またはその機能的断片と前記タンパク質S100A9またはその機能的断片との間の複合体の形成を検出することを含む、請求項33に記載の方法。

20

【請求項35】

炎症に関連した状態を診断する方法において使用するための、請求項1に記載の免疫グロブリンもしくはタンパク質性結合パートナーおよび/または請求項3に記載の免疫グロブリンもしくはタンパク質性結合パートナー。

【請求項36】

前記使用が分子イメージング技術を含む、請求項35に記載の使用のための免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナー。

30

【請求項37】

以下の工程を含む、対象における炎症に関連した状態の発生のリスクまたは該状態の存在を診断するインビトロ方法であって、閾値と比べて減少した、S100A8タンパク質とS100A9タンパク質との間の複合体の量により、炎症に関連した状態の発生のリスクの増大または該状態の存在が示される、インビトロ方法：該対象由来の試料において該複合体の量を検出する工程。

【請求項38】

非変性条件下で、(a)請求項1に記載の免疫グロブリンもしくはタンパク質性結合パートナーが結合特異性を有する領域とは異なるS100A9タンパク質の領域に対する、または(b)請求項3に記載の免疫グロブリンもしくはタンパク質性結合パートナーが結合特異性を有する領域とは異なるS100A8タンパク質の領域に対する結合特異性を有する、免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーと、前記試料を接触させる工程、および、結合したタンパク質S100A8と前記タンパク質S100A9との間の複合体の量を検出する工程を含み、閾値と比べて増加した、それぞれの該免疫グロブリンまたは該タンパク質性結合パートナーとの結合によって検出されたS100A8またはS100A9の量により、S100A8タンパク質とS100A9タンパク質との間の複合体の量の減少が示される、請求項37に記載の方法。

40

【請求項39】

結合したタンパク質S100A8と前記タンパク質S100A9との間の複合体の量を検出する工程が、免疫沈降、フローサイトメトリー、および質量分析のうちの一つを含む、請求項38に記載の方法。

50

**【請求項 4 0】**

非変性条件下で、請求項1に記載または請求項3に記載の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーと前記試料を接触させる工程、および、結合した前記S100A8タンパク質または前記S100A9タンパク質のそれぞれの量を検出する工程を含み、閾値と比べて増加した、該S100A8タンパク質または該S100A9タンパク質の検出された量により、S100A8タンパク質とS100A9タンパク質との間の複合体の量の減少が示される、請求項37に記載の方法。

**【請求項 4 1】**

前記免疫グロブリンまたは前記タンパク質性結合パートナーが、前記対象が属する種のペプチドに対する結合特異性を有する、請求項40に記載の方法。

10

**【請求項 4 2】**

前記免疫グロブリンまたは前記タンパク質性結合パートナーが、ヒトペプチドに対する結合特異性を有し、かつ前記対象がヒトである、請求項41に記載の方法。

**【請求項 4 3】**

前記複合体の量を対照測定と比較する工程をさらに含む、請求項37～42のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 4 4】**

前記対照測定が、炎症性障害に罹患していないことがわかっている対象に由来する試料において前記S100A8タンパク質と前記S100A9タンパク質との間の複合体の量を検出することを含む、請求項43に記載の方法。

20

**【請求項 4 5】**

(a) 非変性条件下で、(i) 請求項1に記載の免疫グロブリンもしくはタンパク質性結合パートナーが結合特異性を有する領域とは異なるS100A9タンパク質の領域に対する、または(ii) 請求項3に記載の免疫グロブリンもしくはタンパク質性結合パートナーが結合特異性を有する領域とは異なるS100A8タンパク質の領域に対する結合特異性を有する免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーと、前記対象由来の第1の試料を接触させる工程、

(b) 非変性条件下で、(i) 請求項1に記載または(ii) 請求項3に記載の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーと、該対象由来の第2の試料を接触させる工程、

(c) 該第1の試料および該第2の試料のそれぞれにおいて該タンパク質S100A8または該S100A9タンパク質の量を検出する工程、ならびに

30

(d) 該第1の試料における結合した該S100A8タンパク質または該S100A9タンパク質と該第2の試料における結合した該S100A8タンパク質または該S100A9タンパク質との差を閾値と比較する工程

を含み、該第1の試料における結合した該タンパク質と該第2の試料における結合した該タンパク質との、閾値と比べて減少した差により、炎症に関連した状態の発生のリスクの増大または該状態の存在が示される、請求項37に記載の方法。

**【請求項 4 6】**

前記閾値が、対照測定についての対応する複合体の形成に基づく、請求項45に記載の方法。

40

**【請求項 4 7】**

前記対照測定が、第3の試料における前記S100A8タンパク質または前記S100A9タンパク質の量と第4の試料における該S100A8タンパク質または該S100A9タンパク質の量との差を決定することを含み、該第3の試料および該第4の試料が、炎症性障害に罹患していないことがわかっている対象に由来する、請求項46に記載の方法。

**【請求項 4 8】**

(a) 前記第1の試料と接触させられた前記免疫グロブリンもしくは前記タンパク質性結合パートナーが、請求項1に記載の免疫グロブリンもしくはタンパク質性結合パートナーが結合特異性を有する領域と異なるS100A9タンパク質の領域に対する結合特異性を有し、かつ、前記第2の試料と接触させられた前記免疫グロブリンもしくは前記タンパク質性結

50

合パートナーが、請求項1に記載の免疫グロブリンもしくはタンパク質性結合パートナーであるか、または

(b) 該第1の試料と接触させられた該免疫グロブリンもしくは該タンパク質性結合パートナーが、請求項3に記載の免疫グロブリンもしくはタンパク質性結合パートナーが結合特異性を有する領域と異なるS100A9タンパク質の領域に対する結合特異性を有し、かつ、該第2の試料と接触させられた該免疫グロブリンもしくは該タンパク質性結合パートナーが、請求項3に記載の免疫グロブリンもしくはタンパク質性結合パートナーである、請求項45～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

前記試料が、血液試料、血漿試料、および血清試料のうちの一つである、請求項37～49のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項50】

炎症性障害に罹患している対象を処置する方法であって、請求項29に記載の方法によって入手された化合物を該対象へ投与し、それによって、該対象の体液におけるS100A8タンパク質とS100A9タンパク質との間の複合体の安定性を増加させる工程を含む、方法。

【請求項51】

炎症性障害に罹患している対象を処置する方法であって、請求項27に記載の方法によって入手された化合物を該対象へ投与し、それによって、タンパク質S100A8またはタンパク質S100A9と該対象の細胞上のTLR4受容体との間の複合体の形成を減少させるかまたは阻害する工程を含む、方法。 20

【請求項52】

生物における請求項13～21のいずれか一項に記載の単離されたペプチドまたはペプチド模倣体の結合パートナーを同定する方法であって、

(a) 該単離されたペプチドまたは該ペプチド模倣体を該生物由来の試料と接触させ、それによって、反応混合物を形成させる工程、

(b) 該単離されたペプチドまたは該ペプチド模倣体と結合パートナーとの間の複合体を該反応混合物中に形成させる工程、

(c) 該結合パートナーとの複合体に含まれている該ペプチドまたは該ペプチド模倣体を該反応混合物から単離する工程、および

(d) 該結合パートナーを分析する工程 30

【請求項53】

前記ペプチドまたは前記ペプチド模倣体を前記反応混合物から単離する工程が、免疫沈降、クロマトグラフィー、およびフローサイトメトリーのうちの一つを含む、請求項52に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2011年10月17日に欧州特許庁に提出され出願番号EP 12 183 736を正式に付与された「炎症性状態の予防、処置、および診断のための方法および化合物 (Methods And Compounds For Preventing, Treating And Diagnosing An Inflammatory Condition)」についての出願に基づく恩典および優先権を主張する。2011年10月17日に提出された該出願の内容は、PCT規則4.18に準じて、全ての表、図面、および特許請求の範囲を含み、また本明細書に含まれずPCT規則20.5(a)において引用された明細書、特許請求の範囲、または図面の任意の要素または部分も含む、事実上全体が参照によって本明細書に組み入れられる。 40

【0002】

発明の分野

本発明は、対象における炎症性状態の予防、処置、および診断のための方法および化合 50

物に関する。対象における炎症性状態の予防、処置、および診断に適した化合物を同定する方法が、さらに提供される。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

発明の背景の以下の考察は、読み手が本発明を理解するのに援助するために提供されるに過ぎず、本発明に対する先行技術を記載するものまたは構成するものとは認められない。

【0004】

無調節の炎症過程は、感染症、敗血症、敗血症性ショック、アレルギー、および自己免疫疾患、ならびに、動脈硬化症のような慢性疾患などの多くの疾患において重要な役割を果たす。特異的な適応免疫系に加えて、自然免疫系の非特異的な炎症過程も、最近注意の焦点となっている。自然免疫系は、侵入してくる病原体およびその他の外部からの有害物質に対する防御の第一線となっている。特異的な「パターン認識受容体」(PRR)による様々な病原体の保存された構造の認識は、十分特徴決定されている。PRRには、とりわけ、「病原体関連分子パターン」(PAMP)としても公知の、炎症過程の活性化を開始するトール様受容体(TLR)のファミリーが含まれる。一例として、グラム陰性菌による感染中、リポ多糖(LPS)が、食細胞におけるLPS-受容体複合体(TLR4/MD2/CD14)を介した炎症応答、とりわけ、TNF およびIL1 のような炎症誘発性サイトカインの誘導を極めて効果的に誘導する。

10

20

【0005】

TLR4を阻止する治療アプローチは、臨床研究において既に調査中である。さらに、細胞ストレスの間に活性化された細胞または壊死細胞によって放出されるタンパク質である、いわゆる「傷害関連分子パターン」(DAMP)が、ここ数年の間に同定された。これらの内在性のリガンドまたは「アラミン(Alarmin)」は、同様に、PRRを活性化し、それによって、炎症性免疫応答を増幅し、炎症反応を増強する。2種のDAMPタンパク質は、S100タンパク質ファミリーのメンバー、即ち、S100A8およびS100A9である。

【0006】

グラム陰性菌の内毒素のための結合部位に関係がある限り、そのような治療は必然的にそのような細菌産物に対する応答を同様に阻止するため、TLR4の阻止を目標とした現在の治療は、感染症の増加したリスクを包含する。従って、この有害作用を回避するアプローチによって炎症反応を阻害し得ることが望ましいと考えられる。

30

【発明の概要】

【0007】

脊椎動物門の生物における炎症反応を阻害するのに適した方法および化合物が、本明細書に提供される。従来の治療アプローチとは対照的に、本明細書に記載される方法または使用は、2種の内在性TLR4リガンド、即ちS100A8/S100A9の作用に影響を与えることを含む。そのため、そのような使用または方法は、従来のアプローチより実質的に特異的である。

【0008】

健康な個体の血中において、タンパク質S100A8およびS100A9は、不活性複合体の形態で存在する。炎症誘発機能が発揮されるためには、これらのタンパク質が活性化される必要がある。本発明者らは、この活性化機序を同定し、それによって、抗炎症治療の新規アプローチのための極めて特異的な出発点も同定した。

40

【0009】

第1の局面において、本発明は、脊椎動物S100A9タンパク質のエピトープに対する結合特異性を有する化合物を提供する。このエピトープは、Uniprot/Swissprotアクセッション番号P06702(2012年9月5日時点でバージョン147、SEQ ID NO:77)のヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置63からアミノ酸位置79までの範囲に及ぶアミノ酸に対応する領域のアミノ酸配列を有する。ヒトタンパク質S100A9との言及は、このデータベースエントリーの

50

配列のタンパク質に関する。この領域、即ち、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置63～79は、ウシタンパク質S100A9のアミノ酸位置63からアミノ酸位置79までの範囲に及ぶアミノ酸配列にも対応する。この領域は、推定ウマタンパク質S100A9 (Swissprot/Uniprotアクセッション番号F6RM82、2012年9月5日時点でバージョン10、SEQ ID NO:79) のアミノ酸位置62からアミノ酸位置78までのアミノ酸配列にも対応する。この領域は、推定マーモセットタンパク質S100A9 (Swissprot/Uniprotアクセッション番号F71D42、2012年9月5日時点でバージョン8、SEQ ID NO:80) のアミノ酸位置62からアミノ酸位置78までのアミノ酸配列にも対応する。この領域は、推定マーモセットタンパク質S100A9 (Swissprot/Uniprotアクセッション番号F71D42、2013年7月24日時点でバージョン15、SEQ ID NO:81) のアミノ酸位置62からアミノ酸位置78までのアミノ酸配列にも対応する。さらなる例として、この領域は、ウシタンパク質S100A9 (Swissprot/Uniprotアクセッション番号E1BL19、2013年5月29日時点でバージョン14、SEQ ID NO:85) のアミノ酸位置63からアミノ酸位置79までのアミノ酸配列に対応する。典型的な態様において、第1の局面による化合物は、上記のエピトープに対する結合特異性を有する免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーである。

10

**【0010】**

脊椎動物S100A9タンパク質には、脊椎動物S100A9タンパク質の天然に存在するバリエーションが含まれることが理解される。いくつかの態様において、第1の局面による化合物は、医薬として使用するための、または診断において使用するための化合物である。

**【0011】**

第2の局面において、本発明は、脊椎動物S100A9タンパク質のエピトープに対する結合特異性を有する化合物を提供する。エピトープは、SEQ ID NO:77 (下記参照) のヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置73からアミノ酸位置85までの範囲に及ぶアミノ酸配列に対応する領域のアミノ酸配列を有する。この領域は、推定ウマタンパク質S100A9 (Swissprot/Uniprotアクセッション番号F6RM82、2012年9月5日時点でバージョン10、SEQ ID NO:79) のアミノ酸位置72からアミノ酸位置84までのアミノ酸配列にも対応する。典型的な態様において、第2の局面による化合物は、上記のエピトープに対する結合特異性を有する免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーである。

20

**【0012】**

いくつかの態様において、第2の局面による化合物は、医薬として使用するための、または診断において使用するための化合物である。

30

**【0013】**

第3の局面において、本発明は、脊椎動物S100A8タンパク質のエピトープに対する結合特異性を有する化合物を提供する。エピトープは、Uniprot/Swissprotアクセッション番号P05109 (2012年9月5日時点でバージョン138、SEQ ID NO:78) を有するヒトタンパク質S100A8のアミノ酸位置55からアミノ酸位置71までの範囲に及ぶアミノ酸配列に対応する領域のアミノ酸配列を有する。ヒトタンパク質S100A8との言及は、このデータベースエントリーの配列のタンパク質に関する。この領域、即ち、ヒトタンパク質S100A8のアミノ酸位置55～71は、推定オポッサムタンパク質S100A8 (Swissprot/Uniprotアクセッション番号F6SK92、2012年9月5日時点でバージョン9、SEQ ID NO:82) のアミノ酸位置58からアミノ酸位置73までのアミノ酸配列にも対応する。典型的な態様において、第3の局面による化合物は、上記のエピトープに対する結合特異性を有する免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーである。

40

**【0014】**

脊椎動物S100A8タンパク質には、脊椎動物S100A8タンパク質の天然に存在するバリエーションが含まれることが理解される。いくつかの態様において、第3の局面による化合物は、医薬として使用するための、または診断において使用するための化合物である。

**【0015】**

第4の局面において、本発明は、第1の局面による化合物と第3の局面による化合物との組み合わせを提供する。いくつかの態様において、組み合わせは、第2の局面による化合

50

物をさらに含む。いくつかの態様において、第4の局面による組み合わせは、単一の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーなどの単一の化合物に含まれている。そのような免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーは、典型的には、少なくとも1つの結合二重特異性(dual binding specificity)を有する。

【0016】

いくつかの態様において、第4の局面による組み合わせは、医薬として使用するための、または診断において使用するための組み合わせである。

【0017】

第5の局面において、本発明は、第2の局面による化合物と第3の局面による化合物との組み合わせを提供する。いくつかの態様において、第5の局面による組み合わせは、単一の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーなどの単一の化合物に含まれている。そのような免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーは、典型的には、少なくとも1つの結合二重特異性を有する。

10

【0018】

いくつかの態様において、第5の局面による組み合わせは、医薬として使用するための、または診断において使用するための組み合わせである。

【0019】

第6の局面において、本発明は、第1の局面による化合物と第2の局面による化合物との組み合わせを提供する。いくつかの態様において、第6の局面による組み合わせは、単一の免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーなどの単一の化合物に含まれている。そのような免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーは、典型的には、少なくとも1つの結合二重特異性を有する。

20

【0020】

いくつかの態様において、第6の局面による組み合わせは、医薬として使用するための、または診断において使用するための組み合わせである。

【0021】

第7の局面において、本発明は、炎症性障害に罹患している対象を処置する方法を提供する。方法は、第1の局面による化合物および/または第2の局面による化合物を対象へ投与する工程を含む。

【0022】

第8の局面において、本発明は、炎症性障害に罹患している対象を処置する方法を提供する。方法は、第3の局面による化合物を対象へ投与する工程を含む。

30

【0023】

第9の局面において、本発明は、炎症性障害に罹患している対象を処置する方法を提供する。方法は、第4、第5、または第6の局面による組み合わせを対象へ投与する工程を含む。

【0024】

第10の局面において、本発明は、単離されたペプチドまたはペプチド模倣体を提供する。ペプチドまたはペプチド模倣体は、

$X_3EX_2X_3X_1X_1X_1X_1X_1X_1X_5X_1X_1X_6X_2X_1X_1$  (SEQ ID NO: 6)

の配列を含むか、該配列から本質的になるか、または該配列からなる。この配列および本書に開示されたその他の配列において、 $X_1$ は、任意のアミノ酸を表す。この配列および本書に開示されたその他の配列において、 $X_2$ は、カルボン酸基を保有している側鎖を有するアミノ酸を表す。この配列および本書に開示されたその他の配列において、 $X_3$ は、非極性アミノ酸を表す。この配列および本書に開示されたその他の配列において、 $X_5$ は、アミノ酸D、N、E、またはQのうちの一つを表す。この配列および本書に開示されたその他の配列において、 $X_6$ は、芳香族アミノ酸を表す。

40

【0025】

一般に、第10の局面によるペプチドは、全長カルシウム結合タンパク質と異なる。いくつかの態様において、第10の局面によるペプチド模倣体は、全長タンパク質カルグラニユ

50

リンBであるS100A9のような全長S100タンパク質の配列と異なる配列を有する。

【 0 0 2 6 】

第10の局面によるペプチドは、典型的には、120アミノ酸またはそれ未満などの、150アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、100アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、80アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、60アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、50アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、40アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、30アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。

10

【 0 0 2 7 】

いくつかの態様において、第10の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$X_3EX_2X_3X_2X_1X_4X_1X_5X_1X_5X_1X_1X_6X_2X_2X_1$  (SEQ ID NO: 66)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

【 0 0 2 8 】

いくつかの態様において、第10の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$X_3EX_2X_3X_2X_1X_4X_1X_5X_1QX_1X_6X_1EX_2X_1$  (SEQ ID NO: 64)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。この配列および本書に開示されたその他の配列において、 $X_4$ は、アミノ酸NまたはQの一方を表す。

20

【 0 0 2 9 】

いくつかの態様において、第10の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$MEX_2X_1X_1X_1NX_1X_1QX_1X_1FEX_1X_1$  (SEQ ID NO: 67)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

30

【 0 0 3 0 】

いくつかの態様において、第10の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$MEX_2X_3X_8X_1X_1X_1X_1QX_1X_1FEX_8X_1$  (SEQ ID NO: 74)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。この配列および本書に開示されたその他の配列において、 $X_8$ は極性アミノ酸を表す。

【 0 0 3 1 】

いくつかの態様において、第10の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$MEX_2X_3X_8X_1X_8X_1X_8X_1QX_1X_1FEX_2X_1$  (SEQ ID NO: 75)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

40

【 0 0 3 2 】

いくつかの態様において、第10の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$MEX_2X_3X_2X_1X_2X_1X_2X_1QX_1X_1FEX_8X_1$  (SEQ ID NO: 76)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、ま

50

たは該配列もしくはその相同体からなる。

【0033】

いくつかの態様において、第10の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

MEX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>DX<sub>1</sub>NX<sub>1</sub>DX<sub>1</sub>QX<sub>1</sub>X<sub>1</sub>FEX<sub>2</sub>X<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 7)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

【0034】

いくつかの態様において、第10の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

MEDX<sub>3</sub>X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>X<sub>1</sub>DX<sub>1</sub>QX<sub>3</sub>X<sub>1</sub>FEX<sub>1</sub>X<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 72)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

【0035】

いくつかの態様において、第10の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

MEDX<sub>3</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>5</sub>X<sub>1</sub>X<sub>5</sub>X<sub>1</sub>QX<sub>3</sub>X<sub>1</sub>FEX<sub>2</sub>X<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 73)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

【0036】

いくつかの態様において、第10の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

MEDX<sub>3</sub>DX<sub>3</sub>NX<sub>1</sub>DX<sub>1</sub>QX<sub>3</sub>X<sub>1</sub>FEEX<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 8)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

【0037】

いくつかの態様において、第10の局面のペプチドまたはペプチド模倣体は、SEQ ID NO: 6の配列の相同体からなるか、該相同体を含むか、または該相同体から本質的になる。

【0038】

第11の局面において、本発明は、単離されたペプチドまたはペプチド模倣体を提供する。ペプチドまたはペプチド模倣体は、

X<sub>5</sub>X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>6</sub>X<sub>2</sub>X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>X<sub>3</sub>X<sub>3</sub>X<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 9)

の配列を含むか、該配列から本質的になるか、または該配列からなる。この配列において、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>5</sub>、およびX<sub>6</sub>は、上記定義の通りである。一般に、第11の局面によるペプチドは、カルシウム結合タンパク質と異なる。いくつかの態様において、第11の局面によるペプチド模倣体は、カルシウム結合タンパク質の配列と異なる配列を有する。

【0039】

一般に、第11の局面によるペプチドは、全長カルシウム結合タンパク質と異なる。いくつかの態様において、第11の局面によるペプチド模倣体は、全長タンパク質カルグラニューリンBであるS100A9のような全長S100タンパク質の配列と異なる配列を有する。

【0040】

第11の局面によるペプチドは、典型的には、120アミノ酸またはそれ未満などの、150アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、100アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、80アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、60アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、50アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、40アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、30アミノ酸またはそれ未満の長さを有

10

20

30

40

50

する。

【 0 0 4 1 】

いくつかの態様において、第11の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$X_5X_1X_1X_6X_2X_2X_1X_1X_3X_3X_3X_3X_1$  (SEQ ID NO: 68)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

【 0 0 4 2 】

いくつかの態様において、第11の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$QX_1X_1FEX_2X_1X_1X_3X_3X_3X_3X_7$  (SEQ ID NO: 10)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。この配列および本書に開示されたその他の配列において、 $X_7$ は、アミノ酸RまたはKの一方を表す。

【 0 0 4 3 】

いくつかの態様において、第11の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$QX_1X_6X_1EX_2X_1X_1X_3X_3X_3X_3X_7$  (SEQ ID NO: 65)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

【 0 0 4 4 】

いくつかの態様において、第11の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$QX_3X_1FEEX_1X_1MLMX_3X_7$  (SEQ ID NO: 11)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。いくつかの態様において、第11の局面のペプチドまたはペプチド模倣体は、SEQ ID NO:6の配列の相同体からなるか、該相同体を含むか、または該相同体から本質的になる。

【 0 0 4 5 】

第12の局面において、本発明は、単離されたペプチドまたはペプチド模倣体を提供する。

ペプチドまたはペプチド模倣体は、

$X_6X_8X_5X_3X_1X_1X_1X_1X_1X_1X_1X_1NX_3X_5X_1X_6$  (SEQ ID NO: 12)

の配列もしくはこの配列の相同体を含むか、該配列もしくは該相同体から本質的になるか、または該配列もしくは該相同体からなる。この配列において、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_5$ 、および $X_6$ は、上記定義の通りである。 $X_5$ は、D、N、E、またはQを表す。この配列および本書に開示されたその他の配列において、 $X_8$ は、極性アミノ酸を表す。一般に、第12の局面によるペプチドまたはペプチド模倣体は、カルシウム結合タンパク質と異なる。

【 0 0 4 6 】

いくつかの態様において、第12の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$FX_8X_5X_3X_1X_1X_1X_1X_1X_1X_1X_1NX_3X_5X_1F$  (SEQ ID NO: 2)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

【 0 0 4 7 】

いくつかの態様において、第12の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$FX_8X_5X_3X_1X_1X_8X_1X_1X_1X_1X_1NX_3X_5X_1F$  (SEQ ID NO: 4)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

【 0 0 4 8 】

いくつかの態様において、第12の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$FX_8X_5X_3X_1X_1X_8X_1X_1X_1X_1X_1NX_3X_5X_1F$  (SEQ ID NO: 4)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、第12の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$\text{FX}_8\text{X}_5\text{X}_3\text{X}_2\text{X}_1\text{X}_8\text{X}_1\text{DX}_1\text{X}_1\text{X}_1\text{NX}_3\text{X}_5\text{X}_1\text{F}$  (SEQ ID NO: 69)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

【0049】

いくつかの態様において、第12の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$\text{FX}_8\text{X}_5\text{X}_3\text{X}_2\text{X}_1\text{X}_8\text{X}_1\text{X}_1\text{X}_1\text{X}_1\text{NX}_3\text{X}_5\text{EF}$  (SEQ ID NO: 70)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

【0050】

いくつかの態様において、第12の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$\text{FX}_8\text{X}_5\text{X}_3\text{X}_2\text{X}_1\text{X}_8\text{X}_1\text{X}_1\text{X}_1\text{X}_1\text{NX}_3\text{X}_5\text{EF}$  (SEQ ID NO: 71)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。

【0051】

いくつかの態様において、第12の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体は、

$\text{FX}_8\text{EX}_3\text{DX}_1\text{NX}_1\text{DX}_9\text{X}_1\text{X}_{10}\text{NX}_{11}\text{X}_5\text{EF}$  (SEQ ID NO: 13)

の配列もしくはその相同体を含むか、該配列もしくはその相同体から本質的になるか、または該配列もしくはその相同体からなる。いくつかの態様において、第12の局面のペプチドまたはペプチド模倣体は、SEQ ID NO:6の配列の相同体からなるか、該相同体を含むか、または該相同体から本質的になる。

【0052】

一般に、第12の局面によるペプチドは、全長カルシウム結合タンパク質と異なる。いくつかの態様において、第12の局面によるペプチドまたはペプチド模倣体は、S100A8のような全長S100タンパク質の配列と異なる配列を有する。いくつかの態様において、第12の局面によるペプチドまたはペプチド模倣体は、カルモジュリンタンパク質の配列と異なる配列を有する。

【0053】

第12の局面によるペプチドは、典型的には、120アミノ酸またはそれ未満などの、130アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、100アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、80アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、60アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、50アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、40アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、30アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。

【0054】

本明細書に開示された所定の配列について、配列に含まれている $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{X}_3$ 、 $\text{X}_4$ 、 $\text{X}_5$ 、 $\text{X}_6$ 、 $\text{X}_7$ 、 $\text{X}_8$ 、 $\text{X}_9$ 、 $\text{X}_{10}$ 、 $\text{X}_{11}$ 、 $\text{X}_{12}$ 、 $\text{X}_{13}$ 、 $\text{X}_{14}$ 、または $\text{X}_{15}$ のような適切なアミノ酸の群および/または亜群を含む、配列の選択されたアミノ酸位置についての個々のアミノ酸の態様のいずれかは、それ自体、他の相同配列における示された選択された位置における任意の他のアミノ酸、適切なアミノ酸の群および/または亜群と組み合わせられ得る。従って、本明細書に開示されたペプチドまたはペプチド模倣体の様々な態様における位置での個々のアミノ酸は、それぞれのペプチドまたはペプチド模倣体のさらなる態様をさらに提供するため、互いに組み合わせられ得る。特定の配列の態様として示されたそのようなアミノ

10

20

30

40

50

酸、アミノ酸の群または亜群が、他の配列のアミノ酸位置に対応する場合、これらのアミノ酸、アミノ酸の群または亜群は、そのような配列に関して示されたアミノ酸、アミノ酸の群または亜群と、いずれかの配列において、個々に組み合わせられ得る。以下に示される適切なアミノ酸の群および/または亜群を含む、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、または $X_4$ のような総称型変数によって表示された選択された位置、即ち、特定の配列の態様として示されたアミノ酸またはアミノ酸の群/亜群の位置における個々のアミノ酸の態様にも、同一のことが当てはまる。従って、配列が、例えば、 $X_7$ として示されたアミノ酸および $X_5$ として示されたアミノ酸を含む場合、Rである $X_7$ およびKである $X_7$ と、 $X_5$ を表すD、N、E、またはQのいずれかとの組み合わせのいずれかが、本書の開示に含まれる。例示的な例として、Rである $X_7$ とDである $X_5$ との組み合わせが、Rである $X_7$ とQである $X_5$ との組み合わせ、またはKである $X_7$ とDである $X_5$ との組み合わせと同等に含まれる。

10

## 【0055】

第13の局面において、本発明は、第10の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体と、第12の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体との組み合わせを提供する。いくつかの態様において、組み合わせは、第11の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体をさらに含む。いくつかの態様において、第13の局面によるペプチドまたはペプチド模倣体の組み合わせは、単一のペプチドまたはペプチド模倣体に含まれている。

## 【0056】

いくつかの態様において、第13の局面による組み合わせは、医薬として使用するための、または診断において使用するための組み合わせである。

20

## 【0057】

第14の局面において、本発明は、第11の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体と、第12の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体との組み合わせを提供する。いくつかの態様において、第14の局面によるペプチドまたはペプチド模倣体の組み合わせは、単一のペプチドまたはペプチド模倣体に含まれている。

## 【0058】

いくつかの態様において、第14の局面による組み合わせは、医薬として使用するための、または診断において使用するための組み合わせである。

## 【0059】

第15の局面において、本発明は、第10の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体と、第11の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体との組み合わせを提供する。いくつかの態様において、第15の局面によるペプチドまたはペプチド模倣体の組み合わせは、単一のペプチドまたはペプチド模倣体に含まれる。

30

## 【0060】

いくつかの態様において、第15の局面による組み合わせは、医薬として使用するための、または診断において使用するための組み合わせである。

## 【0061】

上述のように、第10の局面によるペプチドもしくはペプチド模倣体、第11の局面によるペプチドもしくはペプチド模倣体、および/または第12の局面によるペプチドもしくはペプチド模倣体は、いくつかの態様において、共通のペプチドに、ペプチド模倣体に、またはペプチドとペプチド模倣体とのハイブリッドに含まれていてもよい。いくつかの態様において第13、第14、および/または第15の局面の組み合わせは、単一のペプチドもしくはペプチド模倣体に、またはそれぞれのペプチド/ペプチド模倣体ハイブリッドに包含されている。

40

## 【0062】

第16の局面において、本発明は、単離された核酸分子を提供する。核酸分子は、SEQ ID NO:6の配列を有するペプチドをコードする配列を含む。一般に、コードされたペプチドは、カルシウム結合タンパク質の全長配列と異なる。コードされたペプチドは、典型的には、全長タンパク質カルグラニユリンBであるS100A9のような全長S100タンパク質と異な

50

る。

【0063】

第16の局面の核酸分子によってコードされたペプチドは、典型的には、120アミノ酸またはそれ未満などの、150アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、100アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、75アミノ酸または70アミノ酸のような、80アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、60アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、例えば、45アミノ酸を含む、50アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、40アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、30アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。

10

【0064】

第17の局面において、本発明は、単離された核酸分子を提供する。核酸分子は、SEQ ID NO:9の配列を有するペプチドをコードする配列を含む。一般に、コードされたペプチドは、カルシウム結合タンパク質の全長配列と異なる。コードされたペプチドは、典型的には、全長タンパク質カルグラニユリンBであるS100A9のような全長S100タンパク質と異なる。

【0065】

コードされたペプチドは、典型的には、120アミノ酸またはそれ未満などの、150アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、95アミノ酸、90アミノ酸、または85アミノ酸などの、100アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、80アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、60アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、50アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、40アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、30アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。

20

【0066】

第18の局面において、本発明は、単離された核酸分子を提供する。核酸分子は、SEQ ID NO:12の配列またはその相同体を有するペプチドをコードする配列を含む。一般に、コードされたペプチドは、カルシウム結合タンパク質の全長配列と異なる。

30

【0067】

一般に、第18の局面による核酸分子によってコードされたペプチドは、全長カルシウム結合タンパク質と異なる。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、S100A8のような全長S100タンパク質の配列と異なる配列を有する。いくつかの態様において、コードされたペプチドは、カルモジュリンタンパク質の配列と異なる配列を有する。

【0068】

第18の局面の核酸分子によってコードされたペプチドは、典型的には、120アミノ酸またはそれ未満などの、130アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、100またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、80アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、60アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、50アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、35アミノ酸のような、40アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には、30アミノ酸またはそれ未満の長さを有する。

40

【0069】

第19の局面において、本発明は、単離された核酸分子を提供する。核酸分子は、SEQ ID NO:6の配列を有するペプチドをコードする配列と、SEQ ID NO:12の配列を有するペプチドをコードする配列との組み合わせを含む。いくつかの態様において、第19の局面による

50

核酸分子は、SEQ ID NO:9の配列を有するペプチドをコードする配列をさらに含む。

【0070】

第20の局面において、本発明は、単離された核酸分子を提供する。核酸分子は、SEQ ID NO:9の配列を有するペプチドをコードする配列と、SEQ ID NO:12の配列を有するペプチドをコードする配列との組み合わせを含む。

【0071】

第21の局面において、本発明は、単離された核酸分子を提供する。核酸分子は、SEQ ID NO:6の配列を有するペプチドをコードする配列と、SEQ ID NO:9の配列を有するペプチドをコードする配列との組み合わせを含む。

【0072】

第22の局面において、本発明は、ペプチドおよび/またはペプチド模倣体とツール様受容体4 (TLR4) タンパク質またはTLR4受容体タンパク質の機能的断片との間の複合体の形成を減少できるかまたは阻害できる化合物を同定するインビトロ方法を提供する。ペプチドおよび/またはペプチド模倣体は、(i) SEQ ID NO:6もしくは9のアミノ酸配列および/または(ii) SEQ ID NO:12のアミノ酸配列を含む。TLR4受容体の機能的断片は、適宜、SEQ ID NO:1および/またはSEQ ID NO:3のための結合部位を含む。方法は、一般に、ペプチドおよび/またはペプチド模倣体を準備する工程を含む。方法は、一般に、TLR4受容体またはTLR4受容体の機能的断片を準備する工程も含む。さらに、方法は、一般に、ペプチドおよび/またはペプチド模倣体とTLR4受容体またはTLR4受容体の機能的断片との間の複合体の形成に影響を与えると推測される化合物を準備する工程を含む。さらに、方法は、ペプチドおよび/またはペプチド模倣体とTLR4受容体またはその機能的断片と化合物とを、互いに接触させる工程を含む。方法は、ペプチドおよび/またはペプチド模倣体とTLR4受容体またはTLR4受容体の機能的断片との間の複合体の形成を検出する工程も含む。上述のように、SEQ ID NO:6または9の配列を有するペプチドおよび/またはペプチド模倣体、ならびにSEQ ID NO:12の配列を有するペプチドおよび/またはペプチド模倣体は、いくつかの態様において、共通のペプチド、ペプチド模倣体、またはペプチド/ペプチド模倣体ハイブリッドに含まれていてもよい。

【0073】

第22の局面による方法のいくつかの態様において、検出は、適切な分光学的技術、光化学的技術、測光技術、蛍光測定技術、放射線学的技術、酵素技術、または熱力学的技術によって実施される。

【0074】

いくつかの態様において、第22の局面による方法は、複合体の形成を対照測定と比較する工程を含む。そのような対照測定は、例えば、複合体形成に影響を与えると推測される化合物の非存在下で、ペプチドおよび/またはペプチド模倣体とTLR4タンパク質またはその機能的断片との間の複合体の形成を検出することを含む。

【0075】

第23の局面において、本発明は、S100A8タンパク質またはS100A8タンパク質の機能的断片とS100A9タンパク質またはS100A9タンパク質の機能的断片との間の複合体の安定性を増加させることができる化合物を同定するインビトロ方法を提供する。方法は、一般に、S100A8タンパク質またはS100A8タンパク質の機能的断片を準備する工程を含む。方法は、一般に、S100A9タンパク質またはS100A9タンパク質の機能的断片を準備する工程も含む。方法は、一般に、S100A8タンパク質またはS100A8タンパク質の機能的断片とS100A9タンパク質またはS100A9タンパク質の機能的断片との間の複合体の形成に影響を与えると推測される化合物を準備する工程をさらに含む。方法は、S100A8タンパク質またはS100A8タンパク質の機能的断片と、S100A9タンパク質またはS100A9タンパク質の機能的断片と、複合体形成に影響を与えると推測される化合物とを、互いに接触させる工程も含む。方法は、S100A8タンパク質またはS100A8タンパク質の機能的断片とS100A9タンパク質またはS100A9タンパク質の機能的断片との間の複合体の形成を検出する工程をさらに含む。

【0076】

第23の局面による方法のいくつかの態様において、S100A8タンパク質の機能的断片および/またはS100A9タンパク質の機能的断片は、EFハンドIおよびEFハンドIIのうちの少なくとも一つを含有している。第23の局面による方法のいくつかの態様において、S100A8タンパク質またはその機能的断片と、S100A9タンパク質またはその機能的断片と、複合体形成に影響を与えると推測される化合物とを、カルシウムの塩の存在下で互いに接触させる。第23の局面による方法のいくつかの態様において、S100A8タンパク質またはその機能的断片と、S100A9タンパク質またはその機能的断片と、それぞれの化合物とを、亜鉛の塩の存在下で互いに接触させる。第23の局面による方法のいくつかの態様において、S100A8タンパク質またはその機能的断片と、S100A9タンパク質またはその機能的断片と、それぞれの化合物とを、銅の塩の存在下で互いに接触させる。

10

## 【0077】

いくつかの態様において、第23の局面による方法は、S100A8タンパク質またはその機能的断片とS100A9タンパク質またはその機能的断片との間のヘテロ四量体複合体の形成を検出する工程を含む。そのような態様の方法は、S100A8タンパク質またはその機能的断片とS100A9タンパク質またはその機能的断片との間のヘテロ四量体複合体の安定性を増加させることができる化合物を同定する方法である。

## 【0078】

第23の局面による方法のいくつかの態様において、検出は、適切な分光学的技術、光化学的技術、測光技術、蛍光測定技術、放射線学的技術、酵素技術、または熱力学的技術によって実施される。

20

## 【0079】

いくつかの態様において、第23の局面による方法は、複合体の形成を対照測定と比較する工程を含む。そのような対照測定は、例えば、複合体形成に影響を与えると推測される化合物の非存在下で、S100A8タンパク質またはその機能的断片とS100A9タンパク質またはその機能的断片との間の複合体の形成を検出することを含む。

## 【0080】

S100A8タンパク質またはその機能的断片とS100A9タンパク質またはその機能的断片との間の複合体の安定性を増加させる化合物は、単量体型のS100A8およびS100A9との間、ヘテロ二量体複合体S100A8/S100A9間、およびヘテロ四量体複合体(S100A8/S100A9)<sub>2</sub>間に存在する平衡に影響を与える。従って、一般に、より多くのヘテロ四量体複合体が形成される。その結果として、TLR4受容体へ結合することができる使用可能なヘテロ二量体複合体は少なくなる。

30

## 【0081】

第23の局面による方法のいくつかの態様において、S100A8タンパク質またはS100A8タンパク質の機能的断片と、S100A9タンパク質またはS100A9タンパク質の機能的断片と、複合体形成に影響を与えると推測される化合物とをカルシウムの存在下で互いに接触させる。

## 【0082】

いくつかの態様において、第23の局面による方法は、S100A8タンパク質またはS100A8タンパク質の機能的断片とS100A9タンパク質またはS100A9タンパク質の機能的断片との間のヘテロ四量体複合体の安定性を増加させることができる化合物を同定するインビトロ方法である。典型的には、そのような方法は、S100A8タンパク質またはS100A8タンパク質の機能的断片とS100A9タンパク質またはS100A9タンパク質の機能的断片との間のヘテロ四量体複合体の形成を検出する工程を含む。

40

## 【0083】

第24の局面において、本発明は、対象における炎症に関連した状態の発生のリスクまたは該状態の存在を診断する方法を提供する。方法は、対象由来の試料においてS100A8タンパク質とS100A9タンパク質との間の複合体の量を検出する工程を含む。閾値と比べて減少した複合体の量により、炎症に関連した状態の発生のリスクの増大または該状態の存在が示される。

## 【0084】

50

第25の局面において、本発明は、炎症性障害に罹患している対象を処置する方法を提供する。方法は、第23の局面の方法によって入手された化合物を対象へ投与する工程を含む。化合物の投与は、対象の体液におけるS100A8タンパク質とS100A9タンパク質との間の複合体の安定性が増加することを可能にすることを含む。

【0085】

第26の局面において、本発明は、炎症性障害に罹患している対象を処置する方法を提供する。方法は、第22の局面による方法によって入手された化合物を対象へ投与する工程を含む。化合物の投与は、タンパク質S100A8またはタンパク質S100A9と対象の細胞上のTLR4受容体との間の複合体の形成が減少するかまたは阻害されることを可能にすることを含む。

10

【0086】

第27の局面において、本発明は、生物における第10、第11、および/または第12の局面による単離されたペプチドまたはペプチド模倣体の結合パートナーを同定する方法を提供する。方法は、一般に、インビトロ方法である。方法は、ペプチドまたはペプチド模倣体を生物由来の試料と接触させる工程を含む。試料を、ペプチドまたはペプチド模倣体の結合パートナーの存在について分析される。いくつかの態様において、試料を、ペプチドまたはペプチド模倣体の結合パートナーの同一性についても分析する。ペプチドまたはペプチド模倣体を試料と接触させることによって、反応混合物を形成させる。方法は、単離されたペプチドまたはペプチド模倣体と結合パートナーとの間の複合体が、反応混合物中に形成されることを可能にする工程も含む。さらに、方法は、反応混合物からペプチドまたはペプチド模倣体を単離する工程を含む。ペプチドまたはペプチド模倣体は、結合パートナーとの複合体の中にまだ存在する。方法は、結合パートナーを分析する工程をさらに含む。結合パートナーの分析は、分子量のような一つまたは複数の物理的特性の決定を含み得る。結合パートナーの分析は、それがペプチドもしくはタンパク質であるか、核酸分子であるか、脂質であるか、多糖であるか、細胞であるか、ウイルスであるか、またはその他の物質であるかの判定も含み得る。結合パートナーが、ペプチドもしくはタンパク質、多糖、または核酸分子である場合、結合パートナーの配列をさらに分析することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0087】

30

【図1】ヒト単球を、示された濃度の(A)組換えヒトS100A8、組換えヒトS100A9、またはヒトS100A8/S100A9、(B)組換えヒトS100A8/S100A9、組換えヒトS100A8/S100A9(N69A)、またはS100A8/S100A9(E78A)によって4時間刺激した。培養培地へ放出されたTNF $\alpha$ を、ELISAによって定量化した。

【図2A】ヒトS100A9ホモ二量体の3D構造の断面図を示す。2個のS100単量体は灰色の影で示されている。ホモ二量体型でのみアクセス可能であり、ヘテロ二量体型ではアクセス可能でない領域は、白色で示されている。いくつかのアミノ酸が、ヒト配列における位置によって示されている。

【図2B】ヒトS100A9のアミノ酸配列の一部を示す。溶媒へアクセス可能であり、カルシウム配位に関与しないかまたは骨格を介してのみカルシウム配位に関与する6個のアミノ酸(位置64、65、72、73、77、および85)を、変異研究のために選択した。

40

【図3A】示された時点でのヒトS100A9のトリプシン消化。単球を断片の混合物によって4時間刺激し、ELISAを介してTNF $\alpha$ の放出を定量化した。挿入図は、まだ完全であるS100A9を検出するためのウエスタンブロットを示す。

【図3B】ヒトS100A9のトリプシン消化によって生成された断片を、TLR4/MD2がカップリングされているビーズと共にインキュベートした。ビーズに結合した断片を、MALDI質量分析を介して同定した。17種の可能性のあるペプチドのうち、S100A9のC末端EFハンドの一部に対応する単一のペプチド(15番:位置73~85のアミノ酸)のみが、TLR4/MD2との特異的な相互作用を示すものとして検出され得た。

【図3C】図1Bと同様の、対照ペプチドの消化の後のMALDI質量分析を示す。ペプチドは

50

、TLR4/MD2との結合にとって重要である可能性が最も高い4個のアミノ酸（E64A、D65A、Q73A、およびE77A、S100A9の名称が維持された）、さらに、アミノ酸K72Aがアラニンに交換された、S100A9のアミノ酸位置63～79の配列を有していた（63-79 5A、分子量：1758g/mol）。

【図3D】同定されたペプチドの配列を示す。隣接アミノ酸が括弧内に示される。

【図3E】TLR4/MD2に対するS100A9ペプチドおよびS100A8ペプチドの免疫沈降試験の構成を概略的に例示する。1 = アガロースビーズ；2 = ペプチド；3 = TLR4/MD2。

【図4】MALDI-TOF質量分析による溶出液の分析を示す。溶出液は、位置63～79（A）および位置63～79 A5（B、C）に対応するペプチドをTLR4/MD2複合体へカップリングした後に入手された。

10

【図5A】MALDI-TOF質量分析による溶出液の分析を示す。溶出液は、位置55～71に対応するペプチドをTLR4/MD2複合体にカップリングした後に入手された。

【図5B】MALDI-TOF質量分析による溶出液の分析を示す。溶出液は、位置55～71 A3に対応するペプチドをTLR4/MD2複合体にカップリングした後に入手された。

【図6A】TLR4/MD2に対するS100A9タンパク質およびS100A9変異体の結合試験の構成を概略的に例示する。

【図6B】S100A9ホモ二量体またはその変異体のTLR4/MD2との結合を検出した分析の結果を示す。変異体は、示されるような改変型アミノ酸を含有していた、即ち、E64、D65、K72、Q73、E77、またはR85に、天然に存在するアミノ酸の代わりにアラニンを含有していた。

20

【図6C】S100A9ホモ二量体またはその変異体のTLR4/MD2との結合を検出した分析の結果を示す。変異体は、示されるような2個の改変型アミノ酸を含有していた、即ち、E64およびD65；Q73およびE77；E64およびQ73；ならびにD65およびQ73の両方に、天然に存在するアミノ酸の代わりにアラニンを含有していた。

【発明を実施するための形態】

【0088】

発明の詳細な説明

本発明は、一般に、生物の炎症反応の調節において使用することができる化合物および方法に関するものと理解され得る。より具体的には、S100A8タンパク質および/またはS100A9タンパク質のTLR4受容体との相互作用を調節するための化合物および方法が、提供される。

30

【0089】

タンパク質名「S100」は、そのタンパク質が100%硫酸アンモニウムに可溶性であるために最初に選ばれた。MRP8およびMRP14、カルグラニューリンAおよびカルグラニューリンBとしても公知のS100A8およびS100A9は、それぞれ、Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質のS100ファミリーの2種のメンバーである。S100A8およびS100A9は、好中球、単球、およびいくつかの上皮細胞において構成的に発現されているが、組織マクロファージまたはリンパ球においては一般に発現されていない。単球および好中球顆粒球は、主としてS100A8/S100A9ヘテロ二量体として、大量にこれらのタンパク質を発現している。S100A8タンパク質およびS100A9タンパク質は、顆粒球の可溶性サイトゾル内容物のおよそ40～50%に寄与する。好中球、活性化単球、およびマクロファージは、ストレス、感染症、炎症、組織損傷、および敗血症性ショックに反応してこれらのタンパク質を産生する。S100A8およびS100A9は、炎症の部位において特異的にエネルギー依存的に放出され、それは厳密に調節されている。S100A8およびS100A9は、重要な傷害関連分子パターン（DAMP）分子である。S100A8/S100A9複合体は、単球上のTLR4の内在性リガンドである。S100A8およびS100A9の両方が、TLR4受容体複合体に直接結合し、公知の古典的なシグナル伝達カスケードを介して、炎症誘発エフェクター機序を誘導する。従って、S100A8/S100A9は、炎症の病因における重要な因子である。

40

【0090】

S100A8およびS100A9は、既に、慢性および急性の炎症のための生化学的マーカーとして

50

用いられている。両S100タンパク質は、多くの炎症反応、例えば、敗血症、肺および皮膚の感染症、関節炎、ならびに自己免疫疾患において強力な炎症誘発活性を示す。膝関節へのS100A8の直接適用は、例えば、重篤な関節炎症および軟骨の破壊を引き起こす。T細胞依存性自己免疫疾患の実験マウスモデルにおいても、両タンパク質は、自己反応性CD8+T細胞の生成および活性化を誘導し、IL17によって媒介される免疫応答の増加をもたらす。

#### 【0091】

カルシウム結合性サイトゾル分子S100タンパク質は、中央ヒンジ領域によって接続された、カルシウムに対する異なる親和性を有する2個のカルシウム結合EFハンドを特徴とする。EFハンドモチーフは、中央のカルシウム結合ループに隣接する2個のヘリックスを有しており、従って、古典的なヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフをもたらす。S100A8およびS100A9は、以後、それぞれホモ二量体複合体およびヘテロ二量体複合体とも呼ばれる、1個のホモ二量体およびS100A8/A9 (MRP8/14、カルプロテクチン)として公知のヘテロ二量体を形成することができ、さらに高度のオリゴマー型も形成することもできる。S100A8およびS100A9は、以後、ヘテロ四量体複合体とも呼ばれる、ヘテロ四量体を形成することも見出されている。四量体形成は、カルシウムの存在に厳密に依存しており、カルシウムの非存在下では、ヘテロ二量体がS100A8およびS100A9の好ましい型である。

#### 【0092】

本発明は、TLR4受容体に対するS100A8タンパク質内の結合部位およびS100A9タンパク質内の結合部位の同定に基づく。本発明は、S100A8タンパク質およびS100A9タンパク質の両方のTLR4受容体のための結合部位が、言及のしやすさのため(S100A8/S100A8)<sub>2</sub>とも呼ばれるヘテロ四量体複合体の形成の間にアクセス不可能になるという驚くべき所見にさらに基づく。図1Aから理解されるように、S100A8とS100A9との間のヘテロ四量体複合体は、単球において炎症応答を誘導しないが、個々のタンパク質S100A8およびS100A9は、単球において特定の強力な炎症誘発応答を誘導する。この応答は、LPSによる刺激と比較可能である。同様に、S100A8およびS100A9のホモ二量体も、この応答を誘導する。

#### 【0093】

CD284とも名付けられたトール様受容体4またはTLR4受容体は、グラム陰性菌の外膜の主要成分であるリポ多糖(LPS)を検出するため、生物の自然免疫系の活性化において重要な役割を果たす。本明細書に開示された方法または使用のいくつかの態様において、TLR4は、Swissprot/Uniprotアクセッション番号000206(2012年9月5日時点でバージョン132)を有するヒトタンパク質である。いくつかの態様において、TLR4は、Swissprot/Uniprotアクセッション番号Q9GL65(2012年7月11日時点でバージョン88)を有するか、またはSwissprot/Uniprotアクセッション番号Q8SQ55(2012年3月21日時点でバージョン56)を有するウシタンパク質である。いくつかの態様において、TLR4は、Swissprot/Uniprotアクセッション番号Q9QX05(2012年7月11日時点でバージョン99)を有するラットタンパク質である。いくつかの態様において、TLR4は、Swissprot/Uniprotアクセッション番号Q9QUK6(2012年9月5日時点でバージョン113)を有するマウスタンパク質である。いくつかの態様において、TLR4は、Swissprot/Uniprotアクセッション番号Q68Y56(2012年7月11日時点でバージョン62)を有するブタタンパク質である。いくつかの態様において、TLR4は、Swissprot/Uniprotアクセッション番号H2QXS5(2012年6月13日時点でバージョン4)を有するチンパンジータンパク質である。いくつかの態様において、TLR4は、Swissprot/Uniprotアクセッション番号F6RL35(2012年7月11日時点でバージョン10)を有するウマタンパク質である。いくつかの態様において、TLR4は、Swissprot/Uniprotアクセッション番号C4PCF3(2012年7月11日時点でバージョン24)を有するか、またはSwissprot/Uniprotアクセッション番号Q7ZTG5(2012年9月5日時点でバージョン67)を有するニワトリタンパク質である。いくつかの態様において、TLR4は、Swissprot/Uniprotアクセッション番号F1PDB9(2012年9月5日時点でバージョン14)を有するイヌタンパク質である。

#### 【0094】

本発明者らは、それぞれのタンパク質のTLR4受容体との結合のために必要とされるS100A8およびS100A9の各々における領域を同定することができた。S100A9タンパク質について

、この配列は、ヒトタンパク質（前記）のアミノ酸位置63～85に対応する。本発明者らは、例えば、立体的に覆うことによって、例えば、上記のヘテロ四量体複合体を形成させることによって、アミノ酸位置63～79に対応するS100A9タンパク質の領域がTLR4受容体に結合するのを防止することが十分であることをさらに見出した。この領域の阻止は、単球における炎症応答の開始を防止する。この領域は、ウシタンパク質、テナガザルタンパク質、アヌビスヒヒタンパク質、ポノボタンパク質、パンダタンパク質、ブタタンパク質、アフリカゾウのタンパク質、またはモルモットのタンパク質のアミノ酸位置63～79にも対応する。この領域は、Genbank（NCBI）遺伝子ID：94195 S100a9によってコードされたラットタンパク質、NCBIアクセッション番号NP\_033140.1（SEQ ID NO:83）のマウスタンパク質、またはNCBIアクセッション番号EDM00535.1（SEQ ID NO:84）のラットタンパク質のアミノ酸位置62～78にも対応する。さらなる例として、この領域は、Swissprot/Uniprotアクセッション番号L5MD39（2013年5月4日時点でバージョン4、SEQ ID NO:86）のホオヒゲコウモリ（mouse-eared bat）（デーヴィッツホオヒゲコウモリ（David's myotis））のチャイニーズエンデミックバット（Chinese endemic bat）種のタンパク質のアミノ酸位置61～77、またはSwissprot/Uniprotアクセッション番号G9KM87（2013年7月24日時点でバージョン10、SEQ ID NO:87）のケナガイタチタンパク質のアミノ酸位置122～138にも対応する。

10

**【0095】**

同様に、アミノ酸位置73～85に対応するヒトS100A9タンパク質の領域がTLR4受容体と結合するのを防止することも、炎症応答を阻止するために十分である。この領域は、ウシタンパク質、ブタタンパク質、スモールイヤードガラゴ（small-eared galago）のタンパク質、ハダカデバネズミ（naked mole rat）のタンパク質、またはモルモットのタンパク質のアミノ酸位置73～85にも対応する。

20

**【0096】**

S100A8タンパク質について、ヒトタンパク質（前記）のアミノ酸位置55～71に対応する配列が、S100A8タンパク質のTLR4受容体との結合のために必要であることを、本発明者らは同定した。この領域は、マカカタンパク質、マーモセットタンパク質、イヌタンパク質、アナウサギ（European rabbit）のタンパク質、ケナガイタチタンパク質、ウマタンパク質、ウシタンパク質、ブタタンパク質、アフリカゾウのタンパク質、パンダタンパク質、マウスタンパク質、ラットタンパク質、ハダカデバネズミのタンパク質、チャイニーズハムスターのタンパク質、ウサギタンパク質、マーモセットタンパク質、またはモルモットのタンパク質のアミノ酸位置55～71にも対応する。

30

**【0097】**

「位置」という用語は、本開示に従って使用される場合、本明細書に示されたアミノ酸配列内のアミノ酸の位置、または本明細書に示された核酸配列内のヌクレオチドの位置のいずれかを意味する。「対応する」という用語には、本明細書において使用される場合、位置が、先行するヌクレオチド/アミノ酸の数によって決定されるのみならず、その配列の周辺部分の前後関係において考慮されるべきであることも含まれる。従って、置換され得る、本開示による所定のアミノ酸の位置は、（変異体または野生型）ウイルスにおける他の場所におけるアミノ酸の欠失または付加のため、変動し得る。これに関して、S100A8タンパク質またはS100A9タンパク質の核酸配列上のデータベースエントリーが、コード領域の長さは不変/同一であっても、非翻訳領域の内含に関して変動し、それによって、異なる核酸位置を同定する可能性があることも注目される。同様に、置換され得る、本開示による所定のヌクレオチドの位置は、プロモーターおよび/もしくはその他の制御配列を含むウイルスの非翻訳領域または（エクソンおよびイントロンを含む）遺伝子における他の場所における欠失または付加的なヌクレオチドのために変動する可能性がある。

40

**【0098】**

従って、ある位置が本開示によって「対応する位置」と呼ばれる場合、ヌクレオチド/アミノ酸は、指定された数字に関して異なっても、類似した近隣のヌクレオチド/アミノ酸を有し得ることが理解される。交換、欠失、または付加され得るそのようなヌクレ

50

オチド/アミノ酸も、「対応する位置」という用語に含まれる。

【0099】

具体的には、既知の株と異なるS100A8タンパク質またはS100A9タンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基が、既知の株のアミノ酸配列のある位置に対応するか否かを判定するため、当業者は、当技術分野において周知の手段および方法、例えば、手動のアライメント、またはBasic Local Alignment Search Toolを表すBLAST2.0もしくはClustalWのようなコンピュータプログラムもしくは配列アライメントを生成するのに適したその他の適切なプログラムを使用することによるアライメントを使用することができる。従って、既知の野生型ウイルス株を「主配列」または「参照配列」として用い、本明細書に記載された野生型ウイルス株と異なるウイルスのアミノ酸配列または核酸配列を「問い合わせ配列」として用いることができる。「参照配列」および「野生型配列」という用語は、本明細書において交換可能に使用される。

10

【0100】

上記の配列のうちの一つまたはそのような配列の相同体（前記）を含むペプチドまたはペプチド模倣体、例えば、ペプトイドも、本明細書に提供される。相同体は、SEQ ID NO: 11の配列のようなポリペプチドの所定の配列との、少なくとも約70%、例えば、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する、生物学的活性を有する配列である。いくつかの態様において、相同体は、ネイティブ配列ポリペプチドとの少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有する生物学的活性を有する配列である。相同体は、本書に記載された単離された核酸分子または単離されたペプチドもしくはタンパク質の機能的等価物である。核酸配列に関連して、遺伝暗号の縮重は、同一のアミノ酸を指定し、従って、同一のタンパク質を与える、あるコドンの他のコドンへの置換を可能にする。メチオニンおよびトリプトファンを例外として、既知のアミノ酸は複数のコドンによってコードされ得るため、核酸配列は実質的に変動し得る。従って、示された配列に示されるものと有意に異なる核酸配列を与えるため、本明細書に記載された核酸配列の一部または全部を合成することができる。しかしながら、そのコードされたアミノ酸配列は、保存され得る。

20

【0101】

さらに、核酸配列は、所定の配列に示された核酸式の5'末端および/または3'末端への少なくとも1個のヌクレオチドの付加、欠失、または置換に起因するヌクレオチド配列を含み得る。付加、欠失、または置換が、ヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を改変しないのであれば、任意のヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが、これに関して使用され得る。例えば、本発明は、本発明の核酸配列もしくはその誘導体の5'末端への開始コドンとしてのATGの付加、または本発明のヌクレオチド配列もしくはその誘導体の3'末端への終止コドンとしてのTTA、TAG、もしくはTGAの付加に起因する任意の核酸配列を含むものとする。さらに、核酸分子は、必要に応じて、5'末端および/または3'末端に付加された制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有していてもよい。所定の核酸配列のそのような機能的改変は、それに融合した外来核酸配列によってコードされた異種タンパク質の分泌および/またはプロセッシングを促進する機会を与える。

30

【0102】

さらに、構造的に修飾されているが、未修飾の核酸分子によって産生されるポリペプチドと実質的に同一の有用性または活性を有するポリペプチドを作製するため、コドンを欠失させること、または1個もしくは複数個のコドンを縮重コドン以外のコドンに置換することが可能である。当技術分野において認識されるように、核酸分子の間の違いが遺伝暗号の縮重に関係していなくても、2種のポリペプチドは、それらの産生を与える2種の核酸分子と同様に、機能的に等価である。

40

【0103】

本書に開示されたアミノ酸配列に関する「配列同一性パーセント(%)」とは、保存的置換を配列同一性の一部と見なさず、最大の配列同一性パーセントを達成するため、配列を整列させ、必要であれば、ギャップを導入した後、例えば、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、またはSEQ ID NO:12の参照配列内のアミノ酸残基と同一である候補配

50

列内のアミノ酸残基の百分率として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、当技術分野における技術の範囲内にある様々な方式で、例えば、BLAST、ALIGN、またはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成され得る。当業者は、比較される配列の全長において最大アライメントを達成するために必要とされるアルゴリズムを含む、アライメントの測定のための適切なパラメータを決定することができる。本明細書に開示されたヌクレオチド配列についても同様である。

【 0 1 0 4 】

対応する配列を比較する必要があるという事実は、当業者に周知であろう。対応する配列の使用には、位置が、先行するヌクレオチド/アミノ酸の数によってのみ決定されるのではないことが含まれる。従って、置換され得る、本開示による所定のアミノ酸の位置は、S100A8タンパク質またはS100A9タンパク質のような(変異体または野生型)タンパク質の他の場所におけるアミノ酸の欠失または付加によって変動し得る。従って、本開示による「対応する位置」に関して、例えば、データベースエントリーを比較する場合、アミノ酸が、示された数について異なっても、類似した近隣アミノ酸を有する場合があることが理解されるべきである(上記参照)。

10

【 0 1 0 5 】

上述のように、いくつかの態様において、SEQ ID NO:11またはSEQ ID NO:19に対応する配列などの配列は、保存的置換を含有する。保存的置換は、一般には以下の置換であり、変異しているアミノ酸によって列挙され、各々の後に保存的であると見なされ得る一つまたは複数の置換が続いている：

20

Ala → Gly, Ser, Val; Arg → Lys; Asn → Gln, His; Asp → Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala; His → Arg, Asn, Gln; Ile → Leu, Val; Leu → Ile, Val; Lys → Arg, Gln, Glu; Met → Leu, Tyr, Ile; Phe → Met, Leu, Tyr; Ser → Thr; Thr → Ser; Trp → Tyr; Tyr → Trp, Phe; Val → Ile, Leu

。その他の置換も許容され、それらは、経験的に、またはその他の既知の保存的置換もしくは非保存的置換に従って、決定され得る。さらなる指南として、以下の八つの群は各々、互いに関する保存的置換を定義すると典型的に見なされ得るアミノ酸を含有する：

30

- (1) アラニン (Ala)、グリシン (Gly) ;
- (2) アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu) ;
- (3) アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln) ;
- (4) アルギニン (Arg)、リジン (Lys) ;
- (5) イソロイシン (Ile)、ロイシン (Leu)、メチオニン (Met)、バリン (Val) ;
- (6) フェニルアラニン (Phe)、チロシン (Tyr)、トリプトファン (Trp) ;
- (7) セリン (Ser)、トレオニン (Thr) ; および
- (8) システイン (Cys)、メチオニン (Met) 。

【 0 1 0 6 】

それとは対照的に、以下などのより実質的な変化は保存的置換に相当しない：

40

Ala → Leu, Ile; Arg → Gln; Asn → Asp, Lys, Arg, His; Asp → Asn;  
Cys → Ala; Gln → Glu; Glu → Gln; His → Lys; Ile → Met, Ala, Phe; Leu → Ala, Met,  
ノルロイシン; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ile, Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr, Ser; Val → Met, Phe, Ala

【 0 1 0 7 】

S100A8タンパク質 (MRP8) およびS100A9タンパク質 (MRP14) の配列アライメントおよび結晶構造の分析は、どのアミノ酸がカルシウム結合に関連しているかを以前に示した。

50

Ishikawaら (Acta Crystallographica Section D[2000]56,559-566) は、例えば、S100A8タンパク質の構造を公表した。この文献は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先されるであろう。例えば、ブタタンパク質の配列

FKELDINKDG AVNFEEF

(SEQ ID NO:48) またはチャニーズハムスタータンパク質の配列

FKELDINQDN AVNFEEF

(SEQ ID NO:53) に対応する、ヒトタンパク質の配列

FKELDINTDG AVNFQEF

(SEQ ID NO:5) における配列アライメントによって、これらの著者は、下線付きのアミノ酸がカルシウムイオンの配位に関与していることを同定した。これらのアミノ酸は、SEQ ID NO:5のアミノ酸位置5、7、9、および16に対応する。著者は、カルシウムによって誘発されるS100タンパク質のコンフォメーション変化を示唆した。しかしながら、どのアミノ酸残基が標的タンパク質との結合に関与しているかは、入手可能なデータにおいて予測不可能である。

【0108】

例えば、ウシタンパク質の配列

MEDLDTNVDK QLSFEEF

(SEQ ID NO:15) またはマーモセットタンパク質の配列

LEDLDTNADK QLTFFEF

(SEQ ID NO:18) に対応する、ヒトS100A9タンパク質の配列

MEDLDTNADK QLSFEEF

(SEQ ID NO:1) において、これらの著者は、下線付きのアミノ酸がカルシウムイオンの配位に関与していることを同定した。これらのアミノ酸は、SEQ ID NO:1のアミノ酸位置5、7、9、および16に対応する。

【0109】

ヒトS100A9タンパク質の配列

QLSFEEFIML MAR

(SEQ ID NO:3) において、著者は、SEQ ID NO:3のアミノ酸位置6に対応する下線付きのアミノ酸がカルシウムイオンの配位に関与していることを同定した。

【0110】

従って、カルシウム結合がヘテロ四量体複合体の形成のための必要条件であるため、S100A8タンパク質とS100A9タンパク質との間のヘテロ四量体複合体の形成が分析される使用または方法においては、上述の保存されたアミノ酸が存在するべきである。TLR4受容体との結合は、S100A8タンパク質またはS100A9タンパク質のホモ二量体型、ヘテロ二量体型、または単量体型でのみ起こるため、TLR4受容体との結合が分析される使用または方法においては、上述の保存されたアミノ酸は一般に存在する必要はない。

【0111】

いくつかの態様において、免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーが提供される。免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーは、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置63~79に対応する領域および/またはヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置73~85に対応する領域によって定義されたエピトープである脊椎動物S100A9タンパク質のエピトープに対する結合特異性を有し得る。免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーは、ヒトタンパク質S100A8のアミノ酸位置55~71に対応する領域によって定義されたエピトープである脊椎動物S100A8タンパク質のエピトープに対する結合特異性も有し得る。「特異的な」および「特異性」という用語は、本明細書において使用される場合、結合パートナーが、それぞれのタンパク質領域のアミノ酸配列を有するペプチドに対するものであるか、そのようなペプチドに結合するか、またはそのようなペプチドと反応すること

10

20

30

40

50

を示すものと理解される。従って、に対するものである、に結合する、またはと反応するには、適宜、結合パートナーがS100A9タンパク質またはS100A8タンパク質の領域に特異的に結合することが含まれる。これに関して、「特異的に」という用語は、適宜、結合パートナーがS100A9またはS100A8の対応する領域または/およびその一部と反応するが、他のタンパク質とは少なくとも本質的には反応しないことを意味する。「他のタンパク質」という用語には、例えば、結合パートナーの相手であるS100A9およびS100A8と密接に関連しているかまたは相同であるタンパク質を含む、任意のタンパク質が含まれる。「本質的に結合しない」という用語は、結合パートナーが、他のタンパク質に対して特定の親和性を有しないこと、即ち、S100A9またはS100A8に対する親和性と比較された場合、約30%未満、例えば、約20%未満、約10%未満、例えば、約9、8、7、6、または5%未満の交差反応性を示すことを意味する。本明細書において既に定義されたように、結合パートナーが特異的に反応するか否かは、とりわけ、適宜、それぞれの結合パートナーのS100A9またはS100A8との反応を、結合パートナーの他のタンパク質との反応と比較することによって、容易に試験され得る。「に対するものである」または「と反応する」という用語と交換可能に使用され得る「を特異的に認識する」という用語は、本開示に関して、特定の分子、一般に、免疫グロブリン、免疫グロブリン断片、または免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子が、本明細書に定義されるようなエピトープに関する少なくとも2個、例えば、少なくとも3個、例えば、少なくとも4個、またはさらにそれ以上のアミノ酸と特異的に相互作用しかつ/または結合し得ることを意味する。一般に、免疫グロブリンまたはタンパク質性結合分子は、それによって、S100A9またはS100A8のそれぞれのエピトープとの複合体を形成することができる。そのような結合は、「鍵と鍵穴の原理」の特異性によって例証され得る。「特異的結合」は、例えば、ウエスタンブロット、ELISA試験、RIA試験、ECL試験、IRMA試験、FACS、IHC、およびペプチドスキャンによって判定され得る。

10

20

30

40

50

#### 【0112】

例えば、S100A9またはS100A8のそれぞれの結合パートナーは、免疫グロブリン、その断片、または免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合パートナー（即ち、分子）であり得る。（組換え）抗体断片の例は、Fab断片、Fv断片、単鎖Fv断片（scFv）、ジアボディ（diabody）、またはドメイン抗体のような免疫グロブリン断片である（Holt, L.J., et al., Trends Biotechnol. (2003), 21, 11, 484-490）。免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子の例は、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテインである（WO 03/029462、Beste et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96, 1898-1903）。ピリン結合タンパク質、ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン、ヒトアポリポタンパク質D、またはグリコデリン（glycodelin）のようなリポカリンは、ハプテンとして公知の選択された小さなタンパク質領域と結合するよう修飾され得る天然のリガンド結合部位を有している。その他のタンパク質性結合分子の例は、いわゆるグルボディ（glubody）（例えば、国際特許出願WO 96/23879またはNapolitano, E.W., et al., Chemistry & Biology (1996) 3, 5, 359-367を参照のこと）、アンキリン足場（Mosavi, L.K., et al., Protein Science (2004) 13, 6, 1435-1448）または結晶足場（例えば、国際特許出願WO 01/04144）に基づくタンパク質、Skerra, J. Mol. Recognit. (2000) 13, 167-187に記載されたタンパク質、アドネクチン（AdNectin）、テトラネクチン（tetranectin）、およびアビマー（avimer）である。アビマーは、数種の細胞表面受容体に複数のドメインのストリングとして存在する、いわゆるAドメインを含有している（Silverman, J., et al., Nature Biotechnology (2005) 23, 15, 56-1561）。ヒトフィブロネクチンのドメインに由来するアドネクチンは、標的との免疫グロブリン様の結合のために工作され得る3つのループを含有している（Gill, D.S. and Damle, N.K., Current Opinion in Biotechnology (2006) 17, 653-658）。それぞれのヒトホモ三量体タンパク質に由来するテトラネクチンは、同様に、所望の結合のために工作され得るループ領域をC型レクチンドメイン中に含有している（同書）。タンパク質リガンドとして作用し得るペプチドは、側鎖が炭素原子ではなくアミド窒素に接続されているという点でペプチドと異なるオリゴ(N-アルキル)グリシンである。ペプチドは、典型的には、プロテアーゼおよびその他の修飾酵素に対して抵抗性であり、ペプチドよりはるかに

高い細胞透過性を有し得る（例えば、Kwon, Y.-U., and Kodadek, T., J. Am. Chem. Soc. (2007) 129, 1508-1509を参照のこと）。S100A9またはS100A8の結合パートナーとの複合体を形成する分子も、同様に、既に説明されたような免疫グロブリン、その断片、または免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子であり得る。従って、例示的な態様において、例えば、S100A9またはS100A8の量の検出は、プロSP-Bに特異的に結合することができる第1の抗体または抗体断片、および第1の抗体または抗体断片に特異的に結合することができる第2の抗体または抗体断片を使用して実施され得る。上に引用された文献は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先されるであろう。

#### 【0113】

「抗体」という用語は、本明細書において使用される場合、選択されたタンパク質、例えば、プロSP-Bに特異的に結合することができる免疫グロブリンおよび免疫グロブリン断片、ならびに免疫グロブリン様機能を有するそれぞれのタンパク質性結合分子を含むものと理解される。例示的な例として、抗体は、ラクダ重鎖免疫グロブリンであり得る。少数のさらなる非限定的な例として、抗体は、EGF様ドメイン、クリングルドメイン、フィブロネクチンI型ドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン、PANドメイン、G1aドメイン、SRCRドメイン、クニッツ/ウシ膵臓トリプシンインヒビタードメイン、テングミスタット (tendamistat)、カザール型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、シロツメクサ属植物 (P型) ドメイン、フォンビルブランド因子C型ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、チログロブリンI型リピート、LDL受容体クラスAドメイン、スシ (Sushi) ドメイン、リンク (Link) ドメイン、トロンボスポンジンI型ドメイン、免疫グロブリンドメイン、または免疫グロブリン様ドメインであり得る（さらなる例については上記を参照のこと）。いくつかの態様において、抗体は、例えば、WO 01/92655に記載されたSpiegelmer（登録商標）を含む、アダプターである。アダプターは、典型的には、ペプチド、タンパク質、核酸分子、または細胞のような選択された他の分子に結合する能力に基づき、ランダム核酸プールから選択され得る核酸分子である。Spiegelmerを含むアダプターは、ペプチド、タンパク質、および低分子量化合物のような分子と結合することができる。Spiegelmer（登録商標）は、天然オリゴヌクレオチドのL-異性体から構成される。アダプターは、インビトロ選択の繰り返しを通して、またはSELEX（試験管内進化）テクノロジーを通して工作される。標的分子に対するSpiegelmerの親和性は、しばしば、ピコモル～ナノモル範囲にあり、従って、免疫グロブリンと比較可能である。アダプターは、ペプチドであってもよい。ペプチドアダプターは、両端でタンパク質足場に付着した短い可変性ペプチドドメインからなる。本書の全体にわたって、「抗体」という用語には、そのような結合パートナーが含まれるが、抗体という用語は、「タンパク質性結合パートナー」という用語と共に使用され得る。この重複性の二重の表記は、免疫グロブリンを同義的に抗体と呼ぶ、当技術分野における「抗体」という語の頻繁な使用を考慮するためのものに過ぎない。

#### 【0114】

免疫グロブリンまたはタンパク質性結合分子のようなポリペプチドに関する「断片」とは、全長配列より短く、かつタンパク質の関心対象の機能を果たすことができ、免疫グロブリンの場合には、所望の標的、例えば、抗原（例えば、プロSP-B）と特異的に結合することができる限り、対応するポリペプチドに存在する任意のアミノ酸配列を意味する。「免疫グロブリン断片」という用語は、特定の分子に対する特異的な結合親和性を示す免疫グロブリンの一部、しばしば、超可変領域ならびに周囲の重鎖および軽鎖の一部をさす。超可変領域は、ポリペプチド標的に物理的に結合する免疫グロブリンの一部である。

#### 【0115】

免疫グロブリンは、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。「ポリクローナル」という用語は、抗原またはその抗原性機能的誘導体によって免疫感作された動物の血清に由来する免疫グロブリン分子の不均質集団である免疫グロブリンをさす。ポリクローナル免疫グロブリンの作製のためには、様々な宿主動物のうちの一つまたは複数、抗原

10

20

30

40

50

の注射によって免疫感作することができる。宿主種に依って、様々なアジュバントを、免疫学的応答を増加させるために使用することができる。「モノクローナル免疫グロブリン」または「モノクローナル抗体」とは、特定の抗原に対する免疫グロブリンの実質的に均質の集団である。それらは、連続培養細胞株による免疫グロブリン分子の産生を提供する任意の技術によって入手され得る。モノクローナル免疫グロブリンは、当業者に周知の方法によって入手され得る（例えば、Kohler et al., Nature(1975)256,495-497および米国特許第4,376,110号を参照のこと）。例えば、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置63~79に対応する領域、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置73~85に対応する領域、またはヒトタンパク質S100A8のアミノ酸位置55~71に対応する領域に対してのみ特異的な結合親和性を有する免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片を、原核生物または真核生物から単離するか、濃縮するか、または精製することができる。当業者に公知のルーチンの方法が、原核生物および真核生物の両方における、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片および免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子の両方の作製を可能にする。

10

**【0116】**

より詳細には、免疫グロブリンは、関心対象のタンパク質、例えば、S100A9またはS100A8に対する結合親和性を、他のポリペプチドに対する親和性結合と比較することによって単離され得る。抗体のヒト化型は、キメラ化またはCDR移植のような当技術分野において公知の手法のうちの一つを使用して生成され得る。一般に、モノクローナル抗体およびハイブリドーマを調製するための技術は、当技術分野において周知である。抗体を産生することが公知であるヤギ、マウス、またはウサギのような任意の動物を、選択されたポリペプチド、例えば、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置63~79に対応する領域、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置73~85に対応する領域、またはヒトタンパク質S100A8のアミノ酸位置55~71に対応する領域の配列を有するポリペプチドによって免疫感作することができる。

20

**【0117】**

免疫感作のための方法は、当技術分野において周知である。そのような方法には、ポリペプチドの皮下注射または腹腔内注射が含まれる。当業者は、免疫感作のために使用されるポリペプチドの量および免疫感作計画が、免疫感作される動物、例えば、免疫感作される哺乳動物の種、その免疫状態、および哺乳動物の体重、ならびにポリペプチドの抗原性および注射の部位に基づき変動し得ることを認識するであろう。

30

**【0118】**

ペプチド抗原性を増加させるため、ポリペプチドを修飾するか、またはアジュバントで投与することができる。ポリペプチドの抗原性を増加させる方法は、当技術分野において周知である。そのような手法には、抗原を（グロブリンもしくはガラクトシダーゼのような）異種タンパク質とカップリングすること、または免疫感作の間にアジュバントを含めることが含まれる。

**【0119】**

典型的には、免疫感作された哺乳動物から採血し、各血液試料由来の血清を、適切なスクリーニングアッセイ法を使用して、特定の抗体についてアッセイする。例示的な例として、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置63~79に対応する領域、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置73~85に対応する領域、またはヒトタンパク質S100A8のアミノ酸位置55~71に対応する領域の配列を有するポリペプチドを発現している細胞からの、<sup>125</sup>Iによって標識された細胞溶解物の免疫沈降によって、抗S100A9免疫グロブリンまたは抗S100A8免疫グロブリンを同定することができる。フローサイトメトリーによって、例えば、抗S100A9または抗S100A8を認識すると考えられる抗体と共にインキュベートされたラモス（Ramos）細胞の蛍光染色を測定することによって、抗S100A9免疫グロブリンまたは抗S100A8免疫グロブリンを同定することもできる。

40

**【0120】**

モノクローナル免疫グロブリンについては、リンパ球、典型的には、脾細胞を、免疫感作された動物から取り出し、不死細胞株、典型的には、SP2/O-Ag14骨髓腫細胞のような骨

50

髄腫細胞と融合させ、モノクローナル免疫グロブリンを産生するハイブリドーマ細胞にする。典型的には、骨髓腫細胞株のような不死細胞株は、リンパ球と同一の哺乳動物種に由来する。例示的な不死細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含有している培養培地（「HAT培地」）に対して感受性のマウス骨髓腫細胞株である。典型的には、HAT感受性のマウス骨髓腫細胞を、1500分子量のポリエチレングリコール（「PEG 1500」）を使用して、マウス脾細胞と融合させる。次いで、非融合骨髓腫細胞および非産生的に融合した骨髓腫細胞を死滅させるHAT培地を使用して、融合に起因するハイブリドーマ細胞を選択することができる（非融合脾細胞は、形質転換されていないため、数日後に死滅する）。

#### 【0121】

当技術分野において周知の多数の方法のいずれかを、所望の特徴を有する免疫グロブリンを産生するハイブリドーマ細胞を同定するために使用することができる。典型的には、ハイブリドーマ細胞の培養上清を、抗原に対する免疫グロブリンについてスクリーニングする。適切な方法には、ELISAアッセイ法、ウエスタンブロット分析、またはラジオイムノアッセイ法（Lutz et al., Exp. Cell Res. [1988]175, 109-124）によるハイブリドーマのスクリーニングが含まれるが、これらに限定されない。例えば、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置63~79に対応する領域、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置73~85に対応する領域、またはヒトタンパク質S100A8のアミノ酸位置55~71に対応する領域の配列を有するポリペプチドを発現している組換え細胞株に結合する能力を有する分泌された抗体について、ハイブリドーマ培養上清を試験することによって、抗S100A9免疫グロブリンまたは抗S100A8免疫グロブリンを産生するよう調製されたハイブリドーマをスクリーニングすることができる。完全免疫グロブリンである本発明の範囲内の抗体相同体、例えば、抗S100A9抗体相同体または抗S100A8抗体相同体を作製するためには、そのようなスクリーニングアッセイ法において陽性と判定されたハイブリドーマ細胞を、ハイブリドーマ細胞が培養培地へモノクローナル免疫グロブリンを分泌することを可能にするために十分な条件および時間において栄養培地中で培養することができる。ハイブリドーマ細胞に適した組織培養技術および培養培地は、当技術分野において周知である。条件ハイブリドーマ培養上清を収集し、任意で、例えば、抗S100A9免疫グロブリンまたは抗S100A8免疫グロブリンを、周知の方法によってさらに精製することができる。あるいは、免疫感作されていないマウスの腹腔へハイブリドーマ細胞を注射することによって、所望の免疫グロブリンを作製することができる。ハイブリドーマ細胞は、腹腔において増殖し、腹水として蓄積する免疫グロブリンを分泌する。注射器によって腹腔から腹水を吸引することによって、免疫グロブリンを採集することができる。

#### 【0122】

当技術分野において公知の手法を使用して、所望の免疫グロブリンを分泌するハイブリドーマをクローニングし、クラスおよびサブクラスを決定する。ポリクローナル免疫グロブリンについては、免疫グロブリンを含有している抗血清を、免疫感作された動物から単離し、上記の手法のうちの一つを使用して、所望の特異性を有する免疫グロブリンの存在についてスクリーニングする。上記の抗体を固体支持体上に固定化してもよい。そのような固体支持体の例には、ポリカーボネートのようなプラスチック、アガロースおよびセファロースのような複合糖質、ポリアクリルアミドおよびラテックスビーズのようなアクリル樹脂が含まれる。そのような固体支持体へ抗体をカップリングするための技術は、当技術分野において周知である。

#### 【0123】

多数の従来ディスプレイテクノロジーが、免疫グロブリン、免疫グロブリン断片、またはタンパク質性結合分子を選択するために使用可能である。Liら（Organic & Biomolecular Chemistry(2006), 4, 3420-3426）は、例えば、選択されたDNAアダプターとの複合体を形成することができる単鎖Fv断片を、ファージディスプレイを使用して入手することができる方法を証明した。ディスプレイ技術は、例えば、選択された標的分子に対して高い親和性を有する工作された免疫グロブリンおよびリガンドの生成を可能にする。従って、

10

20

30

40

50

わずかにのみ異なるペプチドまたはタンパク質のアレイを、典型的には、遺伝子工学によって、ディスプレイすることも可能である。それによって、相互作用の特性および生物物理学的パラメータに関してタンパク質またはペプチドをスクリーニングし、その後、進化させることが可能である。変異および選択の反復的な繰り返しを、インビトロで適用することができる。

#### 【0124】

ペプチドおよびタンパク質の選択のためのインビトロディスプレイテクノロジーは、ペプチドまたはタンパク質と、それをコードする核酸との間の物理的連結に頼る。技術の大きなパネルが、この目的のために確立されており、最も一般的に使用されているのは、ファージ/ウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイ、細胞表面ディスプレイ、「ペプチドオンプラスミド (peptide on plasmid)」、mRNAディスプレイ、DNAディスプレイ、およびマイクロビーズディスプレイを含むインビトロコンパートメンタライゼーション (in vitro compartmentalisation) である (概説については、例えば、Rothe, A., et al., FASEB J. (2006)20, 1599-1610 ; Sergeeva, A., et al., Advanced Drug Delivery Reviews (2006)58, 1622-1654を参照のこと)。

10

#### 【0125】

タンパク質またはペプチドと核酸とを物理的に連結する異なる手段も使用可能である。細胞表面分子を有する細胞における発現、ウイルス/ファージコートタンパク質との融合ポリペプチドとしての発現、RNA分子とリボソームとそれぞれのポリペプチドとの安定化されたインビトロ複合体、ピューロマイシン分子またはマイクロビーズを介したインビトロ共有結合性カップリングが、当技術分野において現在使用されているタンパク質/ペプチドと核酸とを連結する方式の例である。さらなるディスプレイ技術は、油中水型乳濁液に頼る。水滴が、各々単一の遺伝子が転写され翻訳されるコンパートメントとして役立つ (Tawfik, D.S., and Griffiths, A.D., Nature Biotech. (1998)16, 652-656、米国特許出願第2007/0105117号)。ペプチドまたはタンパク質と (それをコードする) 核酸との間のこの物理的連結は、選択されたタンパク質またはペプチドをコードする核酸を回収する可能性を提供する。従って、免疫沈降のような技術と比較して、ディスプレイ技術においては、選択された標的分子の結合パートナーを同定するかまたは選択することのみならず、この結合パートナーの核酸を回収し、さらなる加工のために使用することも可能である。従って、現在のディスプレイ技術は、例えば、標的発見、リード発見、およびリード最適化のための手段を提供する。ペプチドまたはタンパク質、例えば、抗体の巨大なライブラリーを、大規模にスクリーニングすることができる可能性がある。

20

30

#### 【0126】

上述のように、場合に応じて、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置63~79に対応する領域、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置73~85に対応する領域、もしくはヒトタンパク質S100A8のアミノ酸位置55~71に対応する領域の配列を有するポリペプチドの結合パートナー、またはこれらのペプチドのうちの一つの結合パートナーとの複合体を形成する分子に、検出可能マーカーをカップリングすることができる。これらのペプチドのうちの一つの結合パートナーまたはそれとの複合体を形成する分子にカップリングされ得るそれぞれの検出可能マーカーは、光学的に検出可能な標識、フルオロフォア、または発色団であり得る。適切な標識の例には、有機分子、酵素、放射性部分、蛍光性部分、および/または発色性部分、蛍光性部分、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、金属錯体、金属、およびコロイド金が含まれるが、これらに限定されない。従って、例えば、TLR4受容体との結合のために必要とされる領域がアクセス可能であるS100A9および/またはS100A8のレベルを検出するため、例えば、励起可能な蛍光色素、放射性アミノ酸、蛍光性タンパク質、または酵素を使用することができる。適切な蛍光色素の例には、フルオレセインイソチオシアネート、5,6-カルボキシメチルフルオレセイン、Cascade Blue (登録商標)、Oregon Green (登録商標)、テキサスレッド、ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル、クマリン、ダンシルクロリド、ローダミン、アミノメチルクマリン、DAPI、エオシン、エリトロシン、BODIPY (登録商標)、ピレン、リサミン、キサンテン、アクリジン、オキ

40

50

サジン、フィコエリトリン、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5PE、Cy5.5、Cy7、Cy7PE、またはCy7APCのようなCy色素、アレクサ647のようなアレクサ色素、およびNBD（ナフトール塩基性色素）が含まれるが、これらに限定されない。適切な蛍光タンパク質の例には、EGFP、エメラルド、EYFP、フィコエリトリン（PE）またはアロフィコシアニンのようなフィコビルタンパク質、単量体赤色蛍光タンパク質（mRFP）、mOrange、mPlum、およびmCherryが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、Dronpa、bsDronpa、およびPadronのような可逆的に光切替え可能（photoswitchable）な蛍光タンパク質を用いることができる（Andresen, M., et al., Nature Biotechnology (2008) 26, 9, 1035）。適切な酵素に関しては、アルカリホスファターゼ、ダイズペルオキシダーゼ、または西洋ワサビペルオキシダーゼが、少数の例示的な例として役立つ。いくつかの態様において、検出の方法には、電気泳動、HPLC、フローサイトメトリー、蛍光相関分光法、またはこれらの技術の改変型が含まれ得る。これらの工程のいくつかまたは全部は、自動分離/検出システムの一部であり得る。

10

#### 【0127】

本書に記載される免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーは、いくつかの態様において、対象の生物における炎症過程に関連した状態の診断において使用され得る。既に説明されたように、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置63~79に対応する領域およびヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置73~85に対応する領域のアクセス可能性、ならびにヒトタンパク質S100A8のアミノ酸位置55~71に対応する領域のアクセス可能性は、タンパク質がヘテロ四量体複合体内にないため、S100A9およびS100A8によるTLR4受容体との結合が起こり得ることを示す。従って、S100A9およびS100A8が関与している炎症性状態に対象が罹患していること診断するため、既に定義されたような免疫グロブリンまたは結合特異性を有するタンパク質性結合パートナーを使用することができる。さらに、典型的には、対象の生物における炎症の部位の少なくともいくつかを同定することができる。

20

#### 【0128】

いくつかの態様において、上記の特異性を有する免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーを使用することによって、炎症性状態を診断する方法は、分子イメージング技術の使用を含む。この目的のため、免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーは、放射標識を有し得る。適切な放射標識の二つの例示的な例は、キレート部分によって免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーにカップリングされ得る<sup>124I</sup>および<sup>89Zr</sup>である。いくつかの態様において、<sup>68Ga</sup>も放射標識として使用され得る。その場合、ポジトロン放出断層撮影（PET）イメージングが使用され得る。当技術分野において使用される典型的なPETスキャナは、 $10^{-11}\text{M}$ ~ $10^{-12}\text{M}$ の濃度を検出することができ、それはS100A9およびS100A8の検出のために十分である。PETは、対象の生物における放射標識された免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーの分布を定量的に画像化することができる。分子磁気共鳴画像法（MRI）、生物発光、蛍光、標的型超音波（targeted ultrasound）、および単一光子放射型コンピュータ断層撮影（SPECT）を含むが、これらに限定されないさらなる分子イメージング技術を使用することができる。分子イメージング技術についての概説は、Dzik-Jurasz (The British Journal of Radiology (2003) 76 S98-S109) によって与えられている。いくつかの態様において、免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーは、ナノ結晶のようなナノ粒子にカップリングされ得る。

30

40

#### 【0129】

所望により、上記定義のような免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーを、ハイブリッドイメージングアプローチにおいて使用することができる。例えば、PET/CTカメラまたはSPECT/CTカメラは、単一の検査において、正確に融合される解剖学的情報および機能的情報の両方を連続的に取得することを可能にする市販の複合システムである。統合PET/磁気共鳴画像法は、器官または対象の運動についての補正を可能にする。磁気共鳴画像法は、PET再構成および炎症に関するデータ分析において所望され得る、灌流および血流に関する情報も提示する。免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーによる分子イメージングは、光音響断層撮影（PAT）の形態で実施されるか、またはPATと組み

50

合わせられてもよい。PATは、光エネルギーから超音波エネルギーへの変換に基づく。現在、PATは、熱および音響のインパルス応答を発生させるため、ナノ秒パルスのレーザービームを使用して、画像化される生物学的組織を照射することによって実施されている。今日、PATは、焦点走査型光音響顕微鏡法 (focused-scanning photoacoustic microscopy) (PAM)、光音響コンピュータ断層撮影 (PACT)、および光音響内視鏡検査 (PAE) として一般に実装されている。

#### 【0130】

本書に開示される免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーは、いくつかの態様において、対象の生物における治療、具体的には、炎症過程に関連した状態、例えば、疾患の処置において使用され得る。本書に開示される免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーは、対象の生物における炎症過程に関連した状態の予防においても使用され得る。「予防する」という用語は、生物が異常状態に罹患しているかまたはそれを発症する確率を減少させることをさす。いくつかの態様において、そのような免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーは、その必要のある対象における慢性または急性の無菌性炎症、神経障害性疼痛、原発性移植片不全、虚血再灌流損傷、再灌流損傷、再灌流浮腫、同種移植片機能障害、肺再移植応答、および/または臓器移植における原発性移植片機能不全の予防または処置において使用される。本書に開示される免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーは、敗血症性ショック、喘息状態、クローン病、潰瘍性大腸炎、再灌流損傷、自己免疫疾患、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、冠性心疾患、糖尿病、リウマチ様 (rheumatoidal) 疾患、乾癬および脂漏のような皮膚科学的疾患、移植片拒絶、ならびに肺、心臓、腎臓、口腔 (例えば、歯周炎)、または子宮の炎症の処置においても使用され得る。免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーは、そのような状態の診断においても有用であり得ることが理解される。

10

20

#### 【0131】

それぞれの方法は、本明細書に開示される免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーを投与する工程を含む。いくつかの態様において、免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーを、TLR4阻害剤と組み合わせて投与することができる。いくつかの態様において、免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーを、TLR2、MYD88、TICAM1、および/またはTIRAP阻害剤と組み合わせて投与することができる。

30

#### 【0132】

「処置すること」または「処置」または「寛解」とは、生物における異常な状態、例えば、病理学的状態を予防するか、減速させる (軽減する) か、または少なくとも部分的に寛解させるかもしくは消失させることを目的とした、治療的な処置および予防的または防止的な措置の両方をさす。処置を必要とする者には、既に障害を有する者が含まれ、障害を有する傾向がある者、または障害が予防される (防御) 者も含まれる。「投与すること」という用語は、生物の細胞または組織へ化合物を組み入れる方法に関する。

#### 【0133】

既に説明されたように、いくつかの態様において、ペプチドまたはペプチドの組み合わせが提供される。ペプチドが提供される場合、ペプチドは単離されている。同様に、ペプチドの組み合わせが提供される場合、ペプチドの組み合わせのペプチドは単離されている。「単離されている」という用語は、ペプチドもしくは核酸分子が、通常の生理学的環境、例えば、天然起源から除去されていること、またはペプチドもしくは核酸が合成されたものであることを示す。「単離されている」という用語の使用は、天然に存在する配列が、通常の細胞環境、例えば、染色体環境から除去されていることを示す。従って、配列は、無細胞培地中であってもよいが、または異なる細胞環境に置かれていてもよい。従って、細胞は、最初に提供されたのとは異なる水溶液のような培地中に含まれていてもよいが、または異なる生理学的環境に置かれてもよい。典型的には、それらの環境、例えば、適宜、溶液/懸濁物において、存在する全ての細胞、ペプチド、または核酸分子のうち、単離された細胞、ペプチド、または核酸分子が構成する割合は、それらが採取された環境における割合より高い。ポリペプチドまたは核酸分子に関して、「単離された」とは、天然

40

50

起源から単離されたか、または合成された、互いにカップリングされたアミノ酸（2個またはそれ以上のアミノ酸）またはヌクレオチドの重合体、例えば、ポリペプチドまたは核酸分子を意味する。「単離された」という用語は、配列が存在する唯一のアミノ酸鎖またはヌクレオチド鎖であることを意味するのではなく、例えば、天然にそれに関連している非アミノ酸材料および/または非核酸材料をそれぞれ本質的に含まず、例えば、約90～95%またはそれ以上純粋であることを意味する。

#### 【0134】

上述のように、ペプチドの代わりにまたはペプチドに加えて、ペプチド模倣体が、本発明に関して同様に使用され得る。「ペプチド模倣体」という用語は、本明細書において使用される場合、対応するポリペプチドと同一の一般構造を有するが、安定性または生物学的機能を増加させる修飾を含む化合物をさす。いくつかの態様において、ペプチド模倣体は、1個もしくは複数個のD-アミノ酸を含むか、D-アミノ酸から本質的になるか、またはD-アミノ酸からなり得る。D-アミノ酸は、天然に存在するLアミノ酸の光学異性体である。Dアミノ酸は、Lアミノ酸の鏡像であると思なされ得る。Dアミノ酸のストレッチは、タンパク質分解を介して宿主生物において分解される傾向がより低い。いくつかの態様において、ペプチド模倣体は、Dアミノ酸のみからなる同一配列の類似体であるインバーソ（*inverso*）類似体であり得る。いくつかの態様において、ペプチド模倣体は、ペプチド模倣体がペプチドの逆配列を含むことを意味する所定のペプチドの「リバーソ（*reverso*）」類似体であり得る。いくつかの態様において、ペプチド模倣体は、配列が逆の順序に配置されたD-アミノ酸からなる類似体である「D-レトロ鏡像異性体ペプチド」であり得る。ペプチド模倣体は、ペプチドを含むか、ペプチドから本質的になるか、またはペプチドからなっていないもよい。ペプチドは、側鎖が炭素原子ではなくアミド窒素に接続されている点でペプチドと異なる。従って、ペプチドは、オリゴ(N-アルキル)グリシンであると思なされ得るが、にも関わらず、対応するポリペプチドと同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有する。ペプチドは、典型的には、プロテアーゼおよびその他の修飾酵素に対して抵抗性であり、ペプチドよりはるかに高い細胞透過性を有し得る。例えば、Kwon, Y.-U., and Kodadek, T., *J. Am. Chem. Soc.* (2007) 129, 1508-1509を参照のこと。この文献は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先されるであろう。

10

20

30

#### 【0135】

ペプチドまたはペプチド模倣体は、任意の方法によって、例えば、ペプチドもしくはペプチド模倣体を合成することによって、または細胞において適切なアミノ酸配列をコードする核酸を発現させ、細胞からペプチドを採集することによって調製され得る。そのような方法の組み合わせも同様に使用され得る。ペプチドおよびペプチド模倣体を新規合成する方法、ならびにペプチドおよびペプチド模倣体を組換え作製する方法は、当技術分野において周知である。

#### 【0136】

本明細書に開示されるペプチドもしくはペプチド模倣体またはペプチドもしくはペプチド模倣体の組み合わせは、S100A8タンパク質および/またはS100A9タンパク質のTLR4受容体との結合に干渉する能力を有し得る。TLR4受容体が細胞の表面上に存在する場合、その結果として、それぞれのS100A8タンパク質のTLR4受容体への結合によって誘導される細胞シグナリングも同様に誘導され得る。「シグナリング」および「シグナル伝達経路」という用語は、ある種の条件、変化、または外的刺激に応答して細胞成分に作用する細胞機序および分子をさす。典型的には、そのような機序および分子は、細胞外シグナルを細胞膜を通して細胞内シグナルになるよう伝達する。次いで、このシグナルが細胞応答を刺激し得る。

40

#### 【0137】

本明細書に開示される核酸分子は、1種または複数種のペプチド/タンパク質をコードする1種または複数種の配列を含有し得る。いくつかの態様において、これらのコードされた配列には、SEQ ID NO:6の配列もしくはその相同体をコードする配列が含まれるか、

50





長さを有するペプチドをコードする単一の配列を含有する。いくつかの態様において、本明細書に開示される核酸分子は、SEQ ID NO:12の配列またはその相同体を含有する20~30アミノ酸の長さを有するペプチドをコードする単一の配列を含有する。いくつかの態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:12の配列またはその相同体から本質的になるペプチドをコードする単一の配列を含有する。いくつかの態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:12の配列またはその相同体からなるペプチドをコードする単一の配列を含有する。

#### 【0141】

「核酸」という用語は、本明細書において使用される場合、一本鎖、二本鎖、またはそれらの組み合わせのような任意の可能な配置の核酸分子をさす。核酸には、例えば、DNA分子、RNA分子、ヌクレオチド類似体を使用してまたは核酸化学を使用して生成されたDNAまたはRNAの類似体、ロックド核酸分子(LNA)、タンパク質核酸分子(PNA)、およびtecto-RNA分子(例えば、Liu, B., et al., J. Am. Chem. Soc. (2004) 126, 4076-4077)が含まれる。PNA分子は、骨格が糖ではなく偽ペプチドである核酸分子である。従って、PNAは、一般に、例えば、DNAまたはRNAとは対照的に、電荷中性の骨格を有する。にも関わらず、PNAは、(例えば、PNAが構造的模倣体であると見なされる)DNAまたはRNAと同様に、少なくとも相補的な核酸鎖および実質的に相補的な核酸鎖にハイブリダイズすることができる。LNA分子は、フラノース環をN型配置にロックし、より高い二重鎖安定性およびヌクレアーゼ抵抗性をそれぞれの分子に与えるメチレンブリッジをC4'とO2'との間に含む修飾されたRNA骨格を有する。PNA分子と異なり、LNA分子は、電荷を有する骨格を有する。DNAまたはRNAは、ゲノム起源または合成起源であり得、一本鎖または二本鎖であり得る。そのような核酸は、例えば、mRNA、cRNA、合成RNA、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA、DNAとRNAとの共重合体、オリゴヌクレオチド等であり得る。それぞれの核酸は、さらに、非天然ヌクレオチド類似体を含有していてもよく、かつ/またはアフィニティタグもしくは標識に連結されていてもよい。

#### 【0142】

多くのヌクレオチド類似体が公知であり、本明細書に開示された方法において使用され得る。ヌクレオチド類似体とは、例えば、塩基、糖、またはリン酸部分に修飾を含有しているヌクレオチドである。例示的な例として、siRNAの2'-OH残基の2'F残基、2'-O-Me残基、または2'H残基への置換は、それぞれのRNAのインピボ安定性を改善することが公知である。塩基部分の修飾には、A、C、G、およびT/Uの天然の修飾および合成による修飾、ウラシル-5-イル、ヒポキサンチン-9-イル、および2-アミノアデニン-9-イルのような異なるプリン塩基またはピリミジン塩基が含まれ、非プリンヌクレオチド塩基または非ピリミジンヌクレオチド塩基も含まれる。他のヌクレオチド類似体は、ユニバーサル塩基として役立つ。ユニバーサル塩基には、3-ニトロピロールおよび5-ニトロインドールが含まれる。ユニバーサル塩基は、他の塩基と塩基対を形成することができる。塩基修飾は、しばしば、例えば、増加した二重鎖安定性のような独特の特性を達成するため、例えば、2'-O-メトキシエチルのような糖修飾と、例えば、組み合わせられ得る。

#### 【0143】

いくつかの態様において、本明細書に開示される核酸分子は、SEQ ID NO:6の配列もしくはその相同体、SEQ ID NO:9の配列もしくはその相同体、および/またはSEQ ID NO:12の配列もしくはその相同体を発現することができる。いくつかの態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:6の配列もしくはその相同体、SEQ ID NO:9の配列もしくはその相同体、および/またはSEQ ID NO:12の配列もしくはその相同体が発現されることを可能にする配列を含む。核酸分子は、例えば、これらの配列のうちの一つもしくは複数、またはこれらの配列のうちの一つもしくは複数を含む配列に機能的に連結されたプロモーターを含み得る。いくつかの態様において、本明細書に開示される核酸分子は、これらの配列のうちの一つもしくは複数、またはこれらの配列のうちの一つもしくは複数を含む配列に機能的に連結された終結シグナルを含む。いくつかの態様において、本発明による核酸分子は、これらの配列のうちの一つもしくは複数に、またはこれらの配列のうちの一つもしくは複数を含む配列に機能的に連結された制御配列を含む。

## 【0144】

「制御配列」という用語には、調節可能な転写プロモーター、オペレーター、エンハンサー、サイレンサー、転写ターミネーター、転写および翻訳を実施するために宿主細胞タンパク質と相互作用する5'および3'の非翻訳領域、ならびに開始コドンおよび終止コドンを含む、遺伝子発現を調節し得るその他の要素が含まれる。制御配列は、使用される細胞および/またはヌクレオチド配列に対してネイティブ（同種）であってもよいまたは外来性（異種）であってもよい。遺伝子配列発現のために必要とされる制御配列の正確な性質は、生物によって変動し得るが、一般に、プロモーター領域を含むべきであり、原核生物において、プロモーター領域は、（RNA転写の開始を指図する）プロモーターおよびRNAへ転写された場合に合成開始のシグナルを与え得るDNA配列の両方を含有している。そのような領域は、通常、TATAボックス、キャッピング配列、またはCAAT配列のような、転写および翻訳の開始に関与する5'非コード配列を含み得る。これらの制御配列は、一般に、ある種の態様のため、例えば、使用されるある種の細胞のため、個々に選択される。原核細胞における適切な発現のためには、遺伝子配列コード配列の上流にリボソーム結合部位が存在する必要があることを、当業者は承知しているであろう。

10

## 【0145】

いくつかの態様において、本明細書に開示される核酸分子は、SEQ ID NO:6の配列もしくはその相同体、SEQ ID NO:9の配列もしくはその相同体、および/またはSEQ ID NO:12の配列もしくはその相同体を含むペプチドを入手するため、細胞において発現される。いくつかの態様において、細胞は、S100A9タンパク質および/またはS100A8タンパク質を発現する。以下に説明されるように、そのようなペプチドの発現は、ペプチドをコードする配列を含む構築物を有するベクターの生成を含み得る。構築物を含有するベクターまたは核酸分子を発現のために調製すると、核酸構築物を、多様な適切な手段、即ち、形質転換、トランスフェクション、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、電気穿孔、パーティクルガンテクノロジー、リン酸カルシウム沈殿、直接微量注入等のいずれかによって、選択された適切な宿主細胞へ導入することができる。ベクターの導入の後、ベクター含有細胞の増殖を選択する選択培地において、レシピエント細胞を増殖させる。クローニングされた遺伝子の発現は、本明細書に開示されるタンパク質もしくはペプチドまたはそれらの断片の産生をもたらす。これは、そのままの形質転換細胞において起こるか、またはこれらの細胞の分化を誘導した後、起こる。多様なインキュベーション条件を、本明細書に開示されるペプチドを形成させるために使用することができる。生理学的条件を模倣する条件を使用することが望まれ得る。

20

30

## 【0146】

「発現」および「発現された」という用語は、本明細書において使用される場合、核酸分子に含まれかつペプチド/タンパク質をコードする配列が、そのペプチド/タンパク質産物へ変換されることを意味するため、最も広義に使用される。従って、核酸がDNAである場合、発現とは、DNAの配列のRNAへの転写およびRNAのタンパク質への翻訳をさす。核酸がRNAである場合、発現は、このRNAのさらなるRNAコピーへの複製および/またはRNAのDNAへの逆転写を含み得、任意で、このDNAのさらなるRNA分子への転写を含み得る。いずれにせよ、RNAの発現は、準備/作製されたRNA種のタンパク質への翻訳を含む。従って、発現は、翻訳によって達成され、転写、逆転写、および複製からなる群より選択される一つまたは複数の過程を含む。多数のペプチドおよび/またはタンパク質のメンバーのタンパク質またはペプチドの発現を、インビトロ発現システムを使用して実施することができる。そのような発現システムは、細胞抽出物、典型的には、細菌、ウサギ網状赤血球、または小麦麦芽からの細胞抽出物を含み得る。多くの適切なシステムが市販されている。所望により、ライブラリーにおいて作製されるタンパク質の可能な数または種類を増加させるため、使用されるアミノ酸の混合物が合成アミノ酸を含んでいてもよい。これは、tRNAに人工アミノ酸を負荷し、選択すべきタンパク質のインビトロ翻訳のためにこれらのtRNAを使用することによって達成され得る。DNAのような核酸分子は、転写および翻訳の制御情報を含むヌクレオチド配列を含有しており、そのような配列が、ポリペプチドをコ

40

50

ードするヌクレオチド配列に機能的に連結されている場合、ペプチド/タンパク質を「発現することができる」と言われる。発現目的に適した態様は、ベクター、特に、発現ベクターの使用である。従って、発現ベクターによって形質転換/トランスフェクトされた宿主細胞も提供される。

【0147】

いくつかの態様において、本明細書に開示される核酸分子は、SEQ ID NO:6の配列もしくはその相同体、SEQ ID NO:9の配列もしくはその相同体、および/またはSEQ ID NO:12の配列もしくはその相同体を含むペプチドの発現を誘導しかつ/または制御することができる発現カセットを含む。いくつかの態様において、本明細書に開示される核酸分子は、(内在性起源のものであってもよいし外因性起源のものであってもよい)それぞれの宿主細胞における転写を開始するのに有効なプロモーターを含有するベクターに包含されている。

10

【0148】

本明細書において使用される場合、「発現カセット」という用語は、適切な宿主細胞における特定のヌクレオチド配列の発現を指図することができる核酸分子をさす。発現カセットは、1個または複数個の終結シグナルに機能的に連結された、関心対象のヌクレオチド配列に機能的に連結されたプロモーターを含む。それは、ヌクレオチド配列の適切な翻訳のために必要とされる配列も含み得る。コード領域は、関心対象のポリペプチドをコードすることができ、アンチセンスRNAまたは非翻訳RNAを含むが、これらに限定されない、関心対象の機能性RNAを、センス方向またはアンチセンス方向にコードすることもできる。関心対象のヌクレオチド配列を含む発現カセットは、キメラであり得る。即ち、その成分のうちの少なくとも一つが、その他の成分のうちの少なくとも一つに対して異種であり得る。発現カセットは、天然に存在するが、異種発現のために有用な組換え形態で入手されたものであってもよい。しかしながら、いくつかの態様において、発現カセットは宿主に対して異種である；即ち、発現カセットの特定の核酸配列が、宿主細胞に天然には存在せず、形質転換イベントによって宿主細胞または宿主細胞の祖先へ導入されたものである。発現カセット内のヌクレオチド配列の発現は、構成性プロモーターの調節下にあってもよいが、または宿主細胞が何らかの特定の外的刺激に曝された場合にのみ転写を開始する誘導可能プロモーターの調節下にあってもよい。植物または動物のような多細胞生物の場合、プロモーターは、特定の組織、器官、または発達の段階に特異的であってもよい。

20

30

【0149】

「遺伝子」とは、染色体上の特定の遺伝子座を占有し、生物学的機能に関連した核酸のセグメントである遺伝の単位を意味する。遺伝子は、転写および/または翻訳の制御配列、ならびにコード領域を包含する。コード配列に加えて、遺伝子は、プロモーター領域、シス制御配列、制御タンパク質のための特異的な認識配列である非発現DNAセグメント、遺伝子発現に寄与する非発現DNAセグメント、所望のパラメータを有するよう設計されたDNAセグメント、またはそれらの組み合わせを含み得る。遺伝子は、生物学的試料からのクローニング、既知のまたは予測された配列情報に基づく合成、および既存の配列の組換え誘導を含む、多様な方法によって入手され得る。

【0150】

遺伝子送達システムまたは遺伝子移入ビヒクルとも呼ばれる場合がある「ベクター」という用語は、インピトロ、エクスピボ、またはインピボの宿主細胞へ送達すべきポリヌクレオチドを含む高分子または分子の複合体に関する。典型的には、ベクターは、核酸配列の細胞への移行を可能にするかまたは容易にする一本鎖または二本鎖の環状核酸分子である。ベクターは、一般に、細胞へトランスフェクトされ、細胞ゲノム内で、または細胞ゲノムとは無関係に、複製することができる。環状の二本鎖核酸分子は、制限酵素による処理によって切断され、それによって直鎖化され得る。各種の核酸ベクター、制限酵素、および制限酵素によって切断されるヌクレオチド配列についての知識は、当業者に容易に入手可能である。SEQ ID NO:6の配列もしくはその相同体、SEQ ID NO:9の配列もしくはその相同体、および/またはSEQ ID NO:12の配列もしくはその相同体を含む配列のようなペプ

40

50

チドをコードする核酸分子は、制限酵素によってベクターを切断し、二片をライゲートすることによってベクターへ挿入され得る。ベクターは、例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスに基づくベクター、またはアデノウイルスベクターのようなウイルスベクターであり得る。ベクターは、原核生物ベクターの典型的な例でもあるプラスミドベクターであってもよい。それぞれのプラスミドは、いくつかの態様において、例えば、pBR322、ColEI、pSC101、pACYC184、または VXのような、大腸菌 (*E. coli*) において複製することができるプラスミドであってもよい。バチルスプラスミドには、pC194、pC221、またはpT127が含まれる。適切なストレプトマイセス (*Streptomyces*) プラスミドには、p1J101、および C31のようなストレプトマイセスバクテリオファージが含まれる。ベクターは、エピソームベクターとも呼ばれるリボソームに基づく染色体外ベクターであってもよい。エピソームベクターの二つの例示的な例は、oriPに基づくベクターおよびEBNA-1の誘導体をコードするベクターである。リンパ増殖性ヘルペスウイルスは、リンパ芽球において複製し、その天然生活環の一部においてプラスミドになるヘルペスウイルスである。ベクターは、有機的に修飾されたケイ酸に基づくものであってもよい。いくつかの態様において、ベクターは、トランスポゾンに基づくシステム、即ち、いわゆる、スリーピングビューティ (*Sleeping Beauty*) のようなトランスポゾン/トランスポサーゼシステム、フロッグプリンス (*Frog Prince*) トランスポゾン-トランスポサーゼシステム、またはTTAA特異的トランスポゾンピギーバック (*piggyBac*) システムであってもよい。トランスポゾンは、単細胞のゲノム内の異なる位置へ動き回ることができるDNAの配列であるという点で可動性の遺伝要素であり、その過程は転移と呼ばれる。その過程において、トランスポゾンは、変異を引き起こし、ゲノム内のDNAの量を変化させることができる。

10

20

#### 【0151】

「プロモーター」という用語は、本書の全体にわたって使用される場合、遺伝子配列発現のために必要とされる核酸配列をさす。プロモーター領域は、生物によって変動するが、種々の生物について、当業者に周知である。例えば、原核生物において、プロモーター領域は、(RNA転写の開始を指図する)プロモーター、およびRNAへ転写された場合に合成開始のシグナルを与え得るDNA配列の両方を含有する。そのような領域は、通常、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列等のような、転写および翻訳の開始に關与する5'非コード配列を含み得る。構成性プロモーターおよび誘導可能プロモーターの両方が、特定の態様の必要性に応じて、本発明に関して使用され得る。多様な可能性のある宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが周知である。制限酵素消化を介して起源DNAからプロモーターを除去し、単離されたプロモーター配列を選択のベクターへ挿入することによって、選択されたプロモーターを、本明細書に記載されたポリペプチドをコードするシストロンDNAに機能的に連結することができる。ネイティブプロモーター配列および多くの異種プロモーターの両方が、選択された核酸配列の増幅および/または発現を指図するために使用され得る。

30

#### 【0152】

本明細書に開示された方法において、核酸は、当技術分野において入手可能な細胞の形質転換のための核酸送達の任意の適切な技術によって宿主細胞へ導入され得る。適切な技術の例には、DNAの直接送達、例えば、トランスフェクション、微量注入を含む注入、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、DEAEデキストランに続くポリエチレングリコールの使用、直接超音波負荷、リボソームによって媒介されるトランスフェクション、受容体によって媒介されるトランスフェクション、微粒子銃、炭化ケイ素繊維による攪拌、アグロバクテリウムによって媒介される形質転換、乾燥/阻害によって媒介されるDNA取り込み、またはそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

40

#### 【0153】

本明細書に開示される方法は、SEQ ID NO:6の配列もしくはその相同体、SEQ ID NO:9の配列もしくはその相同体、および/またはSEQ ID NO:12の配列もしくはその相同体を含む配列の発現を測定する工程をさらに含み得る。これは、例えば、選択されたプロモーター

50

の調節下にあるコード核酸分子から転写されたRNA分子の数を決定することによって達成され得る。当技術分野において一般的に使用されている方法は、その後の逆転写酵素を使用したRNAのcDNAへのコピー、およびcDNA分子の蛍光色素へのカップリングである。分析は、例えば、DNAマイクロアレイの形態で実施され得る。多数のそれぞれのサービスおよびキットが市販されており、例えば、AffymetrixからGeneChip（登録商標）発現アレイが市販されている。転写因子の遺伝子発現を測定する他の手段には、オリゴヌクレオチドアレイおよび定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）が含まれるが、これらに限定されない。

**【0154】**

いくつかの態様において、ペプチド/タンパク質発現データを較正すること、またはそれらを見積もることが、有利であるかまたは所望される場合がある。従って、いくつかの態様において、本明細書に開示される方法は、入手された結果の、一つまたは複数の対照測定のものとの比較をさらに含む。そのような対照測定は、主測定自体と異なる任意の条件を含み得る。それは、例えば、それぞれのペプチド/タンパク質の発現が起こらない方法の条件を含み得る。対照測定のさらなる手段は、それぞれのペプチド/タンパク質の変異型、例えば、SEQ ID NO:6の配列もしくはその相同体、SEQ ID NO:9の配列の配列もしくはその相同体、および/もしくはSEQ ID NO:12の配列もしくはその相同体を含む対応するペプチド/タンパク質をコードしないか、または非機能性のペプチド/タンパク質をコードする核酸配列または遺伝子の使用である。

**【0155】**

一般に、本発明は、S100A8および/またはS100A9によって媒介される障害、即ち、タンパク質S100A8およびS100A9の一方または両方によって誘導される過度のTLR4シグナリングを含むTLR4シグナリングを特徴とする障害、状態、または疾患状態の診断の方法および使用ならびに処置の方法および使用にも関する。具体的な局面において、TLR4シグナリングは、類似した疾患を有しない細胞または組織におけるTLR4シグナリングのレベルを越えている、疾患を有すると推測される細胞または組織におけるTLR4シグナリングのレベルである。具体的な局面において、S100A8および/またはS100A9によって媒介される障害には、炎症が含まれる。いくつかの態様において、本明細書に開示されるペプチドまたはペプチド模倣体の使用は、TLR4シグナリング活性の阻止または低下を可能にする。

**【0156】**

本明細書に開示されるいくつかの方法および使用において、S100A8および/またはS100A9とTLR4受容体との間の複合体の形成が、低下させられる、例えば、防止される。本明細書に開示されるいくつかの方法および使用において、S100A8とS100A9との間のヘテロ四量体複合体の形成が、低下させられる、例えば、防止される。

**【0157】**

いくつかの態様において、本明細書に開示された方法は、S100A8および/もしくはS100A9またはこれらのタンパク質のいずれかの機能的断片と、TLR4受容体またはTLR4受容体の機能的断片との間の複合体の形成の測定を含む。TLR4受容体との結合に関して、S100A8の機能的断片およびS100A9の機能的断片は、二つの基準によって定義される。第1に、機能的断片は、TLR4受容体に結合し、TLR4受容体のシグナル伝達に影響を与えるのに十分に安定している複合体を形成することができる。一般に、S100A8のそのような断片は、ヒトS100A8タンパク質のアミノ酸位置55からアミノ酸位置71までに及ぶアミノ酸配列に対応する領域のアミノ酸配列を含むエピトープを含有する。S100A9のそのような断片は、一般に、ヒトS100A8タンパク質のアミノ酸位置63からアミノ酸位置79、および/またはアミノ酸位置73からアミノ酸位置85までに及ぶアミノ酸配列に対応する領域のアミノ酸配列を含むエピトープを含有する。第2に、そのような断片は、それぞれS100A8およびS100A9の天然に存在するパリアントの対応するアミノ酸配列との少なくとも60%の配列同一性を有し得る。いくつかの態様において、それぞれの断片は、それぞれS100A8およびS100A9の既知のパリアントの対応するアミノ酸配列との少なくとも80%、例えば、少なくとも95%の配列同一性を有する。S100A8またはS100A9の機能的断片は、TLR4受容体とのその複合体形成が影

響を受けるような方式で、化合物によってモジュレートされ得ることが理解される。

【0158】

TLR4受容体の機能的断片は、二つの基準によって定義される。第1に、機能的断片は、S100A8タンパク質およびS100A9タンパク質に結合し、TLR4受容体のシグナル伝達に影響を与えるのに十分に安定している複合体を形成することができる。第2に、そのような断片は、TLR4受容体の天然に存在するパリアントの対応するアミノ酸配列との少なくとも60%の配列同一性を有し得る。いくつかの態様において、それぞれの断片は、TLR4受容体の既知のパリアントの対応するアミノ酸配列との少なくとも80%、例えば、少なくとも95%の配列同一性を有する。TLR4受容体の機能的断片は、S100A8タンパク質およびS100A9タンパク質とのその複合体形成が影響を受けるような方式で、化合物によってモジュレートされ得ることが理解される。

10

【0159】

いくつかの態様において、本明細書に開示される方法は、二分子結合、即ち、S100A8タンパク質またはS100A8タンパク質の機能的断片とS100A9タンパク質またはS100A9の機能的断片との間の複合体の形成の測定を含む。いくつかの態様において、方法は、四分子結合、即ち、S100A8またはS100A8の機能的断片の2分子とS100A9またはS100A9の機能的断片の2分子との間の複合体の形成の測定を含む。

【0160】

互い対する結合に関して、S100A8の機能的断片およびS100A9の機能的断片は、三つの基準によって定義される。第1に、S100A9タンパク質の機能的断片は、S100A8タンパク質に結合し、1ミリ秒より長く検出されるよう十分に安定している複合体を形成することができる。同様に、S100A8タンパク質の機能的断片は、S100A9タンパク質に結合し、1ミリ秒より長く検出されるよう十分に安定している複合体を形成することができる。一般に、それぞれの複合体は、生理学的条件下で1ミリ秒より長い半減期を有する。第2に、そのような断片は、カルシウムイオンに結合することができる。それぞれの断片は、亜鉛イオンおよび/または銅イオンにも結合することができ得る。典型的には、S100A8タンパク質およびS100A9タンパク質のそのような断片は、少なくとも1個の機能的EFハンド、即ち、カルシウム結合のために必要とされることが公知の保存されたアミノ酸を含有するEFハンドを有する。第3に、そのような断片は、それぞれS100A8およびS100A9の天然に存在するパリアントの対応するアミノ酸配列との少なくとも60%の配列同一性を有し得る。いくつかの態様において、それぞれの断片は、それぞれS100A8およびS100A9の公知のパリアントの対応するアミノ酸配列との少なくとも80%、例えば、少なくとも95%の配列同一性を有する。それぞれS100A8およびS100A9の機能的断片は、それぞれS100A9およびS100A8とのその複合体形成が影響を受けるような方式で、化合物によってモジュレートされ得ることが理解される。

20

30

【0161】

複合体形成のそのような測定は、例えば、分光学的手段、光化学的手段、測光手段、蛍光測定手段、放射線学的手段、酵素手段、もしくは熱力学的手段、または細胞効果に頼ることができる。分光学的検出法の例は、蛍光相関分光である。光化学的方法は、例えば、光化学的架橋である。光活性標識、蛍光標識、放射標識、または酵素標識の使用は、それぞれ、測光検出法、蛍光測定検出法、放射線学的検出法、および酵素検出法の例である。熱力学検出法の例は、等温滴定熱量測定である。細胞効果を使用する方法の例は、単球からの炎症因子の放出、例えば、TNF の放出の測定である。これらの方法のいくつかは、電気泳動またはHPLCのような付加的な分離技術を含み得る。詳細には、標識の使用の例には、プローブとしての化合物または酵素が付着した免疫グロブリン、検出可能シグナルをもたらす触媒反応が含まれ得る。放射標識および電気泳動による分離を使用する方法の例は、電気泳動移動度シフトアッセイ法である。

40

【0162】

S100A9タンパク質およびS100A8タンパク質もしくはそれぞれの断片の間、またはS100A9および/もしくはS100A8タンパク質もしくはそれぞれの断片の間の複合体形成の測定が、

50

生物における炎症状態に関連した状態の診断、予防、および/または処置に適した化合物を同定する方法に含まれ得る。複合体の形成は、S100A9および/またはS100A8に特異的な免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様機能を有する結合パートナーの標的の非変性条件下での分子量に基づき分析され得る。例示的な例として、増加した分子量を有することが見出された標的を検出して、例えば、蛍光部分または蛍光シグナルを生成する部分によって検出可能に標識された免疫グロブリンまたは結合パートナーのシグナル強度を、定量化し、複合体形成の指標として使用することができる。さらなる例として、S100A9とS100A8との相互作用、またはS100A9および/もしくはS100A8とTLR4との相互作用、任意で、それぞれの機能的断片の相互作用は、例えば、表面プラズモン分光、光導波路光モード分光、またはプラズモン導波路共鳴分光を使用して、表面プラズモン共鳴に基づき検出され得る。光電子技術である表面プラズモン共鳴は、標識なしで、または量子ドットの形態のような金属もしくはメタロイドを含み得るナノ粒子のような標識を使用して測定され得る。いくつかの態様において、ナノ粒子は、近赤外線周波数を含む可能性のある可視波長で表面プラズモン共鳴を示す。そのようなナノ粒子は、金もしくは銀のような貴金属を含むことまたは該貴金属からなることができ、即ち、元素周期表の第11族（新IUPAC系による。旧IUPAC系およびCAS系によるとIB族）の元素、またはパラジウムもしくは白金のような元素周期表の第10族（新IUPAC系による。旧IUPAC系によるとVIII A族、CAS系のVIII族）の元素を含むことまたは該元素からなることができる。それぞれのナノ粒子は、可視スペクトルにおいて強力なプラズモン共鳴消滅バンドを示し、従って、分子色素に類似した深い色を示す。これらの消滅バンドは、入射光周波数が、局在表面プラズモン共鳴（LSPR）としても公知の、自由（電導）電子の集団的振動と共鳴する場合に起こる。LSPR励起は、極めて大きいモル吸光係数での波長選択的な吸収、効率的なレイリー散乱、およびナノ粒子の表面の付近での増強された局所的電磁場をもたらす。当技術分野においてよく確立されている方法である表面プラズモン共鳴の序論、およびセンサーへのその応用を提供している多様な概説が入手可能である（例えば、Willems, K.A., and Van Duyne, R.P., *Annu. Rev. Phys. Chem.* (2007) 58, 267-297; Homola, J. et al., *Anal. Bioanal. Chem.* (2003) 377, 528-539; Schuck, P., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (1997) 26, 541-566; またはHafner, J., *Laser Focus World* (2006) April, 99-101を参照のこと）。

10

20

### 【0163】

対応する複合体の測定を含むそれぞれの方法は、いくつかの態様において、入手された結果を、参照値または閾値と比較する工程を含み得る。閾値は、例えば、複合体が形成されているか否かを判定するために設定された値であり得る。閾値は、対象が炎症性状態に罹患しているか否かを判定するために設定された値であってもよい。閾値は、対象がS100A9およびS100A8に関連した炎症性状態に罹患しているか否かを判定するために設定された値であってもよい。

30

### 【0164】

いくつかの態様において、対応する複合体の測定を含む方法は、炎症性状態に罹患していることが推測されるかまたはわかっている対象に由来する試料に対して実施される。本書において参照測定とも呼ばれる対照測定は、炎症性状態に罹患していないことがわかっている対象に由来する試料に対して実施される測定であり得る。いくつかの態様において、それぞれの参照測定は、同年齢の対象に由来する（対照）試料に対して実施される。いくつかの態様において、そのような参照測定は、過去の時点で採取された同一の対象に由来する試料に対して実施される。本明細書に開示される方法において、例えば、試料において決定された形成された複合体の量を、そのような参照測定と比較することができる。いくつかの態様において、試料において決定された複合体の量を、閾値と比較する。そのような閾値は、いくつかの態様において、予め決定された閾値であり得る。いくつかの態様において、閾値は、対照試料において決定された複合体の量に基づく。一般に、それぞれの対照試料は、主測定において使用された試料と異なる任意の条件を有し得る。

40

### 【0165】

いくつかの態様において、対応する複合体の測定を含む方法は、複合体形成に影響を与

50

えると推測される物質を任意で含む、複合体の濃縮、精製、または単離された成分の混合物において実施される。TLR4受容体、S100A9、またはS100A8のような使用されるタンパク質は、例えば、適切な宿主生物において組換え形態で発現されたものであり得る。TLR4受容体、S100A9、またはS100A8の断片も、同様に、組換え形態での発現によって入手されたものであり得る。TLR4受容体、S100A9、またはS100A8の断片は、いくつかの態様において、確立されているペプチド合成技術によって合成されたものであってもよい。そのような測定は、一般に、緩衝剤および/またはカルシウム塩もしくは亜鉛塩のような塩を含む水溶液において実施される。多数の緩衝化合物が、当技術分野において使用されており、本明細書に記載された様々な過程を実施するために使用され得る。緩衝液の例には、リン酸、炭酸、コハク酸、クエン酸、酢酸、ギ酸、バルビツール酸、シュウ酸、乳酸、フタル酸、マレイン酸、カコジル酸、ホウ酸、(ACESとも呼ばれる)N-(2-アセトアミド)-2-アミノ-エタンスルホン酸、(HEPESとも呼ばれる)N-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸、(HEPPSとも呼ばれる)4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジン-プロパンスルホン酸、(PIPESとも呼ばれる)ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)、(TESとも呼ばれる)(2-[トリス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]-1-エタンスルホン酸、(CHESとも呼ばれる)2-シクロヘキシルアミノ-エタンスルホン酸、および(ADAとも呼ばれる)N-(2-アセトアミド)-イミノジアセテートの塩の溶液が含まれるが、これらに限定されない。任意の対イオンが、これらの塩において使用され得る；アンモニウム、ナトリウム、およびカリウムが、例示的な例として役立つ。緩衝剤のさらなる例には、少数を挙げると、トリエタノールアミン、ジエタノールアミン、エチルアミン、トリエチルアミン、グリシン、グリシルグリシン、ヒスチジン、(TRISとも呼ばれる)トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、(BIS-TRISとも呼ばれる)ビス-(2-ヒドロキシエチル)-イミノ-トリス(ヒドロキシメチル)メタン、および(TRICINEとも呼ばれる)N-[トリス(ヒドロキシメチル)-メチル]-グリシンが含まれるが、これらに限定されない。緩衝液は、そのような緩衝化合物の水溶液または適切な極性有機溶媒による溶液であり得る。例示的な例として、緩衝剤は、固体の形態に置かれていてもよく、例えば、凍結乾燥物であり得る。そのような場合、例えば、超音波によって補助されるかまたは達成される融合およびまたは混合によって、固形緩衝剤、例えば、粉末を水相に溶解させることができる。そのような場合、例えば、使用されるそれぞれの水相の容量を、所望の最終緩衝剤濃度を入手するために使用することができる。

10

20

30

**【0166】**

そのような態様において、即ち、複合体の濃縮、精製、または単離された成分の混合物が使用される場合、参照測定は、主測定の条件と異なる任意の条件の使用を含み得る。例示的な例として、TLR4受容体、S100A9、および/またはS100A8の断片が使用される場合、参照測定は、対応する全長タンパク質の使用を包含し得る。それぞれの複合体形成に対する効果について試験される化合物が主測定に含まれる態様において、参照測定は、この化合物が省略された測定であり得る。

**【0167】**

いくつかの態様において、閾値は、参照試料とも呼ばれ得る、多数の対照試料のデータの集合である。そのような態様において、閾値は、対照と関心対象の対象に由来する試料との間に有意差があるよう設定され得る。「有意」という用語は、増加のレベルが統計的に意味のあることを示すために使用される。例示的な例として、多数の試料を含む多数の測定は、関心対象の対象から入手されたものであり得る。次いで、p値を決定することができる。0.05、0.02、0.01、またはそれ未満のp値を、差を示すために採用することができる。いくつかの態様において、有意な増加とは、約2倍またはそれ以上、例えば、3倍またはそれ以上、例えば、少なくとも約5~約10倍またはそれ以上の、対照試料の値と比べた試験試料の値の偏差である。

40

**【0168】**

上述のように、予め決定された閾値は、いくつかの態様において、炎症性状態に関連した障害に罹患していないことがわかっている1人または複数人の対象から収集されたデー

50

タに基づき設定され得る。いくつかの態様において、そのようなデータ、例えば、表面プラズモン共鳴測定において測定されたシグナル強度、または非変性条件下での複合体形成を検出する抗体シグナル（前記）の、あるパーセンタイルを、閾値として使用することができる。対象の試料から入手されたか、または試験化合物の非存在下での参照条件を使用したデータのセットの値の範囲を、100等分することができる、即ち、範囲の百分率を決定することができる。パーセンタイルとは、データのあるパーセントがそれ未満であるそれぞれの範囲の中の値、換言すると、その値より小さい値の百分率を表す。例えば、95パーセンタイルは、データの95パーセントがそれ未満に見出される値である。いくつかの態様において、プロSP-Bまたはその有効部分のレベルは、90パーセンタイルより高いか、92パーセンタイルより高いか、93パーセンタイルより高いか、94パーセンタイルより高いか、95パーセンタイルより高いか、96パーセンタイルより高いか、97パーセンタイルより高いか、98パーセンタイルより高いか、または99パーセンタイルより高い場合に、増加または増大していると思なされ得る。

10

20

30

40

50

**【0169】**

予め決定された閾値であり得る閾値との比較は、手動で、半自動的に、または完全に自動的に実施され得る。いくつかの態様において、比較は、コンピュータによって支援され得る。コンピュータによって支援された比較は、例えば、コンピュータによって実装されるアルゴリズムを介して、入手された値または決定された量を比較するための参照として、データベースに保存された値を用いることができる。同様に、参照測定との比較は、手動で、半自動的に、または完全に自動的に、例えば、コンピュータによって支援された様式で実施され得る。

**【0170】**

いくつかの態様において、上記の複合体の形成を、複合体の成分のうちの一つを表面上に固定化することによって判定することができる。複合体の成分を互いに接触させ、複合体を形成させた後、典型的には、固定化された複合体成分を包含している媒体、例えば、緩衝溶液を交換することによって、複合体の未結合成分を除去することができる。その後、複合体が形成されたか否かを査定し、任意で、そのような複合体がどの程度形成されたかを査定するため、固定化された形態で提供されなかった、形成された複合体の成分の存在を判定することができる。例示的な例として、TLR4受容体の機能的断片と、S100A9タンパク質および/またはS100A8タンパク質との間の複合体が形成されたか否か、例えば、どの程度形成されたかを判定することを意図することができる。そのような態様において、TLR4受容体の断片を、表面、例えば、マルチウェルプレート内のウェルの表面に固定化することができる。複合体形成およびウェル内の媒体の交換の後、S100A9および/またはS100A8に対する結合特異性を有する免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーを、複合体形成の検出のために使用することができる。既に説明されたように、S100A9上および/またはS100A8上の領域に対する結合特異性を有する本明細書に開示された抗体は、TLR4受容体との結合の部位において、それぞれ、S100A9およびS100A8と相互作用する。従って、そのような抗体は、TLR4受容体に結合していないS100A9および/またはS100A8のみを検出することができる。従って、TLR4受容体との複合体として存在するS100A9タンパク質およびS100A8タンパク質の検出のためには、異なる特異性を有する、即ち、S100A9上および/またはS100A8上の異なる部位に結合する免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーが、一般に使用され得る。S100A9上のそのような結合部位は、Uniprot/Swissprotアクセッション番号P06702のヒトタンパク質のアミノ酸位置63~79および/またはアミノ酸位置73~85によって定義された領域とは異なるエピトープである。S100A8上のそれぞれの結合部位は、Uniprot/Swissprotアクセッション番号P05109 (SEQ ID NO:78) のヒトタンパク質のアミノ酸位置55~71によって定義された領域とは異なるエピトープである。ヒトS100A9タンパク質のアミノ酸位置63~79および/またはアミノ酸位置73~85によって定義された領域に対する結合特異性を有する抗体を、この領域がアクセス可能であるS100A9タンパク質が残存しているか否かを判定するため、対照測定において使用することができる。

## 【 0 1 7 1 】

試料中のS100A9、S100A8、および/またはTLR4受容体の量の決定は、使用可能な任意の適切な技術によって実施され得る。これに関して適切な技術の例示的な例は、ラジオイムノアッセイ法(RIA)のような放射標識アッセイ法、または酵素連結免疫吸着アッセイ法(ELISA)のような酵素イムノアッセイ法、沈降(具体的には、免疫沈降)、サンドイッチ酵素免疫試験、電気化学発光サンドイッチイムノアッセイ法(ECLIA)、解離増強ランタニド蛍光イムノアッセイ法(DELFIA)、シンチレーション近接アッセイ法(SPA)、比濁法、比濁分析、ラテックス増強型の比濁法もしくは比濁分析、または固相免疫試験である。(ゲル電気泳動、2Dゲル電気泳動、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、ウエスタンブロッティング、および質量分析のような)当技術分野において公知のさらなる方法を、単独で、または本明細書に記載される標識もしくはその他の検出法と組み合わせる使用することができる。RIAは、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子と抗原との間に形成された複合体に関連した放射能の測定に基づき、ELISAは、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子と抗原との間に形成された複合体に関連した酵素反応の測定に基づく。典型的には、放射標識アッセイ法または酵素イムノアッセイ法は、例えば、S100A9、S100A8、および/またはTLR4との複合体を形成していないS100A9、S100A8、および/またはTLR4の結合パートナーを除去し(前記参照)、それによって、S100A9、S100A8、および/またはTLR4との複合体を形成したS100A9、S100A8、および/またはTLR4の結合パートナーのみを残す、一つまたは複数の分離工程を含む。これは、S100A9、S100A8、および/またはTLR4の存在に起因する特異的なシグナルの生成を可能にする。

10

20

## 【 0 1 7 2 】

S100A9、S100A8、および/またはTLR4の量、即ち、抗原の量を測定するためのELISA試験またはRIA試験は、競合型であり得る。例えば、酵素によって標識された抗原を、限定された量の免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子について競合する抗原を含有している試験試料と混合する。次いで、反応した(結合した)抗原を、遊離の材料から分離し、その酵素活性を基質の添加によって推定する。抗原測定のための代替的な方法は、二重免疫グロブリン/タンパク質性結合分子サンドイッチ技術である。この改変においては、固相を、特異的な免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子によってコーティングする。次いで、これを、抗原を含有している対象由来の試料と反応させる。次いで、酵素によって標識された特異的な免疫グロブリン/タンパク質性結合分子を添加し、続いて、酵素基質を添加する。それによって、試験試料中の「抗原」が「捕獲され」、感作された固相に固定化され、次いで、それ自体が、酵素によって標識された免疫グロブリン/タンパク質性結合分子を固定化する。この技術は、イムノラジオメトリックアッセイ法と類似している。

30

## 【 0 1 7 3 】

間接ELISA法においては、抗原を受動吸着によって固相上に固定化する。次いで、試験血清を固相と共にインキュベートすることができ、試験血清中の免疫グロブリンが、固相上の抗原と共に複合体を形成する。同様に、固相上の抗原とタンパク質性結合分子との間の複合体の形成を可能にするため、免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子の溶液を固相と共にインキュベートすることができる。未反応の血清成分を除去するために洗浄した後、酵素に連結された抗免疫グロブリン免疫グロブリン抗タンパク質性結合分子免疫グロブリンを固相と接触させ、インキュベートする。第2の試薬が、免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子であるよう選択される場合、抗原に対するタンパク質性結合分子または免疫グロブリンに特異的に結合するそれぞれのタンパク質性結合分子が使用される。第2のタンパク質性結合分子または免疫グロブリンと、抗原に結合した第1のタンパク質性結合分子または免疫グロブリンとの複合体が形成される。再び洗浄することによって、未反応の材料を除去する。RIAの場合には、放射能シグナルを検出する。ELISAの場合には、酵素基質を添加する。その色変化が、試験試料中の抗体値に比例する抗原を含む固定化された複合体の量の尺度になり得る。

40

50

## 【0174】

別の態様において、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子を、重合体ビーズ（前記）の表面のような表面へ固定化すること、または重合体プレートもしくはガラスプレートのような装置の表面へコーティングすることができる。そのような態様は、上記の複合体の形成の測定と組み合わせで使用され得る。S100A9、S100A8、および/またはTLR4に対する結合特異性を有する免疫グロブリンまたはタンパク質性結合分子を、表面に結合する抗体のそれぞれの標的を固定化するために用いることができる。次いで、複合体の残りの成分を提供し、任意で、複合体形成に対する影響について試験すべき化合物を提供した後、複合体を形成させることができる。その後、複合体の形成を、適切な免疫グロブリンまたはタンパク質性結合分子を使用して検出することができる。固定化によって、ELISAのような検出技術において、表面、例えば、ビーズまたはプレートを単に洗浄することによって、存在する他の成分から免疫複合体を容易に分離することができる。これは、当技術分野において現在使用されている最も一般的な方法であり、固相RIAまたは固相ELISAと呼ばれる。この態様は、S100A9、S100A8、および/またはTLR4の量を決定するために特に有用であり得る。一般に、放射標識アッセイ法または酵素免疫アッセイ法の任意の態様において、固相への受動吸着を、最初の工程において使用することができる。全てのその後の洗浄およびインキュベーションの工程において、湿潤剤を含めることによって、他の試薬の吸着を防止することができる。ある工程から次の工程への試薬のキャリアオーバーを防止するため、洗浄を実施することが有利であり得る。

10

## 【0175】

ELISAの様々な他の改変が、当技術分野において使用されている。例えば、二重抗体サンドイッチ法において使用される第2のタンパク質性結合分子または免疫グロブリンが異なる種に由来し、次いで、これが、抗免疫グロブリン酵素コンジュゲートまたは抗タンパク質性結合分子酵素コンジュゲートと反応させられるシステムである。この技術には、不足しているかまたは低い有効性を有している場合がある特異的な免疫グロブリンまたはタンパク質性結合分子の標識を回避するという可能性のある利点がある。この同技術は、純粋でない抗原しか入手可能でない場合に、免疫グロブリンまたはタンパク質性結合分子をアッセイするために使用され得；特異的な反応性の抗原が、固相上に固定化された抗体によって選択される。

20

## 【0176】

抗原についてのELISAアッセイ法の別の例において、表面、特異的な抗原を、表面、例えば、使用されるプレートに固定化し、次いで、表面を、参照免疫グロブリンまたは参照タンパク質性結合分子と試験試料との混合物と共にインキュベートする。試験試料中に抗原が存在しない場合、参照免疫グロブリンまたは参照タンパク質性結合分子が、抗原によって感作された表面に固定される。試験溶液中に抗原が存在する場合、これが、参照免疫グロブリンまたは参照タンパク質性結合分子と化合し、それらは感作された固相とは反応し得ない。次いで、付着した免疫グロブリン/タンパク質性結合分子の量は、酵素によって標識された抗グロブリン/抗結合分子コンジュゲートおよび酵素基質によって示される。（参照システムと比較された）試験試料中の基質分解の障害の量は、試験システム中の抗原の量に比例する。

30

## 【0177】

いくつかの態様において、対象の試料においてまたは対象の試料から決定された、ヒトタンパク質S100A9のアミノ酸位置63~79および/もしくは73~85に対応する領域ならびに/またはヒトタンパク質S100A8のアミノ酸位置55~71に対応する領域がアクセス可能でないS100A9および/もしくはS100A8の量またはS100A9の割合を、対照対象由来の試料のような、単一の対照試料または複数の対照試料と、任意の適切な様式で比較することができる。例示的な例として、対照試料中のS100A9およびS100A8のヘテロ二量体またはヘテロ四量体のレベルを、例えば、所定の時点において、標準偏差値とカップリングされた平均（平均の）値によって特徴決定することができる。いくつかの態様において、対象におけるS100A9およびS100A8のヘテロ二量体およびまたはヘテロ四量体のレベルは、一つまたは複数

40

50

の対照試料において決定された対応するヘテロ二量体 / 四量体の平均値より1標準偏差またはそれ以上高いかまたは低い場合、増加したまたは減少したと見なされ得る。いくつかの態様において、ヘテロ二量体 / 四量体の決定されたレベルは、入手された値が、対照試料において決定された平均値より約1.5標準偏差高いかまたは低い場合、例えば、約2標準偏差、約3標準偏差、約4標準偏差、またはそれ以上高いかまたは低い場合、増加したまたは減少したと見なされる。いくつかの態様において、ヘテロ二量体 / 四量体の決定された量は、入手された値が、対照試料において決定されたタンパク質レベルより約1.2倍であるかまたはそれより高いもしくは低い場合、例えば、約1.5倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約5倍、またはそれ以上高いかまたは低い場合、異なっていると見なされる。いくつかの態様において、ヘテロ二量体 / 四量体の決定されたレベルは、入手された値が、対照試料において決定されたS100A9およびS100A8のヘテロ二量体およびまたはヘテロ四量体の量より、約0.8倍またはそれ未満である場合、例えば、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%、約25%、約20%、またはそれ以下である場合、増加したと見なされる。

10

20

30

40

50

#### 【0178】

免疫グロブリンまたはタンパク質性結合パートナーを含む、本明細書に記載された化合物または組み合わせ、および本明細書に開示される方法によって同定された化合物または組み合わせを、単独で、または、併用療法の場合などの他の活性成分と混合されたかもしくは安定剤を含む適切な担体もしくは賦形剤と混合された薬学的組成物として、細胞、動物、またはヒト患者へ投与することができる。そのような担体、賦形剤、または安定剤は、一般的に、用いられた投薬量および濃度において、それに曝された細胞または哺乳動物にとって非毒性であるという点で、薬学的に許容される。多くの場合、生理学的に許容される担体は、水性pH緩衝溶液である。生理学的に許容される担体の例には、リン酸、クエン酸、およびその他の有機酸のような緩衝剤；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性重合体；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、もしくはリジンのようなアミノ酸；単糖、二糖、およびグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含むその他の炭水化物；EDTAのようなキレート剤；マンニトールもしくはソルビトールのような糖アルコール；ナトリウムのような塩形成対イオン；ならびに / またはTWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、およびPLURONICS（登録商標）のような非イオン性界面活性剤が含まれる。例示的な経路には、経口、経皮、および非経口の送達が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0179】

適切な投与経路には、例えば、デポー投与、経口投与、直腸投与、経粘膜投与、または腸投与；筋肉内注射、皮下注射、静脈内注射、髄内注射、およびくも膜下腔内注射、直接脳室内注射、腹腔内注射、鼻腔内注射、または眼内注射を含む非経口送達が含まれ得る。

#### 【0180】

あるいは、例えば、組織への化合物または組み合わせの直接注射を介して、しばしばデポー製剤または徐放性製剤で、全身的ではなく局所的に化合物または組み合わせを投与することもできる。

#### 【0181】

さらに、標的型薬物送達システムで、例えば、腫瘍特異抗体によってコーティングされたリポソームで、薬物を投与することもできる。リポソームは、腫瘍へターゲティングされて、腫瘍によって選択的に取り込まれ得る。

#### 【0182】

本明細書に開示された薬学的組成物は、上記定義のような化合物または組み合わせを含む。そのような薬学的組成物は、自体公知である様式で、例えば、従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、粉碎、乳化、カプセル化、封入、または凍結乾燥の過程によって製造され得る。

#### 【0183】

従って、本発明に従い使用するための薬学的組成物は、薬学的に使用され得る調製物への活性化化合物または組み合わせの加工を容易にする賦形剤および助剤を含む1種または複数種の生理学的に許容される担体を使用して、従来の様式で製剤化され得る。適切な製剤は、選ばれた投与経路に依存する。

【0184】

注射の場合、本明細書に開示された製剤は、水溶液、例えば、ハンス液、リンゲル液、または生理食塩緩衝液のような生理学的に適合性の緩衝液で製剤化され得る。経粘膜投与の場合、透過すべき障壁にとって適切な浸透剤が、製剤中に使用される。そのような浸透剤は、当技術分野において一般に公知である。

【0185】

経口投与の場合、化合物または組み合わせは、化合物または組み合わせを当技術分野において周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって容易に製剤化され得る。そのような担体は、処置すべき患者による経口摂取のための錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、または懸濁物として、本明細書に開示された化合物または組み合わせを製剤化することを可能にする。

【0186】

経口使用のための薬学的調製物は、固形賦形剤を添加し、任意で、得られた混合物を破碎し、錠剤または糖衣錠のコアを入手するため、所望により、適切な助剤を添加した後、顆粒の混合物を加工することによって入手され得る。適切な賦形剤は、具体的には、乳糖、ショ糖、マンニトール、またはソルビトールを含む糖のような増量剤；例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、イネデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および/またはポリビニルピロリドン (PVP) のようなセルロース調製物である。

【0187】

所望により、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムのようなその塩のような、崩壊剤が添加されてもよい。

【0188】

糖衣錠コアには、適切な剤皮が施される。任意で、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、ならびに適切な有機溶媒または溶媒混合物を含有していてもよい、濃縮糖溶液が、この目的のために使用され得る。同定のため、または活性化化合物の異なる組み合わせもしくは組み合わせ用量を特徴決定するため、錠剤または糖衣錠の剤皮に染料または色素が添加されてもよい。

【0189】

経口使用され得る薬学的調製物には、ゼラチンで作製されたプッシュフィット (push-fit) カプセル、ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールのような可塑性で作製された軟密封カプセルが含まれる。プッシュフィットカプセルは、乳糖のような増量剤、デンプンのような結合剤、および/またはタルクもしくはステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤と混和され、任意で、安定剤と混和された活性成分を含有することができる。軟カプセルにおいて、活性化化合物または組み合わせは、脂肪油、流動パラフィン、または液状ポリエチレングリコールのような適切な液体に溶解または懸濁させられ得る。さらに、安定剤が添加され得る。経口投与のための製剤は、全て、そのような投与に適した投薬量でなければならない。頬投与の場合、組成物は、従来の様式で製剤化された錠剤またはロゼンジの形態をとり得る。

【0190】

吸入による投与の場合、本明細書に開示される使用のための化合物または組み合わせは、適切な噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、またはその他の適切な気体を使用して、加圧されたパックまたは噴霧器から、エアロゾルスプレー提示の形態で便利に送達される。加圧

10

20

30

40

50

されたエアロゾルの場合、投薬量単位は、定量を送達するための弁を提供することによって決定され得る。吸入器または通気器において使用するためのカプセルおよびカートリッジ、例えば、ゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物または組み合わせの粉末混合物および乳糖またはデンプンのような適切な粉末基剤を含有して、製剤化され得る。

【0191】

化合物または組み合わせは、注射、例えば、ポーラス注射または連続注入による非経口投与のために製剤化されてもよい。注射のための製剤は、単位剤形、例えば、アンプルまたは保存剤が添加された多用量容器で提示され得る。組成物は、油性または水性のビヒクルによる懸濁物、溶液、または乳濁液のような形態をとり得、懸濁剤、安定剤、および/または分散剤のような製剤化用薬剤を含有し得る。

10

【0192】

非経口投与のための薬学的製剤には、水溶性の形態の活性化合物または組み合わせの水溶液が含まれる。さらに、活性化合物または組み合わせの懸濁物は、適切な油性注射用懸濁物として調製され得る。適切な親油性の溶媒またはビヒクルには、ゴマ油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、またはリポソームが含まれる。水性注射用懸濁物は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランのような懸濁物の粘性を増加させる物質を含有し得る。任意で、懸濁物は、適切な安定剤、または高度に濃縮された溶液の調製を可能にするための化合物もしくは組み合わせの可溶性を増加させる薬剤も含有し得る。

20

【0193】

あるいは、活性成分は、使用前に、適切なビヒクル、例えば、無菌の発熱性物質不含水によって再生させるための粉末形態であってもよい。化合物または組み合わせは、例えば、カカオ脂またはその他のグリセリドのような従来の坐薬用基剤を含有している、坐薬または停留浣腸のような直腸組成物へ製剤化されてもよい。

【0194】

既に記載された製剤に加えて、化合物または組み合わせは、デポー調製物としても製剤化され得る。そのような長時間作用型製剤は、留置（例えば、皮下もしくは筋肉内）、または筋肉内注射によって投与され得る。従って、例えば、化合物または組み合わせは、適切な重合体材料もしくは疎水性材料を用いて（例えば、許容される油による乳濁液として）、またはイオン交換樹脂を用いて、または難溶性誘導體として、例えば、難溶性塩として製剤化され得る。

30

【0195】

本明細書に開示された疎水性化合物または組み合わせのための薬学的担体は、ベンジルアルコールを含む共溶媒系、非極性界面活性剤、水混和性有機重合体、および水相である。共溶媒系は、VPD共溶媒系であり得る。VPDは、無水エタノールで全量にされた3%w/vベンジルアルコール、8%w/v非極性界面活性剤ポリソルベート80、および65%w/vポリエチレングリコール300の溶液である。VPD共溶媒系（VPD:D5W）は、5%デキストロース水溶液で1:1に希釈されたVPDからなる。

【0196】

この共溶媒系は、疎水性化合物または組み合わせを十分に溶解させ、それ自体、全身投与時に低い毒性を生ずる。当然、共溶媒系の割合は、その可溶性および毒性の特徴を破壊することなく大きく変動させられ得る。

40

【0197】

さらに、共溶媒成分の同一性が変動し得る。例えば、他の低毒性の非極性界面活性剤が、ポリソルベート80の代わりに使用されてもよく；ポリエチレングリコールの分率サイズが変動させられてもよく；ポリエチレングリコールが、他の生体適合性の重合体、例えば、ポリビニルピロリドンに交換されてもよく；デキストロースが他の糖または多糖に置換されてもよい。

【0198】

疎水性薬学的化合物のためのその他の送達システムも用いられ得る。リポソームおよび

50

乳濁液は、疎水性薬物のための送達ビヒクルまたは担体の周知の例である。ジメチルスルホキシドのようなある種の有機溶媒も用いられるが、一般的には、より大きな毒性という犠牲を伴う。さらに、化合物または組み合わせは、治療剤を含有している固形疎水性重合体の半透性マトリックスのような徐放システムを使用して送達され得る。様々な型の徐放性材料が確立されており、当業者に周知である。徐放性カプセルは、化学的性質に依って、数週間～100日超にわたり化合物または組み合わせを放出する。治療用試薬の化学的性質および生物学的安定性に依って、タンパク質安定化のための付加的な戦略が用いられてもよい。

【0199】

薬学的組成物は、適切な固相またはゲル相の担体または賦形剤も含み得る。

10

【0200】

そのような担体または賦形剤の例には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールのような重合体が含まれるが、これらに限定されない。

【0201】

本発明に関して使用され得る化合物の多くは、薬学的に適合性の対イオンとの塩として提供され得る。薬学的に適合性の塩は、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等を含むが、これらに限定されない、多くの酸によって作製され得る。塩は、対応する遊離塩基形態である水性またはその他のプロトン性の溶媒においてより可溶性である傾向がある。

20

【0202】

本発明に関して使用するのに適した薬学的組成物には、活性成分がその意図された目的を達成するのに有効な量で含有されている組成物が含まれる。より具体的には、治療的に有効な量とは、疾患を予防するか、疾患を寛解させるか、もしくは疾患の症状を寛和するのに、または処置されている対象の生存を延長するのに有効な化合物の量を意味する。治療的に有効な量の決定は、特に、本書において提供された詳細な開示を考慮すれば、十分に当業者の能力の範囲内にある。

【0203】

本明細書に開示された方法において使用される任意の化合物について、治療的に有効な用量は、細胞培養アッセイ法から最初に推定され得る。例えば、細胞培養物において決定されるIC<sub>50</sub>（即ち、キナーゼ活性の最大の半分の阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血中濃度範囲を達成するための用量を、動物モデルにおいて公式化することができる。そのような情報を、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。

30

【0204】

本明細書に記載された化合物または組み合わせの毒性および治療有効性は、例えば、LD<sub>50</sub>（集団の50%に対して致死の用量）およびED<sub>50</sub>（集団の50%において治療的に有効な用量）を決定するための、細胞培養物または実験動物における標準的な薬学的手法によって決定され得る。毒性効果と治療効果との間の用量比が治療指数であり、それは、LD<sub>50</sub>とED<sub>50</sub>との間の比として表され得る。高い治療指数を示す化合物または組み合わせを使用することが所望され得る。これらの細胞培養アッセイ法および動物研究から入手されたデータを、ヒトにおいて使用するための投薬量の範囲を公式化するために使用することができる。そのような化合物または組み合わせの投薬量は、好ましくは、ED<sub>50</sub>を含む循環血中濃度の範囲内に存在し、毒性をほとんどまたは全く有しない。投薬量は、用いられる剤形および用いられる投与経路に依って、この範囲内で変動し得る。正確な製剤、投与経路、および投薬量は、患者の状態を考慮して、個々の医師によって選ばれ得る。

40

【0205】

投薬の量および間隔は、キナーゼをモジュレートする効果を維持するのに十分である活性部分の血漿レベルまたは最小有効濃度（MEC）を提供するため、個々に調整され得る。MECは、各々の化合物または組み合わせについて変動し得るが、インビトロデータ；例えば

50

、キナーゼの50～90%の阻害を達成するのに必要な濃度から推定され得る。MECを達成するのに必要な投薬量は、個々の特徴および投与経路に依ると考えられる。しかしながら、HPLCアッセイ法またはバイオアッセイ法を、血漿中濃度を決定するために使用することができる。

【0206】

投薬間隔も、MEC値を使用して決定され得る。化合物は、10～90%、例えば、約30～約90%、例えば、約50～約90%の時間、MECより高い血漿中レベルを維持する計画を使用して、投与されるべきである。局所投与または選択的取り込みの場合、薬物の有効局所濃度は、血漿中濃度に関係しない可能性がある。投与される組成物の量は、当然、処置される対象、対象の体重、罹患の重症度、投与の様式、および処方する医師の判断に依存し得る。

10

【0207】

組成物は、所望により、活性成分を含有している1個または複数個の単位剤形を含有することができる、パックまたはディスペンサー装置で提示され得る。パックには、例えば、プリスターパックのような、金属製またはプラスチック製のホイルが含まれ得る。パックまたはディスペンサー装置には、投与のための説明書が添付され得る。医薬品の製造、使用、または販売を規制する政府機関によって規定された形態で、ヒトまたは動物への投与のための化合物の形態の機関による承認を反映する、容器に関連した通知も、パックまたはディスペンサーに添付され得る。そのような通知は、例えば、処方薬のためのU.S. Food and Drug Administrationもしくはその他の政府機関によって承認されたラベリング、または承認された添付文書であり得る。

20

【0208】

適合性の薬学的担体で製剤化された本明細書に開示された組成物は、調製され、適切な容器に置かれ、適応症の処置のためのラベルを付されてもよい。ラベル上に示される適切な状態には、例えば、癌の処置が含まれ得る。

【0209】

既に説明されたように、本発明は、とりわけ、S100A8タンパク質および/またはS100A9タンパク質に結合し、その活性をモジュレートすることができる免疫グロブリンまたはタンパク質性結合分子の診断的、予後的、および治療的な使用を包含する。本発明者らの所見に基づき、炎症に関連した状態を予防するか、阻害するか、阻止するか、または逆転させることができる化合物を同定する方法も、提供される。これらの方法のいくつかは、インビボ方法またはエクスピボ方法である。方法のいくつかは、それぞれのペプチド、ペプチド模倣体、または組み合わせを同定するインビトロ方法である。

30

【0210】

本明細書中の以前に発表された文献についての掲載または考察は、その文献が最先端技術の一部であるかまたは共通の一般知識であることの容認として必ずしも解釈されるべきでない。

【0211】

本明細書に例示的に記載された本発明は、本明細書に具体的に開示されていない1つまたは複数の要素、1つまたは複数の限定のいずれも無い状態で、適切に実施され得る。従って、例えば、「を含む (comprising)」、「を含む (including)」、「含有している」等の用語は、拡張的に非限定的に読解されるべきである。「1つの (a)」、「1つの (an)」、または「その (the)」のような単数形には、文脈によって明白に否定されない限り、複数の対象物が含まれる。他に示されない限り、一連の要素に先行する「少なくとも」という用語は、一連の中の全ての要素をさすものと理解される。「少なくとも1つ」および「のうちの少なくとも1つ」という用語には、例えば、1、2、3、4、もしくは5つまたはそれ以上の要素が含まれる。明示された範囲の上下のわずかな変動が、範囲内の値と実質的に同一の結果を達成するために使用され得る。また、他に示されない限り、範囲の開示は、最小値と最大値との間の全ての値を含む連続的な範囲であるものとする。

40

【0212】

さらに、本明細書において使用された用語および表現は、限定ではなく説明の用語とし

50

て使用されており、そのような用語および表現の使用に、示され記載された特色またはその一部の等価物を除外する意図はなく、様々な改変が特許請求の範囲に記載された本発明の範囲内で可能であることが認識される。従って、本発明が、例示的な態様およびオプションの特色によって具体的に開示されたが、本明細書に開示された具体化された本発明の改変および変動が、当業者によって再分類され得、そのような改変および変動は、本発明の範囲内にあると見なされることが、理解されるべきである。

#### 【0213】

本発明は、本明細書において広範に一般的に記載された。一般的開示に含まれる、より狭い種および垂属の群の各々も、本発明の一部を形成する。これは、削除された材料が本明細書中に具体的に言及されているか否かに関わらず、属から何らかの主題を除去するという条件または否定的限定を含む本発明の一般的説明を含む。

10

#### 【0214】

他の態様も、添付の特許請求の範囲に含まれる。さらに、本発明の特色または局面がマーカッシュ群によって記載される場合、それによってマーカッシュ群の個々のメンバーまたはメンバーの垂群によっても本発明が記載されることを、当業者は認識するであろう。

#### 【0215】

本発明が容易に理解され、実施され得るよう、以下の非限定的な例によって具体的な態様を説明する。

#### 【実施例】

#### 【0216】

当技術分野において公知の標準的な技術を使用して、本発明者らは、個々のヒトタンパク質S100A8およびS100A9を組換え形態で発現させ、精製した。ホモ二量体およびヘテロ二量体を生成した後、複合体の特性を分析した。図1は、示された濃度の(A)組換えヒトS100A8、組換えヒトS100A9、またはヒトS100A8/S100A9、および(B)組換えヒトS100A8/S100A9、組換えヒトS100A8/S100A9(N69A)、またはS100A8/S100A9(E78A)によるヒト単球の4時間の刺激を例示する。培養培地へ放出されたTNF を、ELISAによって定量化した。

20

#### 【0217】

ホモ二量体は、単球に対する活性化特性を示したが、s100A8およびS100A9のヘテロ四量体複合体は、個々の成分と比較可能な活性化特性を示さなかった(図1A)。部位特異的変異誘発によって(S100A8/S100A9)<sub>2</sub>四量体の形成を防止し、本発明者らは、四量体の形成がTLR4への結合にとって重要なあるアミノ酸を阻止することを見出した。

30

#### 【0218】

S100A9内の第2のカルシウム結合EFハンド内の特定のアミノ酸、即ち、N69およびE78を変異させることによって、四量体形成の阻害が引き起こされる。さらに、この変異は、ホモ二量体によって引き起こされる活性化と比較可能な単球の活性化をもたらす(図1B)。従って、S100A8およびS100A9の活性は、そのオリゴマー化状態によって調節される。

#### 【0219】

S100A8タンパク質およびS100A9タンパク質の発現および精製。付加的なペプチド配列を含まない組換え(rec)タンパク質の発現のため、野生型S100A8、野生型S100A9、およびS100A9 EFハンド変異体からのcDNAを、pET11/20ベクター[50-NdeI;30-BamHI]へクローニングした。遺伝子産物の発現および単離を、大腸菌株BL21(DE3)において実施した。細菌を、2×YTで37 °Cで24時間増殖させた。その後、細菌を採集し、溶解し、封入体(IB)を調製した。IBペレットを8M尿素緩衝液に溶解させ、適切な再折り畳みを確立するため、塩酸を添加することによって試料をまずpH 2.0~2.5に調整した。室温での60分のインキュベーションの後、試料を、2mM DTTの存在下で、再折り畳みのため、pH 7.4に適應するよう、段階的に透析した。凝集した材料をペレット化するための遠心分離(10分、60,000g、4 °C)の後、試料をさらに透析し、陰イオン交換カラムおよびゲル濾過クロマトグラフィーに適用した。ヘテロ二量体複合体を調製するため、組換えタンパク質を、まず等モル濃度において1:1で混合した。試料を-20 °Cでストック溶液として保管した。正確な再折り畳みおよび複合体形成を、SDS-PAGE、CD分光学、MALDI-MS、およびESI-MSによって査定し

40

50

た。

【0220】

S100調製物中の最大内毒素混入を、リムルスアメボサイトライゼート(LAL)アッセイ法(BioWhittaker, Walkersville, MD)によって決定したところ、1pg LPS/μg S100タンパク質未満であったか、または異なるバッチにおいては検出できなかった。さらに、LPS混入による刺激効果を除外するため、対照実験においてポリミキシンB(50μg/ml; Sigma)をS100A8に添加した。

【0221】

単球の調製および刺激。フィコールパック(Ficoll-Paque)およびその後のパーコール(Percoll)密度遠心法(Pharmacia, Freiburg, Germany)によって、ヒトバフィーコートから単球を単離した。刺激前に1日、15%ウシ胎仔血清が補足されたマッコイ5a培地を使用して、テフロンバッグ(Biofolie 25; Heraeus Instruments, Hanau, Germany)において細胞を培養した。図に示されるような異なる用量のhS100A8、hS100A9、hS100A8/S100A9、または修飾型タンパク質と共に単球を4時間インキュベートし、上清中のTNF-α濃度をELISA(OptEIA, BD Biosciences, Germany)によって決定した。

10

【0222】

サイトカイン濃度の決定。ELISA(OptEIA, BD Biosciences)によって、培養上清中のサイトカインTNF-αの放出を測定した。

【0223】

当技術分野において公知である、ホモ二量体、ヘテロ二量体、およびヘテロ四量体の3D構造に基づくコンピュータ支援アプローチを使用して、本発明者らは、ホモ二量体型、およびS100A8とS100A9とのヘテロ二量体においては自由にアクセス可能であるが、ヘテロ四量体型(S100A8/S100A9)<sub>2</sub>においては阻止される、S100A9のアミノ酸を同定した。主として、EFハンドIIとも名付けられているC末端EFハンドに位置するアミノ酸が、含まれていることが見出された(図2A)。カルシウム結合には同時に関与しないアミノ酸である、これらのアミノ酸のうちのいくつかを、その後、変異研究のために選択した(図2B、即ち、Uniprot/Swissprotアクセッション番号P06702(2012年9月5日時点でバージョン147、SEQ ID NO:77)のヒトタンパク質S100A9の位置のアミノ酸。

20

【0224】

コンピュータ支援リガンド/受容体相互作用研究:S100A8/A9四量体(PDB ID:1XK4)、S100A9(PDB ID:11RJ)、およびS100A8(PDB id:1MR8)のPDBファイルを、RSCB PDBウェブサイトから検索した。S100A8/A9 pdbファイルを、ヘテロ二量体に類似したE鎖およびG鎖のみを含有するよう修飾した。修飾されたS100A8/A9ファイルを、ヘテロ二量体またはS100A9ホモ二量体においては自由であるが、四量体においては埋め込まれているアミノ酸を分析するため、Autodock(3Dコンピュータモデリングプログラム)、Pymol、およびSwiss-PDBviewerのようなコンピュータモデリングプログラムを使用して分析した(界面分析)。本発明者らは、さらにCa<sup>++</sup>結合には関与しておらず、TLR4との結合のために立体的に自由であるアミノ酸の同定に分析を集中させた。S100A9内のアミノ酸(位置64、65、72、73、77、および85)を変異研究のために選んだ。

30

【0225】

アミノ酸位置64(グルタミン酸)、65(アスパラギン酸)、73(グルタミン)、および77(グルタミン酸)における変異は、S100A9ホモ二量体についても機能喪失を引き起こした。アミノ酸位置72(リジン)および85(アルギニン)における変異は、ほとんど効果を引き起こさなかった。精製された変異タンパク質を用いたこれらの研究は、EFハンドIIが、TLR4との結合およびTLR4の活性化を実際に担っていることを示している。

40

【0226】

方法論的に独立した平行アプローチにおいて、S100A9を、トリプシンによって部分消化した。入手されたペプチド断片を、単球を活性化する能力に関して調査した。完全S100A9タンパク質分子ほど良好な能力はもはや検出可能でなかったが、S100A9についての1個または複数個の断片が明らかにまだ単球を活性化し得ることが見出された(図3A)。特定の

50

ペプチドを、TLR4/MD2がカップリングされたセファロースビーズによって単離した。ペプチドを質量分析によって分析した。S100A9の位置73~85のアミノ酸配列からなるペプチドを同定した。同定されたペプチドは、コンピュータに基づくシミュレーションアプローチの結果および変異研究と極めて良好に一致した。

【0227】

ヒトS100A9ホモ二量体のトリプシン消化：固定化されたTPCKトリプシン（25  $\mu$ lの固定ゲル、Pierce, Rockford）を、図に示されるような異なる時点で37  $^{\circ}$ Cで30  $\mu$ gのヒトS100A9を消化するために使用し、その後、トリプシンビーズを除去するため、樹脂セパレーターを使用して、試料を遠心分離した（5分、400  $\times$ g）。遠心分離物からアリコートを得、SDS-PAGE / ウエスタンブロットによって分析するかまたはヒト単球を4時間刺激した。刺激された単球の上清中のTNF- $\alpha$ 濃度を、ELISA（OptEIA, BD Biosciences, Germany）によって決定した。

10

【0228】

ウエスタンブロット分析：トリプシンによって消化されたS100A9のペプチド断片を、SDSポリアクリルアミドゲル上で分離し、ニトロセルロース膜（Schleicher and Schuell）に移した。膜を、5%脱脂粉乳でブロッキングし、その後、4  $^{\circ}$ Cで一晩、一次抗体 $\alpha$ -S100A9（ウサギ、ポリクローナル、1  $\mu$ g/ml）によってプロ-ビングした。その後、結合した一次抗体を、HRPとコンジュゲートした二次抗体（ヤギ抗ウサギHRP）によって検出し、増強化学発光系（ECL）によって発色させた。

【0229】

TLR4/MD2結合ペプチドを同定するための免疫沈降研究：抗His抗体（5  $\mu$ l、0.5mg/mL、Invivogen）およびhisタグ付きrhTLR4/MD2（5  $\mu$ l、1mg/mL、担体不含、R&D SYSTEMS）を混合し、プロテインA/Gアガロース（50  $\mu$ l、Pierce, Thermo Scientific）にカップリングした。S100A9のトリプシン消化ペプチドを、1mMカルシウムの存在下で4  $^{\circ}$ Cで3時間添加した。HBS/1mM Ca緩衝液でビーズを3回洗浄した後、結合したペプチド断片を、10mM TRIS/2mM EDTA緩衝液の添加によって溶出させ、ESI-QIT質量分析およびMALDI-TOF質量分析によって分析した。化学合成されたS100A9（aa63-79）、S100A8（aa55-71）のペプチド、ならびに対応する対照ペプチドaa63-79 A5およびaa55-71 A3の結合を分析するため、同一の実験を実施した。免疫沈降試験の概要は、図3Eに示される。

20

【0230】

さらなるアプローチにおいて、本発明者らは、S100A9のアミノ酸位置63~79に対応する配列、即ち、完全C末端EFハンド（MEDLDTNADKQLSFEEF、分子量：2032g/mol）を有する合成ペプチドを、TLR4/MD2との結合に関して調査した。TLR4/MD2との結合にとって重要である可能性が最も高いものとして同定された4個のアミノ酸（E64A、D65A、Q73A、およびE77A、S100A9の名称が維持される）、さらにアミノ酸K72Aが、アラニンに交換された、S100A9のアミノ酸位置63~79の配列を有するペプチド（63-79 5A、分子量：1758g/mol）を、対照として用いた。図4Aと図4Bとの比較は、非変異ペプチド（63-79）のみがTLR4/MD2に結合し得ることを明白に示す。それとは対照的に、5個の変異アミノ酸を有するペプチド（63-79 A5）については、Y軸（1758m/zにピーク）を拡大したとしても、結合を検出することができなかった。

30

40

【0231】

平行アプローチにおいて、本発明者らは、TLR4/MD2との結合に関与していると想定される領域に変異を含有しているS100A9の変異体を使用した。これらのS100A9変異体は、精製タンパク質の形態で使用され、1個または2個の変異型アミノ酸を含有しており、位置63~79の領域内の1個または2個のアミノ酸がアラニンに交換されていた。図6Bから理解され得るように、変異型タンパク質S100A9E64A、S100A9D65A、S100A9Q73A、およびS100A9E77Aは、非変異型タンパク質（S100A9野生型）と比較された場合、受容体とのより弱い結合を示した。変異型タンパク質S100A9K72AおよびS100A9R85Aは、野生型タンパク質S100A9と有意に異なる結合を示した（図6B）。二つの位置にアミノ酸交換を含有しているS100A9の変異型タンパク質は、野生型タンパク質と比較された場合、受容体との結合のほぼ完全な

50

喪失を示した。この観察は、S100A9のこの領域、ならびにアミノ酸E54、D65、Q73、およびE77が、受容体相互作用のために重要であることをさらに立証している。

【0232】

S100A9-野生型および変異タンパク質のTLR4/MD2との結合：S100A9タンパク質のTLR4/MD2との結合を、改変型S100A9-ELISAによって分析した。簡単に説明すると、TLR4/MD2を、96穴プレートのウェルにカップリングし、捕獲分子として用いた。PBS/5%脱脂乳粉による非特異的な結合部位のブロッキングの後、プレートを3回洗浄した。S100A9-野生型タンパク質または変異S100A9タンパク質を、100 μMカルシウムの存在下および非存在下で各々2 μg/mlの濃度で添加し、室温で2時間インキュベートした。プレートを3回洗浄することによって未結合のS100A9を除去した後、一次抗S100A9抗体（1 μg/ml、ポリクローナル、ウサギ）を添加した。洗浄工程の後、HRPにカップリングされた二次抗ウサギIgG抗体（1 μg/ml、Cell Signalling）を添加した。ELISAリーダー（Anthos Mikrosysteme）において450nmでの吸光度を読み取ることによって結合を定量化するため、TMBをHRPの基質として使用した。

10

【0233】

最後に、本発明者らは、ヒトS100A8（Uniprot/Swissprotアクセッション番号P05109、2012年9月5日時点でバージョン138、SEQ ID NO:78）の位置55~71のアミノ酸配列、即ち、完全C末端EFハンド（  
FKELDINTDGAVNFQEF

、分子量：1990g/mol）を有する合成ペプチドを、TLR4/MD2との結合に関して分析した。再び、S100A9と同様に、TLR4/MD2との結合にとって重要である可能性が最も高いものとして同定されたアミノ酸がアラニンに交換された、S100A8のアミノ酸位置55~71の配列を有するペプチド（55-71 3A、分子量：1815g/mol）を、対照として用いた。ペプチドの純度は最適ではなかったが、図5Aと図5Bとの比較は、非変異ペプチド55-71のみがTLR4/MD2に結合し得ることを示している（図5A）。しかしながら、3個の変異アミノ酸を有するペプチド55-71A3については、Y軸（1815m/zでピーク）を拡大したとしても、結合を検出することができなかった。

20

【0234】

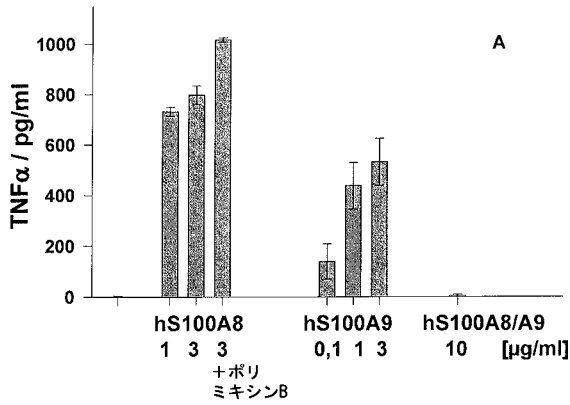
要約すると、これらのデータは、ヒトS100A9のアミノ酸位置63~79（  
MEDLDTNADKQLSFEEF

、分子量：2032g/mol）およびS100A8のアミノ酸位置55~71（  
FKELDINTDGAVNFQEF

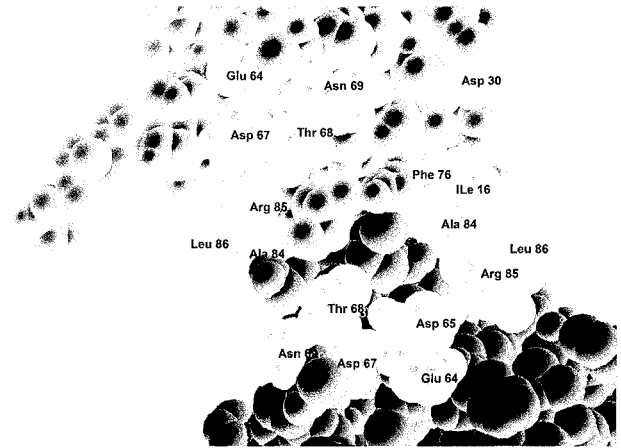
、分子量：1990g/mol）に対応するC末端カルシウム結合ハンドが、それぞれのタンパク質のTLR4との相互作用を媒介することを示している。

30

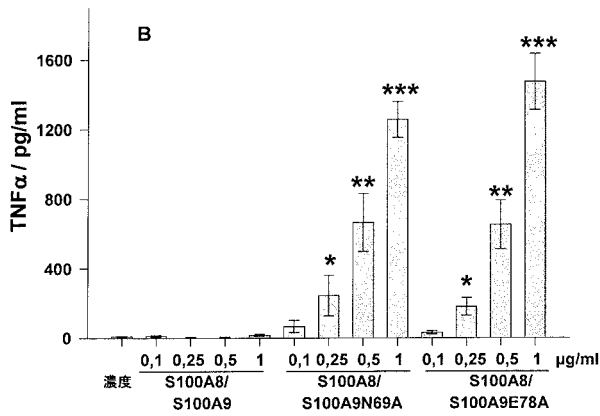
【 図 1 】



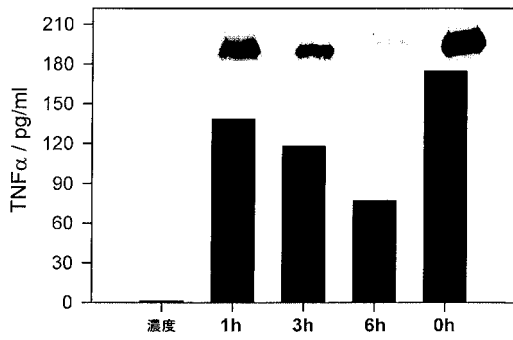
【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



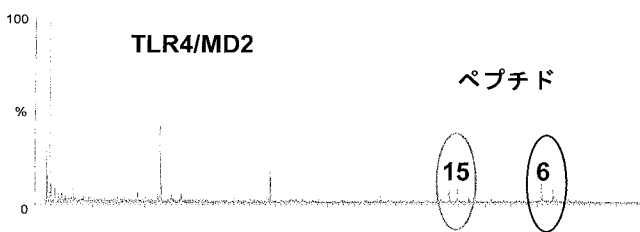
【 図 3 A 】



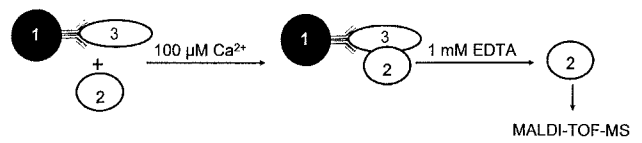
【 図 3 D 】

ペプチド	配列	開始	終始
15	(K)QLSFEEFIMLMAR(L)	73	85

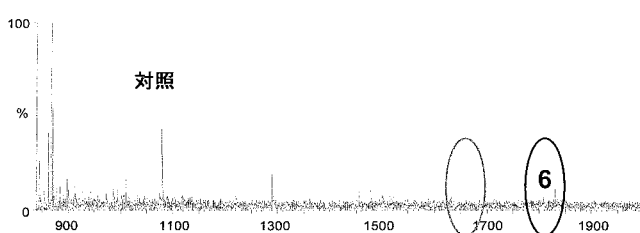
【 図 3 B 】



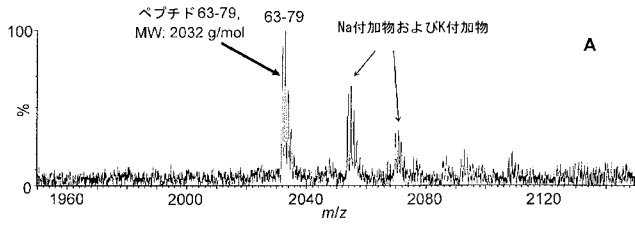
【 図 3 E 】



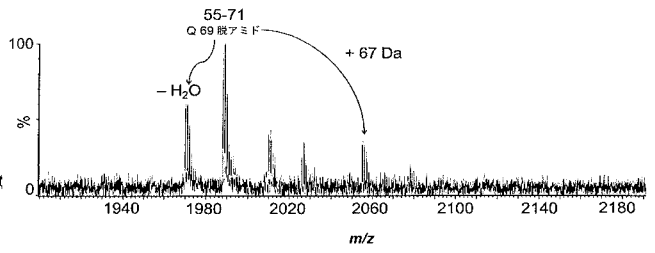
【 図 3 C 】



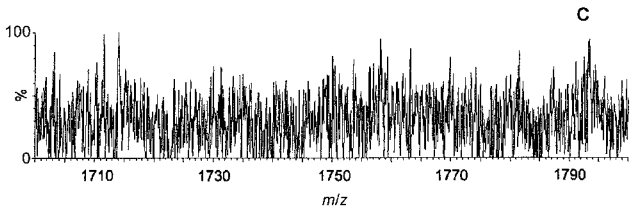
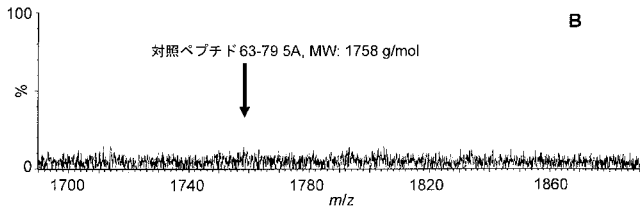
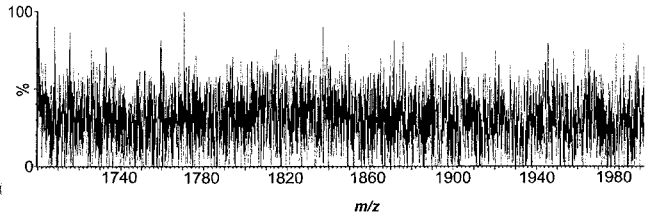
【 図 4 】



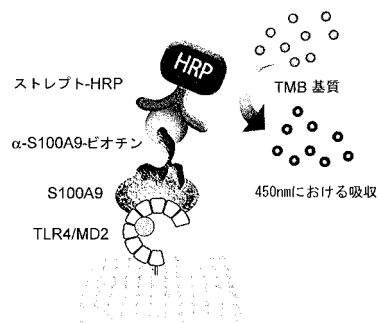
【 図 5 A 】



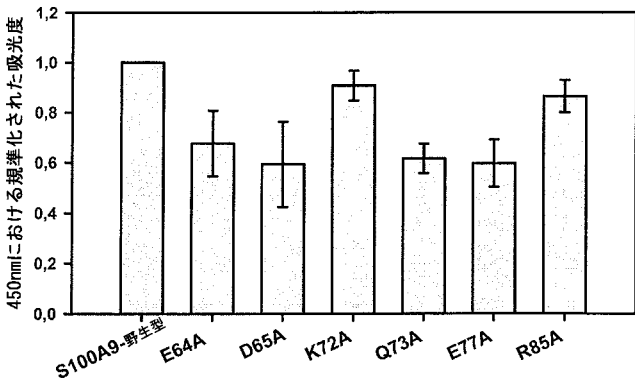
【 図 5 B 】



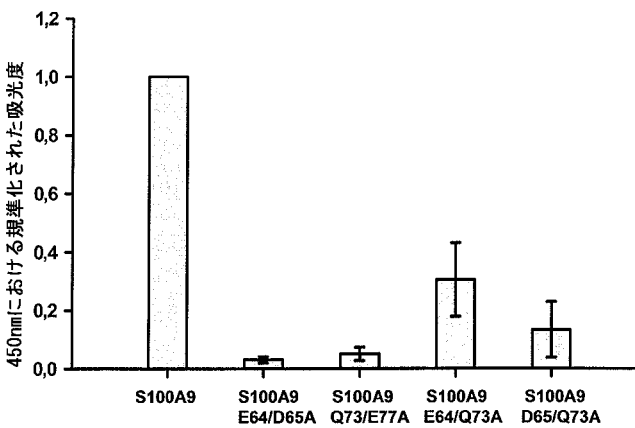
【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



【配列表】

2015533485000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年5月21日(2015.5.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2015533485000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/068757
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. C07K16/24 C07K14/52 ADD. A61P35/00 A61P37/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61P		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/131908 A1 (ACTIVE BIOTECH AB) 6 November 2008 (2008-11-06) page 15, line 22 - page 16, line 25 page 23, line 17 - page 24, line 7 page 28, line 18 - line 27 page 30, line 11 - page 31, line 33 page 32, line 4 - page 38, line 5 table 1 figures 17-18  ----- -/--	1,2,5,6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  11 December 2013		Date of mailing of the international search report  05/03/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Nooij, Frans

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/068757

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. EHRCHEN ET L.: "The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity and cancer.", JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, vol. 86, September 2009 (2009-09), pages 557-566, XP002717782, abstract page 562, left-hand column, line 32 - right-hand column, line 8 conclusions table 1 -----	1,2,5,6
X	EP 2 081 029 A2 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 22 July 2009 (2009-07-22)	13-15, 24-26, 35,36
A	sequence 28 table 3 examples -----	1,2,5,6
A	WO 2009/055820 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 30 April 2009 (2009-04-30)  figure 11b -----	1,2,5,6, 13-15, 24-26, 35,36
A	WO 2009/109862 A2 (R. LEWENSOHN ET L.) 11 September 2009 (2009-09-11)  sequence 56 -----	1,2,5,6, 13-15, 24-26, 35,36
A	E. KÄLLBERG ET AL.: "S100A9 interaction with TLR4 promotes tumor growth.", PLOS ONE, vol. 7, no. 3, E34207, March 2012 (2012-03), pages 1-11, XP002717783, abstract page 5 figure 6 -----	1,2,5,6, 13-15, 24-26, 35,36

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2013/068757**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
13-15(completely); 1, 2, 5, 6, 24-26, 35, 36(partially)

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/ EP2013/ 068757

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 13-15(completely); 1, 2, 5, 6, 24-26, 35, 36(partially)

Peptide or peptidomimetic corresponding to amino acid positions 63-79 of vertebrate S100A9, and its encoding nucleic acid. Specific immunoglobulin or proteinaceous binding partner and combinations thereof. Methods of diagnosis using said peptide, peptidomimetic, immunoglobulin or proteinaceous binding partner.

---

2. claims: 16, 17(completely); 1, 2, 5, 6, 24-26, 35, 36(partially)

Peptide or peptidomimetic corresponding to amino acid positions 37-85 of vertebrate S100A9, and its encoding nucleic acid. Specific immunoglobulin or proteinaceous binding partner and combinations thereof. Methods of diagnosis using said peptide, peptidomimetic, immunoglobulin or proteinaceous binding partner.

---

3. claims: 3, 4, 18-21(completely); 5, 6, 24-26, 35, 36(partially)

Peptide or peptidomimetic corresponding to amino acid positions 55-71 of vertebrate S100A8, and its encoding nucleic acid. Specific immunoglobulin or proteinaceous binding partner and combinations thereof. Methods of diagnosis using said peptide, peptidomimetic, immunoglobulin or proteinaceous binding partner.

---

4. claims: 7-12

A combination of one or more immunoglobulins or proteinaceous binding partners of claim 1 and the immunoglobulin or proteinaceous binding partner of claim 3.

---

5. claims: 22, 23

A combination of an isolated peptide or peptidomimetic of claim 13 or an isolated peptide or peptidomimetic of claim 16 and an isolated peptide or peptidomimetic of claim 18, wherein the peptidomimetic comprising the SEQ ID NO:6 or 9, and the peptidomimetic comprising the sequence of SEQ ID NO:12 are comprised in a single chain.

---

6. claims: 27, 28

An in-vitro method of identifying a compound capable of decreasing or inhibiting the formation of a complex between a peptide comprising one of (i) the amino acid sequence of

International Application No. PCT/ EP2013/ 068757

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

SEQ ID NO:6 or 9 and (ii) the amino acid sequence of SEQ ID NO:12 and a TLR4 receptor or a functional fragment thereof, the functional fragment of the TLR4 receptor comprising the binding site for SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3, respectively.

---

**7. claims: 29-34**

An in vitro method of identifying a compound capable of increasing the stability of a complex between a S100A8 protein, or a functional fragment thereof, and a S100A9 protein, or functional fragments thereof.

---

**8. claims: 37-49**

An in-vitro method of diagnosing the risk of occurrence, or the presence, of a condition associated with an inflammation in a subject, the method comprising detecting the amount of a complex between a S100A8 protein and a S100A9 protein in a sample from the subject, wherein a decreased amount of the complex relative to a threshold value, indicates an elevated risk of occurrence, or the presence, of a condition associated with an inflammation.

---

**9. claim: 50**

A method of treating a subject suffering from an inflammatory disorder, the method comprising administering to the subject a compound obtained by the method of claim 29, thereby increasing the stability of a complex

---

**10. claim: 51**

A method of treating a subject suffering from an inflammatory disorder, the method comprising administering to the subject a compound obtained by the method of claim 27, thereby decreasing or inhibiting the formation of a complex between the protein S100A8 or the protein S100A9 and a TLR4 receptor on cells of the subject.

---

**11. claims: 52, 53**

A method of identifying a binding partner of the isolated peptide or peptidomimetic of any one of claims 13 to 21 in an organism.

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/068757

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008131908	A1	06-11-2008	EP 2150819 A1 10-02-2010 US 2010166775 A1 01-07-2010 WO 2008131908 A1 06-11-2008
EP 2081029	A2	22-07-2009	EP 2081029 A2 22-07-2009 EP 2267457 A1 29-12-2010 JP 2009168819 A 30-07-2009 KR 20090079294 A 22-07-2009 US 2009186032 A1 23-07-2009 US 2011269248 A1 03-11-2011
WO 2009055820	A2	30-04-2009	US 2011021370 A1 27-01-2011 WO 2009055820 A2 30-04-2009
WO 2009109862	A2	11-09-2009	NONE

## 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	7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P	3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P	37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
		G 0 1 N 33/15	Z
		G 0 1 N 33/53	D

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

- (74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ロス ヨハネス

ドイツ国 ミュンスター レントゲンシュトラッセ 21 インスティタット フュール イムノ  
ロジュー ユーケイエム

(72)発明者 フォグル トーマス

ドイツ国 ミュンスター レントゲンシュトラッセ 21 インスティタット フュール イムノ  
ロジュー ユーケイエム

Fターム(参考) 2G045 AA25

4B024 AA11 BA21 BA80 CA04 CA06 DA06 EA04 GA11 HA01 HA11

4C084 AA02 AA07 BA01 BA18 CA59 NA14 ZA361 ZA362 ZA451 ZA452

ZA511 ZA512 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892

ZA941 ZA942 ZA961 ZA962 ZB071 ZB072 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112

ZB131 ZB132 ZB151 ZB152 ZB261 ZB262 ZB321 ZB322 ZB351 ZB352

ZC211 ZC212 ZC351 ZC352 ZC411 ZC412

4C085 AA13 AA14 BB41 CC22 EE01

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA16 BA17 CA40 DA01 DA75 EA22

EA50 FA20

专利名称(译)	用于预防，治疗和诊断炎症病症的方法和化合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015533485A</a>	公开(公告)日	2015-11-26
申请号	JP2015530449	申请日	2013-09-10
申请(专利权)人(译)	皮草马甲里奇·威廉 - 通用施塌忒明斯特		
[标]发明人	ロスヨハネス フォグルトーマス		
发明人	ロス ヨハネス フォグル トーマス		
IPC分类号	C12N15/09 C07K19/00 C07K16/18 C07K16/46 C07K14/46 C07K7/08 A61K38/00 A61P1/18 A61P3/06 A61P3/10 A61P1/04 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P13/12 A61P21/00 A61P17/06 A61P17/00 A61P19/02 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 A61P37/06 A61P11/00 A61K39/395 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/04 A61P1/18 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 C07K16/24 C07K2317/34 C07K7/08 C07K16/2896		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K19/00 C07K16/18 C07K16/46 C07K14/46 C07K7/08 A61K37/02 A61P1/18 A61P3/06 A61P3/10 A61P1/04 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P13/12 A61P21/00 A61P17/06 A61P17/00 A61P19/02 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00.111 A61P37/06 A61P11/00 A61K39/395.D A61K39/395.N G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA25 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA18 4C084/CA59 4C084/NA14 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C084/ZA451 4C084/ZA452 4C084/ZA511 4C084/ZA512 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZA941 4C084/ZA942 4C084/ZA961 4C084/ZA962 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB131 4C084/ZB132 4C084/ZB151 4C084/ZB152 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB321 4C084/ZB322 4C084/ZB351 4C084/ZB352 4C084/ZC211 4C084/ZC212 4C084/ZC351 4C084/ZC352 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB41 4C085/CC22 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA20		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	2012183736 2012-09-10 EP		
其他公开文献	JP6502851B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

提供了对表位具有特异性的抗体，所述表位是对应于人蛋白S100A9的氨基酸位置63-79或73-85的区域。还提供了对表位具有特异性的抗体，所述表位是对应于人蛋白S100A8的氨基酸位置55-71的区域。本发明还提供了这种抗体在治疗或诊断炎症疾病中的用途。还提供了一种体外方法，用于鉴定能够抑制对应于S100A9的上述表位之一的肽或S100A8的上述表位与TLR4受体之间形成复

化合物的化合物，其中怀疑影响该化合物的化合物。复合物形成与肽和TLR4受体接触。还提供了鉴定能够增加S100A8蛋白和S100A9蛋白之间复合物稳定性的化合物的体外方法，其中两种蛋白在怀疑影响复合物形成的化合物存在下接触。

(21) 出願番号	特願2015-530449 (P2015-530449)	(71) 出願人	514070764
(86) (22) 出願日	平成25年9月10日 (2013. 9. 10)		ヴェストファーリッシュ ヴィルヘルム- ユニバーシテート ミュンスター
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月9日 (2015. 3. 9)		ドイツ国 ミュンスター シュロスブラッ ツ 2
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/068757		
(87) 国際公開番号	WO2014/037588	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成26年3月13日 (2014. 3. 13)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	12183736.3	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成24年9月10日 (2012. 9. 10)		弁理士 香名 雅夫
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕幸
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一

最終頁に続く