

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-535707

(P2010-535707A)

(43) 公表日 平成22年11月25日(2010.11.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 4
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	4 C O 8 5
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	4 C O 8 6
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	4 H O 4 5
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2010-518699 (P2010-518699)	(71) 出願人	510001962
(86) (22) 出願日	平成20年8月4日 (2008.8.4)		オブソナ セラピューティクス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成22年2月1日 (2010.2.1)		アイルランド国 ダブリン 8 セント
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/060249		ジェームズ ホスピタル トリニティ セ
(87) 国際公開番号	W02009/019260		ンター フォー ライフ サイエンス
(87) 国際公開日	平成21年2月12日 (2009.2.12)		インスティテュート オブ モレキュラー
(31) 優先権主張番号	2007/0558		メディシン ファースト フロアー ル
(32) 優先日	平成19年8月3日 (2007.8.3)		ーム 2. 1 3
(33) 優先権主張国	アイルランド (IE)	(74) 代理人	100106002
(31) 優先権主張番号	61/038, 555		弁理士 正林 真之
(32) 優先日	平成20年3月21日 (2008.3.21)	(74) 代理人	100120891
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 林 一好
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 再灌流障害および組織損傷を処置するための T L R - 2 拮抗薬の使用

(57) 【要約】

【課題】本発明は、虚血再灌流障害を処置および予防するための組成物および方法を提供する。特に本発明は、T o l l 様受容体 2 の生物学的機能または発現を抑制するために機能する化合物を提供する。

【解決手段】本発明の第 1 の態様によれば、虚血再灌流障害に関与する T L R 2 発現細胞または組織における T o l l 様受容体 2 (T L R 2) の 1 つ以上の生物学的活性を減少させる方法であって、細胞または組織における T L R 2 の 1 つ以上の生物学的活性を減少させるのに十分な量で、T L R 2 活性または発現の少なくとも 1 つの拮抗薬と、細胞または組織とを接触させる工程を含む、方法を提供する。

【選択図】 図 5

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

虚血再灌流障害に關与する T L R 2 発現細胞または組織における T o l l 様受容体 2 (T L R 2) の 1 つ以上の生物学的活性を減少させる方法であつて、

前記細胞または組織における T L R 2 の 1 つ以上の生物学的活性を減少させるのに十分な量で、 T L R 2 活性または発現の拮抗薬と、前記細胞または組織とを接触させる工程を含む、方法。

【請求項 2】

前記 T L R 2 発現細胞または組織は、心筋虚血、虚血性心疾患、高血圧心筋虚血、鬱血性心不全、組織虚血、臓器虚血、急性冠症候群、肥大、脳梗塞、心筋梗塞、不整脈、および虚血再灌流障害 (I / R) からなる群より選択される再灌流により誘導された心臓炎症状態に關与する細胞または組織である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記接触させる工程は、細胞溶解物、再構成系または培養物中の細胞において起こる、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記接触させる工程は、被験体に存在する細胞または組織で起こる、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記被験体は、腎不全または腎障害を有するか、あるいはそれらの危険性があるヒト患者である、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記 T L R 2 は、ヒトまたはマウス T L R 2 である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記 T L R 2 拮抗薬は、ヒト T L R 2 に結合する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記 T L R 2 拮抗薬は、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、炭水化物、脂質および低分子化合物からなる群より選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記 T L R 2 拮抗薬は、モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記 T L R 2 拮抗薬は、ヒト T L R 2 に特異的に結合している抗体である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗体は、 T L R 2 に特異的に結合しているヒト、ヒト化、キメラ、合成、ラクダ、サメまたは生体外の抗体、あるいはそれらのいずれか由来の結合断片からなる群より選択される、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記抗体は、 F a b、 s c F v、 F v、 d A b、 および断片からなる群より選択される抗体結合断片である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記抗体分子は、 2 つの完全な重鎖、および 2 つの完全な軽鎖、またはそれらの抗原結合断片を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 T L R 2 拮抗薬は、ヒト T L R 2 の細胞外ドメインによって規定されるエピトープに結合する、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 15】

前記 TLR2 拮抗薬は、ヒト TLR2 のアミノ酸配列のアミノ末端およびカルボキシル末端由来のアミノ酸残基を含む不連続エピトープに結合する、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 TLR2 拮抗薬は、配列番号 1 のアミノ酸残基 19 ~ 39、または 538 ~ 549 を含む TLR2 上のエピトープに結合する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 TLR2 拮抗薬は、TLR2 タンパク質をコードする核酸の発現を阻害する、請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記 TLR2 拮抗薬は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重螺旋分子、アンチセンス DNA、アンチセンス RNA、リボザイム、iRNA、miRNA、siRNA、shRNA 分子からなる群より選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

虚血再灌流障害またはそれによって引き起こされる状態を処置および/または予防するための方法であって、前記方法は、

To11 様受容体 2 の機能を調節する治療有効量の薬剤を提供する工程、およびそのような処置を必要とする被験体に前記化合物を投与する工程を含む、方法。

【請求項 20】

TLR2 機能を調節する前記薬剤は、TLR2 拮抗薬である、請求項 19 に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記 TLR2 拮抗薬は、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、炭水化物、脂質および低分子化合物からなる群より選択される結合化合物である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記 TLR2 拮抗薬は、抗体またはその抗体由来の結合断片である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体または合成抗体からなる群より選択される、請求項 22 に記載の方法。

30

【請求項 24】

前記抗体は、ヒト TLR2 に対する、ヒト、ヒト化、ラクダ、生体外で産生した抗体からなる群より選択される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記抗体は、IgG、IgA、IgM、および IgE からなる群より選択されるアイソタイプである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

前記抗体は、約 10^{-7} M ~ 約 10^{-11} M の解離定数 (Kd) で TLR2 に存在する阻害エピトープに結合する、請求項 22 に記載の方法。

40

【請求項 27】

前記抗体は、ヒト TLR2 の細胞外ドメインによって規定されるエピトープに結合する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 28】

前記抗体は、ヒト TLR2 のアミノ酸配列のアミノ末端およびカルボキシル末端由来のアミノ酸残基を含む不連続エピトープに結合する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 29】

前記抗体は、配列番号 1 のアミノ酸残基 19 ~ 39、または 538 ~ 549 を含む TLR2 上のエピトープに結合する、請求項 22 に記載の方法。

50

【請求項 30】

前記 TLR2 拮抗薬は、配列番号 1 のアミノ酸残基 19 ~ 39 および 538 ~ 549 を含む TLR2 上のエピトープに結合する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 31】

TLR2 調節薬剤は、組み換え Toll 様受容体 2 の可溶性形態である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 32】

TLR2 の前記可溶性形態は、二次タンパク質に結合した配列番号 3 のアミノ酸配列を含む TLR2 タンパク質上の細胞外ドメインを含む融合タンパク質である、請求項 31 に記載の方法。

10

【請求項 33】

前記二次タンパク質は、抗体またはその断片の Fc ドメインである、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

TLR2 調節薬剤は、TLR2 遺伝子産物の発現を阻害する阻害核酸である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 35】

前記阻害核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重螺旋分子、アンチセンス DNA、アンチセンス RNA、リボザイム、iRNA、miRNA、siRNA、および shRNA からなる群より選択される、請求項 34 に記載の方法。

20

【請求項 36】

TLR2 調節薬剤は、心筋の TLR2 発現細胞または組織における 1 つ以上の TLR2 生物学的活性を減少または阻害させるために前記被験体に投与され、それによって、前記状態を処置する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 37】

前記虚血再灌流障害は、被験体における低酸素症、脳卒中、心臓発作、慢性腎不全または臓器移植からなる群より選択される少なくとも 1 つの状態に起因する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記 TLR2 は、ヒト TLR2 またはマウス TLR2 である、請求項 19 に記載の方法。

30

【請求項 39】

治療有効量の少なくとも 1 つの二次治療化合物を投与する工程をさらに含み、前記二次治療化合物は、免疫抑制剤化合物である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 40】

前記二次治療化合物は、グルココルチコイド、細胞増殖抑制剤、代謝拮抗物質、抗 CD2 抗体または関連結合断片、抗 CD20 抗体、抗 TNF- α 抗体、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムスまたは FTY720 からなる群より選択される、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記二次治療化合物は、HMG-CoA 還元酵素阻害剤、血管拡張剤、利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、カルシウムチャンネル遮断薬、抗凝固剤、チクロピジンまたは硫酸クロピドグレルなどのアデノシン二リン酸受容体拮抗薬、ピパリルジン、アルガトロバンまたはヘパリンなどの糖タンパク質 IIb/IIIa 受容体拮抗薬、アドレナリン受容体作動薬、抗血栓溶解剤、抗酸化剤、および遮断薬からなる群より選択される、請求項 39 に記載の方法。

40

【請求項 42】

前記薬剤は、前記二次治療化合物と同時に投与される、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 43】

前記薬剤は、前記二次治療化合物の投与と連続して投与される、請求項 39 に記載の方

50

法。

【請求項 4 4】

前記薬剤は、前記二次治療化合物の投与と別に投与される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記 T L R 2 調節化合物は、前記被験体が、血管形成、心臓バイパス手術、血栓溶解、動脈内膜切除、臓器移植、および冠動脈バイパス術 (C A B G) からなる群より選択される外科手術を受ける前、間、または後に、前記被験体に投与される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記方法は、細胞または組織において生じる虚血性イベントの発生の前、間、または後に被験体で実施される、請求項 1 9 に記載の方法。

10

【請求項 4 7】

前記方法は、再灌流の発生の間、または後に被験体で実施される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記方法は、虚血性イベント後に臨床的に決定される緊急の猶予時間の間、被験体で実施される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 4 9】

虚血再灌流障害またはそれに関連する状態の処置および予防に使用するための医薬組成物であって、少なくとも 1 つの薬理的に許容できる担体、希釈剤、可溶化剤、乳化剤、保存剤および / または補助剤と共に T o l l 様受容体 2 の機能または発現を調節する薬剤を含む、医薬組成物。

20

【請求項 5 0】

前記 T L R 2 調節薬剤は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体または抗体断片、アプタマー、融合タンパク質およびペプチド模倣物からなる群より選択される T L R 2 拮抗薬である化合物である、請求項 4 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 1】

前記 T L R 2 調節薬剤は、T L R 2 受容体の可溶性形態である、請求項 5 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 2】

前記 T L R 2 調節薬剤は、T L R 2 の発現を阻害する阻害核酸ベースの化合物である、請求項 5 0 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 5 3】

前記組成物は、二次治療化合物をさらに含む、請求項 5 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 4】

前記二次治療化合物は、グルココルチコイド、細胞増殖抑制剤、代謝拮抗物質、抗 C D 2 抗体または関連結合断片、抗 C D 2 0 抗体、抗 T N F - 抗体、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムスまたは F T Y 7 2 0 からなる群より選択される免疫抑制剤である、請求項 5 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 5】

前記二次治療化合物は、H M G - C o A 還元酵素阻害剤、血管拡張剤、利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、アンジオテンシン I I 受容体拮抗薬、カルシウムチャンネル遮断薬、抗凝固剤、チクロピジンまたは硫酸クロピドグレルなどのアデノシン二リン酸受容体拮抗薬、ピパリルジン、アルガトロバンまたはヘパリンなどの糖タンパク質 I I b / I I I a 受容体拮抗薬、アドレナリン受容体作動薬、抗血栓溶解剤、抗酸化剤、および遮断薬からなる群より選択される心臓血管治療薬である、請求項 5 3 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 5 6】

心臓病またはそれに関連する疾患状態を処置または予防するための方法であって、前記方法は、

50

T o l l 様受容体 2 の機能を調節する治療有効量の薬剤を提供する工程、および前記化合物を、そのような処置を必要とする被験体に投与する工程を含む、方法。

【請求項 5 7】

心臓炎症状態は、心筋虚血、虚血性心疾患、高血圧心筋虚血、鬱血性心不全、組織虚血、臓器虚血、急性冠症候群、肥大、脳梗塞、心筋梗塞、不整脈、虚血再灌流障害 (I / R) からなる群より選択される、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

T L R 2 機能を調節する前記薬剤は、T L R 2 拮抗薬である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記 T L R 2 拮抗薬は、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、炭水化物、脂質、および低分子化合物からなる群より選択される結合化合物である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

T L R 2 調節薬剤は、組み換え T o l l 様受容体 2 の可溶性形態である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 1】

T L R 2 の前記可溶性形態は、二次タンパク質に結合した T L R 2 タンパク質上の細胞外ドメインを実質的に含む、融合タンパク質である、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記二次タンパク質は、抗体またはその断片の F c ドメインである、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記 T L R 2 調節薬剤は、前記 T L R 2 タンパク質の発現を阻害する阻害核酸である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記阻害核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重螺旋分子、アンチセンス D N A、アンチセンス R N A、リボザイム、i R N A、m i R N A、s i R N A、および s h R N A からなる群より選択される、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記 T L R 2 拮抗薬は、抗体またはその抗体由来の結合断片である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または合成抗体からなる群より選択される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 7】

二次治療薬剤を投与する工程をさらに含む、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

二次治療化合物は、グルココルチコイド、細胞増殖抑制剤、代謝拮抗物質、抗 C D 2 抗体または関連結合断片、抗 C D 2 0 抗体、抗 T N F - 抗体、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムスまたは F T Y 7 2 0 からなる群より選択される、免疫抑制剤化合物である、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記二次治療化合物は、H M G - C o A 還元酵素阻害剤、血管拡張剤、利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、アンジオテンシン I I 受容体拮抗薬、カルシウムチャンネル遮断薬、抗凝固剤、チクロピジンまたは硫酸クロピドグレルなどのアデノシン二リン酸受容体拮抗薬、ピバリルジン、アルガトロバンまたはヘパリンなどの糖タンパク質 I I b / I I I a 受容体拮抗薬、アドレナリン受容体作動薬、抗血栓溶解剤、抗酸化剤、および遮断薬からなる群より選択される心臓血管治療薬である、請求項 6 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 70】

前記薬剤は、前記二次治療化合物と同時に、別にまたは連続して投与される、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 71】

再灌流障害の処置のための医薬を調製するための T o l l 様受容体 2 の機能または発現を調節する薬剤の使用。

【請求項 72】

前記再灌流障害は、心筋虚血、虚血性心疾患、高血圧心筋虚血、鬱血性心不全、組織虚血、臓器虚血、急性冠症候群、肥大、脳梗塞、心筋梗塞、不整脈、および虚血再灌流障害 (I / R) からなる群より選択される少なくとも 1 つの状態をさらに引き起こす、請求項 71 に記載の使用。

10

【請求項 73】

前記薬剤は、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、炭水化物、脂質、および低分子化合物からなる群より選択される、請求項 71 に記載の使用。

【請求項 74】

前記薬剤は、ヒト T L R 2 に対する結合特異性を有する抗体である、請求項 71 に記載の使用。

【請求項 75】

前記抗体は、T L R 2 に対する結合特異性を有するヒト、ヒト化、キメラ、合成、ラクダ、サメまたは生体外の抗体、あるいはそれらのいずれか由来の結合断片からなる群より選択される、請求項 74 に記載の使用。

20

【請求項 76】

前記抗体は、F a b、s c F v、F v、d A b、および断片からなる群より選択される抗体結合断片である、請求項 74 に記載の使用。

【請求項 77】

前記抗体分子は、2 つの完全な重鎖、および 2 つの完全な軽鎖、またはそれらの抗原結合断片を含む、請求項 74 に記載の使用。

【請求項 78】

前記薬剤は、ヒト T L R 2 の細胞外ドメインによって規定されるエピトープに結合する T L R 2 拮抗薬である、請求項 71 に記載の使用。

30

【請求項 79】

前記薬剤は、ヒト T L R 2 のアミノ酸配列のアミノ末端およびカルボキシル末端由来のアミノ酸残基を含む不連続エピトープに結合する T L R 2 拮抗薬である、請求項 71 に記載の使用。

【請求項 80】

前記薬剤は、配列番号 3 のアミノ酸残基 19 ~ 39、または 538 ~ 549 を含む T L R 2 上のエピトープに結合する T L R 2 拮抗薬である、請求項 71 に記載の使用。

【請求項 81】

前記薬剤は、T L R 2 タンパク質をコードする核酸の発現を阻害する、請求項 71 に記載の使用。

40

【請求項 82】

前記薬剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重螺旋分子、アンチセンス D N A、アンチセンス R N A、リボザイム、i R N A、m i R N A、s i R N A、s h R N A 分子からなる群より選択される、請求項 71 に記載の使用。

【請求項 83】

前記薬剤は、T o l l 様受容体 2 の可溶性形態である、請求項 71 に記載の使用。

【請求項 84】

T o l l 様受容体 2 の前記可溶性形態は、配列番号 5 に規定されるアミノ酸配列を含む、請求項 73 に記載の使用。

【請求項 85】

50

再灌流障害を処置するために使用するための T o l l 様受容体 2 の機能または発現を調節する薬剤。

【請求項 8 6】

前記再灌流障害は、さらに、心筋虚血、虚血性心疾患、高血圧心筋虚血、鬱血性心不全、組織虚血、臓器虚血、急性冠症候群、肥大、脳梗塞、心筋梗塞、不整脈、および虚血再灌流障害 (I / R) からなる群より選択される少なくとも 1 つの状態を生じる、請求項 8 5 に記載の薬剤。

【請求項 8 7】

前記薬剤は、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、炭水化物、脂質、および低分子化合物からなる群より選択される、請求項 8 5 に記載の薬剤。

10

【請求項 8 8】

前記薬剤は、ヒト T L R 2 に対する結合特異性を有する抗体である、請求項 8 5 に記載の薬剤。

【請求項 8 9】

前記抗体は、T L R 2 に対する結合特異性を有するヒト、ヒト化、キメラ、合成、ラクダ、サメまたは生体外の抗体、あるいはそれらのいずれか由来の結合断片からなる群より選択される、請求項 8 8 に記載の薬剤。

【請求項 9 0】

前記抗体は、F a b、s c F v、F v、d A b、および断片からなる群より選択される抗体結合断片である、請求項 8 8 に記載の薬剤。

20

【請求項 9 1】

前記抗体分子は、2 つの完全な重鎖、および 2 つの完全な軽鎖、またはそれらの抗原結合断片を含む、請求項 8 8 に記載の薬剤。

【請求項 9 2】

前記薬剤は、ヒト T L R 2 の細胞外ドメインによって規定されるエピトープに結合する T L R 2 拮抗薬である、請求項 8 8 に記載の薬剤。

【請求項 9 3】

前記薬剤は、ヒト T L R 2 のアミノ酸配列のアミノ末端およびカルボキシル末端由来のアミノ酸残基を含む不連続エピトープに結合する T L R 2 拮抗薬である、請求項 8 8 に記載の薬剤。

30

【請求項 9 4】

前記薬剤は、配列番号 3 のアミノ酸残基 1 9 ~ 3 9、または 5 3 8 ~ 5 4 9 を含む T L R 2 上のエピトープに結合する T L R 2 拮抗薬である、請求項 8 8 に記載の薬剤。

【請求項 9 5】

前記薬剤は、T L R 2 タンパク質をコードする核酸の発現を阻害する、請求項 8 5 に記載の薬剤。

【請求項 9 6】

前記薬剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重螺旋分子、アンチセンス D N A、アンチセンス R N A、リボザイム、i R N A、m i R N A、s i R N A、s h R N A 分子からなる群より選択される、請求項 8 5 に記載の薬剤。

40

【請求項 9 7】

前記薬剤は、T o l l 様受容体 2 の可溶性形態である、請求項 8 5 に記載の薬剤。

【請求項 9 8】

T o l l 様受容体 2 の前記可溶性形態は、配列番号 3 に規定されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 7 に記載の薬剤。

【請求項 9 9】

再灌流の間または後に生じる T o l l 様受容体 2 によって媒介される炎症および関連する細胞、組織または臓器の損傷を抑制する化合物を同定するためのスクリーニング方法であって、前記方法は、

T o l l 様受容体 2 に対する結合特異性を有するリガンドと共に、膜結合 T o l l 様受

50

容体 2 受容体を提供する工程、

候補化合物を T o l l 様受容体 2 と接触させる工程、

T o l l 様受容体 2 を T o l l 様受容体 2 リガンドに曝露する工程、

T o l l 様受容体 2 に対する前記 T o l l 様受容体 2 リガンドの結合を決定する工程、
を含み、前記 T o l l 様受容体 2 リガンドによる T o l l 様受容体 2 の結合の阻害は、前記候補化合物が T o l l 様受容体 2 活性化およびシグナル伝達の調節因子であることを示す、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、虚血再灌流障害を処置および予防するための方法に関する。特に、本発明は、虚血再灌流障害を処置または予防する際に使用するための新規の標的としての T o l l 様受容体 2 を同定する。拮抗薬によって T o l l 様受容体 2 の機能活性を遮断することは、再灌流障害に関連する炎症過程を下方制御し、これにより、T o l l 様受容体 2 拮抗薬が投与される被験体にとって改善された治療結果を生じる。

【背景技術】

【0002】

心臓麻痺は、心臓が身体の循環系を通して十分な速度で血液を送り出すことができない病態生理学的状態である。この状態は、心臓の低下したポンプ機能に起因して過剰体液が蓄積する場合に生じる状態である鬱血性心不全を引き起こし得る。心臓組織への血液供給の遮断により、血液供給が与えられない組織領域の壊死を生じる場合、心筋梗塞が生じる。

【0003】

身体の臓器または一部が十分な血液供給を受けられない場合、虚血が生じる。適切な血液供給が与えられない臓器は、低酸素といわれる。一時的な欠乏後、血流が臓器に対して再開する場合、再灌流が生じる。

【0004】

再灌流障害は、虚血期間後、組織に対して血液供給が戻ってくる際に組織または臓器に生じる損傷に関する。虚血期間の間の酸素および栄養素の欠乏は、血液循環が再開した場合、炎症および酸化的損傷の期間を生じる。虚血再灌流障害の例としては、低酸素症、脳卒中、心臓麻痺、慢性腎不全または臓器移植が挙げられる。

【0005】

再灌流障害の病因学は、炎症性免疫反応に強く関連するが、多因子性である。特に、以前に血流が与えられない領域に対する血流の再循環は、白血球付着および湿潤、フリーラジカルの放出ならびにサイトカイン産生などの多くの炎症性過程の開始を生じ得る。さらに、虚血を受けた領域における細胞膜に対する損傷は、さらなるフリーラジカルの放出を生じ得る。プログラム細胞死（アポトーシス）も生じ得るが、虚血領域への白血球の移動は、毛細血管の閉塞を生じ得、これにより、血流の制限およびさらなる虚血の関連した危険性が生じる。従って、虚血期間後の血流の回復は、実際に、虚血性イベント自体より損傷を与え得る。

【0006】

薬理的であろうとまたは機械的であろうと、心筋梗塞の処置のための治療戦略は、心筋組織の血流および灌流を回復させるために、閉塞した冠状動脈を開くこと、または開き続けることに狙いを定めている。梗塞に関係した動脈における血流および生存の危険にさらされた心筋の再灌流の早期の回復は、臨床転帰を改善する。しかしながら、逆説的にはあるが、再灌流自体は、虚血 / 再灌流 (I / R) 障害といわれる心筋細胞における壊死およびアポトーシスの促進を生じる。生存している心筋組織の損傷に起因する合併症は、心筋梗塞後もまだ見られるため、再灌流だけでは、危険にさらされた心筋を救うのに不十分のようである。

【0007】

10

20

30

40

50

再灌流は、先天性免疫系によって媒介される炎症反応を活性化させる。先天性免疫系のこの活性化はまた、炎症性サイトカインの放出に起因する心筋細胞の死を引き起こし、好中球と心筋細胞との間の細胞-細胞間の相互作用を害する。細胞内の核因子- κ B (NF- κ B) シグナル伝達経路は、心筋虚血/再灌流 (I/R) 障害における炎症性遺伝子の転写を媒介する。さらに、酸素の再導入は、損傷を与えるフリーラジカルの大量の産生、炎症媒介物の増加、および関連した壊死の発現を生じる。再灌流の重症度は、虚血の持続時間、虚血の重症度、および再灌流の速度などの多くの要因に起因して変化し得る。

【0008】

Toll様受容体 (TLR) は、先天性免疫応答を活性化するのに重要な役割を有するパターン認識受容体のファミリーを形成する。11のToll様受容体が、今までヒトにおいて同定されている。Toll様受容体ファミリーの膜は、10~15のToll様受容体を有するほとんどの哺乳動物種と共に高度に保存される。各Toll様受容体は、特定の病原体関連分子の特徴を認識する。Toll様受容体2 (TLR2、CD282、TLR-2) は、ペプチドグリカン、リポタンパク質およびリポタイコ酸によって活性化され得る。

10

【0009】

今までの研究は、虚血および再灌流の間に誘発される複合体相互作用の調節および炎症機構を完全に解明していない。さらに、異なる動物モデル、異なる患者、および異なる組織において発現するため、虚血再灌流障害の性質および変動は、治療的介入および虚血再灌流の予防のための方法を特定することに関するさらなる障壁となっている。

20

【0010】

多数の実験の後に、本発明者らは驚くべきことに、Toll様受容体2が、虚血の期間を受けた組織または臓器における虚血再灌流障害に関連する先天性炎症性免疫の発現および進行において重要な役割を有することを確認した。本発明者らは、Toll様受容体2に対する結合特異性を有し、Toll様受容体2の作動物質として機能する化合物が、再灌流障害の進行に関連する異常な炎症性免疫応答を予防する際に有用性を有することを確認した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

従って、本発明者らは、Toll様受容体2の活性化およびシグナル伝達を抑制することにより媒介される虚血再灌流障害の予防および処置のための治療的アプローチが、特にToll様受容体2の保存されている性質として潜在的に重要であることを確認し、これは、そのような治療的アプローチが、様々な種、組織および細胞型におけるこの状態の処置に包括的なアプローチを提供することを示唆する。

30

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の第1の態様によれば、虚血再灌流障害に関与するTLR2発現細胞または組織におけるToll様受容体2 (TLR2) の1つ以上の生物学的活性を減少させる方法であって、

40

細胞または組織におけるTLR2の1つ以上の生物学的活性を減少させるのに十分な量で、TLR2活性または発現の少なくとも1つの拮抗薬と、細胞または組織とを接触させる工程を含む、方法を提供することである。

【0013】

本明細書中に定義する場合、用語「虚血再灌流障害に関与するTLR2発現細胞または組織」とは、虚血再灌流障害の発現または進行を引き起こす細胞または組織、あるいは虚血再灌流障害を受けた細胞型または組織を意味する。

【0014】

特定の実施形態において、TLR2発現細胞または組織は、心筋虚血の細胞または組織である。特定の実施形態において、TLR2発現細胞または組織は、限定されないが、心

50

筋虚血、虚血性心疾患、高血圧心筋虚血、鬱血性心不全、組織虚血、臓器虚血、急性冠症候群、肥大、脳梗塞、心筋梗塞、不整脈、虚血再灌流障害（I/R障害）からなる群より選択される再灌流によって誘発された心臓の炎症状態に関する細胞または組織である。

【0015】

特定の実施形態において、組織および/または細胞をTLR2拮抗薬と接触させる工程は、細胞溶解物、再構成系または培養物中の細胞において起こる。実施形態において、接触させる工程は、被験体に存在する細胞または組織で起こる。特定の実施形態において、TLR2はヒトTLR2またはマウスTLR2であり得る。

【0016】

特定の実施形態において、この方法は、虚血再灌流障害を有するか、または有する危険性があるヒト被験体で実施される。

10

【0017】

特定の実施形態において、少なくとも1つのTLR2拮抗薬は、限定されないが、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、炭水化物、脂質、および低分子化合物からなる群より選択される。

【0018】

特定の実施形態において、TLR2拮抗薬は、抗体分子である。典型的に、その抗体は、ヒトTLR2に存在するエピトープ、特にTLR2の規定された細胞外ドメインのアミノ酸残基を含むエピトープに対する結合特異性を有する。特定の実施形態において、TLR2拮抗薬は、ヒトTLR2のアミノ酸配列のアミノ末端およびカルボキシル末端由来のアミノ酸残基を含む不連続エピトープに結合する。特定の実施形態において、TLR2拮抗薬は、配列番号1のアミノ酸残基19~39、または538~549を含むTLR2上のエピトープに結合する。

20

【0019】

特定の実施形態において、抗体は、限定されないが、TLR2に対する結合特異性を有するヒト、ヒト化、キメラ、合成、ラクダ、サメまたは生体外の抗体からなる群より選択される。特定のさらなる実施形態において、結合断片が使用されてもよく、前記結合断片は、上記抗体のいずれか由来である。特定の実施形態において、抗体は、Fab、scFv、Fv、dAb、および断片からなる群より選択される抗体結合断片である。特定の実施形態において、抗体分子は、2つの完全な重鎖、および2つの完全な軽鎖、またはそれらの抗原結合断片を含む。特定の実施形態において、抗体は、アイソタイプIgG、IgA、IgMである。抗体がアイソタイプIgGである実施形態において、抗体は、サブタイプIgG1、IgG2、またはIgG3であり得る。

30

【0020】

特定の実施形態において、抗体は、マウスIgG1抗TLR2抗体（ハイブリドーマクローンT2.5, HyCult Biotechnology b.v., Cell Sciences, Canton, USA: カタログ番号1054由来のマウスToll様受容体2（TLR2）抗体）またはそのヒト化型である。

【0021】

特定の実施形態において、TLR2拮抗薬は、TLR2タンパク質をコードする少なくとも1つの核酸の発現を阻害する。特定の実施形態において、TLR2拮抗薬は、限定されないが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重螺旋分子、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、iRNA、miRNA、siRNA、shRNA分子からなる群より選択される。

40

【0022】

特定の実施形態において、1つより多いTLR2拮抗化合物は、細胞、組織または被験体に投与される。例えば、TLR2特異的TLR2拮抗抗体は、TLR2の活性化を防止するために投与されてもよく、一方、阻害核酸もまた、TLR2の発現を阻害するために投与されてもよい。

【0023】

50

本発明のなおさらなる態様によれば、虚血再灌流障害またはそれによって引き起こされるか、もしくはそれと関連する状態の処置および/または予防のための方法であって、その方法は、

Toll様受容体2の機能を調節する治療有効量の薬剤を提供する工程、およびそのような処置を必要とする被験体に前記化合物を投与する工程を含む、方法が提供される。

【0024】

本明細書中に定義する場合、用語「機能を調節する」とは、薬剤が、Toll様受容体2の1つ以上の生物学的機能活性を変化または修正することを意味する。特定の実施形態において、Toll様受容体2の機能の調節は、薬剤が、TLR2特異的リガンドの結合後、Toll様受容体2の機能活性を阻害すること、および/またはTLR2リガンドなどによる活性化の後、Toll様受容体2によって媒介される下流の細胞内シグナル伝達を阻害もしくは抑制することを意味する。TLR2の機能の調節はさらに、Toll様受容体2タンパク質の発現の抑制または阻害、あるいはToll様受容体2をコードする遺伝子の発現の阻害または遮断にまで及ぶことができ、従って、TLR2機能を調節する薬剤はさらに、TLR2タンパク質の発現を阻害し得るか、またはTLR2遺伝子産物の発現を遮断し得る。

10

【0025】

本明細書中に定義する場合、TLR2を調節する「薬剤」は、Toll様受容体2の活性化もしくは機能を抑制または遮断する化合物である。「薬剤」は、Toll様受容体2に対するリガンドもしくは結合化合物の結合を阻害または遮断する拮抗化合物であり得る。例えば、「薬剤」は、Toll様受容体2の細胞外ドメインに結合するToll様受容体2結合薬剤であってもよく、前記薬剤は、TLR2に対する結合特異性を有する活性化リガンドの結合を阻害する。さらに、「薬剤」は、リガンド結合および/またはToll様受容体2活性化の後、Toll様受容体2によって媒介される細胞内シグナル伝達を阻害または抑制する化合物であってもよい。「薬剤」はさらに、例えば、Toll様受容体2タンパク質をコードする遺伝子の発現を阻害することによって、Toll様受容体2タンパク質または遺伝子発現を調節する化合物であってもよい。このような化合物はまた、TLR2調節薬剤としても公知であり得る。

20

【0026】

特定の実施形態において、TLR2機能を調節する「薬剤」は、結合特異性を有するか、またはToll様受容体2に特異的に結合する結合化合物であってもよい。特定の実施形態において、結合化合物は、限定されないが、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、ポリヌクレオチド、多糖、オリゴペプチド、炭水化物、脂質、アプタマー、低分子化合物、および植物由来化合物もしくは模倣物などの天然化合物、それらの類似体または誘導体からなる群より選択されてもよい。

30

【0027】

特定の実施形態において、薬剤は、既知のTLR2リガンド結合部位以外の結合部位でToll様受容体2に結合する結合化合物であり、これにより、TLR2に対する結合の際に、Toll様受容体2活性化および/またはTLR2拮抗リガンド結合の阻害を引き起こすToll様受容体2の構造の変化が生じる。

40

【0028】

用語「特異的に結合する」または「結合特異性」とは、非標的エピトープに結合するより大きい親和性でTLR2上に存在する標的エピトープに結合するTLR2調節薬剤またはTLR2結合化合物の能力をいう。特定の実施形態において、特異的結合とは、非標的エピトープに対する親和性より少なくとも10、50、100、250、500、または1000倍高い親和性でTLR2に存在する特定の標的エピトープに対して結合することをいう。特定の実施形態において、結合親和性は、親和性ELISAアッセイによって測定される。特定の実施形態において、親和性は、BIACoreアッセイによって測定される。特定の実施形態において、結合親和性は、速度論的方法によって測定される。特定

50

の実施形態において、親和性は、平衡 / 溶液方法によって測定される。

【0029】

一実施形態によれば、TLR2拮抗薬などのTLR2結合薬剤を含むTLR2調節因子は、高い親和性でTLR2に結合し、これは、例えば、少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ 、典型的に約 $10^8 M^{-1}$ 、より典型的に約 $10^9 M^{-1} \sim 10^{10} M^{-1}$ またはそれ以上の親和定数を有する結合親和性として定義され、これは、TLR2応答細胞および/または組織における1つ以上のTLR2生物学的活性を調節、例えば、減少および/または阻害する。

【0030】

特定の実施形態において、TLR2調節薬剤は、虚血期間後に再灌流を受ける可能性のある細胞または組織で発現されたToll様受容体2に標的化される。このような標的化は、局所的送達、送達ベクターの使用などの当業者に公知の任意の適切な手段、または標的化されるべき細胞もしくは組織で発現された細胞表面標的に対する結合特異性を有する抗体などの標的化手段によってであってもよい。本発明の方法および組成物を用いて、調節、例えば、阻害または減少され得る例示的なTLR2活性の例としては、限定されないが、以下：(i) TLR2発現を阻害または抑制すること、(ii) TLR2リガンド結合および関連するTLR2活性化を阻害すること、ならびに(iii) TLR2によって媒介される細胞内シグナル伝達を阻害または抑制すること、のうちの1つ以上が挙げられる。

【0031】

従って、さらなる態様において、本発明は、TLR2応答細胞および/または組織（例えば、虚血を受けた組織、虚血を受ける可能性のある組織、または再灌流を受ける可能性のある組織）における機能を調節する（例えば、TLR2の1つ以上の生物学的活性を変える）方法を提供する。この方法は、TLR2応答細胞および/またはTLR2応答組織を、TLR2応答細胞または組織の機能、あるいはその細胞または組織におけるTLR2の生物学的活性を調節するのに十分な量で、TLR2調節薬剤、例えば、TLR2結合薬剤、例えば、ヒトTLR2活性または発現の拮抗薬と接触させる工程を含む。一実施形態において、接触させる工程は、生体外、例えば、細胞溶解物または再構成系中で達成され得る。あるいは、本発明の方法は、培養物中の細胞、例えば、生体外（*in-vitro*または*ex-vivo*）で実施され得る。例えば、精製細胞または組み換え細胞などの細胞は生体外で培養されてもよく、接触工程は、TLR2調節因子を培地に加えることによって達成されてもよい。典型的に、TLR2応答細胞はヒト細胞などの哺乳動物細胞である。一部の実施形態において、TLR2応答組織は、虚血を受け、再灌流を受ける可能性のある組織、またはそれに関連する細胞集団である。他の実施形態において、この方法は、例えば、生体内プロトコルの一部として被験体、または動物被験体（例えば、ヒト被験体、または生体内動物モデルを含む）に存在する細胞で実施されてもよい。生体内プロトコルは、治療的または予防的であってもよく、炎症性モデルは、例えば、過剰発現したTLR2を有する動物モデルなどの遺伝子組み換えされたモデル、あるいはTLR受容体の変異体または欠失体であってもよい。生体内での方法に関して、単独または別の薬剤と組み合わせ、TLR2調節因子は、被験体における1つ以上のTLR2媒介活性または機能を調節するのに十分な量で、関節リウマチなどの自己免疫疾患に罹患する被験体に投与されてもよい。一部の実施形態において、投与されるTLR2調節因子の量または投与量は、TLR2の1つ以上の機能活性を変える、例えば、減少または阻害するのに必要とされるTLR2調節因子の量を生体外（*in-vitro*または*ex-vivo*）で試験することによって投与前に決定されてもよく、前記機能活性は、典型的に、本明細書に記載される1つ以上のTLR2生物学的活性である。

【0032】

1つ以上のTLR2生物学的活性を阻害、減少または低下させることが所望される特定の実施形態において、TLR2応答細胞および/または組織は、例えば、TLR2拮抗薬を被験体に投与することにより、TLR2拮抗薬と接触される。一実施形態において、T

10

20

30

40

50

TLR2拮抗薬は、TLR2タンパク質の発現に関するTLR2ポリペプチドまたはmRNAと相互作用、例えば、結合し、1つ以上のTLR2活性を減少または阻害する。典型的に、拮抗されるTLR2は、哺乳動物TLR2（またはその機能的変異体）、例えば、ヒトTLR2またはマウスTLR2である。特定の実施形態において、拮抗されるTLR2は、図12（配列番号1）（Genbank Accession Number AAC34133（URL www.ncbi.nlm.nih.gov）に規定される784アミノ酸全長ヒトToll様受容体配列を含む）に規定されるヒトTLR2配列、図13（配列番号2）（Genbank Accession Number NP_036035（Mus 筋肉））に規定されるアミノ酸配列を含むマウスTLR2配列、またはそれらの一部、および/あるいはそれらと実質的に相同、特に少なくとも90%の配列相同同一性、あるいは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有するアミノ酸配列を含む。

10

【0033】

本明細書中に定義する場合、用語「Toll様受容体2の活性化」とは、リガンドによるToll様受容体2の結合を意味し、ここで、そのリガンドは、細胞内シグナル伝達カスケードを誘発するために、作動物質として作用し、Toll様受容体2を活性化させる。Toll様受容体2の活性化およびシグナル伝達後に媒介される細胞内シグナル伝達は、炎症性免疫反応を媒介する転写因子および遺伝子の発現の活性化を生じる。

【0034】

特定の実施形態において、TLR2調節薬剤は、Toll様受容体2とToll様受容体2の作動物質リガンドとの間の相互作用を阻害する。

20

【0035】

特定の実施形態において、Toll様受容体2の活性化および/またはシグナル伝達を抑制するTLR2調節薬剤は、Toll様受容体2の拮抗薬として作用する化合物である。典型的に、Toll様受容体2の機能の拮抗作用は、Toll様受容体2に対するリガンド結合が阻止されるような方法において、Toll様受容体2に対するToll様受容体2の調節因子の結合によって達成される。Toll様受容体2のリガンド結合のこの阻害は、例えば、Toll様受容体2のリガンド結合部位を部分的または完全に遮断すること、あるいは例えば、TLR2リガンド結合を阻止するToll様受容体2のリガンド結合部位の三次構造の構造変化に起因する、Toll様受容体2のリガンド結合を阻止する方法で変化したToll様受容体2のリガンド結合部位を生じるToll様受容体2に結合もしくは会合する際の構造変化を誘導することによる多くの手段によって達成され得る。

30

【0036】

特定の実施形態において、TLR2調節薬剤は、TLR2に存在する少なくとも1つのエピトープに結合し、ここで、このエピトープに対する結合は、TLR2機能、最も典型的にはTLR2活性化またはTLR2によって媒介される下流シグナル伝達の阻害を生じる。本明細書中に定義する場合、「エピトープ」とは、リガンド、低分子、抗体などの結合化合物によって認識され、結合され得るTLR2タンパク質をコードする複数のアミノ酸残基をいう。エピトープは、一般に、化学的に活性な表面基から構成され、特異的な三次元構造特性、および特異的な電荷特性、エピトープの三次元構造に起因する前述のものを有する。

40

【0037】

典型的に、TLR調節薬剤はTLR2の機能活性に拮抗し、そのようにして、阻害エピトープまたは抑制エピトープとして公知のエピトープに結合する。「阻害」または「抑制」エピトープとは、低分子または抗体などの結合化合物によって結合した場合、例えば、TLR2作動物質によってTLR2の結合を阻止する結合化合物に起因してTLR2の生物学的活性の損失を生じるTLR2に存在するエピトープを意味する。TLR2に存在し、TLR2機能に拮抗するために、結合化合物により結合されるエピトープは、5以上のアミノ酸残基を含み得る。

50

【0038】

特定の実施形態において、本発明のTLR2調節薬剤は、連続エピトープを認識する。さらなる実施形態において、エピトープは、成熟Toll様受容体2(TLR2)タンパク質のN末端(アミノ末端)およびC末端(カルボキシ末端)部分の両方由来の残基を含む不連続エピトープである。特定の実施形態において、エピトープは、配列番号3(図14)に示されるToll様受容体2の細胞外ドメインの586アミノ酸配列から決定されるため、残基19~39を含み得る。そのようなエピトープはさらに、それを含むアミノ酸に関して規定されてもよく、該エピトープは、配列番号3に規定されるTLR2の細胞外ドメインの少なくともアミノ酸残基KEESSNQASLSCDRNGICKGS(配列番号4)を含む。さらに、結合エピトープは、配列番号1のアミノ酸配列のC末端領域に存在するため、Toll様受容体2のアミノ酸残基538~549をさらに含み得、この配列はアミノ酸CSCFLSFTQEQQ(配列番号5)を含む。TLR2調節薬剤結合部位は、配列番号1のアミノ酸残基19~39、または538~549によって、あるいは配列番号1のアミノ酸残基19~39および538~549によってさらに規定され得る。

10

【0039】

Toll様受容体2の機能活性の減少、阻害または拮抗は、Toll様受容体2が別のToll様受容体(例えば、Toll様受容体1、Toll様受容体6または別のToll様受容体(例えば、Toll様受容体4またはToll様受容体10))とヘテロ二量体を形成するか否かに関わらず、起こり得る。用語「Toll様受容体2の活性化および下流を介するシグナル伝達」によってとは、TLR2の活性化によって誘導されるいずれかの細胞内シグナル伝達経路を意味する。シグナル伝達経路は、TLR2特異的経路であり得るか、または例えば、シグナル伝達経路が他の源によって、例えば、転写因子NF-Bなどの免疫応答の媒介物の活性化に起因するTLR2以外の受容体の活性化によって、活性化され得る「共有」シグナル伝達経路であり得る。

20

【0040】

TLR2が、2つの機能的ヘテロ二量体に二量体化することは公知である。特に、TLR2が、Toll様受容体1またはToll様受容体6のいずれかとヘテロ二量体を形成することは公知である。さらなるヘテロ二量体が、Toll様受容体4(TLR4、TLR-4)およびToll様受容体10(TLR10、TLR-10)と形成することは可能である。この二量体化は、異なる微生物由来のリガンドによってTLR2の結合をもたらす識別と関連すると考えられる。加えて、TLR2の細胞外ドメインは、循環系および哺乳動物の乳においてCD14と可溶性ヘテロ二量体を形成し得る。

30

【0041】

本発明者らは、虚血後の再灌流の間、または後にTLR2媒介性炎症を抑制することにおける包括的な治療的アプローチを与えるために、ヘテロ二量体がTLR2と別のTLR(例えば、TLR1、TLR6、TLR4またはTLR10)との間に形成されるか否かに関わらず、TLR2に対する結合特異性を有する結合化合物を与えることが望ましいと認識している。これに関して、多数の実験後に、本発明者らは、結合する場合、TLR2機能活性を抑制するTLR2タンパク質のN末端およびC末端の両方に存在するアミノ酸残基からなる立体構造の不連続エピトープを同定した。TLR2拮抗結合化合物によるこのエピトープの結合は、TLR2がTLR1、TLR4、TLR6またはTLR10とヘテロ二量体を形成するか否かに関わらず、TLR2機能を抑制するのに役立つ。

40

【0042】

従って、特定のさらなる実施形態において、本発明によって与えられるTLR2調節薬剤は、以下の特性のうちの少なくとも1つを有し得る：(i)それはモノクローナル抗体である、(ii)それはヒト由来または生体外で産生された抗体である、(iii)それは配列番号4および/または配列番号5のアミノ酸を含むヒトまたはマウスTLR2の立体構造の不連続エピトープに結合し、ヘテロ二量体がTLR2と、TLR1、TLR6、TLR4またはTLR10との間に形成されるか否かに関わらず、TLR2機能の抑制を

50

媒介する、(i v)それは少なくとも 10^{-6} Mの親和定数(K a)でTLR2の細胞外ドメインに存在するエピトープに結合する

【0043】

特定の実施形態において、Toll様受容体2の機能および/またはシグナル伝達および/または発現を抑制または阻害するTLR2調節因子は、限定されないが、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、ポリヌクレオチド、多糖、オリゴペプチド、炭水化物、脂質、低分子化合物、および天然化合物からなる群のうちの少なくとも1つより選択される。

【0044】

典型的に、TLR2の機能を調節する薬剤はTLR2拮抗薬である。特定の実施形態において、TLR2拮抗薬は、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、炭水化物、脂質、および低分子化合物からなる群より選択される結合化合物である。

10

【0045】

特定の実施形態において、TLR2拮抗薬は、抗体または抗体由来の結合断片である。特定の実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体または合成抗体からなる群より選択される。特定のさらなる実施形態において、抗体は、ヒトTLR2に対するヒト、ヒト化、ラクダ、生体外で産生した抗体からなる群より選択される。抗体は、IgG、IgA、IgMおよびIgEからなる群より選択されるアイソタイプであってもよい。抗体は、約 10^{-7} M~約 10^{-11} Mの解離定数(K d)でTLR2に存在する阻害エピトープに結合し得る。

20

【0046】

特定の実施形態において、TLR2調節薬剤は、組み換えToll様受容体2の可溶性形態である。特に、TLR2の可溶性形態は、二次タンパク質に結合したTLR2タンパク質上の細胞外ドメインを実質的に含む融合タンパク質である。特定の実施形態において、二次タンパク質は、抗体、またはその断片のFcドメインであり得る。

【0047】

特定のさらなる実施形態において、TLR2調節薬剤は、TLR2タンパク質の発現を阻害する阻害核酸である。特定の実施形態において、阻害核酸タンパク質は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重螺旋分子、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、iRNA、miRNA、siRNA、およびshRNAからなる群より選択される。

30

【0048】

特定の実施形態において、本発明の方法は、心筋のTLR2発現細胞または組織における1つ以上のTLR2の生物学的活性を減少または阻害するために、治療有効量のTLR2調節薬剤を、そのような処置を必要とする被験体に投与するために使用されて、それにより、その状態を処置する。

【0049】

特定の実施形態において、本発明の方法は、被験体における低酸素症、脳卒中、心臓発作、慢性腎不全または臓器移植からなる群より選択される少なくとも1つの状態に起因し得る虚血再灌流障害の処置または予防のために使用され得る。

40

【0050】

特定の実施形態において、この方法は、虚血/再灌流障害または関連状態の処置または予防に使用するための少なくとも1つの二次治療化合物の治療有効量を投与するさらなる工程を含み得る。典型的に、前記二次治療化合物は、グルココルチコイド、細胞増殖抑制剤、代謝拮抗物質、抗CD2抗体または関連結合断片、抗CD20抗体、抗TNF-抗体、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムスまたはFTY720からなる群より選択され得る。

【0051】

特定のさらなる実施形態において、前記二次治療化合物は、HMG-CoA還元酵素阻害剤、血管拡張剤、利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、アンジオテン

50

シンII受容体拮抗薬、カルシウムチャンネル遮断薬、抗凝固剤、チクロピジンまたは硫酸クロピドグレルなどのアデノシンニリン酸受容体拮抗薬、ビバリルジン、アルガトロバンまたはヘパリンなどの糖タンパク質IIb/IIIa拮抗薬、アドレナリン受容体作動薬、抗血栓溶解剤、抗酸化剤、および遮断薬からなる群より選択され得る。

【0052】

特定の実施形態において、二次治療薬剤は、少なくとも1つのTLR2調節薬剤と同時に、連続して、または別に投与され得る。

【0053】

特定の実施形態において、TLR2調節化合物は、被験体が、血管形成、心臓バイパス手術、血栓溶解、動脈内膜切除、臓器移植、および冠動脈バイパス術(CABG)からなる群より選択される外科手術を受ける前、間、または後に被験体に投与される。特定の実施形態において、この方法は、細胞または組織において生じる虚血性イベント発生の前、間、または後に被験体で実施される。特定の実施形態において、この方法は、再灌流の発生の間、または後に被験体で実施される。特定の実施形態において、この方法は、虚血性イベント後に臨床的に決定される緊急の猶予時間の間、被験体で実施される。

10

【0054】

特定の実施形態において、本発明のこの態様の方法は虚血再灌流障害を予防し、従って、再灌流の後または間の臓器障害を阻害する。特定のさらなる実施形態において、本発明のこの態様の方法は、Toll様受容体2(TLR2、TLR-2、CD282)を介するシグナル伝達によって媒介され、細胞、組織または臓器の虚血後の再灌流の間または後に、細胞、組織または臓器障害の原因となる炎症性免疫反応の抑制または阻害により、虚血再灌流障害を予防する。

20

【0055】

本発明のなおさらなる態様によれば、虚血再灌流障害またはそれに関する状態の処置および予防に使用するための医薬組成物が提供され、その医薬組成物は、少なくとも1つの薬理的に許容できる担体、希釈剤、可溶化剤、乳化剤、保存剤および/または補助剤と共にToll様受容体2の機能または発現を調節する薬剤を含む。

【0056】

特定の実施形態において、TLR2調節薬剤は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体または抗体断片、アプタマー、融合タンパク質およびペプチド模倣物からなる群より選択されるTLR2拮抗薬である化合物である。

30

【0057】

特定の実施形態において、TLR2調節薬剤は、TLR2受容体の可溶性形態である。TLR2の前記可溶性形態は組み換え体であり得る。

【0058】

特定の実施形態において、TLR2調節薬剤は、TLR2の発現を阻害する阻害核酸ベースの化合物である。

【0059】

特定の実施形態において、医薬組成物は、限定されないが、グルココルチコイド、特にサイトカインの発現を抑制するグルココルチコイド；アルキル化剤などの細胞増殖抑制剤、メトトレキサートなどの代謝拮抗物質；OKT-3、抗CD20抗体、抗TNF-抗体インフリキシマブ(REMICADE(商標))、エタネルセプト(ENBREL(商標))またはアダリムマブ(HUMIRA(商標))などの抗CD3抗体などの抗体または関連結合断片；シクロスポリン、タクロリムスまたはシロリムスなどのイムノフィリンで作用する薬剤化合物；あるいはFTY720またはHMG-CoA還元酵素阻害剤、血管拡張剤、利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、アンジオテンシンII受容体拮抗薬、カルシウムチャンネル遮断薬、抗凝固剤、チクロピジンもしくは硫酸クロピドグレルなどのアデノシンニリン酸受容体拮抗薬、ビバリルジン、アルガトロバンもしくはヘパリンなどの糖タンパク質IIb/IIIa受容体拮抗薬、アドレナリン受容体作動薬、抗血栓溶解剤、抗酸化剤、および遮断薬のうちの少なくとも1つ以上を含む治

40

50

療的心臓血管化合物などの低分子からなる群より選択されるうちの少なくとも1つであり得る、限定されないが、免疫抑制剤などの二次治療薬剤をさらに含み得る。

【0060】

特定の実施形態において、Toll様受容体2調節薬剤は、1日あたり被験体の体重の約1mg/kg～約10mg/kgの用量で被験体に経口投与される。特定の実施形態において、Toll様受容体2調節薬剤の用量は、1日あたり約100mg～1日あたり約1000mgである。特定のさらなる実施形態において、Toll様受容体2の調節薬剤の用量は、1日あたり約200mg～1日あたり約300mgである。

【0061】

特定の実施形態において、Toll様受容体2の調節薬剤は、哺乳動物の体重の約0.001mg/kg～1.0mg/kgの用量範囲で、非経口で被験体に投与される。

10

【0062】

特定の実施形態において、Toll様受容体2の調節薬剤は、Toll様受容体2のレベルおよび/または活性を下方制御するのに十分な期間かつ条件下で、被験体に投与される。

【0063】

本発明のさらなる態様は、心臓病またはそれに関連する状態を処置または予防するための方法を提供し、その方法は、

Toll様受容体2の機能を調節する治療有効量の薬剤を提供する工程、および前記化合物を、そのような処置を必要とする被験体に投与する工程、を含む。

20

【0064】

特定の実施形態において、心臓炎症状態は、限定されないが、心筋虚血、虚血性心疾患、高血圧心筋虚血、鬱血性心不全、組織虚血、臓器虚血、急性冠症候群、肥大、脳梗塞、心筋梗塞、不整脈、虚血再灌流障害(I/R)からなる群より選択される。

【0065】

特定の実施形態において、TLR2の機能を調節する薬剤はTLR2拮抗薬である。特定の実施形態において、TLR2拮抗薬は、限定されないが、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、炭水化物、脂質、および低分子化合物からなる群より選択される結合化合物である。

【0066】

特定の実施形態において、TLR2調節薬剤は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体または抗体断片、アプタマー、融合タンパク質およびペプチド模倣物からなる群より選択されるTLR2拮抗薬である化合物である。

30

【0067】

特定の実施形態において、TLR2調節薬剤は、TLR2受容体の可溶性形態である。TLR2の前記可溶性形態は、組み換え技術によって産生され得る。

【0068】

特定の実施形態において、TLR2調節薬剤は、TLR2の発現を阻害する阻害核酸ベースの化合物である。特定の実施形態において、この阻害核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重螺旋分子、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、iRNA、miRNA、siRNA、およびshRNAからなる群より選択され得る。

40

【0069】

特定の実施形態において、TLR2拮抗薬は、抗体またはその抗体由来の結合断片である。その抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または合成抗体からなる群より選択され得る。

【0070】

特定の実施形態において、この方法は、本明細書に記載される二次治療化合物を投与する工程をさらに含み得る。

【0071】

従って、本発明のさらなる態様は、再灌流から生じる組織または臓器障害を予防する方

50

法を提供し、その方法は、

T o l l様受容体2タンパク質の発現を遮断する、治療有効量の阻害核酸を提供する工程、および

そのような処置を必要とする被験体に前記阻害核酸を投与する工程、を含む。

【0072】

特定の実施形態において、阻害核酸としては、限定されないが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、iRNA、miRNA、siRNA、shRNAが挙げられ得る。

【0073】

特定の実施形態において、再灌流は、前記臓器または組織の虚血の期間後に生じる。

10

【0074】

本明細書に定義する場合、T o l l様受容体2の遺伝子発現に関連して使用される場合、用語「遮断する」および「遮断している」とは、T o l l様受容体2タンパク質の発現を生じる少なくとも1つの遺伝子の発現のサイレンシングを意味する。

【0075】

遺伝子サイレンシングは、遺伝子組み換え以外の機構によって遺伝子の発現を停止させる。遺伝子サイレンシングは、転写レベルまたは転写後レベルで媒介され得る。転写遺伝子サイレンシングは、転写装置に隔絶される遺伝子を生じ得、例えば、ヒストン修飾によって媒介され得る。転写後遺伝子サイレンシングは、破壊される遺伝子のmRNAに起因し、従って、TLR2タンパク質が存在する場合、タンパク質などの活性遺伝子産物を防

20

止する。

【0076】

従って、一実施形態において、本発明のこの態様は、TLR2タンパク質の発現を遮断するために、例えば、干渉リボ核酸（例えば、siRNAまたはshRNA）などのRNAi（RNA干渉）剤またはその転写鑄型（例えば、被験体に存在する少なくとも1つの細胞型、組織または臓器に対してshRNAをコードするDNA）などの有効量の阻害核酸分子の被験体への投与を提供する。

【0077】

特定のさらなる実施形態において、阻害核酸分子は、アンチセンスRNA分子であり得る。アンチセンスは遺伝子発現の抑制を引き起こし、mRNAに物理的に結合する一本鎖RNA断片を含み、これにより、mRNAの転写を遮断する。阻害核酸を使用するための適切な核酸の調製のための技術は、当業者に周知である。

30

【0078】

本発明のさらなる態様によれば、再灌流に起因する細胞、組織または臓器障害の処置のための医薬の調製におけるT o l l様受容体2タンパク質の発現を遮断する阻害核酸の使用が提供される。

【0079】

本発明のなおさらなる態様は、再灌流に起因する細胞、組織または臓器障害を処置するためのT o l l様受容体2の発現を遮断するために使用するための阻害核酸を提供する。

【0080】

特定の実施形態において、再灌流は、虚血の期間の後に生じる。

40

【0081】

特定の実施形態において、阻害核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、iRNA、miRNA、siRNA、shRNAからなる群より選択される。

【0082】

本発明のなおさらなる態様によれば、虚血/再灌流障害によって引き起こされる細胞、組織または臓器障害を処置するための医薬組成物が提供され、この組成物は、少なくとも1つの薬理的に許容できる担体、希釈剤、可溶化剤、乳化剤、保存剤および/または補助剤と共に、T o l l様受容体2の発現を遮断する治療有効量の阻害核酸を含む。

50

【0083】

特定の実施形態において、この障害核酸は、限定されないが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、iRNA、miRNA、siRNA、shRNAからなる群より選択される。

【0084】

特定の実施形態において、医薬組成物は、少なくとも1つの免疫抑制因子化合物をさらに含み得る。特定の実施形態において、免疫抑制因子（免疫抑制剤としても公知である）は、限定されないが、グルココルチコイド、特にサイトカインの発現を抑制するグルココルチコイド；アルキル化剤などの細胞増殖抑制剤、メトトレキサートなどの代謝拮抗物質；OKT-3、抗CD20抗体、抗TNF- α 抗体インフリキシマブ（REMICADE（商標））、エタネルセプト（ENBREL（商標））またはアダリムマブ（HUMIRA（商標））などの抗CD3抗体などの抗体または関連結合断片；シクロスポリン、タクロリムスまたはシロリムスなどのイムノフィリンで作用する薬剤化合物；あるいはFTY720などの低分子からなる群のうちの少なくとも1つであり得る。

10

【0085】

Toll様受容体2の発現を遮断する核酸を障害する場合に使用するための適切な核酸の調製のための技術は、当業者に周知である。

【0086】

特定の実施形態において、この障害核酸は、被験体が、限定されないが、血管形成、心臓バイパス手術、血栓溶解、臓器移植、動脈内膜切除、および冠動脈バイパス術（CABG）からなる群より選択される外科手術を受ける前、間、または後に被験体に投与される。

20

【0087】

特定のさらなる実施形態において、障害核酸は、虚血性イベントの前、間、または後に被験体に投与される。特定の実施形態において、障害核酸は、再灌流の間、または後に被験体に投与される。特定の実施形態において、障害核酸は、虚血性イベント後の緊急の猶予の間、被験体に投与される。

【0088】

特定の実施形態において、障害核酸は、被験体が、細胞、組織または少なくとも1つの臓器の移植であるか、またはそれらに関連する外科手術を受ける前、間、または後に被験体に投与される。典型的に、前記方法は、組織障害、特に再灌流に起因する細胞または組織障害を引き起こすTLR2媒介性免疫応答を予防または制限するために実施される。

30

【0089】

さらなる態様において、本発明は、Toll様受容体2の機能活性の遮断または抑制を引き起こす、Toll様受容体2に対する結合特異性を有する少なくとも1つのアプタマーの提供にまで及ぶ。例えば、SELEX技術を用いる、適切なアプタマーを選択するための技術は当業者に周知である。

【0090】

従って、種々のさらなる実施形態において、本発明は、Toll様受容体2に対する結合特異性を有する核酸リガンドを同定および単離する方法にまで及び、この方法は、

40

- (a) 核酸の候補混合物を提供する工程、
- (b) Toll様受容体2を発現する細胞を前記候補核酸混合物と接触させる工程、
- (c) 他の候補核酸に比べてToll様受容体2に対する高い親和性を有する核酸を選択する工程、
- (d) Toll様受容体2に対する親和性を有する少なくとも1つの核酸を提供するために、前記選択された核酸を増幅させる工程、および
- (e) Toll様受容体2に対する高い親和性および特異性を有する核酸から少なくとも1つの核酸を選択する工程、を含む。

【0091】

本発明者らはさらに、Toll様受容体2の機能の抑制が、膜結合Toll様受容体2

50

を活性化するのに利用可能なリガンドの量を減少させることによって達成され得ることを確認した。膜結合Toll様受容体2に結合するのに利用可能なリガンドの量の減少は、Toll様受容体2によって媒介されるシグナル伝達の下方向制御を生じ、それによって、炎症性免疫応答のTLR2によって媒介される活性化の下方向制御を生じる。特に、本発明者らは、炎症性応答のToll様受容体2によって媒介される活性化を抑制する際にToll様受容体2の可溶性形態またはその機能的断片のいずれかである可溶性ペプチドの有用性を確認した。前記抑制は、TLR2特異的結合リガンドについてTLR2の膜結合形態と競合するToll様受容体2の可溶性形態またはToll様受容体2の切断非膜形態に起因する。この競合的結合は、Toll様受容体2のリガンドに利用可能なTLR2の効果的な「仕上げ(mopping up)」の可溶性形態または切断形態を生じる。膜結合Toll様受容体2の結合および活性化の関連する減少は、Toll様受容体2によって媒介される炎症性免疫応答の下方向制御を生じる。

10

【0092】

従って、Toll様受容体2の可溶性形態の投与は、虚血再灌流の間および後に組織損傷の原因となる炎症性免疫応答を抑制するための方法において有用性を有する。

【0093】

従って、本発明のさらなる態様は、細胞、組織、または臓器の虚血再灌流障害を処置および/または予防する方法を提供し、この方法は、

Toll様受容体2のリガンドに結合できるToll様受容体2の可溶性形態またはその可溶性断片の治療有効量を提供する工程、および

20

治療有効量の前記化合物をそのような処置を必要とする被験体に投与する工程、を含む。

【0094】

ヒトToll様受容体2の細胞外ドメイン(外部ドメイン(ectodomain))のアミノ酸配列は、配列番号3(図14)として本明細書に提供される。Toll様受容体2のヒト形態の細胞外ドメインは、587アミノ酸残基、特にGenbank Accession Number AAC 34133(URL www.ncbi.nlm.nih.gov)に規定されるように、規定784アミノ酸の完全長ヒトToll様受容体配列のアミノ酸1~587を含む。本明細書に定義する場合、TLR2の外部ドメインは、細胞外スペースにわたるTLR2の膜結合形態の一部である。

30

【0095】

特定の実施形態において、TLR2の可溶性形態は、組み換え技術によって調製される。Toll様受容体2の可溶性形態は、典型的に、TLR2の細胞外ドメインのみを含み、従って、Genbank Accession Number AAC 34133に規定されるToll様受容体2の細胞内および膜貫通ドメインは存在しない。特定の実施形態において、Toll様受容体2の可溶性形態は、規定されるヒトToll様受容体2の配列のアミノ酸1~587を含み得る。可溶性Toll様受容体2の配列は、1以上のアミノ酸残基の付加、欠失または置換によって修飾され得る。従って、特定の実施形態において、Toll様受容体2の可溶性形態は、配列番号3において本明細書に規定されるToll様受容体2の決定された膜結合形態の細胞外ドメイン由来である。さらなる実施形態において、Toll様受容体2の可溶性形態は、配列番号3(図14)において本明細書に規定されるToll様受容体2のアミノ酸配列に結合した完全長の膜の切断形態由来であり、前記切断形態は、(i)可溶性であり、(ii)Toll様受容体2の膜結合形態に存在する少なくとも1つのエピトープに対する結合特異性を有するリガンドによって結合できる機能特性を示す。

40

【0096】

特定の実施形態において、TLR2の膜結合形態から規定される細胞内および/または膜貫通ドメインに関連するアミノ酸残基の欠失および/または置換に加えて、欠失および/または置換によってさらに、細胞外ドメインのアミノ酸残基が作製され得る。TLR2の細胞外ドメインのアミノ酸残基の任意のこのような欠失および/または置換は、TLR

50

2の修飾形態が、TLR2の膜結合形態に存在する少なくとも1つのエピトープに結合できるリガンドに結合できる限りなされ得る。

【0097】

特定の実施形態において、Toll様受容体2の可溶性形態(sTLR2)は、虚血後、再灌流を受けた、または虚血後、再灌流を受けている臓器、組織または細胞に標的化され得るか、あるいは虚血を受け、やがて再灌流を受ける可能性のある少なくとも1つの特異的細胞型に標的化され得る。sTLR2の全身投与は、TLR2受容体の全体的な免疫抑制、それによって、一部の場において望まれない場合があるTLR2によって媒介されるシグナル伝達の抑制を生じ得るため、このようなsTLR2の標的化は有用である。

【0098】

sTLR2の可溶性形態の標的化は、融合タンパク質の形成によって提供され得、前記融合タンパク質は、TLR2受容体の可溶性部分からなり、典型的に、細胞外ドメインまたはその一部は、二次ペプチドに結合され、典型的に、Fc受容体結合タンパク質は、免疫グロブリン、典型的に、ヒト免疫グロブリンの重鎖由来である。Fcドメインは、治療タンパク質の循環半減期を延長するために広範に使用されている。

【0099】

特定の実施形態において、sTLR2の可溶性形態は、限定されないが、血管形成、心臓バイパス手術、血栓溶解、臓器移植、動脈内膜切除、および冠動脈バイパス術(CABG)からなる群より選択される外科手術を被験体が受ける前、間、または後に投与され得る。

【0100】

特定のさらなる実施形態において、sTLR2の可溶性形態は、虚血性イベントの前、間、または後に被験体に投与され得る。特定の実施形態において、sTLR2の可溶性形態は、再灌流の発生の間、または後に被験体に投与され得る。特定の実施形態において、sTLR2の可溶性形態は、虚血性イベント後の緊急の猶予の間に被験体に投与され得る。

【0101】

特定の実施形態において、sTLR2の可溶性形態は、細胞、組織または少なくとも1つの臓器の移植であるか、またはそれらに関連する外科手術を被験体が受ける前、間、または後に被験体に投与され得る。典型的に、前記方法は、組織障害を引き起こすTLR2によって媒介される免疫応答を予防または制限するために実施される。

【0102】

本発明のなおさらなる態様は、前記調製物の投与についての指示書とともに、Toll様受容体2の膜結合形態によって媒介される機能、発現またはシグナル伝達を抑制する薬剤を含む医薬調製物を含むキットを提供する。

【0103】

特定の実施形態において、この指示書は、調製物が、限定されないが、バイパス術、血栓溶解、動脈内膜切除および血管形成からなる群より選択される外科手術の前、間、または後に被験体に投与されるべきであることを明示し得る。

【0104】

本発明はさらに、再灌流の間または後に、細胞、組織または臓器に対して再灌流障害を予防できる化合物を同定するのに使用するためのスクリーニングアッセイにまで及び、前記再灌流障害は、TLR2の活性化またはToll様受容体2の機能を抑制することによってTLR2経路を介するシグナル伝達により媒介される。

【0105】

本発明のなおさらなる態様は、再灌流の間または後に発生するToll様受容体2によって媒介される炎症および関連細胞、組織または臓器障害を抑制する化合物を同定するためのスクリーニング法を提供し、この方法は、

Toll様受容体2に結合特異性を有するリガンドと共に膜結合Toll様受容体2の受容体を提供する工程、

10

20

30

40

50

候補化合物を T o l l 様受容体 2 と接触させる工程、
T o l l 様受容体 2 を T o l l 様受容体 2 のリガンドに曝露する工程、
T o l l 様受容体 2 に対する T o l l 様受容体 2 のリガンドの結合を測定する工程、を
含み、T o l l 様受容体 2 のリガンドによる T o l l 様受容体 2 の結合の阻害は、前記候
補化合物が T o l l 様受容体 2 の活性化およびシグナル伝達の調節因子であることを示す
。

【 0 1 0 6 】

特定の実施形態において、再灌流の間または後に発生する T o l l 様受容体 2 によって
媒介される炎症および関連細胞、組織または臓器障害を抑制する化合物は、T L R 2 作動
物質である。

10

【 0 1 0 7 】

本発明のさらなる態様は、再灌流障害を予防または処置するために T L R 2 によって媒
介される炎症応答を抑制するのに使用するための本発明の上述の態様に従って同定された
調節薬剤を提供する。

【 0 1 0 8 】

本明細書に定義する場合、再灌流障害とは、血液供給が虚血の期間の後に組織に戻る場
合に引き起こされる組織に対する障害をいう。再灌流障害は脳の虚血性カスケードと関連
があると考えられ、これは脳卒中および脳損傷に関与し、従って、再灌流障害を予防す
る際に、本発明の T L R 2 調節薬剤は、脳卒中および / または脳損傷を予防するのにも役立
ち得る。

20

【 0 1 0 9 】

本発明者らはさらに、受容者における移植されたドナー細胞、または組織の免疫学的拒
絶を予防することによって、被験体への細胞、組織または臓器の移植を改善するのに使用
するための本発明の方法および T L R 2 調節薬剤の有用性を認めた。

【 0 1 1 0 】

一般に、移植手術の間、ドナー臓器、組織、または細胞塊は、血液供給の不足に起因す
る長期の虚血に供され、それにより、ドナー臓器、組織または細胞塊の酸素レベルは枯
渇する。再灌流障害に対する主用な要因と考えられる免疫応答はさらに、移植手術後、宿
主によって起こされる移植片拒絶を生じる全身的免疫応答の原因となる。

30

【 0 1 1 1 】

従って、本発明のなおさらなる態様は、受容者によって移植された組織、臓器または細
胞塊の拒絶の原因となり得る異常な免疫応答を抑制するための方法を提供し、この方法は

、
T o l l 様受容体 2 の活性化および / またはシグナル伝達を調節する治療有効量の薬剤
を提供する工程、および

治療有効量の前記化合物をそのような処置を必要とする被験体に投与する工程、を含む
。

【 0 1 1 2 】

本発明のなおさらなる態様は、移植外科手術後、受容者によって受容されるドナー組織
の拒絶を引き起こす異常な免疫応答を予防するのに使用するための医薬の調製において T
o l l 様受容体 2 の機能を抑制する薬剤の使用を提供する。

40

【 0 1 1 3 】

本発明者らはさらに、虚血再灌流障害に付随するか、または関連する心臓病を処置す
るための本発明の方法および化合物の有用性を確認した。

【 0 1 1 4 】

従って、本発明のさらなる態様は、心臓病またはそれに関連する病状を処置または予防
するための方法を提供し、この方法は、

治療有効量の T o l l 様受容体 2 の抑制薬剤を提供する工程、および
前記処置を必要とする被験体に前記抑制薬剤を投与する工程、を含む。

【 0 1 1 5 】

50

特定の実施形態において、心臓の炎症状態は、心筋虚血、虚血性心疾患、高血圧心筋虚血、鬱血性心不全、組織虚血、臓器虚血、急性冠症候群、肥大、脳梗塞、心筋梗塞、不整脈、虚血再灌流障害（I/R）からなる群より選択される少なくとも1つの状態であり得る。

【0116】

本発明のさらなる態様によれば、心臓病またはそれに関連する疾患もしくは炎症状態を処置するための医薬組成物が提供され、この組成物は、少なくとも1つの薬理的に許容できる担体、希釈剤、可溶化剤、乳化剤、保存剤および/または補助剤と共に、Toll様受容体2に対する結合特異性を有し、その機能を阻害する結合化合物を含む。

【0117】

特定の実施形態において、心臓病またはそれに関連する疾患状態は、心筋虚血、虚血性心疾患、高血圧心筋虚血、鬱血性心不全、組織虚血、臓器虚血、急性冠症候群、肥大、脳梗塞、心筋梗塞、不整脈、虚血再灌流障害（I/R）、アテローム性動脈硬化症、同種移植片血管障害、高血圧、鬱血性心不全からなる群より選択される少なくとも1つの状態であり得る。

【0118】

特定の実施形態において、医薬組成物はさらに、限定されないが、グルココルチコイド、特にサイトカインの発現を抑制するグルココルチコイド；アルキル化剤などの細胞増殖抑制剤、メトトレキサートなどの代謝拮抗物質；OKT-3、抗CD20抗体、抗TNF-抗体インフリキシマブ（Remicade）、エタネルセプト（ENBREL）またはアダリムマブ（HUMIRA）などの抗CD3抗体などの抗体または関連結合断片；シクロスポリン、タクロリムスまたはシロリムスなどのイムノフィリンで作用する薬剤化合物；あるいはFTY720などの低分子化合物あるいはHMG-CoA還元酵素阻害剤、血管拡張剤、利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、アンジオテンシンI受容体拮抗薬、カルシウムチャンネル遮断薬、抗凝固剤、チクロピジンもしくは硫酸クロピドグレルなどのアデノシンニリン酸受容体拮抗薬、ピバリルジン、アルガトロバンもしくはヘパリンなどの糖タンパク質IIb/IIIa受容体拮抗薬、アドレナリン受容体作動薬、抗血栓溶解剤、抗酸化剤、および遮断薬のうちの少なくとも1つを含む治療的心臓血管化合物からなる群のうちの少なくとも1つであり得る、限定されないが、免疫抑制剤などの二次治療薬剤を含み得る。

【0119】

本発明のさらなる態様は、Toll様受容体2に対する結合特異性を有し、心臓病に関連する炎症を処置するための医薬の調製においてToll様受容体2の機能を抑制するために機能する結合薬剤の使用を提供する。

【0120】

本発明は、ここで、例示の目的のために提供され、本発明を限定すると解釈することを意図しない以下の実施例を参照して記載される。

【図面の簡単な説明】

【0121】

【図1】陽性対照としてのp38阻害剤（SB239063）の投与後の心臓の断面を示す。

【図2】PBSの投与後の心臓の断面を示す。

【図3】陰性対照としてのIgGアイソタイプの抗体の投与後の心臓の断面を示す。

【図4】実験的な抗TLR2拮抗モノクローナル抗体OPN-301の投与後の心臓の断面を示す。

【図5】全左心室（LV）のパーセントとしてのリスク領域（AAR）のグラフを示す。

【図6】リスク領域（AAR）のパーセントとしての梗塞面積を示す。

【図7】全左心室（LV）のパーセントとしての梗塞面積を示す。

【図8】全左心室（LV）のパーセントとしての梗塞面積を示す。

【図9】リスク領域（AAR）のパーセントとしての梗塞面積を示す。

10

20

30

40

50

- 【図10】左心室のパーセントとしてのリスク領域 (A a r) を示す。
- 【図11】リスク領域のパーセントとしての梗塞面積を示す。
- 【図12】ヒトT o l l 様受容体2のアミノ酸配列 (配列番号1) を示す。
- 【図13】ヒトT o l l 様受容体2のアミノ酸配列 (配列番号2) を示す。
- 【図14】ヒトT o l l 様受容体2の細胞外ドメイン (配列番号3) を示す。
- 【図15】陽性対照としてのp 3 8 阻害剤 (S B 2 3 9 0 6 3) の投与後の心臓の第2の断面を示す。
- 【図16】P B S の投与後の心臓の第2の断面を示す。
- 【図17】陰性対照としてのI g G アイソタイプの抗体の投与後の心臓の第2の断面を示す。
- 【図18】実験的な抗T L R 2 拮抗モノクローナル抗体O P N - 3 0 1 の投与後の心臓の第2の断面を示す。
- 【図19】全左心室 (L V) のパーセントとしてのリスク領域 (A A R) の第2のグラフを示す。
- 【図20】リスク領域 (A A R) のパーセントとしての梗塞面積の第2のグラフを示す。
- 【図21】全左心室 (L V) のパーセントとしてのさらなる梗塞面積を示す。
- 【図22】全左心室 (L V) のパーセントとしての梗塞面積を示す。
- 【図23】図23 A は、30分の虚血に続いて24時間の再灌流後の血液K O および臓器K O のキメラマウス由来の心臓部分におけるマクロファージの数のグラフを示す。心臓部分からの代表的な画像は、マクロファージについて (赤色細胞を青色の核で) 染色した。細胞密度の差は染色した膜であった。図23 B は、マクロファージについて染色した心臓部分からの代表的な画像、マクロファージについて (赤色細胞を青色の核で) 染色した心臓部分からの代表的な画像を示す。細胞密度の差は染色した膜であった。
- 【図24】心臓機能および形状およびベースライン (t = 0) および梗塞後 (t = 28) を示す。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0122】

本発明は、T L R 2 の生物学的機能を阻害するか、または虚血後の再灌流に起因する組織または臓器障害を予防するのに使用するためのT L R 2 の発現を遮断するT o l l 様受容体2 (T L R 2) に特異的である調節薬剤に関する。

【0123】

本明細書に定義する場合、T o l l 様受容体2は、T L R 2、T L R - 2またはC D 2 8 2ともいわれ得る。典型的に、T o l l 様受容体2は、ヒトT o l l 様受容体2である。あるいは、T o l l 様受容体2は、マウスT o l l 様受容体2である。さらなる実施形態において、T o l l 様受容体2は、ヒトまたはマウス以外の任意の哺乳動物、例えば、ウシまたはラット由来のヒトT L R 2 のホモログまたはオルソログである。特定のさらなる実施形態において、T L R 2 機能を抑制する化合物は、異なる種由来のT o l l 様受容体2においてT o l l 様受容体2の機能の抑制を媒介するという点で交差反応性である。

【0124】

本明細書で使用する場合、用語「エピトープ」とは、特異的結合リガンドによって結合され得る高分子の一部、この場合においてポリペプチド、特にT o l l 様受容体2の一部に関する。エピトープは、ポリペプチド配列内に含まれるアミノ酸残基の隣接配列または非隣接配列から規定され得る。用語「隣接エピトープ (contiguous epitope)」は、エピトープを規定するポリペプチド内の直線状の一連のアミノ酸残基からなるエピトープを規定する。「非隣接エピトープ (non-contiguous epitope)」は、配列が非直線状である一連のアミノ酸残基からなるエピトープであり、それによって、その残基はポリペプチド配列の長さに沿って不連続様式で間隔があいているか、または集合している。不連続 (non-continuous) エピトープは、アミノ酸残基が2つの直線状配列に集合する不連続エピトープであり得るか、または不連続エピトープは、エピトープの一因となる残基が、ポリペプチドの長さに沿って配列され

た直線状アミノ酸配列の3以上の集団で与えられる不連続散在性エピトープであり得る。

【0125】

(抗体)

「抗体」は、天然または部分的もしくは完全に合成的に産生される免疫グロブリンである。この用語はまた、結合ドメイン、つまり抗体結合ドメイン、またはそれに相同的である結合ドメインを有する任意のポリペプチド、タンパク質またはペプチドを含む。これらは天然源由来であってもよいか、またはそれらは部分的もしくは完全に合成的に産生されてもよい。抗体の例は、免疫グロブリンアイソタイプおよびそれらの同形のサブクラスならびに F a b、s c F v、F v、d A b、F d、および二重特異性抗体などの抗原結合ドメインを含む断片である。

10

【0126】

特定の実施形態において、その抗体は、ラクダ抗体、特にラクダ重鎖抗体であり得る。さらに、その抗体断片は、ラクダ重鎖抗体由来のドメイン抗体またはナノボディであり得る。特定の実施形態において、その抗体は、サメ抗体またはサメ由来の抗体であり得る。

【0127】

特定の実施形態において、その抗体は「単離抗体」である。これは抗体が、(1)通常見出される少なくとも一部のタンパク質を含まず、(2)同じ源、例えば、同じ種由来の他のタンパク質を実質的に含まず、(3)異なる種由来の細胞によって発現されるか、または(4)天然に発生しないことを意味する。

【0128】

抗体は多くの方法で修飾され得るため、用語「抗体」は、必要とされる特異性で結合ドメインを有する任意の結合メンバーまたは物質を含むと解釈されるべきである。本発明の抗体は、モノクローナル抗体、またはその断片、誘導體、機能的等価物もしくは相同体であり得る。この用語は、天然または完全もしくは部分的に合成であろうとなかろうと、免疫グロブリン結合ドメインを含む任意のポリペプチドを含む。従って、別のポリペプチドに融合した免疫グロブリン結合ドメイン、または等価物を含むキメラ分子が含まれる。キメラ抗体のクローニングおよび発現は、欧州特許出願公開 E P 0 , 1 2 0 , 6 9 4 号および欧州特許出願公開 E P 0 , 1 2 5 , 0 2 3 号に記載される。

20

【0129】

抗体の定常領域は任意の適切な免疫グロブリンサブタイプであり得るが、抗体サブタイプが I g G 1 であることが好ましい。しかしながら、代替の実施形態において、抗体のサブタイプは、ヒト免疫グロブリン分子が使用されるクラス I g A、I g M、I g D および I g E であり得る。そのような抗体はさらに、任意のサブクラス、例えば、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3 および I g G 4 に属し得る。

30

【0130】

全抗体の断片は抗原結合の機能を実施し得る。そのような結合断片の例は、V L、V H、C L および C H 1 抗体ドメインからなる F a b 断片；単一抗体の V L および V H ドメインからなる F v 断片；F (a b ') 2 断片、2つの連結した F a b 断片を含む二価断片；一本鎖 F v 分子 (s c F v)、ここで、V H ドメインおよび V L ドメインは、2つのドメインを結合させて抗原結合部位を形成させるペプチドリンカーによって連結される；または遺伝子融合によって構築される多価もしくは多特異的断片であり得る二重特異性抗体である。

40

【0131】

本発明において使用するための抗体またはポリペプチドの断片は、例えば、T L R 2 特異的抗体の断片であり、一般に、少なくとも5~7の隣接アミノ酸、しばしば少なくとも約7~9の隣接アミノ酸、典型的に少なくとも約9~13の隣接アミノ酸、より好ましくは少なくとも約20~30またはそれ以上の隣接アミノ酸、および最も好ましくは少なくとも約30~40またはそれ以上の連続アミノ酸のアミノ酸残基の伸長を意味する。

【0132】

このような抗体またはポリペプチド、あるいは T L R 2 特異的抗体の断片の「誘導體」

50

とは、タンパク質のアミノ酸配列を変化させること、例えば、タンパク質をコードする核酸の操作によって、あるいはタンパク質それ自体を変化させることによって修飾された抗体またはポリペプチドを意味する。天然アミノ酸配列のこのような誘導体は、1つ以上のアミノ酸の挿入、付加、欠失および/または置換を含み得るが、好ましくは、TLR2結合活性を有するペプチドを与える。好ましくは、このような誘導体は、25以下のアミノ酸、より好ましくは15以下、さらにより好ましくは10以下、なおより好ましくは4以下、最も好ましくは1または2のアミノ酸のみの挿入、付加、欠失および/または置換を含む。

【0133】

特定の実施形態において、ヒト化抗体もまた提供される。ヒト化抗体は、例えば、米国特許第5,585,089号に記載されるWinterの方法によって産生され得る。

10

【0134】

ヒト化抗体は、TLR2特異的抗体などのモノクローナル抗体の超可変領域およびヒト抗体の定常領域を有する修飾された抗体であり得る。従って、結合メンバーはヒト定常領域を含み得る。

【0135】

超可変領域以外の可変領域はまた、ヒト抗体の可変領域由来であっても、および/またはTLR2特異的抗体などのモノクローナル抗体由来であってもよい。このような場合において、全可変領域は、マウスモノクローナル抗体、TLR2特異的抗体由来であり得、その抗体はキメラ化されたといわれる。キメラ抗体を作製するための方法は、当該分野において公知である。このような方法は、例えば、Boss (Celltech) および Cabilly (Genentech) によって米国特許に記載されるものが挙げられる。例えば、それぞれ、米国特許第4,816,397号および同第4,816,567号を参照のこと。

20

【0136】

元の抗体の特異性を保有する他の抗体またはキメラ分子を産生するために、モノクローナルおよび他の抗体を利用すること、ならびに組み換えDNA技術の技術を使用することが可能である。このような技術は、抗体の免疫グロブリン可変領域、または相補性決定領域(CDR)をコードするDNAを、異なる免疫グロブリンの定常領域、または定常領域プラスフレームワーク領域に導入することを含み得る。例えば、欧州特許出願公開第0,184,187号、英国特許出願公開第2,188,638A号または欧州特許出願公開第0,239,400号を参照のこと。ハイブリドーマまたは他の抗体産生細胞は、産生された抗体の結合特異性を変化させ得るか、または変化させ得ない遺伝子操作または他の変更に従ってもよい。

30

【0137】

特定の実施形態において、TLR2阻害化合物またはTLR2結合化合物が抗体または抗体結合断片である場合、その抗体は治療有効量で被験体に投与される。特定の実施形態において、治療有効量は、 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 20\text{mg}/\text{kg}$ 、 $1\text{g}/\text{kg} \sim 10\text{mg}/\text{kg}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 100\text{pg}/\text{kg}$ および $500\text{pg}/\text{kg} \sim 1\text{mg}/\text{kg}$ から選択される範囲の抗体を含む。

40

【0138】

(抗体の産生)

本発明によって提供される抗体は、多くの手段によって提供され得る。例えば、ファージディスプレイベースのバイオパニングアッセイなどの組み合わせスクリーニング技術が、本発明の結合エピトープに対する結合特異性を有するアミノ酸配列を同定するために使用され得る。このようなファージディスプレイバイオパニング技術は、糸状菌の表面上の抗体結合断片のディスプレイを介して、免疫選択を模倣する手順において適切なエピトープ結合リガンドを同定する方法で利用されるファージディスプレイライブラリーの使用を含む。特異的結合活性を有するファージが選択される。選択されたファージはその後、キメラ、CDR移植、ヒト化またはヒト抗体の産生に使用され得る。

50

【0139】

さらなる実施形態において、その抗体は、培養物中の連続細胞株によって抗体分子を産生する任意の適切な方法を用いて産生され得るモノクローナル抗体である。適切な方法は当業者に周知であり、例えば、KohlerおよびMilstein (Kohlerら、Nature, 256, 495-497, 1975)の方法が挙げられる。キメラ抗体またはCDR移植抗体はさらに、本発明の範囲内で提供される。特定の実施形態において、本発明の抗体は、宿主細胞における組み換えDNAの発現によって産生され得る。

【0140】

特定の実施形態において、モノクローナル抗体は、トランスジェニック動物、例えば、優先的に発現されるヒト重鎖および軽鎖をコードする遺伝子座で内因性マウス免疫グロブリン遺伝子の発現を欠失または抑制するために遺伝子操作されているトランスジェニックマウスを用いて産生されたヒト抗体であり得、これにより、完全なヒト抗体の産生を生じる。

10

【0141】

特定の実施形態において、その結合化合物は、抗体、例えば、Fab、F(ab')₂、Fvまたは一本鎖Fv(scFv)などの抗体結合断片由来の結合断片である。

【0142】

特定の実施形態において、結合化合物は、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、合成された抗体もしくは合成抗体、融合タンパク質、またはそれらの断片、あるいは天然もしくは合成キメラ化合物またはペプチド模倣物を含む。本発明のTLR2エピトープに対する親和性および結合特異性を有する抗体を産生するための方法論は、以上に記載される。

20

【0143】

本発明の、および本発明に使用するための抗体(複数も含む)断片はまた、キメラ合成によって完全または部分的に産生され得る。その抗体は、十分に確立されている標準的な液相、または好ましくは固相ペプチド合成法に従って容易に調製され得る。その概要は広範に利用でき、当業者に周知である。さらに、それらは、液相法または固相、液相および溶液化学の任意の組み合わせによって溶液中で調製され得る。

【0144】

本発明における使用に適切な抗体(複数も含む)断片を産生する別の簡便な方法は、発現系における核酸の使用により、それらをコードする核酸を発現することである。

30

【0145】

本発明に従って使用するための核酸はDNAまたはRNAを含み得、完全または部分的に合成され得る。好ましい態様において、本発明において使用するための核酸は、上記の本発明の抗体(複数も含む)断片をコードする。当業者は、本発明の抗体(複数も含む)断片をさらに提供するそのような核酸に対して置換、欠失および/または付加を決定できる。

【0146】

本発明で使用するための抗体(複数も含む)断片をコードする核酸配列は、本明細書に含まれる情報および参考文献ならびに当該分野において公知の技術(例えば、Sambrookら(1989)、およびAusubelら(1992)を参照のこと)、所定の核酸配列および利用可能なクローンを用いて当業者によって容易に調製され得る。これらの技術は、(i)例えば、ゲノム源由来のそのような核酸の試料を増幅させるためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の使用、(ii)化学合成、または(iii)cDNA配列の調製を含む。抗体断片をコードするDNAは、コードDNAを利用すること、発現される部分のいずれかの側で適切な制限酵素認識部位を同定すること、およびDNA由来の前記部分を切断することを含む、当業者に公知の任意の適切な方法で産生され、使用され得る。次いで、その部分は、標準的な市販の発現系における適切なプロモーターに作動可能に連結され得る。別の組み換えアプローチは、適切なPCRプライマーを用いてDNAの関連部分を増幅させることである。配列に対する修飾は、例えば、修飾されたペプチドの発現を生じさせるため、または核酸を発現するために使用される宿主細胞におけるコドン選

40

50

択を考慮するために、部位特異的突然変異誘発法を用いてなされ得る。

【0147】

核酸は、上記の少なくとも1つの核酸を含むプラスミド、ベクター、転写または発現カセットの形態の構築物として含まれ得る。この構築物は、上記の1つ以上の構築物を含む組み換え宿主細胞内に含まれ得る。発現は、適切な条件下で、核酸を含む組み換え宿主細胞を培養することによって簡便に達成され得る。発現によって産生した後、抗体（複数も含む）断片は、任意の適切な技術を用いて単離および/または精製され得、次いで、適切な場合に使用され得る。

【0148】

種々の異なる宿主細胞においてポリペプチドをクローニングおよび発現するための系は周知である。適切な宿主細胞としては、細菌、哺乳動物細胞、酵母、昆虫およびバキュロウイルス系が挙げられる。異種ポリペプチドを発現するための当該分野において利用可能な哺乳動物細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、NS0マウス骨髄腫細胞が挙げられる。一般的な好ましい細菌宿主はE. coliである。E. coliなどの原核細胞における抗体（複数も含む）断片の発現は、当該分野において確立されている。培養物中の真核細胞における発現もまた、結合メンバーを産生するための選択肢として当業者に利用可能である。

10

【0149】

抗体を産生するための一般的技術は当業者に周知であり、そのような方法は、例えば、KohlerおよびMilstein (1975) Nature 256: 495-497; 米国特許第4,376,110号; HarlowおよびLane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor (これらの内容は本明細書に参照として援用される)に議論されている。組み換え抗体分子を調製するための技術は、上記の参考文献および例えば、欧州特許EP0,623,679号および欧州特許EP0,368,684号（これらは本明細書に参照として援用される）にも記載されている。

20

【0150】

本発明の特定の実施形態において、抗体の重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインをコードする挿入を含む組み換え核酸が利用される。定義により、そのような核酸は、コーディング一本鎖核酸、前記コーディング核酸およびその相補的核酸からなる二本鎖核酸、またはそれらの相補的（一本鎖）核酸それ自体を含む。

30

【0151】

さらに、抗体の重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインをコードする核酸は、天然重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメイン、あるいはそれらの変異体をコードする真の配列を有する酵素的または化学的に合成された核酸であり得る。

【0152】

組み換えDNA技術は、本発明の抗体を改良するために使用され得る。従って、キメラ抗体は、診断または治療用途においてその免疫原性を減少させるために構築され得る。さらに、例えば、ブタなどのトランスジェニック生物内の免疫原性は、抗体をヒト化する類似の技術のCDR移植によって抗体を変化させることにより最小化され得る。そのような技術の例は、Winterによる欧州特許EP0,239,400号に記載される。受容者内の免疫原性を減少させるために、本発明は、ヒト定常ドメインに融合される抗体の重鎖可変ドメインをコードする挿入を含む組み換え核酸を使用し得る。同様に、本発明は、ヒト定常ドメイン または 領域に融合される抗体の軽鎖可変ドメインをコードする挿入を含む組み換えDNAに関する。

40

【0153】

さらに、抗体は、抗体遺伝子の変異誘発によって産生されて、抗体の5個の人工レパートリーを産生され得る。この技術は抗体ライブラリーの調製を可能にする。抗体ライブラリーは市販されてもいる。従って、本発明は有利に、本発明のエピトープに対する特異性を有する結合分子を同定するために、免疫グロブリン源として、免疫グロブリンの人工レ

50

パートリー、好ましくは人工 s c F v レパートリーを利用する。

【0154】

(抗体選択系)

本発明のエピトープに結合でき、従って本発明の方法に使用され得る免疫グロブリンは、当業者に公知の任意の技術を用いて同定され得る。そのような免疫グロブリンは、簡便に、免疫グロブリンポリペプチドの人工レパートリーを含むライブラリーから単離され得る。「レパートリー」とは、複数の結合特異性を与えるために、核酸レベルで、ランダム、準ランダムまたは1つ以上の鋳型分子の直接変異によって産生される分子のセットをいう。レパートリーを産生するための方法は、当該分野において十分に特徴付けられている。

10

【0155】

任意のライブラリー選択系が本発明と併せて使用され得る。多くのライブラリーの所望のメンバーを単離するための選択プロトコルは、ファージディスプレイ技術が典型例であるように、当該分野において公知である。種々のペプチド配列が糸状バクテリオファージの表面で表示されるそのようなシステムは、生体外での選択および標的抗原に結合する特異的抗体断片の増幅のための抗体断片(およびそれらをコードするヌクレオチド配列)のライブラリーを作製するのに有用であると証明されている。VHおよびVL領域をコードするヌクレオチド配列は、それらをE. coliの周辺質のスペースに方向付けるリーダーシグナルをコードする遺伝子断片に連結され、その結果として得られた抗体断片は、バクテリオファージの表面に、典型的にバクテリオファージコートタンパク質(例えばpI 20 I I IまたはpV I I I)との融合として表示される。あるいは、抗体断片は、ラムダファージカプシド(ファージ本体)の外面に表示される。ファージベースのディスプレイ系の利点は、それらが生物学系であるため、選択されたライブラリーメンバーが、細菌細胞において選択されたライブラリーメンバーを含むファージを増殖させることによって簡単に増幅され得ることである。さらに、ポリペプチドライブラリーメンバーをコードするヌクレオチド配列は、ファージまたはファージミドベクターに含まれ、配列決定、発現およびその後の遺伝子操作は、比較的、連続して進められる。

20

【0156】

バクテリオファージ抗体ディスプレイライブラリーおよびラムダファージ発現ライブラリーを構築するための方法は、当該分野において周知である(例えば、McCaffertyら(1990) Nature 348 552-554)。1つの特に有益なアプローチは、s c F Vファージディスプレイライブラリーの使用である(例えば、Hustonら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USAを参照のこと)。

30

【0157】

ファージまたは他のクローンライブラリーの使用の代替案は、核酸、好ましくは、選択された標的、例えば、本発明のTLR2エピトープで免疫化された動物のB細胞由来のRNAを使用することである。

【0158】

V領域およびC領域のmRNAの単離により、FabまたはFvなどの抗体断片が細胞内に発現することを可能にする。つまり、RNAは、免疫化された動物のB細胞から、例えば、免疫化されたマウスの脾臓、またはラマの循環B細胞から単離され、PCRプライマーが、RNAプールから選択的にVHおよびVL cDNAを増幅させるために使用される。従って、得られたVHおよびVL配列は、s c F V抗体を作製するために結合される。PCRプライマー配列は、公開されたVHおよびVL配列に基づいてもよい。

40

【0159】

(ペプチド模倣物)

ペプチド模倣物またはペプチド模倣薬などのペプチド類似物は、鋳型ペプチドの代表的な特性を有する非ペプチド化合物である。そのようなペプチド類似物は、典型的に、コンピューターによる分子モデリングを用いて開発される。本発明のTLR2結合エピトープに対する親和性および結合特異性を有するペプチドに構造的に類似するペプチド模倣物は

50

、類似の診断的、予防的および治療的効果を媒介するために使用され得る。

【0160】

ペプチド模倣物は、典型的に、鑄型ペプチドと構造的に類似しているが、当該分野において周知である方法によって、別の結合と置換される1つ以上のペプチド結合を有する。例えば、本発明のTLR2エピトープに対する結合特異性を有するペプチドは、アミド結合置換、非ペプチド部分の導入、または骨格環化を含むように修飾され得る。適切に、システインが存在する場合、この残基のチオールが、遊離硫酸基の損傷を防止するためにキャップされる。ペプチドはさらに、プロテアーゼ攻撃からペプチドを保護するために天然配列から修飾され得る。

【0161】

適切に、本発明のペプチドおよび本発明に使用するためのペプチドはさらに、少なくとも1つのC末端および/またはN末端キャッピング、ならびに/あるいはシステイン残基キャッピングを用いて修飾され得る。適切に、本発明のペプチドおよび本発明に使用するためのペプチドは、アセチル基を用いてN末端残基でキャップされ得る。適切に、本発明のペプチドおよび本発明に使用するためのペプチドは、アミン基を用いてC末端でキャップされ得る。適切に、システインのチオール基は、アセトアミドメチル基を用いてキャップされる。

【0162】

本発明のエピトープおよびその断片を規定するポリペプチドの発現、単離および精製は、任意の適切な技術によってなされ得る。ポリペプチドを産生するための方法は、ポリペプチドの発現を促進する条件下で、ポリペプチドをコードする組み換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養すること、次いでその培養物から発現したポリペプチドを回収することを含む。当業者は、発現されたポリペプチドを精製するための手順が、利用される宿主細胞のタイプなどの要因に従って変化し、そのポリペプチドが細胞内、膜結合または可溶性形態であろうとなかろうと、その宿主細胞から分泌されることを理解するだろう。

【0163】

任意の適切な発現系が利用されてもよい。ベクターは、本発明のポリペプチドまたは断片をコードするDNAを含み、哺乳動物、トリ、微生物、ウイルス、細菌、または昆虫遺伝子由来のものなどの適切な転写または翻訳調節ヌクレオチド配列に作動可能に連結される。ヌクレオチド配列は、調節配列がDNA配列に機能的に関連する場合、作動可能に連結される。従って、プロモーターヌクレオチド配列は、そのプロモーターヌクレオチド配列がDNA配列の転写を制御する場合、DNA配列に作動可能に連結される。形質転換体が同定される所望(E. coli)の宿主細胞、および選択遺伝子において複製する能力を与える複製起点は、発現ベクターに一般的に導入される。

【0164】

さらに、適切なシグナルペプチド(天然または異種)をコードする配列は、発現ベクターに導入され得る。シグナルペプチド(分泌腺リーダー)についてのDNA配列は、フレームにおいて本発明の核酸配列と融合され得、その結果、そのDNAは最初に転写され、mRNAがシグナルペプチドを含む融合タンパク質に翻訳される。意図される宿主細胞において機能するシグナルペプチドは、ポリペプチドの細胞外分泌を促進する。そのシグナルペプチドは、翻訳の間、ポリペプチドから開裂されるが、細胞からのポリペプチドの分泌を可能にする。

【0165】

ポリペプチドを発現するための適切な宿主細胞は、高等真核細胞および酵母を含む。原核細胞系もまた、適切である。哺乳動物細胞、および特にCHO細胞が、宿主細胞としての使用のために特に好ましい。哺乳動物、原核生物、酵母、菌類および昆虫細胞の宿主を用いて使用するための適切なクローニングおよび発現ベクターは、例えば、Pouwelsら、Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, (1986)(ISBN 0444904018)

10

20

30

40

50

に記載されている。

【0166】

(低分子)

種々のさらなる態様において、本発明は、TLR2 活性または発現に拮抗する低分子化合物を同定するのに使用するためのスクリーニングおよびアッセイ方法に関する。特定のさらなる態様は、同定された化合物にまで及び、従って、前記結合化合物は、結合した場合、エピトープに対する親和性および結合特異性を有し、TLR2 の機能活性を阻害する。

【0167】

TLR2 受容体の拮抗薬として同定される物質はペプチドであってもよいが、または天然の非ペプチド、例えば、上記のペプチド模倣物であってもよい。しかしながら、非ペプチド「低分子」は、しばしば、多くの生体内の薬理学的用途に好ましい。従って、本発明に使用するためのTLR2 結合化合物の模倣薬または模倣剤は、薬理学的用途のために設計され得る。

10

【0168】

公知の薬理学的に活性な化合物に対する模倣薬の設計は、「鉛」化合物に基づく薬理学の開発に対する公知のアプローチである。これは、活性化合物を合成することが難しいか、または費用がかかる場合、あるいは特定の投与方法が不適切な場合に望まれ得る。例えば、ペプチドは消化管に存在するプロテアーゼによって分解されるため、経口組成物および投与のための活性因子として十分に適さない。模倣薬の設計、合成および試験は、標的

20

【0169】

所定の標的特性を有する化合物からの模倣薬の設計に一般に利用されるいくつかの工程が存在する。最初に、標的特性を決定する際に決定的および/または重要である化合物の特定の部分が決定される。ペプチドの場合、これは、ペプチドのアミノ酸残基を体系的に変化させることにより、例えば、順に各アミノ酸残基を置換することによりなされ得る。化合物の活性領域を構成する残基のこれらの部分は、その「活性基」として公知である。

【0170】

一旦、活性基が決定されると、その構造は、様々な範囲の源、例えば、分光技術、X線回折データおよびNMRからのデータを用いて、その物理的特性、例えば、立体化学、結合、サイズおよび/または電荷に従ってモデル化される。コンピューター分析、類似マッピング(原子間の結合よりむしろ、電荷および/または活性基の量をモデル化する)および他の技術もまた、このモデル化プロセスに使用され得る。

30

【0171】

このアプローチの変形において、TLR2 結合化合物の三次元構造がモデル化される。これは、リガンドおよび/または結合パートナーが、結合の際に構造を変化する場合に特に有用であり得、そのモデルの模倣薬の設計を考慮に入れることができる。

【0172】

次いで、鑄型分子が選択され、その鑄型分子上で活性基を模倣する化学基が組み込まれ得る。その鑄型分子およびそれに組み込まれた化学基は簡便に選択され得、その結果、模倣薬は、合成しやすく、薬理学的に許容される可能性があり、生体内で分解せず、一方で鉛化合物の生物学的活性も保持する。このアプローチによって見出される模倣薬(複数も含む)は、次いで、それらが標的特性を有するかどうか、またはそれらがどの程度まで標的特性を示すかを調べるためにスクリーニングされ得る。次いで、さらなる最適化または修飾が、生体内または臨床試験についての1つ以上の最終模倣物に到達するように実施され得る。

40

【0173】

特定の実施形態において、模倣薬結合化合物は、薬物スクリーニング計画に使用される天然または合成化合物であってもよい。いくつかの特徴付けられた、または特徴付けられ

50

ていない成分を含む植物の抽出物も使用され得る。

【0174】

なおさらなる態様において、本発明は、エピトープに結合するか、またはエピトープに結合するリガンドの活性を調節するそれらの能力についての潜在的に膨大な数の異なる物質を試験する効果的な方法を提供する組み合わせライブラリー技術 (Schultz, JS (1996) Biotechnol. Prog. 12: 729-743) の使用にまで及ぶ。活性の調節についてのスクリーニングの前、およびスクリーニング時に、試験物質が、例えば、(コード核酸から酵母において発現され得るポリペプチドおよび試験物質の両方を必要とする) 酵母2ハイブリッド法においてポリペプチドと相互作用する能力についてスクリーニングされ得る。これは、ポリペプチドの活性を調節する実際の能力について物質を試験する前に粗いスクリーニングとして使用され得る。

10

【0175】

本発明のアッセイに加えられ得る試験物質または化合物の量は、通常、使用される化合物のタイプに依存して試行錯誤によって決定される。典型的に、約0.01~100nM濃度の推定阻害化合物、例えば、0.1~10nMが使用され得る。ペプチドが試験物質である場合、より高い濃度が使用され得る。

【0176】

(併用医薬)

上記のように、本発明は併用治療にまで及び、組成物または方法は、再灌流障害の原因となり得る免疫応答を抑制するか、または心臓病を処置するのに役立つ少なくとも1つのさらなる治療化合物と組み合わせて投与されるTLR2の機能的活性を阻害する結合化合物の投与に関する。

20

【0177】

典型的に、一次および二次治療組成物は同時に与えられる。特定の実施形態において、一次治療組成物(すなわち、TLR2の機能的活性に拮抗する結合化合物)および二次治療化合物は同時に投与される。特定のさらなる実施形態において、それらは連続して投与される。

【0178】

特定の実施形態において、併用治療は、サイトカイン阻害剤(例えば、限定されないが、IL-1、IL-6、IL-8およびIL-15の阻害剤)、および腫瘍壊死因子の阻害剤、増殖因子阻害剤、免疫抑制因子、抗炎症剤、酵素阻害剤、代謝阻害剤、細胞毒性剤または細胞増殖抑制剤のうち少なくとも1つと共に被験体に同時投与されるTLR2機能的阻害剤を含み得る。

30

【0179】

当業者は、併用治療の被験体への投与が、治療的に有効な効果を達成して関連させるために、被験体へのより少ない用量の治療薬の投与を可能にするという点で有益であり得ることを理解するだろう。より少ない併用用量の投与により、被験体が、投与される化合物に由来する少ない毒性レベルにしか曝露されないという結果も生じる。さらに、本発明によって提供される併用治療の一部として投与される二次治療化合物は、異なる経路を標的とし、治療の全体的な効果を相乗的に向上する可能性がある。効果の向上により、投与され、それによって関連する毒性を減少させる、より少ない用量の必要性を再び生じる。

40

【0180】

本発明のTLR2阻害化合物と共に投与するための適切な二次治療化合物を同定および選択する際に、前記二次治療化合物は、再灌流障害に関連する炎症を生じる炎症反応の異なる段階で免疫応答を調節するような化合物に基づいて選択され得る。このような二次化合物としては、限定されないが、可溶性受容体、ペプチド阻害化合物、低分子、融合タンパク質またはリガンド、抗体、および抗炎症性効果を媒介するサイトカインが挙げられ得る。

【0181】

(投与)

50

本発明のモノクローナル抗体または融合タンパク質は単独で投与され得るが、好ましくは、意図される投与経路に依存して選択される一般に適切な薬理的に許容できる賦形剤、希釈剤または担体を含む医薬組成物として投与される。適切な薬理的担体の例としては、水、グリセロール、エタノールおよび他のGRAS試薬が挙げられる。

【0182】

本発明のモノクローナル抗体または融合タンパク質は、任意の適切な経路を介して処置を必要とする患者に投与され得る。本明細書に定義する場合、組成物が、注射または注入により非経口的に投与されることが好ましい。非経口投与のための好ましい経路の例としては、限定されないが、静脈内、心臓内、動脈内、腹腔内、筋肉内、腔内、皮下、経粘膜的、吸入または経皮的が挙げられる。

10

【0183】

投与経路はさらに、局所のおよび腸内、例えば、粘膜（肺を含む）、経口、経鼻、直腸を含み得る。

【0184】

特定の実施形態において、組成物は、注射可能組成物として送達可能である。静脈内、筋肉内、皮内または皮下適用に関して、活性成分は、発熱物質を含まず、適切なpH、等張性および安定性を有する非経口的に許容できる水溶液の形態である。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射、リンガー液、または乳酸化リンガー液などの等張性ビヒクルを用いて適切な溶液を十分に調製できる。保存剤、安定剤、緩衝剤、酸化防止剤および/または他の添加剤が、必要な場合、含まれ得る。

20

【0185】

組成物はまた、ミクロスフェア、リポソーム、他の微粒子送達系または血液を含む特定の組織に配置される徐放性製剤を介して投与され得る。

【0186】

本発明に従って使用され得る上記の技術およびプロトコルならびに他の技術およびプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Gennaro, A. R., Lippincott Williams およびWilkins; 第20版 ISBN 0-912734-04-3ならびにPharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems; Ansel, H. C.ら, 第7版 ISBN 0-683305-72-7 (それらの全開示は本明細書に参照として援用される)に見出され得る。

30

【0187】

組成物は、好ましくは、「治療有効量」で個体に投与され、これは、その組成物が投与される個体に有益であることを示すのに十分である。投与される実際の用量、ならびに投与速度および投与期間は、処置される状態の性質および重症度、ならびに処置される患者の年齢、性別および体重、および投与経路などの要因に依存し、それらを考慮して決定され得る。さらに、組成物の特性、例えば、その結合活性および生体内での血漿中の半減期、製剤中の融合タンパク質の濃度、ならびに送達の経路、部位および速度が考慮されるべきである。

【0188】

投薬計画は、本発明の組成物の単回投与またはその組成物の複数回の管理上の投与を含んでもよい。その組成物はさらに、本発明の融合タンパク質が処置するために投与される状態の処置に使用される他の治療薬または医薬と連続して、または別々に投与されてもよい。

40

【0189】

被験体に投与され得る投与計画の例は、限定されないが、 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日} \sim 20\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日} \sim 10\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日} \sim 1\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ を含む群から選択され得る。

【0190】

本発明のTLR2調節薬剤は、好ましくは、「治療有効量」で個体に投与され、これは

50

個体に有用性を示すのに十分である。投与される実際の量、ならびに投与速度および期間は、処置されるものの性質および重症度に依存する。処置の処方箋、例えば、投薬量などの決定は、最終的に、一般開業医および他の医師の責任および決定の範囲内であり、典型的に、処置される疾患、個々の患者の状態、送達部位、投与方法および医師に公知の他の要因が考慮される。

【0191】

他に定義されない限り、本明細書に使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明の当業者によって一般に理解される意味を有する。

【0192】

文脈が他に要求しない限り、明細書全体にわたって、用語「含む (comprise)」または「含む (include)」、あるいは「含む (comprises)」または「含んでいる (comprising)」、「含む (includes)」または「含んでいる (including)」などの変形は、記載される整数または整数の群を包含するが、いかなる他の整数または整数の群も排除しないことを示すことが理解されるだろう。

10

【0193】

本明細書で使用する場合、「1つ (a)」、「1つ (an)」および「その (the)」などの用語は、文脈が他に明確に要求しない限り、単数形および複数形の指示対象を含む。従って、例えば、「活性な薬剤」または「薬理学的に活性な薬剤」に対する言及は、単一の活性な薬剤および組み合わせた2つ以上の異なる活性な薬剤を含み、一方、「担体」に対する言及は、2つ以上の担体の混合物および単一の担体などを含む。

20

【0194】

本発明の融合タンパク質のポリペプチド構成要素を記載するために使用される命名は、従来の実務に従い、アミノ基 (N) は各アミノ酸残基の左に提示され、カルボキシ基は右に提示される。

【0195】

本明細書で使用する場合、「アミノ酸」との語句は、天然および合成アミノ酸の両方、ならびにDおよびLアミノ酸の両方を含むことを意図する。合成アミノ酸はまた、限定されないが、アミドなどの塩、およびアミノ酸誘導体を含む化学的に修飾されたアミノ酸を含む。本発明のポリペプチド内に存在するアミノ酸は、メチル化、アミド化、アセチル化またはそれらの生物学的活性に悪影響を与えずに循環半減期を変化させ得る他の化学基での置換によって修飾され得る。

30

【0196】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」は、ペプチド結合またはアイソスターなどの修飾されたペプチド結合による一連の少なくとも2つのアミノ酸共有結合を記載するために本明細書に交換可能に使用される。ペプチドまたはタンパク質を含み得るアミノ酸の最大数に制限は課されない。さらに、用語ポリペプチドは、ペプチドの断片、類似体および誘導体にまで及び、前記断片、類似体または誘導体は、その断片、誘導体または類似体が誘導されるペプチドと同じ生物学的機能活性を保持する。

40

【0197】

さらに、本明細書で使用する場合、用語「融合タンパク質」はまた、融合ポリペプチド、融合ペプチドなどの意味を取り得るか、または免疫抱合体ともいわれ得る。用語「融合タンパク質」は、2つ以上のサブユニット分子、典型的に、ポリペプチドが、共有結合または非共有結合されている分子をいう。

【0198】

本明細書で使用する場合、用語「治療有効量」とは、限定されないが、被験体における低酸素症、脳卒中、心臓発作、慢性腎不全または臓器移植を含む群より選択される少なくとも1つの状態に起因する再灌流障害の原因となるTLR2媒介性炎症を抑制するのに必要とされる本発明の薬剤、結合化合物、低分子、融合タンパク質またはペプチド模倣物の量を意味する。

50

【0199】

本明細書で使用する場合、用語「予防的に有効な量」とは、限定されないが、被験体における低酸素症、脳卒中、心臓発作、慢性腎不全または臓器移植を含む群より選択される少なくとも1つの状態に起因する再灌流障害の原因であるTLR2媒介性炎症の初期の発現、進行または再発を予防するのに必要とされる組成物の量に関する。

【0200】

本明細書で使用する場合、用語「処置」ならびに「処置する」および「処置している」などの関連用語は、TLR2媒介性状態の少なくとも1つの症状の進行、重症度および/または持続の減少を意味し、前記減少または改善は、本発明のTLR2結合エピトープに対する特異性を有する結合化合物の投与に起因する。従って、用語「処置」とは、被験体に有益であり得る任意の投薬計画をいう。この処置は、既存の状態に関してであってもよいか、または予防的（予防的治療）であってもよい。処置は、治療的、軽減的または予防的効果を含んでもよい。本明細書において「治療的」および「予防的」処置に対する言及は、それらの最も広い状況とみなされるべきである。用語「治療的」とは、被験体が完全に回復するまで処置されることを必ずしも意味するわけではない。同様に、「予防的」とは、被験体が最終的に疾患状態にかからないことを必ずしも意味するわけではない。

10

【0201】

本明細書で使用する場合、用語「被験体」とは、動物、好ましくは、哺乳動物、特にヒトをいう。特定の実施形態において、その被験体は哺乳動物、特にヒトである。用語「被験体」は、本明細書で使用する場合、用語「患者」と交換可能である。

20

【実施例】

【0202】

（実施例1 心臓における再灌流障害に対するTLR2拮抗抗体の効果）

（材料および方法）

（i）動物および実験計画

雄性C57BL/6マウス（8～12週齢、体重25～30グラム）に、30分の虚血後、24時間の再灌流を受けさせた。

【0203】

実験化合物を、尾静脈を介して再灌流の5分前に投与した。マウスに、陰性対照（ $n = 10$ ）としてIgGアイソタイプの抗体10mg/kg、陽性対照（ $n = 10$ ）としてSB239063 0.5mg/kg（Alexis Corporation、カタログ番号ALX-270-351）SB239063は、トランス-1-(4-ヒドロキシシクロヘキシル)-4-(フルオロフェニル)-5-(2-メトキシピリミジン-4-イル)イミダゾールとしても公知である、LPS誘導ヒト末梢血単球においてIL-1およびTNF- α 産生（それぞれ、 $IC_{50} = 120$ nMおよび350 nM）を阻害するp38MAPキナーゼの有力な細胞透過性阻害剤（組み換え体の精製されたヒトp38について $IC_{50} = 44$ nM）の、PBS（ $n = 11$ ）および実験的OPN-301モノクローナル抗体15mg/kg（ $n = 6$ ）、10mg/kg（ $n = 10$ 、 $n = 5$ ）、10mg/kg（ $n = 5$ ）のいずれかを含む400～450 μ lのストックを与えた。OPN-301（OPN301）は、マウスIgG1抗TLR2抗体（マウスTo11様受容体2（TLR2）抗体、クローンT2.5、HyCult Biotechnology b.v., Cell Sciences, Canton, USA: カタログ番号1054）である。

30

40

【0204】

マウスを、FENTANYL（商標）（N-(1-フェネチル-4-ピペリジル)-N-フェニル-プロパンアミド）0.05mg/kg、DORMICUM（商標）（Midazolam、8-クロロ-6-(2-フルオロフェニル)-1-メチル-4H-イミダゾ[1,5-a][1,4]ベンゾジアゼピン）5mg/kgおよびDOMITOR（商標）（塩酸メドミジン）0.5mg/kg（腹腔内注射）の混合物で麻酔した。アトロピン（（8-メチル-8-アザビシクロ[3.2.1]オクト-3-イル）3-ヒドロキ

50

シ - 2 - フェニルプロパノアート) 0.05 mg/kg を、冠動脈結紮前に皮下投与した。中核体温を、直腸温度計および自動加熱毛布を用いて連続モニタリングによって手術の間、36 ~ 37.5 に維持した。マウスをインキュベートし、100%の酸素を通気した (Harvard Apparatus Inc.)。左冠動脈前下行枝 (LAD) を、LAD を覆ったポリエチレン - 10 チューブの一部で 8 - 0 バイクリル (vicryl) 縫合糸を用いて結紮した。

【0205】

虚血を心筋が白くなることにより確認した。再灌流を、結紮糸をほどき、ポリエチレン - 10 チューブを除去することにより開始した。危険にさらされた心筋の再灌流を、最初の数分間の典型的な充血により特徴付けた。緩めた縫合糸の一片を、虚血領域を決定するために適所に置いたままにした。胸壁を閉じ、その動物に、ANTISEDAN (商標) (塩酸アチパメゾール、DOMITOR (商標) (塩酸メデトミジン) についての鎮静反転剤) 2.5 mg/kg、ANEXATE (商標) (Flumazenil (フルマゼピルとしても公知である)) 0.5 mg/kg および TEMGESIC (商標) (ブプレノルフィン) 0.1 mg/kg を皮下に与えた。

10

【0206】

(梗塞面積)

梗塞面積 (IS) を、リスク領域 (AAR) および全左心室 (LV) の割合として表した。AAR/LV の比を、虚血および再灌流を受けた心筋組織の範囲 (すなわち、危険にさらされた面積) について測定した。IS/AAR の比は、危険にさらされた心筋内の梗塞面積を決定するための正確な尺度であり、さらに主用評価項目であり、その主用評価項目から処置の有効性が取り扱われる。副次的評価項目 IS/LV の比は、全左心室壁内の梗塞面積の割合である。

20

【0207】

AAR を決定するために、LAD を、(適所に置いたままにした縫合糸によってマークした位置で) 再び結紮し、4%のエバンスブルー染料を、胸大動脈を介して逆行性に注射した。心臓を迅速に外植し、0.9%の生理的食塩水でリンスし、透明な食品ラップで包み、1時間、-20 で凍結した。次いで、心臓を、5つの1mmの断片に機械的にスライスした。心臓断片を、37 で15分間、1%の塩化トリフェニルテトラゾリウム (Sigma-Aldrich) でインキュベートした後、それらをさらに15分間、ホルムアルデヒドに入れた。生存組織を赤く染色したので、梗塞組織は白く見えた。心臓断片を、顕微鏡 (CARL ZEISS (商標)) 下で、デジタル写真 (CANON EOS 400D) でとった。IS、AAR および全LV面積を、ImageJソフトウェア (バージョン1.34) を用いて測定した。

30

【0208】

(統計的分析)

全てのデータを平均 ± SD として表した。歪度 ± SD および尖度 ± SD の正規性を確認した後、ボンフェローニ調整 (表2) およびダネットT検定 (両側 (2-sided)) (表4) を用いて一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を、群間の差を試験するために使用した。異常分布が疑われた場合 (すなわち、尖度および歪度の値がそれらの標準偏差の2倍である場合)、Kolmogorov-Smirnov 試験を実施した。全ての統計的分析を、Windows (登録商標) (SPSS, Chicago, USA) 用の SPSS バージョン 13.0 を用いて実施し、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

40

【0209】

(結果)

生存 - 全ての動物が30分の虚血後、24時間の再灌流で生存していた。

【0210】

心臓の断面 - 図1~4は、異なる群における心臓の断面の代表的な例を示す。

【0211】

記述的統計 - 表1、表3および図5、6、7、8および9は、データおよびそれらの分

50

布を示す。全てのデータを正規分布した。p38阻害剤の群は、異常分布に対する疑いがあったが、Kolmogorov-Smirnov試験により、その正規性(p=0.077)が示された。

【0212】

全左心室内のリスク領域(AAR) - AAR/LVは、群の中で統計的に異なっておらず、左心室は群の間の処置によって等しい影響を受けていたことを意味する(図5)。

【0213】

梗塞面積 - 表2および表4は、実験群の間の平均の比較を示す。mAbは、他の群と比較して平均IS/AARの有意差を示す唯一の群である。OPN-301モノクローナル抗体での処置は、IgGアイソタイプ(p=0.007)およびp38阻害剤(p=0.006)で処置したマウスの両方と比較して43%のAAR内の梗塞面積(IS/AAR)の減少を生じる。IS/AARの減少は、PBSで処置したマウスと比較してさらに顕著である、50%(p<0.001)(図6)。

10

【0214】

全左心室のパーセントとしての梗塞面積(IS/LV)はまた、実験的抗TLR2 OPN-301モノクローナル抗体で処置したマウスで減少する: IgGアイソタイプ(p=0.01)と比較して53%の減少、p38阻害剤(p=0.032)と比較して49%の減少およびPBS(p<0.001)で処置したマウスと比較して65%の減少(図7)。

20

【0215】

p38阻害剤およびIgGアイソタイプで処置したマウスと、PBSで処置したマウスとの間の平均IS/LVの差(それぞれ、-26%および-31%)は、統計的に有意ではなかった(図7)。

【0216】

【表1】

表 1:

表1. 従属変数の記述的統計

群	N	平均	標準偏差	Kurtosis	Kurtosis の標準誤差	Skewness	Skewness の標準誤差	
AAR_LV	IgG アイソタイプ	10	42.4650	9.68402	-.700	1.334	.836	.687
	p38 阻害剤	10	40.3380	11.83944	6.996	1.334	2.559	.687
	PBS	11	46.8518	10.25579	.135	1.279	-.607	.661
	実験的 mAb	10	36.7560	10.17614	2.510	1.334	.792	.687
	合計	41	41.7312	10.78184	.446	.724	.750	.369
IS_AAR	IgG アイソタイプ	10	31.1460	8.87645	-.854	1.334	-.906	.687
	p38 阻害剤	10	31.4000	7.53476	2.766	1.334	-.868	.687
	PBS	11	35.5845	9.74227	-.736	1.279	-.418	.661
	実験的 mAb	10	17.8940	7.32916	-1.163	1.334	.454	.687
	合計	41	29.1666	10.56588	-.835	.724	-.240	.369
IS_LV	IgG アイソタイプ	10	12.8620	3.50649	.877	1.334	-.388	.687
	p38 阻害剤	10	12.0100	2.36137	1.693	1.334	1.265	.687
	PBS	11	17.3100	7.41934	-1.614	1.279	-.101	.661
	実験的 mAb	10	6.1020	1.67206	.617	1.334	.023	.687
	合計	41	12.1988	5.91672	.388	.724	.893	.369

30

40

【0217】

【表 2】

表 2:

表 2. 多重比較についてボンフェローニ調整を用いた一元配置分散分析 (one-way ANOVA) 事後試験

ボンフェロー 従属変数	(i) 群	(j) 群	平均差 (I-J)	標準誤差	有意性	95% 信頼区間	
						下界	上界
AAR_LV	IgG アインタイプ	p38 阻害剤	2.12700	4.70156	1.000	-10.9791	15.2331
		PBS	-4.38682	4.59347	1.000	-17.1916	8.4179
		実験的 mAB	5.70700	4.70156	1.000	-7.3991	18.8131
	p38 阻害剤	IgG アインタイプ	-2.12700	4.70156	1.000	-15.2331	10.9791
		PBS	-6.51382	4.59347	.987	-19.3186	6.2909
		実験的 mAB	3.58000	4.70156	1.000	-9.5261	16.6861
	PBS	IgG アインタイプ	4.38682	4.59347	1.000	-8.4179	17.1916
		p38 阻害剤	6.51382	4.59347	.987	-6.2909	19.3186
		実験的 mAB	10.09382	4.59347	.206	-2.7109	22.8986
	実験的 mAB	IgG アインタイプ	-5.70700	4.70156	1.000	-18.8131	7.3991
		p38 阻害剤	-3.58000	4.70156	1.000	-16.6861	9.5261
		PBS	-10.09382	4.59347	.206	-22.8986	2.7109
IS_AAR	IgG アインタイプ	p38 阻害剤	-2.25400	3.78664	1.000	-10.8096	10.3016
		PBS	-4.43855	3.69957	1.000	-14.7515	5.8744
		実験的 mAB	13.25200(*)	3.78664	.007	2.6964	23.8076
	p38 阻害剤	IgG アインタイプ	.25400	3.78664	1.000	-10.3016	10.8096
		PBS	-4.18455	3.69957	1.000	-14.4975	6.1284
		実験的 mAB	13.50600(*)	3.78664	.006	2.9504	24.0616
	PBS	IgG アインタイプ	4.43855	3.69957	1.000	-5.8744	14.7515
		p38 阻害剤	4.18455	3.69957	1.000	-8.1284	14.4975
		実験的 mAB	17.69055(*)	3.69957	.000	7.3776	28.0035
	実験的 mAB	IgG アインタイプ	-13.25200(**)	3.78664	.007	-23.8076	-2.6964
		p38 阻害剤	-13.50600(**)	3.78664	.006	-24.0616	-2.9504
		PBS	-17.69055(**)	3.69957	.000	-28.0035	-7.3776
IS_LV	IgG アインタイプ	p38 阻害剤	.85200	1.99523	1.000	-4.7099	6.4139
		PBS	-4.44800	1.94935	.170	-9.8820	.9860
		実験的 mAB	6.76000(*)	1.99523	.010	1.1981	12.3219
	p38 阻害剤	IgG アインタイプ	-.85200	1.99523	1.000	-6.4139	4.7099
		PBS	-5.30000	1.94935	.059	-10.7340	.1340
		実験的 mAB	5.90800(*)	1.99523	.032	.3461	11.4699
	PBS	IgG アインタイプ	4.44800	1.94935	.170	-.9860	9.8820
		p38 阻害剤	5.30000	1.94935	.059	-.1340	10.7340
		実験的 mAB	11.20800(*)	1.94935	.000	5.7740	16.6420
	実験的 mAB	IgG アインタイプ	-6.76000(*)	1.99523	.010	-12.3219	-1.1981
		p38 阻害剤	-5.90800(*)	1.99523	.032	-11.4699	-.3461
		PBS	-11.20800(*)	1.94935	.000	-16.6420	-5.7740

* 平均差は .05 レベルで有意である。

10

20

30

【 0 2 1 8 】

【表 3】

表 3 : 従属変数の記述的統計

(以前に含まれていないIS/LVデータおよびTLR2KO, 血液KO, 臓器KOデータを表3に含む変更した表)

群	N	平均	平均 の標準誤差	Kurtosis	Kurtosis の標準誤差	Skewness	Skewness の標準誤差
AAR/LV 生理的食塩水	10	40,7550	3,72254	2,342	1,334	-1,361	,687
p38 阻害剤	10	40,8740	3,75393	6,945	1,334	2,526	,687
IgG アイソタイプ	10	44,0190	2,99674	-,421	1,334	,954	,687
OPN-301	10	38,0840	3,18762	2,583	1,334	,856	,687
TLR2 KO	10	41,4090	5,72911	-,113	1,334	1,020	,687
血液 KO	11	40,6355	1,46900	-,349	1,279	-,035	,661
臓器 KO	9	41,6533	2,63617	3,751	1,400	1,196	,717
IS/AAR 生理的食塩水	10	34,5010	3,25153	-1,895	1,334	-,201	,687
p38 阻害剤	10	31,7250	2,39083	2,860	1,334	-,922	,687
IgG アイソタイプ	10	31,4300	2,72385	-,762	1,334	-,921	,687
OPN-301	10	18,9490	2,16521	-,800	1,334	,420	,687
TLR2 KO	10	23,0090	2,92849	-,755	1,334	,647	,687
血液 KO	11	22,9055	2,74268	-,628	1,279	,278	,661
臓器 KO	9	33,9011	3,23683	-1,309	1,400	,411	,717
IS/LV 生理的食塩水	10	14,0620	2,00624	-1,153	1,334	,659	,687
p38 阻害剤	10	12,3220	,76883	,882	1,334	,999	,687
IgG アイソタイプ	10	13,5420	1,16046	,889	1,334	-,485	,687
OPN-301	10	6,8170	,55525	,382	1,334	-,418	,687
TLR2 KO	10	8,7470	,99411	-1,124	1,334	,000	,687
血液 KO	11	9,0845	,93461	-,907	1,279	-,110	,661
臓器 KO	9	13,7856	1,12967	-,869	1,400	,242	,717

10

20

30

【 0 2 1 9 】

【表 4】

表 4:

多重比較

ダネットt(両側(2-sided))

従属変数	(I)群	(J)群	平均差 (I-J)	標準誤差	有意性	95% 信頼区間	
						上界	下界
AAR_IV	陽性対照	生理的食塩水	.11900	5,30600	.000	-14,2877	14,5257
	陰性対照	生理的食塩水	3,28400	5,30600	.989	-11,1427	17,6707
	実験的 mAB	生理的食塩水	-2,67100	5,30600	.996	-17,0777	11,7357
	TLR2 KO	生理的食塩水	.85400	5,30600	1.000	-13,7527	15,0607
	10mg/kg	生理的食塩水	-4,38100	6,49850	.982	-22,0055	13,2835
	5mg/kg	生理的食塩水	-1,58333	6,12685	1.000	-18,2187	15,0521
IS_AAR	15mg/kg	生理的食塩水	-5,88300	6,49850	.931	-23,3675	11,8815
	陽性対照	生理的食塩水	-2,77600	3,72697	.968	-12,8953	7,3433
	陰性対照	生理的食塩水	-3,97100	3,72697	.947	-13,1903	7,0483
	実験的 mAB	生理的食塩水	-15,55200(*)	3,72697	.001	-25,6713	-5,4327
	TLR2 KO	生理的食塩水	-11,49200(*)	3,72697	.019	-21,6113	-1,3727
	10mg/kg	生理的食塩水	-13,72900(*)	4,56459	.023	-26,3226	-1,3354
5mg/kg	生理的食塩水	-9,74100	4,30353	.142	-21,4258	1,9438	
15mg/kg	生理的食塩水	-13,71900(*)	4,56459	.024	-26,3126	-1,3254	

平均差は .05 レベルで有意である。

ダネットt検定は対照として1群を扱い、それに対して全ての他の群を比較する。

【0220】

TLR2 に対する結合特異性を有する実験的 OPN - 301 モノクローナル抗体は、梗塞面積の大幅な減少を生じることが示される。

【0221】

実験化合物は再灌流の5分前に投与した。これにより、陽性対照(SB239063)が梗塞面積を減少させなかったことが明らかになった。陽性対照が効果的であることを示した研究において、p38 阻害剤(SB239063 または SB203580 のいずれか)は、虚血前および/または再灌流の間に投与された。臨床的環境において、このプロトコルはいくつかの理由のために可能ではない。第一に、心筋梗塞は予測できず、従って、患者は p38 阻害剤を虚血期間前に摂取できない。p38 阻害剤はそれらの作用を及ぼすのに長時間必要とするため、それらはまた、全虚血期間を与える可能性がある。これにより、心筋虚血/再灌流に対する治療が不適切となり、血流の早期の回復が患者にとって有益である：薬物は効果的である十分な時間を有さない。抗TLR2モノクローナル抗体 OPN - 301 は、これらの状況下でさえ、梗塞面積を減少させることができた。

【0222】

全左心室のパーセントとしての梗塞面積(IS/LV) (p = 0.059、表2)を減少させることにおける p38 阻害剤 SB239063 の効果への傾向が存在した。これは、a) PBS 群におけるデータの拡散；b) 以前の研究において虚血期間の前に与えられるものと同じほどの効果を除いて、SB239063 はほとんど効果を有さない、または c) SB239063 に対する動物の間の反応性の変動性によって引き起こされ得る。

【0223】

図9は、抗TLR2モノクローナル抗体 OPN - 301 の 15 mg/kg、10 mg/kg および 5 mg/kg の投与が、生理的食塩水群での 34.5% と比較して、それぞれ、21%、21% および 25% のリスク領域の梗塞を生じることが示す。n = 5 での 10 mg/kg の投与は、図6(OPN - 301モノクローナル抗体で19%の梗塞)で得られた結果と統計的に類似している。しかしながら、5 mg/kg と生理的食塩水群との間の梗塞面積の差は、統計的に有意にはならなかった (p = 0.131)。

【0224】

要約すれば、5 mg/kg 用量のマウス IgG1 抗TLR2抗体 OPN - 301 は、1

10

20

30

40

50

0 mg / kg または 15 mg / kg のマウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 と比較して梗塞面積を有意に減少させなかった。10 mg / kg についての n = 10 と比較して、比較的少ない数のマウス、すなわち n = 5 は、標準偏差の等しい大きさと正規分布したデータを得るのに十分であったため、15 mg / kg のマウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 の効果により、抗体の有効な効力が示された。従って、15 mg / kg のマウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 は、10 mg / kg のマウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 と同様の効力である。

【0225】

(実施例2 心臓における再灌流障害に対する T L R 2 拮抗抗体の効果へのさらなる調査)

実施例1の実験を以下に示すように、および図15~23にさらに示すように繰り返した。

【0226】

(生存)

全ての動物は、30分の虚血/24時間の再灌流で生存していた。I g G アイソタイプで処置した2匹のマウスを除いて、全ての動物は、M I / R 障害後28日にも生存していた。死因は、手順および/または感染症の原因と関連していなかった。

【0227】

(心臓の断面)

図15、16、17および18は、異なる群における心臓の断面の代表的な例を示す。

【0228】

(記述的統計)

表5ならびに図19、20および21は、データおよびそれらの分布を示す。全てのデータは正規分布されている。p38阻害剤群は異常分布に対する疑いがあったが、K o l m o g o r o v - S m i r n o v 試験により、その正規性 ($p = 0.077$) が示された。

【0229】

(全左心室内のリスク領域)

A A R / L V は群の中で異ならず、左心室は群の間の処置によって等しい影響を受けていたことを意味する(図1)。

【0230】

(梗塞面積)

表5は、P B S 処置に対する多重比較を示す。T L R 2 ノックアウトおよびマウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 処置は、有意な梗塞面積の減少を生じる。マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 での処置は、A A R 内の梗塞面積 (I S / A A R) を45% ($p = 0.001$) 減少させる。T L R 2 ノックアウト (K O) マウスは、33.3% ($p = 0.025$) の減少を示す。意図される陽性対照 p38 阻害剤で処置したマウスは、梗塞面積の減少を示さない ($p = 0.956$) (図20)。

【0231】

全左心室 (I S / L V) のパーセントとしての梗塞面積はまた、O P N - 3 0 1 で処置したマウスにおいて減少した：生理的食塩水処置と比較して52%の減少 ($p < 0.001$)。再び、梗塞面積の差は、I g G アイソタイプと p38 阻害剤処置とで観測されなかった(図21)。

【0232】

単一の循環細胞上で T L R 2 を欠くマウスは、全ノックアウトと同程度の心臓保護の利点がある。血液ノックアウトの梗塞面積は、全 T L R 2 ノックアウトマウス (A A R 内の梗塞の33.3%の減少; $p = 0.019$) と類似している。対照的に、実質細胞上で T L R 2 を欠くマウスは、M I / R 障害に対して保護されていない(図22)。T L R 2 が M I / R 障害における炎症応答を媒介するという本発明者らの仮説に従って、血液ノックアウトマウスは、24時間の再灌流後の心筋において2.5倍少ないマクロファージ流入

10

20

30

40

50

を示す (p = 0 . 0 0 0 5 ; 図 2 3) 。これらのデータは、循環細胞上の T L R 2 発現が M I / R 障害を媒介するという考えを支持する。

【 0 2 3 3 】

(心臓機能および形状)

図 2 4 および表 6 は、梗塞 2 8 日後の心臓機能および形状の変化を示す。拡張終期および収縮末期の体積の両方は、生理的食塩水および I g G アイソタイプ処置で増加するが、O P N - 3 0 1 処置は、両方のパラメーターの減少を生じる。さらに、駆出率は、生理的食塩水および I g G アイソタイプで処置したマウスにおいて悪化する。対照的に、マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 は、駆出率のわずかな増加によって示されるように、梗塞 2 8 日後の心臓機能を保存する。これらのデータは、O P N - 3 0 1 処置での梗塞面積の減少が、M I / R 障害後、保存された心臓機能および心臓形状になることを示唆する。

10

【 0 2 3 4 】

【 表 5 】

表 5 : リスク領域および梗塞面積の多重比較

ダネット t (両側(2-sided))			95% 信頼区間				
従属変数	(I) 群	(J) 群	平均差 (I-J)	標準誤差	有意性	上界	下界
AAR_LV	p38 阻害剤	生理的食塩水	,11900	5,01741	1,000	-13,1178	13,3558
	IgG アイソタイプ	生理的食塩水	3,26400	5,01741	,969	-9,9728	16,5008
	OPN-301	生理的食塩水	-2,67100	5,01741	,988	-15,9078	10,5658
	TLR2 KO	生理的食塩水	,65400	5,01741	1,000	-12,5828	13,8908
	血液 KO	生理的食塩水	-,11955	4,90205	1,000	-13,0520	12,8129
	臓器 KO	生理的食塩水	,89833	5,15490	1,000	-12,7012	14,4978
IS_AAR	p38 阻害剤	生理的食塩水	-2,77600	3,94779	,956	-13,1910	7,6390
	IgG アイソタイプ	生理的食塩水	-3,07100	3,94779	,931	-13,4860	7,3440
	OPN-301	生理的食塩水	-15,55200(*)	3,94779	,001	-25,9670	-5,1370
	TLR2 KO	生理的食塩水	-11,49200(*)	3,94779	,025	-21,9070	-1,0770
	血液 KO	生理的食塩水	-11,59555(*)	3,85703	,019	-21,7710	-1,4200
	臓器 KO	生理的食塩水	-,59989	4,05597	1,000	-11,3002	10,1005
IS_LV	p38 阻害剤	生理的食塩水	-1,74000	1,63426	,780	-6,0515	2,5715
	IgG アイソタイプ	生理的食塩水	-,52000	1,63426	,999	-4,8315	3,7915
	OPN-301	生理的食塩水	-7,24500(*)	1,63426	,000	-11,5565	-2,9335
	TLR2 KO	生理的食塩水	-5,31500(*)	1,63426	,010	-9,6265	-1,0035
	血液 KO	生理的食塩水	-4,97745(*)	1,59669	,014	-9,1898	-,7651
	臓器 KO	生理的食塩水	-,27644	1,67904	1,000	-4,7061	4,1532

20

30

* 平均差は . 0 5 レベルで有意である。
ダネット t 検定は対照として 1 群を扱い、それに対して全ての他の群を比較する。

40

【 0 2 3 5 】

【表 6】

表 6 : ベースライン ($t=0$) および 梗塞後 ($t=28$) での心臓機能および形状

	EDV, μ l			ESV, μ l			EF, %		
	ベースライン	梗塞後	Δ EDV, %	ベースライン	梗塞後	Δ ESV, %	ベースライン	梗塞後	Δ EF, %
生理的食塩水	68.4 \pm 3.4	76.8 \pm 3.5	13.9 \pm 6.9	39.7 \pm 3.5	46.4 \pm 3.1	22.8 \pm 12.3	42.6 \pm 2.1	39.9 \pm 2.2	-3.8 \pm 9.2
OPN301	70.05 \pm 3.09	68.2 \pm 2.5	-1.9 \pm 4.2 [†]	38.0 \pm 2.5	33.7 \pm 2.5	-10.9 \pm 5.0 [†]	45.8 \pm 2.4	51.0 \pm 2.1	12.6 \pm 5.0 [†]
IgG									
アイソタイプ	59.97 \pm 5.9	72.1 \pm 6.1	22.4 \pm 9.8 ^{NS}	27.9 \pm 4.6	38.7 \pm 6.4	43.0 \pm 21.4 ^{NS}	55.0 \pm 3.9	48.3 \pm 6.2	-13.1 \pm 7.3 ^{NS}
偽	63.4 \pm 3.9	63.0 \pm 3.5	0.6 \pm 5.5	29.6 \pm 2.2	29.6 \pm 3.3	2.0 \pm 11.8	53.6 \pm 1.2	54.0 \pm 2.8	1.0 \pm 5.3

機能転帰は生理的食塩水処置と比較した。[†] $p < 0.05$;

生理的食塩水処置と比較した有意差 ;

NS: 生理的食塩水処置と比較した有意差なし

【 0 2 3 6 】

(実施例 3 ブタ血液試料における T L R 2 活性の阻害)

ブタ血液試料を、室温で保存されている試料を用いて、ヘパリン化したチューブに与える ($n = 4 \sim 5$)。T L R 2 機能を拮抗する O P N - 3 0 1 モノクローナル抗体の阻害可能性を決定する。T L R - 2 / T L R - 4 阻害ペプチドおよび T L R - 4 阻害ペプチドをまた、精製されたブタ P B M C の誘導後に、定義した T L R 作動薬を用いて評価する。

【 0 2 3 7 】

(実験プロトコル)

ブタ P B M C を、マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 (1 0 0 0 - 0 . 0 1 n g / m g) または T L R 阻害ペプチドの投薬量の存在下または非存在下において、T L R - 2 作動薬 P a m 3 C S K 4 および F S L - 1 または T L R - 4 作動薬 L P S で誘導する。細胞を 6 時間および 2 4 時間誘導し、T N F - の存在について上清を試験した。

【 0 2 3 8 】

有意差は、ブタの種の間で存在できる。すなわち、血栓症研究において、ミニブタは、マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 に対して応答することはできないが、他の種のブタはすることができる。

【 0 2 3 9 】

マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 は、ラットまたはアカゲザル由来の P B M C において T L R 2 リガンドによって誘導された T N F 産生の阻害をほとんどまたは全く示さなかった。しかしながら、カニクイザル P B M C の結果は、第 1 の研究で実施した参照と食い違ったので、さらなる研究をカニクイザルで実施した。

【 0 2 4 0 】

これらのさらなる研究により、マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 が、(F A C S 分析によって) カニクイザル単球上の T L R 2 に結合し、T L R 2 の不十分な発現がサルのリンパ球で観測されたことが示された。さらに、T L R 2 リガンドによって誘導される T N F - 産生の阻害が、2 0 0 0 n g / m l までの濃度でカニクイザルの P B M C で非常にわずかだけ観測されたか、またはほとんど観測されなかった。従って、むしろ、カニクイザルにおいてマウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 の弱い交差反応性があるように見え、この種由来の P B M C の効力検定において見られる低い活性は、ヒトおよびマウスでの調製物に比べて、非常に低い生物学的活性を示す。

【 0 2 4 1 】

マウスは安全な研究を実施するための通常の種ではないため、マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 は、監督機関を満たすために十分な広範囲の毒性プログラムを必要とする。ブタの虚血などの急性疾患および安全試験は、類似の臓器部位および代謝に起因

10

20

30

40

50

するヒトの状態により関連する。従って、本実験は、マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 が、ブタモデルの虚血再灌流障害および可能性のある将来の毒性研究の使用に適切な治療剤であることを立証する。

【 0 2 4 2 】

(実施例 4 ウサギにおける T L R 2 活性の阻害)

ウサギ P B M C を、マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 (1 0 0 0 ~ 0 . 0 1 n g / m l) または T L R 阻害ペプチドの用量範囲の存在下または非存在下において、T L R - 2 拮抗薬 P a m 3 C S K 4 および F S L - 1 または T L R - 4 作動薬 L P S で誘導する。細胞を 6 時間および 2 4 時間誘導し、上清を T N F - の存在について試験した。

10

【 0 2 4 3 】

この実験により、マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 が、ウサギモデルの動脈形成における使用に適切な治療剤であるか否かを立証する。

【 0 2 4 4 】

マウスをこれらの研究に使用したが、ウサギが、ヒトの疾患状態についてより関連したモデルとみなされる。しかしながら、ウサギの動脈形成を実施するために、抗体またはペプチドは、T L R 作動薬によって媒介されるウサギ P B M C 由来の炎症応答を生体外で阻害できることを示されなければならない。

【 0 2 4 5 】

(実施例 5 - 虚血マウスの機構研究)

以前の実験により、マウス虚血再灌流障害におけるマウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 の治療効果が示された。マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 の作用機構をより完全に決定する研究は有益である。マウスで実施した以前の虚血研究と同様のプロトコルを使用するが、免疫組織化学、炎症、好中球、サイトカイン、アポトーシスおよびマトリクスターンオーバーなどの他のパラメーターを試験する。

20

【 0 2 4 6 】

この実験により、免疫系で治療的マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 の作用機構が立証される。さらに、薬物投与の最適経路を確立するキメラマウス研究を使用する。抗体 / ペプチドが、血液 (湿潤単球など) 中、または心臓上皮細胞上の免疫細胞で作用することにより、それらの治療効果を有するか否かを立証するために、野生型由来の血液を有する T L R 2 ノックアウトマウスを、野生型の心臓を有する T L R 2 ノックアウトマウスと比較する。これらの研究の結果は、本発明の治療化合物の投与の静脈内 (i . v .) が、冠動脈内経路のいずれかが最適であることを決定する。

30

【 0 2 4 7 】

(実施例 6 二重介入研究)

虚血再灌流を、T L R - 2 と T L R 4 阻害剤との組み合わせを用いて評価する。これは、マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 が、この動物モデルにおいて機能を示すことを与えるブタで実施する。以前に実施した研究により、心臓虚血炎症応答における T L R 4 の役割が明確に示されている。マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 で実施した以前の研究が、T L R 2 を阻害する治療効果を示すため、併用治療アプローチはさらに有益であり得る。

40

【 0 2 4 8 】

(実施例 7 アテローム性動脈硬化に対する T L R - 2 阻害の効果)

実験は、マウス I g G 1 抗 T L R 2 抗体 O P N - 3 0 1 が特定のマウスモデル (A p o E - / - 腱板モデル) において治療効果を有するか否かを評価する。動脈硬化性プラーク形成の内在する一連のイベントにおける最初の工程の 1 つは、血管損傷部位への単球のリクルートメントである。T L R ファミリーの 1 0 個のメンバーのうち、T L R 1、T L R 2、および T L R 4 の発現は、ヒト動脈硬化性プラークにおいて著しく向上する。最近、T L R 4 および T L R 2 のライゲーションは、マウスの動脈において内膜新生を促進することが観測されている。さらに、向上した T L R 2 発現は、プラークを不安定化すること

50

が示されている。従って、この実験は、プラークサイズおよび形成を減少する際のOPN-301およびTLR阻害ペプチドの治療可能性を試験し、アテローム性動脈硬化のマウスモデルにおけるプラーク安定性を評価する。

【0249】

(実施例8 TLR2拮抗化合物でコーティングしたステント)

ステント挿入後、炎症応答は、典型的に、ステント-ステントを移植された被験体の免疫系によって開始される。典型的に、動脈閉塞は、この炎症免疫応答の結果として生じる。これらの実験は、ステントがマウスIgG1抗TLR2抗体OPN-301または類いのTLR阻害ペプチドでコーティングされる新規の処置計画の治療可能性を試験する。このアプローチの利点は、炎症の局所部位に非常に高い局所性を与え、内膜新生を防止し、さらなる下流の他のプラークを安定化する可能性がある。

10

【0250】

(実施例9 梗塞面積に対する抗TLR2モノクローナル抗体での処置の効果)

この実施例は、抗TLR2モノクローナル抗体OPN-301が、マウスにおける梗塞面積を減少させるのに効果的である機構を考える。この実験は、炎症のためのマーカー、アポトーシスの範囲および生存経路の活性化を考える。

【0251】

キメラマウス実験は、局所または全身Toll様受容体阻害が、梗塞面積を減少するのにより効果的であるか否かを評価する。マウスの対照および実験群を、再灌流の1、24および72時間後、上記の目的のために評価する。最後に、処置の前および28日後に心臓機能を評価する。

20

【0252】

Toll様受容体2(TLR2)に対する実験的モノクローナル抗体は、虚血の30分後、続く、再灌流の24時間後、マウスにおける梗塞面積を著しく減少させる。Toll様受容体は、活性化の際の炎症カスケード; サイトカインおよび他の炎症性化学的誘因因子の放出、好中球およびマクロファージの活性化を開始する。TLRと生存経路PI3K/Aktとの間のクロストーク(cross-talk)も記載されている。

【0253】

Toll様受容体は、循環(炎症)および常在(臓器特異的)細胞の両方で発現されるため、それらは、依然として扱われるべきI/R障害における有害作用に関与する。この問題はまた、臨床的展望から重要である。なぜなら、Toll様受容体阻害は、全身および局所的に生じ得るからである。抗TLR2OPN-301の全身投与は、循環および常在細胞を阻害するが、十分な化合物を必要とする。モノクローナル抗体の局所(すなわち、冠動脈内)注射は、主に、冠動脈内皮細胞および心筋細胞上のTLRを阻害し、より少ない化合物を必要とする。

30

【0254】

この研究の目的は、OPN-301投与を用いた梗塞面積減少の内在プロセスを明確にすることである。対照および実験群は、炎症活性、アポトーシスおよび生存経路活性の差異について研究されている。マウスの心臓は、時間依存性生化学プロセスを研究するために、2つの時点で免疫組織化学およびサイトカイン分析のために移植される。キメラマウス実験は、心筋再灌流障害に対して実質または循環細胞によるTLR2発現の相対的寄与を扱う。さらに、本発明者らは、磁気共鳴画像法(MRI)技術を用いた抗TLRモノクローナル抗体OPN-301処置の心臓機能に対する効果を扱う。

40

【0255】

(材料および方法)

1群あたり6匹のマウスの群に、再灌流の5分前に尾静脈を介して10mg/kgのアイソタイプ対照または実験的抗TLR2OPN-301モノクローナル抗体(mAb)を投与した。

【0256】

処置群は以下のとおりであった:

50

群	処置
1. ビヒクル対照	P B S
2. 実験的 m A b	1 0 m g / k g O P N 3 0 1
3. 陰性対照	1 0 m g / k g I g G アイソタイプ
4. 偽処置	P B S
5. キメラ合成	1 0 m g / k g O P N 3 0 1
6. キメラ心臓	1 0 m g / k g O P N 3 0 1

【0257】

マウスを、免疫組織化学、サイトカインおよびケモカイン分析のために再灌流の1、24および72時間後、屠殺した。心臓機能を、生理的食塩水処置、OPN-301抗TLRモノクローナル抗体処置および偽処置したマウスで心筋虚血/再灌流障害の前後に評価する。

10

【0258】

(マウスにおける虚血再灌流の手順)

C57/BL6マウス(25~30g)を、30分の心筋虚血、および24時間の再灌流または偽処置に供した。簡単に、マウスを、フェンタニル-ドルミカム-メドトミジン(Fentanyl-Dormicum-Domitro)(上述)の混合物で麻酔した。麻酔を維持するために必要な場合、さらなる用量を与えた。マウスをインキュベートし、100%の酸素を通気した。虚血を、通常配置される左心房の頂部から1mmのLCAの上に配置されたPE-10チューブの一部で、8~0絹縫合系を用いて左冠静脈(LCA)を結紮することにより達成した。30分間の閉塞後、再灌流を、結紮をほどき、PE-10チューブを除去することにより、開始した。偽処置したマウスにおいて、絹縫合系を、LCAを結紮せずに配置した。

20

【0259】

マウスを、1時間の再灌流期間の間、麻酔下に維持した。その後、心臓を移植し、生理的食塩水で迅速にリンスした。心臓を、梗塞面積にわたって半分に切断した：半分の一方は、免疫組織化学分析のためにパラフィンで包埋した。半分のもう一方の梗塞面積および隔離面積を、再び分離して、タンパク質/RNA/cDNA単離のために液体窒素に保存した。

【0260】

24および72時間、生存しているマウスにおいて、結紮をほどいた後に胸壁を閉じ、その動物を抜管し、体温を、37のウォームプレートの使用により維持した。上述の停止手順を、生存の24および72時間後、これらの動物で繰り返した。

30

【0261】

(免疫組織化学分析)

免疫組織化学分析のために、心臓を、一晚、4%のホルモル生理的食塩水で固定し、パラフィンで包埋した。4μmの断片を切断し、障害の形態および証拠を評価するために、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。免疫組織学染色は、抗マウスMAC-3(#550292, Pharmingen, クローンM3/84, ラット抗マウスIgG1)、CD45抗体(#550539, Pharmingen, クローン30-F11, ラット抗マウスIgG2b)および好中球特異的マーカーGR-1(#Ab34345, Abcam, クローン7/4, ラット抗マウスIgG2a)を含んだ。適切な単独型二次抗体を、陽性結合を検出するために使用した。一次抗体の特異性を、種およびアイソタイプを適合した抗体を用いることにより調べた。

40

【0262】

核酸化ストレスを、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン(8-OHdG)、DNAに対する酸化ストレスの産物に特異的な免疫染色を用いて評価した。組織断片を、30分間、10%の正常ウマ血清、4で一晩、0.1%のPBSA中のマウス抗8-OHdG(OXISインターネット、Foster City, CA, USA)1:20、1時間、ビオチン標識したウマ抗マウス(Vector Lab., Burlingame

50

、CA, USA) 1:500、および1時間、ストレプトアビジン - HRPO 1:1000とともにインキュベートした。最後に、断片を10分間、H₂O₂ - ジアミンベンジジンとともにインキュベートした。8-OHdG陽性核の量を、200倍の倍率でデジタル画像顕微鏡ソフトウェア(Olympus, Munster, Germany)を用いて1つの断片につき4つのランダムに選択した領域で定量化した。

【0263】

(サイトカイン分析)

TNF- α 、IL-1 β /6/8、ICAM-1およびVCAM-1についての重要なバイオマーカーの発現を、qRT-PCRによって測定した。他の関連する分析は、マクロファージ炎症性タンパク質(MIP)、単球走化性タンパク質(MCP)-1、および生存経路タンパク質(例えば、MAPK、PI3K/Akt)のリン酸化反応の評価を含んだ。

10

【0264】

全RNAを、製造業者の指示書に従ってTripure試薬(Roche)を用いて梗塞および隔離心筋から抽出し、cDNAに変換し、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)に供した。TNF α 、ICAMおよびVCAMを、Superarray Bioscience Corporation製のプライマーを用いてmRNAレベルで決定した。MCP-1、インターロイキンおよびMIPを、市販のサイトフローミックス(cytoflowmix)多重アレイ(Bender MedSystems)を用いてタンパク質レベルで(Tripure単離、Rocheにも続いて)決定した。Aktのリン酸化およびOPN-301モノクローナル抗体での阻害の際のTLR2タンパク質の量を、ウェスタンブロットティングを用いて定量化する。

20

【0265】

(キメラマウス実験)

大腿骨および脛骨を、10%のFCS、100IU/mlのペニシリン、および100 μ g/mlのストレプトマイシン(Invitrogen Corp.)を含む滅菌PBSでフラッシュすることにより、全骨髄を雄性TLR2+/+またはTLR2-/-マウスから回収した。受容体の短期間の生存を確実にするために、雄性TLR2+/+またはTLR2-/-マウス由来の同系脾臓の単細胞の懸濁液を、40 μ mの細胞濾過器を通して10%のFCS、ペニシリン、およびストレプトマイシンを含むPBSにおいて脾臓を破碎することによって得た。雄性TLR2+/+およびTLR2-/-マウスに、ヒトのコンピューター断層撮影において7Gyの1放射線量で致死的な放射線を浴びせた。放射後、滅菌PBS中の5 \times 10⁶のTLR2+/+またはTLR2-/-骨髄細胞および2 \times 10⁵のTLR2+/+またはTLR2-/-の脾臓細胞を、受容体の放射線照射したマウスの尾静脈に注入した。マウスを6週間、マイクロアイソレータケージに維持して、骨髄提供の移植を完了し、その後、心筋I/R障害を誘発させ、梗塞面積を、TTC染色を用いて24時間後に測定した。上記の免疫組織化学分析を用いて病態生理学評価も実施できる。

30

【0266】

(磁気共鳴映像法)

高分解磁気共鳴映像法(MRI, 9.4T, Bruker, Rheinstetten, Germany)による心臓容積および機能の経時的評価を、心筋虚血/再灌流障害の前および28日後に実施した。スライス間の1.0mmの間隔で長軸および短軸の画像を得て、拡張末期容積(EDV)、収縮末期容積(ESV)、1回拍出量(SV)および心拍量(CO)を計算するために使用した。駆出率(EF)を100*(EDV-ESV)/EDVとして計算し、一方、SVはEDVとESVとの間の絶対差である。心拍出量は、1分あたりのSV*平均心拍として計算される1分以内の全容積の拍出量である。全てのMRIデータを、Qmassデジタル画像ソフトウェア(Medis, Leiden, the Netherlands)を用いて解析した。

40

【0267】

50

(結果)

Windows (登録商標) v15.0用のSPSSソフトウェアパッケージを用いることによってデータを解析し、統計的分析を実施した。

【0268】

(i) 梗塞後のMRI心臓機能

ベースラインでの差は存在しない。梗塞の28日後、OPN-301で処置したマウスにおいて、拡張末期容積および収縮末期容積(EDV、ESV)は小さく、1回拍出量(SV)および駆出率(EF)は大きいため、OPN-301抗TLR2モノクローナル抗体で処置したマウスの心臓機能は、生理的食塩水処置に比べて良好である。左心室(左心室重量)は群の間で異ならなかった(それは良い状態である、なぜなら、他の向上した機能はより大きな心臓によって引き起こされ得るからである)。

10

【0269】

しかしながら、偽群は分析から排除した。なぜなら、ベースラインにおいて、それらは他の群と比べて非常に異なっていたからである。それは生物学的変化によって説明できない。本発明者らは、計算の誤差またはマウスの異なるバッチ/バックグラウンドがこのことに関与し得ると考えている。本発明者らは、偽処置について新しいバッチのC57BI6Jマウスの誤差または単に順序を調べる。

【0270】

【表 7】

表 7 一群統計値：

処置	N	平均	標準偏差	標準誤差
				平均
EDV 生理的食塩水	8	68,405	9,6401	3,4083
EDV mAb	8	70,049	8,7510	3,0940
ESV 生理的食塩水	8	39,714	9,9343	3,5123
ESV mAb	8	38,020	7,0095	2,4782
SV 生理的食塩水	8	28,690	1,9269	,6813
SV mAb	8	32,028	5,7211	2,0227
EF 生理的食塩水	8	42,618	6,0618	2,1432
EF mAb	8	45,828	6,8354	2,4167
LV 重量 生理的食塩水	8	73,909	9,2857	3,2830
LV 重量 mAb	8	69,253	6,1860	2,1871
EDV28 生理的食塩水	8	76,801	9,9619	3,5221
EDV28 mAb	8	68,158	7,0632	2,4972
ESV28 生理的食塩水	8	46,360	8,7689	3,1003
ESV28 mAb	8	33,720	7,1595	2,5312
SV28 生理的食塩水	8	30,440	4,6195	1,6332
SV28 mAb	8	34,440	1,2395	,4382
EF28 生理的食塩水	8	39,893	6,1642	2,1794
EF28 mAb	8	51,035	5,9714	2,1112
LV 重量 28 生理的食塩水	8	79,123	9,9238	3,5086
LV 重量 28 mAb	8	75,975	6,4139	2,2676

10

20

30

40

【表 8】

表 8 (独立試料試験)

	レビンの 等分散性検定		平均等価性 t 検定 (t-test for Equality of Means)							
	F	有意性	t	df	有意性 (両側)	平均差	標準誤差	差異の 95%信頼区間		
								下限	上限	
EDV28	仮定した 等分散性	2,129	,167	2,002	14	,065	8,6438	4,3175	-6,165	17,904 0
	仮定していない 等分散性			2,002	12,618	,067	8,6438	4,3175	-7,125	18,000 0
ESV28	仮定した 等分散性	1,929	,187	3,158	14	,007	12,640 0	4,0024	4,0558	21,224 2
	仮定していない 等分散性			3,158	13,461	,007	12,640 0	4,0024	4,0234	21,256 6
SV28	仮定した 等分散性	5,682	,032	-2,365	14	,033	- 4,0000	1,6910	-7,6268	-3,732
	仮定していない 等分散性			-2,365	8,003	,046	- 4,0000	1,6910	-7,8992	-1,1008
EF28	仮定した 等分散性	,037	,851	-3,672	14	,003	- 11,142 5	3,0343	17,650 4	-4,6346
	仮定していない 等分散性			-3,672	13,986	,003	- 11,142 5	3,0343	17,651 0	-4,6340
LV重量 s28	仮定した 等分散性	1,597	,227	,753	14	,464	3,1475	4,1776	-5,8126	12,107 6
	仮定していない 等分散性			,753	11,979	,466	3,1475	4,1776	-5,9565	12,251 5

10

20

30

【0272】

(ii) キメラマウス実験の結果

キメラ化は成功したことを示した。1匹のマウスは、非常に低い梗塞のため分析で排除した。梗塞面積の減少を両方の群で観測した。しかしながら、血液中にTLR2を欠くマウスはより大きな減少を示した。TLR2に陽性の循環細胞は、再灌流障害により関与しているように見える。梗塞面積の減少の差は、小さい試料のサイズのため、統計的差異に到達していなかった。

40

【0273】

【表 9】

表 9

	N	平均		標準偏差		標準誤差		平均についての 95%信頼区間		最小限	最大限
		下界	上界	下界	上界	下界	上界	下界	上界	下界	上界
AAR_LV 生理的食塩水	10	40,7550	11,77170	3,72254	32,3340	49,1760	13,93	54,21			
TLR2 KO	10	41,4090	18,11703	5,72911	28,4489	54,3691	21,76	75,09			
血液 KO	7	40,2071	5,82204	2,20052	34,8227	45,5916	32,75	49,18			
臓器 KO	6	43,6033	7,95412	3,24726	35,2560	51,9507	37,05	59,39			
合計	33	41,3548	12,20156	2,12402	37,0284	45,6813	13,93	75,09			
IS_AR 生理的食塩水	10	34,5010	10,28226	3,25153	27,1455	41,8565	20,99	48,26			
TLR2 KO	10	23,0090	9,26069	2,92849	16,3843	29,6337	11,62	38,98			
血液 KO	7	23,6871	9,01528	3,40746	15,3494	32,0249	11,00	39,50			
臓器 KO	6	28,2333	5,29739	2,16265	22,6741	33,7926	21,48	36,62			
合計	33	27,5852	9,91828	1,72655	24,0683	31,1020	11,00	48,26			

10

20

【 0 2 7 4 】

【表 10】

表 10 (多重比較)

ダネットt(両側(2-sided))

従属変数	(I) 群	(J) 群	平均差	標準誤差	有意性	95% 信頼区間	
			(I-J)			下界	上界
AAR_LV	TLR2 KO	生理的食塩水	,65400	5,70596	,999	-13,5676	14,8756
	血液 KO	生理的食塩水	-,54786	6,28767	1,000	-16,2193	15,1236
	臓器 KO	生理的食塩水	2,84833	6,58868	,953	-13,5734	19,2700
IS_AR	TLR2 KO	生理的食塩水	-11,49200(*)	4,02692	,022	-21,5287	-1,4553
	血液 KO	生理的食塩水	-10,81386	4,43745	,056	-21,8738	,2461
	臓器 KO	生理的食塩水	-6,26767	4,64988	,419	-17,8571	5,3218

30

40

* 平均差は .05 レベルで有意である。
ダネットt 検定は対照として 1 群を扱い、それに対して全ての他の群を比較する。

50

【0275】

表9に示す結果を、図10および11にさらに例示する。図10は、左心室のパーセントとしてリスク領域(AAR_LV)を示す。図11は、リスク領域のパーセントとして梗塞面積(IS_AAR)を示す。

【0276】

本明細書で引用した全ての文書は、参照により本明細書に援用される。本発明の記載した実施形態に対する様々な変更およびバリエーションは、本発明の範囲から逸脱せずに当業者に明らかであろう。本発明は特定の好ましい実施形態に関して記載されているが、特許請求される本発明はそのような特定の実施形態に極度に限定されるべきではないことが理解されるべきである。実際に、当業者に明白である本発明を実施する記載される方法の様々な変更は、本発明に含まれると意図されるべきである。

10

【図1】



図1—陽性対照としてp38阻害剤(SB239063)の投与後の心臓の断面。IS=白+薄い赤のように見える領域。AAR=IS+赤の領域。LV=AAR+青の領域。

【図3】



図3—陰性対照としてIgGアイソタイプ抗体の投与後の心臓の断面。IS=白+薄い赤のように見える領域。AAR=IS+赤の領域。LV=AAR+青の領域。

【図2】

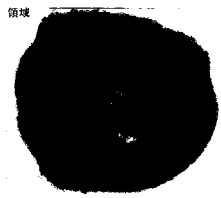


図2—PBSの投与後の心臓の断面。IS=白+薄い赤のように見える領域。AAR=IS+赤の領域。LV=AAR+青の領域。

【図4】

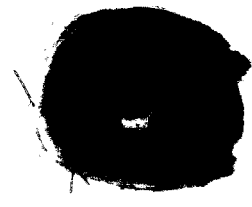


図4—実験的OPN301抗TLR2モノクローナル抗体の投与後の心臓の断面。IS=白+薄い赤のように見える領域。AAR=IS+赤の領域。LV=AAR+青の領域。

【 図 5 】

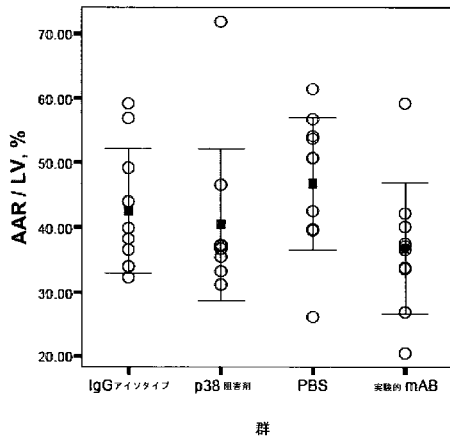


図5-全左心室のパーセントとしてのリスク領域 (AAR)。エラーバーは平均±1.0SDを示す。

【 図 6 】

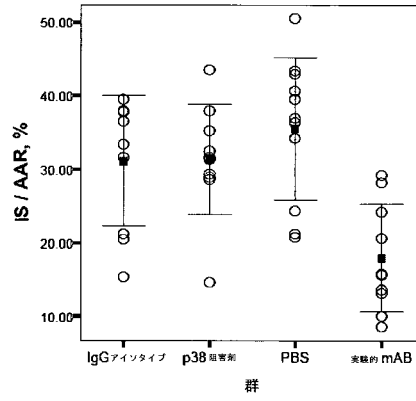


図6-リスク領域のパーセントとしての梗塞面積。エラーバーは平均±1.0SDを示す。

【 図 7 】

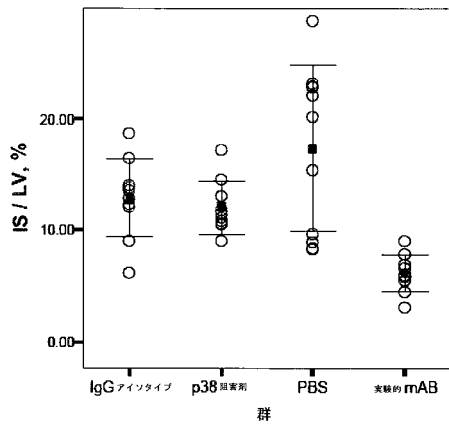


図7-全左心室 (LV) のパーセントとしての梗塞面積。エラーバーは平均±1.0SDを示す。

【 図 8 】

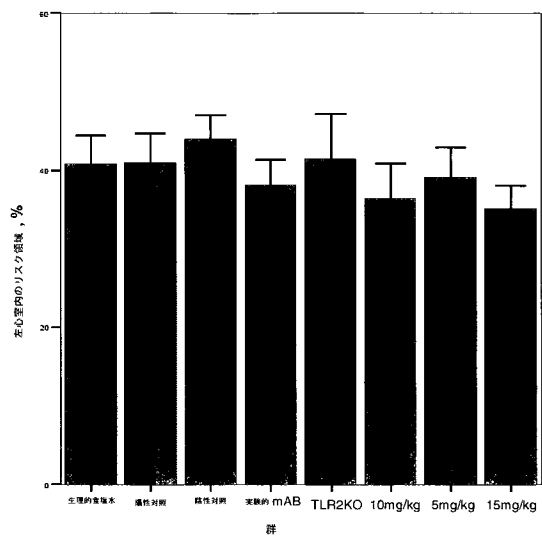


図8-左心室のパーセントとしてのリスク領域

【 図 9 】

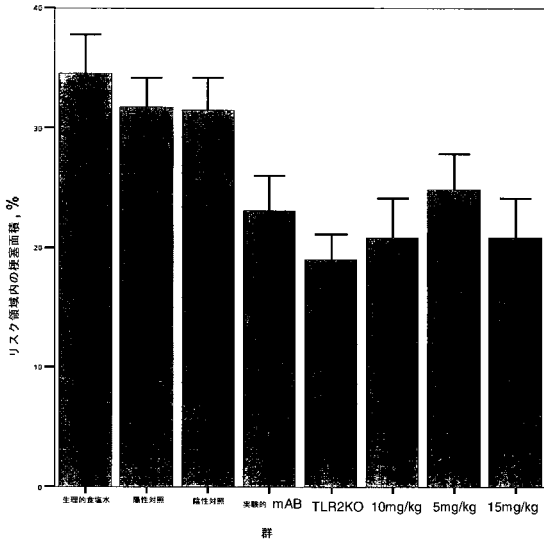


図9-リスク領域のパーセントとしての横断面積

【 図 10 】

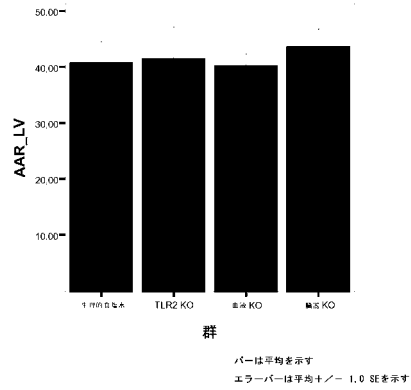


図 10. 左心室のパーセントとしてのリスク領域

【 図 1 1 】

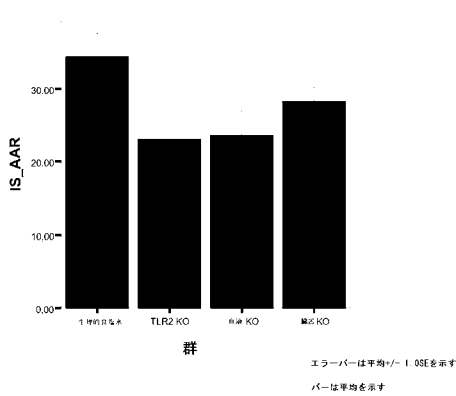


図 11. リスク領域のパーセントとしての横断面積

【 図 1 2 】

```

1  mphtlmwv  lgviiislske  essnqasls  dngickgss  gslnsipsgl  teavksldls
61  nnrityisn  dlqrcvnlg  lvtlsgint  ieedfsslg  slehldlsyn  ylnslsswf
121  kpssltfln  llgnpyktlg  etslfshltk  lqilrvgnmd  tftkiqrkdf  agltfleele
181  idasdlqsy  e pksklsiqnv  shllhmkqh  illleifv  dv tssveclelr  dtdldtfnfs
241  elstgetnsl  ikkftfrnvk  itdeslfqvm  klnqisqll  elefddctln  gvgnfrasn
301  drvidpgkve  tltirrlhip  rfylfydlst  lysltervkr  itvenskvfl  vpcllsqhkl
361  sleylldsen  lmveeylkn  s acedawpslq  tlilrqnhla  slektgetll  tlknltnidi
421  sknsfshampe  tqwpekmky  lnlststrihs  vtgcipktle  ildvsnnln  lfslnlpqk
481  elyisrnklm  tlpdasllpm  llvlklsrna  ittfskeql  d shtlktlea  ggnfnfcsce
541  flsftqeqqa  lakvlidwpa  nylcdspshv  rgqqvqdvrl  svsechrtal  vsgmccalfi
601  lilltgvlch  rfhglwymkm  mwawlgakrk  prkapsrnic  ydafvsyser  daywvenlmv
661  qelenfnppf  klclhkrdfi  pgkwiidnii  dsiekshktv  fvlsenfvks  ewckyeldfs
721  hfrlfeennd  aailillepi  ekkaipqrfo  klrkimntkt  ylewpmdeaq  regfvwnlra
781  aiks

```

図 12. ヒト Toll 様受容体 2 のアミノ酸配列 (配列番号 1)

【 図 1 3 】

```

1 mlralwifwi lvaitvlfsk rcsaqeslsc dasgvcdgrs rsftsipsqgl taamksldls
61 fnkityigghg dlracanlqv lmkssrint iegdafyslg slehldlsdn hlsalssswf
121 gpsslkyn lmgnpqyqlg vtslfpnltn lqtlrignve tfseirridf agltslnele
181 ikalslrnyq sqslksirdi bhltlhlses aflleifadi lssvrylelr dtnlarfqfs
241 plpvdvsssp mkklafrgsv ltdesfnell kllryilels evefddctln glgdfnpses
301 dvvselgkve tvtirrlhip qfylfydlst vysllekvkr itvenskvfl vpcsfsglkk
361 slefldisen lmveeylkns ackgawpslq tivlsqnhlr smqktgeill tiknltsldi
421 srntfhpmpd scqwpkrmf lnlsstgirv vktcipqtle vldvsnnld sfsflprlq
481 elyisrnklk tlpdaslfpv llvmkirena vstfksdqlg sfpkletlea gdnhfvcsee
541 llsftmetpa laqilvdvdpd sylcdsprrl hghrlqdarp svlechqaal vsqvcalll
601 lillvgalch fhfglwylm mwawlqakrk pkkapcrdvc ydafvsyseq dshwvenlmv
661 qqlensdppf klclhkrdfv pgkwiidnii dsiekshktv fvlsenfvrs ewckyeldfs
721 hfrfdendnd aailvllepi erkaipqrfc klrkimntkt ylewpidegq qevfvwnlrt
781 aiks

```

図 13. マウス T o I I 様受容体 2 のアミノ酸配列 (配列番号 2)

【 図 1 4 】

```

mphtlwmwvvlqviislskeessnqalscdnrngickgssgslnsips
glteavksldlsmnrityisnsdlqrcvnlqalvltengintieedf
sslgslehlldlsynylsnlssswfkplssltflnlgnpyktlgetsl
fshltklqlrvgnmdtftkikrkdffagltfleeleidasdlqsyepk
slksiqnvshlilhmkgqhillleifvdtvssveclerdtldlthfhs
elstgetnslkkftfrnvkitdeslfqvmklnqiegllleleddct
lmgvgnfrasnrdndrvidpgkvetlitirrlhiprfylfydlstlyslte
rvkritvenskvflvpcllsqhlksleyldlisenlmveeylknsaced
awpslqtlilrqnhaslektgetlltknltndisknsfhmpetc
qwpekmkylnlssstrihsvtgcipktleildvsnnlnlfnlnlpqlk
elyisrnklmtpdasllpmlvlvkisrnaittfskeqldsftlktl
eaggannficsceflsftqeqqalakovlidwpanylcdspshvrgqqvq
dvrlsvsech

```

図 14. ヒト TLR2 の細胞外ドメイン (配列番号 3)

【 図 1 6 】



図 16 - PBS の投与後の心臓の断面

【 図 1 5 】

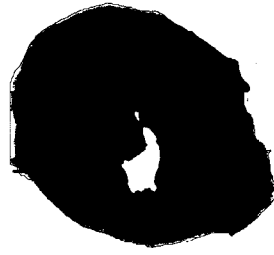


図 15 - 陽性対照として p38 阻害剤 (SB239063) の投与後の心臓の断面

【 図 1 7 】



図 17 - 陰性対照として I g G アイソタイプの抗体の投与後の心臓の断面

【 図 1 8 】

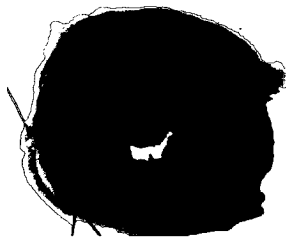


図 1 8 - 実験的 OPN301 抗 TLR2 モノクローナル抗体の投与後の心臓の断面

【 図 1 9 】

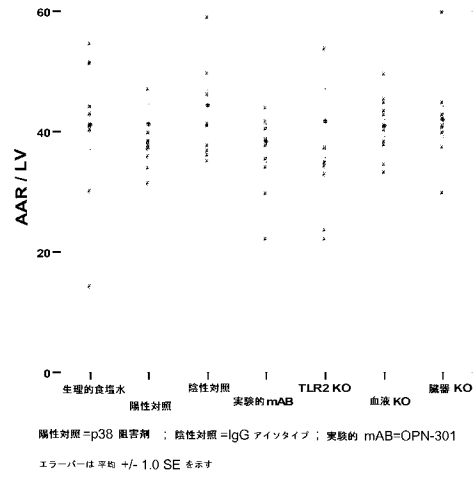
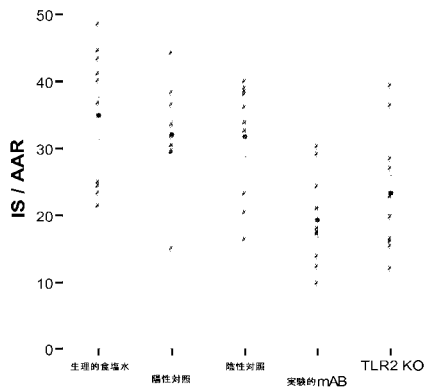


図 1 9 - 全左心室のパーセントとしてのリスク領域 (AAR) エラーバーは平均 \pm 1.0 SD を示す

【 図 2 0 】



陽性対照 = p38 阻害剤; 陰性対照 = IgG アイソタイプ; 実験的 mAB = OPN-301
エラーバーは平均 \pm 1.0 SE を示す

図 2 0 - リスク領域のパーセントとしての梗塞面積 エラーバーは平均 \pm 1.0 SD を示す

【 図 2 1 】

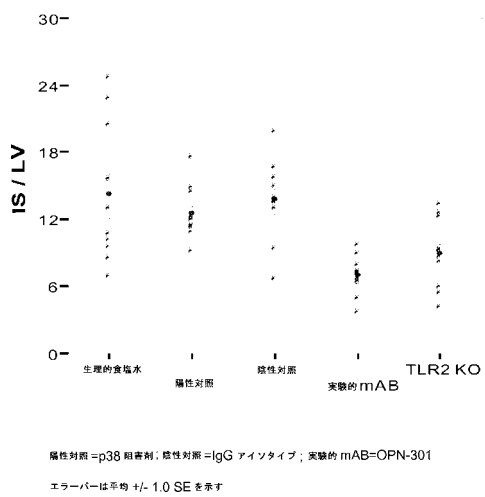


図 2 1 - 全左心室 (LV) のパーセントとしての梗塞面積 エラーバーは平均 \pm 1.0 SD を示す

【 図 2 2 】

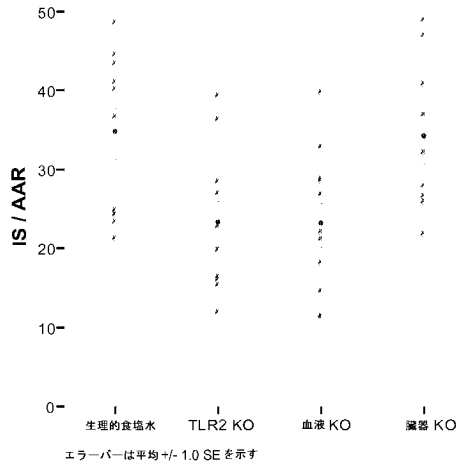


図 2 2 . キメラマウスにおけるリスク領域のパーセントとしての梗塞面積

【 図 2 3 】

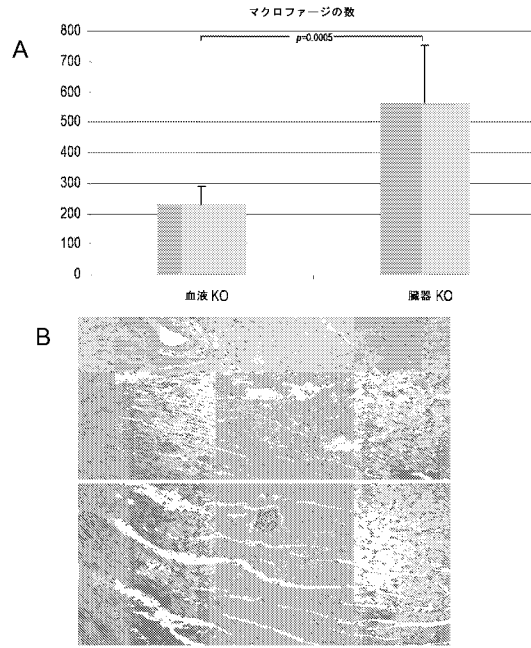


図 2 3 : 30 分の虚血後、続く、24 時間の再灌流後の血液 KO および臓器 KO キメラマウス由来の心臓断片におけるマクロファージの数

【 図 2 4 】

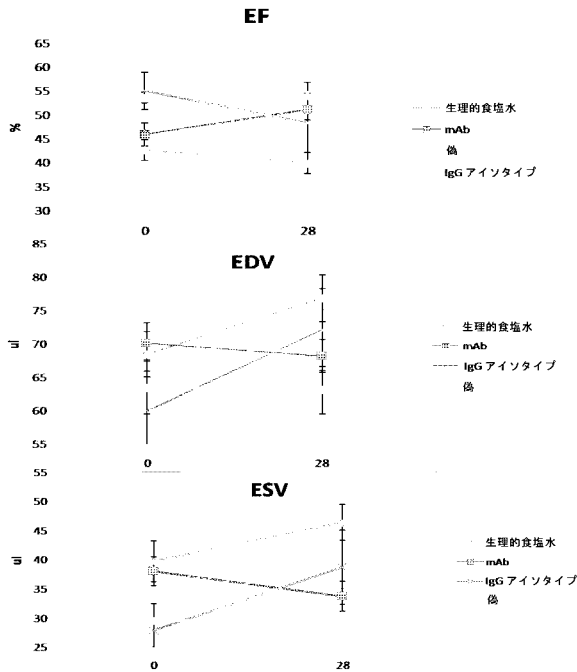


図 24 : ベースライン (t=0) および梗塞後 (t=28) の心臓機能および形状

【配列表】

2010535707000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2008/060249

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61K38/17 A61P39/00	A61K31/00 A61P41/00	A61K39/395 A61P9/10
C12N15/11	C12Q1/00	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P C12N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2009/004094 A (OPSONA THERAPEUTICS LTD [IE]; HEFFERNAN MARK [IE]; O'NEILL LUKE [IE];) 8 January 2009 (2009-01-08) see claims 1-37, page 20 last paragraph, examples 2-3	1-17, 19-30, 34-50, 53-59, 65-81, 85-95,99
X	WO 2005/039504 A (EISAI CO LTD [JP]; CHOW JESSE [US]; GUSOVSKY FABIAN [US]; HAWKINS LYNN) 6 May 2005 (2005-05-06)	99
Y	see claims 37-39	1-17, 19-30, 34-50, 53-59, 65-81, 85-95
----- /-----		
<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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered 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 10 August 2009		Date of mailing of the international search report 14/12/2009
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) 340-3018		Authorized officer Merckling-Ruiz, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/060249

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/028509 A (UNIV MUENCHEN TECH [DE]; KIRSCHNING CARSTEN JUERGEN [DE]; MENG GUANGXU) 31 March 2005 (2005-03-31)	99
Y	see claims 1-23	1-17, 19-30, 34-50, 53-59, 65-81, 85-95,99
Y	LEEMANS JAKLIEN C ET AL: "Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, US, vol. 115, no. 10, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 2894-2903, XP002502398 ISSN: 0021-9738 see abstract and page 2900 left col.	1-17, 19-30, 34-50, 53-59, 65-81, 85-95,99
Y	SAKATA Y. ET AL.: "Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury." AM. J. PHYSIOL. HEART CIRC. PHYSIOL., vol. 292, 15 September 2006 (2006-09-15), pages H503-H509, XP002540619 see abstract	1-17, 19-30, 34-50, 53-59, 65-81, 85-95,99
A	MENG G ET AL: "Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, US, vol. 113, no. 10, 1 May 2004 (2004-05-01), pages 1473-1481, XP002317655 ISSN: 0021-9738 abstract	1-17, 19-30, 34-50, 53-59, 65-81, 85-95,99

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/060249**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.:

see annex

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/EP2008 /060249

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims:

1-8(part),9-13,14-17(part),19-21(part),
22-30,36-50(part),53-59(part
) ,65-66,67-73(part),74-77,78-81,
85-87(part),88-94,95(part),99(part)

Use of a TLR-2 antagonist for treating/preventing
ischemia-reperfusion injury, wherein the antagonist is an
antibody ; method of screening for such antagonists

2. claims:

1-8(part),14-17(part),19-21(part),31-33,
36-50(part),51,53-59(part),
60-62,67-73(part),78-81(part),83-84,
85-87(part),95(part),97-98,99(p
art)

Use of a TLR-2 antagonist for treating/preventing
ischemia-reperfusion injury, wherein the antagonist is a
protein or peptide ; method of screening for such
antagonists

3. claims:

1-8(part),14-17(part),18,19-21(part),
34-35,36-50(part),52,53-59(par
t),63-64,67-73(part),78-81(part),82,
85-87(part),96,99(part)

Use of a TLR-2 antagonist for treating/preventing
ischemia-reperfusion injury, wherein the antagonist is a
nucleic acid ; method of screening for such antagonists

4. claims: 1-8,14-17,19-21,36-50,53-59,67-73,78-81,85-87,95,99 (all partially)

Use of a TLR-2 antagonist for treating/preventing
ischemia-reperfusion injury, wherein the antagonist is a
carbohydrate ; method of screening for such antagonists

5. claims: 1-8,14-17,19-21,36-50,53-59,67-73,78-81,85-87,95,99 (all partially)

Use of a TLR-2 antagonist for treating/preventing
ischemia-reperfusion injury, wherein the antagonist is a
lipid ; method of screening for such antagonists

6. claims: 1-8,14-17,19-21,36-50,53-59,67-73,78-81,85-87,95,99 (all

International Application No. PCT/EP2008 /060249

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

partially)

Use of a TLR-2 antagonist for treating/preventing
ischemia-reperfusion injury, wherein the antagonist is a
small molecule compound ; method of screening for such
antagonists

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/060249

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009004094	A	08-01-2009	NONE	
WO 2005039504	A	06-05-2005	EP 1697389 A2 JP 2007514648 T	06-09-2006 07-06-2007
WO 2005028509	A	31-03-2005	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 3
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/15	Z
	C 0 7 K 16/28	

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

- (72)発明者 ヘファーナン マーク
 アイルランド国 セント ジェームズ ホスピタル トリニティ センター フォー ヘルス サ
 イエンスズ インスティテュート オブ モレキュラー メディシン ファースト フロアー ル
 ーム 2 . 1 3 オブソナ セラピューティクス内
- (72)発明者 オニール ルーク
 アイルランド国 セント ジェームズ ホスピタル トリニティ センター フォー ヘルス サ
 イエンスズ インスティテュート オブ モレキュラー メディシン ファースト フロアー ル
 ーム 2 . 1 3 オブソナ セラピューティクス内
- (72)発明者 マッカーリク ピーター
 アイルランド国 セント ジェームズ ホスピタル トリニティ センター フォー ヘルス サ
 イエンスズ インスティテュート オブ モレキュラー メディシン ファースト フロアー ル
 ーム 2 . 1 3 オブソナ セラピューティクス内
- (72)発明者 キーオ ブライアン
 アイルランド国 セント ジェームズ ホスピタル トリニティ センター フォー ヘルス サ
 イエンスズ インスティテュート オブ モレキュラー メディシン ファースト フロアー ル
 ーム 2 . 1 3 オブソナ セラピューティクス内
- (72)発明者 ロシエル クリストファー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン レキシントン レキシントン リッジ ドライ
 ブ 3 2 3 4
- (72)発明者 デ クレイジン ドミニク
 オランダ国 ユトレヒト ハイデルベルグラーン 1 0 0 ルーム ジー 0 2 - 5 2 3 ユニヴェ
 ルステア メディッシュ セントリウム ユトレヒト
- (72)発明者 アースラン ファティール

オランダ国 ユトレヒト ハイデルベルグラーン 1 0 0 ルーム ジー 0 2 - 5 2 3 ユニヴェ
ルステア メディッシュ セントリウム ユトレヒト

(72)発明者 パスターカンブ ジェラード

オランダ国 ユトレヒト ハイデルベルグラーン 1 0 0 ルーム ジー 0 2 - 5 2 3 ユニヴェ
ルステア メディッシュ セントリウム ユトレヒト

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA25 AA29 AA34 AA35 BB20 BB22 BB24 DA36 FA11
FA16 FB01 FB02 FB03 FB12 GC12 GC15 JA06
4C084 AA02 AA13 AA17 AA20 BA01 BA22 BA23 MA02 NA14 ZA361
ZA381 ZA401 ZA421 ZA811 ZB082 ZC751
4C085 AA13 AA14 BB33 BB35 BB36 BB37 BB41 CC22 CC23 DD62
EE01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA36 ZA38 ZA40
ZA42 ZA81 ZC75
4H045 BA10 CA40 DA76 EA20

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2010535707A5	公开(公告)日	2011-09-15
申请号	JP2010518699	申请日	2008-08-04
[标]申请(专利权)人(译)	奥普索纳医疗有限公司		
申请(专利权)人(译)	Opusona治疗有限公司		
[标]发明人	ヘファーナンマーク オニールルーク マックーリクピーター キーオブライアン ロシエルクリストファー デクレイジンドミニク アースランファティー パスターカンブジェラード		
发明人	ヘファーナン マーク オニール ルーク マックーリク ピーター キーオ ブライアン ロシエル クリストファー デクレイジン ドミニク アースラン ファティー パスターカンブ ジェラード		
IPC分类号	A61K45/00 A61P43/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P9/04 A61P9/06 A61P13/12 A61K39/395 A61K31/711 A61K38/00 A61K31/7088 A61K31/7105 A61P37/06 A61K48/00 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/15 C07K16/28		
CPC分类号	A61K31/00 A61K31/7088 A61K38/177 A61K45/06 A61P7/02 A61P7/10 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/12 A61P13/12 A61P29/00 A61P37/06 A61P39/00 A61P39/06 A61P41/00 A61P43/00 C07K16/2896 C12N15/1138 G01N33/567 G01N2500/00 A61K2300/00 A61K39/3955 A61K2039/505 C07K16/28 C07K16/2803 C07K2317/76		
FI分类号	A61K45/00.ZNA A61P43/00.111 A61P9/10 A61P9/12 A61P9/04 A61P9/06 A61P13/12 A61K39/395.N A61K31/711 A61K37/02 A61K31/7088 A61K31/7105 A61P37/06 A61P43/00.121 A61P9/10.103 A61K39/395.D A61K48/00 G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/15.Z C07K16/28		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB20 2G045/BB22 2G045 /BB24 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC12 2G045/GC15 2G045/JA06 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084 /BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA361 4C084/ZA381 4C084 /ZA401 4C084/ZA421 4C084/ZA811 4C084/ZB082 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085 /BB33 4C085/BB35 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086 /NA14 4C086/ZA36 4C086/ZA38 4C086/ZA40 4C086/ZA42 4C086/ZA81 4C086/ZC75 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20		
代理人(译)	Seihayashi正幸 和义林		
优先权	20070558 2007-08-03 IE 61/038555 2008-03-21 US		

摘要(译)

本发明提供了用于治疗 and 预防缺血再灌注损伤的化合物和方法。特别地，本发明提供了具有抑制Toll样受体2生物学功能或表达的功能的化合物。