

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2020年10月1日(01.10.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/196453 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01)  
A61P 11/00 (2006.01) C12Q 1/6851 (2018.01)  
A61P 11/02 (2006.01) C12Q 1/686 (2018.01)  
A61P 11/06 (2006.01) C12Q 1/6869 (2018.01)  
A61P 37/08 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)  
A61P 43/00 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)

CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 Chiba (JP).

(72) 発明者: 中山 俊憲 (NAKAYAMA Toshinori); 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院内 Chiba (JP). 熊谷 仁 (KUMAGAI Jin); 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院内 Chiba (JP). 平原 潔 (HIRAHARA Kiyoshi); 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院内 Chiba (JP). 木内 政宏 (KIUCHI Masahiro); 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院内 Chiba (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/012841

(22) 国際出願日: 2020年3月24日(24.03.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

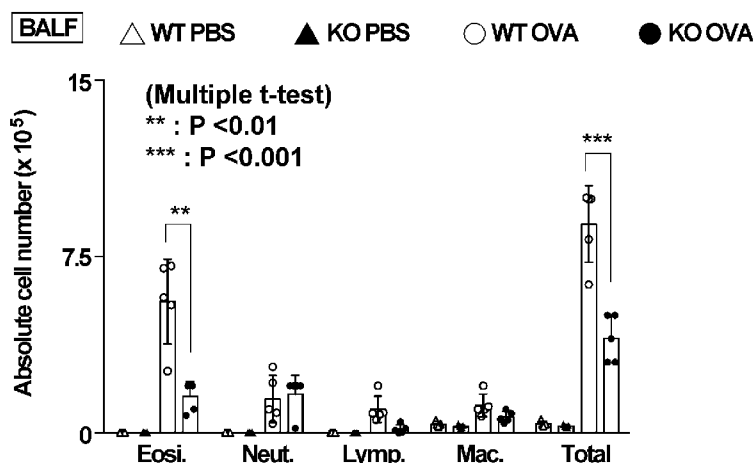
(30) 優先権データ:  
特願 2019-057333 2019年3月25日(25.03.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人千葉大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION

(54) Title: PROPHYLACTIC OR THERAPEUTIC AGENT FOR IL-33-RELATED DISEASES

(54) 発明の名称: IL-33関連疾患の予防又は治療剤

[図2]



(57) Abstract: A prophylactic or therapeutic agent for interleukin (IL)-33-related diseases, which contains a ubiquitin specific peptidase 7 (USP7) inhibitor as an active ingredient.

(57) 要約: Ubiquitin Specific Peptidase 7 (USP7) 阻害剤を有効成分とする、インターロイキン (IL) - 33 関連疾患の予防又は治療剤。

[続葉有]

(74) 代理人: 松沼 泰史, 外(MATSUNUMA Yasushi et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

## 明 細 書

発明の名称： I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、インターロイキン（I L）- 3 3 関連疾患の予防又は治療剤に関する。より具体的には、I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤、I L - 3 3 活性化抑制剤、及び、I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法に関する。本願は、2 0 1 9 年 3 月 2 5 日に、日本に出願された特願 2 0 1 9 - 0 5 7 3 3 3 号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

### 背景技術

[0002] アレルギー性気道炎症は I L - 3 3 関連疾患の一種であり、ヒト疾患では気管支喘息に代表される病態である。気管支喘息の治療剤として、吸入ステロイド薬、 $\beta$  2 受容体刺激薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬、テオフィリン製剤、経口ステロイド薬等が古くから用いられてきた。

[0003] また、近年では、免疫グロブリン E（I g E）を標的としたオマリズマブや、炎症性サイトカインの 1 つである I L - 5 を標的としたメポリズマブ等の生物学的製剤（注射製剤）も難治性喘息患者に対して臨床応用されている。

[0004] これらの従来の気管支喘息治療法では、治療効果が不十分である難治性の患者が一定数存在し、その患者数の割合は最大で約 1 0 % との報告もある。最重症の気管支喘息は、現代においても死に至る可能性のある病であり、難治性患者に対する治療技術の開発が非常に重要である。

[0005] ところで、U b i q u i t i n S p e c i f i c P e p t i d a s e 7（U S P 7）は脱ユビキチン化酵素の一種であり、p 5 3 の E 3 ユビキチンリガーゼである M u r i n e D o u b l e M i n u t e 2（M D M 2）を基質とすることが知られている。特許文献 1 ～ 1 2 及び非特許文献 1 ～ 1 1 には、U S P 7 の活性を特異的に阻害する低分子化合物が記載され

ている。特許文献1～12及び非特許文献1～11は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0006] 特許文献1：米国特許出願公開第2016/272588号明細書  
特許文献2：米国特許出願公開第2016/185785号明細書  
特許文献3：米国特許出願公開第2018/339991号明細書  
特許文献4：米国特許出願公開第2018/162835号明細書  
特許文献5：米国特許出願公開第2018/346480号明細書  
特許文献6：米国特許出願公開第2016/229872号明細書  
特許文献7：米国特許出願公開第2017/088520号明細書  
特許文献8：米国特許出願公開第2014/371247号明細書  
特許文献9：米国特許出願公開第2013/023521号明細書  
特許文献10：米国特許出願公開第2009/181972号明細書  
特許文献11：米国特許出願公開第2009/215786号明細書  
特許文献12：米国特許出願公開第2012/077806号明細書

### 非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Kategaya L, et al, USP7 small-molecule inhibitors interfere with ubiquitin binding., *Nature*, 550 (7677), 534-538, 2017  
非特許文献2：Turnbull A. P., et al., Molecular basis of USP7 inhibition by selective small-molecule inhibitors., *Nature*, 550 (7677), 481-486, 2017  
非特許文献3：Gavory G., et al., Discovery and characterization of highly potent and selective allosteric USP7 inhibitors., *Nat Chem Biol.*, 14 (2), 118-125, 2018  
非特許文献4：Wu J., et al., Chemical Approaches to Intervening in Ubiquitin Specific Protease 7 (USP7) Function for Oncology and Immune Oncology Therapies., *J Med Chem.*, 61 (2), 422-443, 2018

非特許文献5: Tian X., et al., Characterization of selective ubiquitin and ubiquitin-like protease inhibitors using a fluorescence-based multiplex assay format., Assay Drug Dev Technol., 9 (2), 165-173, 2011

非特許文献6: Altun M., et al., Activity-based chemical proteomics accelerates inhibitor development for deubiquitylating enzymes., Chem Biol., 18 (11), 1401-1412, 2011

非特許文献7: Colland F., et al., Small-molecule inhibitor of USP7/HAUSP ubiquitin protease stabilizes and activates p53 in cells., Mol Cancer Ther., 8 (8), 2286-2295, 2009

非特許文献8: Reverdy C., et al., Discovery of specific inhibitors of human USP7/HAUSP deubiquitinating enzyme., Chem Biol., 19 (4), 467-477, 2012

非特許文献9: Weinstock J., et al., Selective Dual Inhibitors of the Cancer-Related Deubiquitylating Proteases USP7 and USP47., ACS Med Chem Lett., 3 (10), 789-792, 2012

非特許文献10: Chen C., et al., Synthesis and biological evaluation of thiazole derivatives as novel USP7 inhibitors., Bioorg Med Chem Lett., 27 (4), 845-849, 2017

非特許文献11: Kemp M., Chapter Three - Recent Advances in the Discovery of Deubiquitinating Enzyme Inhibitors., Progress in Medicinal Chemistry, 55, 149-192, 2016

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] このような背景のもと、本発明は、アレルギー性気道炎症をはじめとするIL-33関連疾患を効果的に予防又は治療する技術を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明は以下の態様を含む。

〔１〕 ＵＳＰ ７ 阻害剤を有効成分とする、インターロイキン（ＩＬ）－３３ 関連疾患の予防又は治療剤。

〔２〕 前記 ＩＬ－３３ 関連疾患が、アレルギー性気道炎症、好酸球性副鼻腔炎又は好酸球性食道炎である、〔１〕に記載の予防又は治療剤。

〔３〕 前記アレルギー性気道炎症が、好酸球性喘息である、〔２〕に記載の予防又は治療剤。

〔４〕 前記 ＵＳＰ ７ 阻害剤が、 ＵＳＰ ７ 遺伝子に対する阻害性核酸である、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の予防又は治療剤。

〔５〕 グランザイムＡ発現抑制剤である、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の予防又は治療剤。

〔６〕 ＩＬ－３３ 活性化抑制剤である、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の予防又は治療剤。

〔７〕 グランザイムＡ阻害剤を有効成分とする、 ＩＬ－３３ 関連疾患の予防又は治療剤。

〔８〕 グランザイムＡ阻害剤を有効成分とする、 ＩＬ－３３ 活性化抑制剤。

〔９〕 被験物質の存在下で ＵＳＰ ７ タンパク質の活性を測定する工程を含み、前記活性が、前記被験物質の非存在下における ＵＳＰ ７ タンパク質の活性と比較して低下したことが、前記被験物質が ＩＬ－３３ 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、 ＩＬ－３３ 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法。

〔１０〕 被験物質の存在下で グランザイムＡタンパク質及び ＩＬ－３３ タンパク質をインキュベートする工程と、切断された前記 ＩＬ－３３ タンパク質を定量する工程と、を含み、切断された前記 ＩＬ－３３ タンパク質の量が前記被験物質の非存在下における切断された前記 ＩＬ－３３ タンパク質の量と比較して減少したことが、前記被験物質が ＩＬ－３３ 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、 ＩＬ－３３ 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法。

〔１１〕 被験物質の存在下で Ｔｈ ２ 細胞を培養する工程と、前記 Ｔｈ ２ 細胞

によるグランザイム A 遺伝子又はタンパク質の発現量を測定する工程と、を含み、前記発現量が、前記被験物質の非存在下におけるグランザイム A 遺伝子又はタンパク質の発現量と比較して低下したことが、前記被験物質が I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法。

[ 1 2 ] 被験物質の存在下で T h 2 細胞を培養する工程と、前記 T h 2 細胞による U S P 7 遺伝子又はタンパク質の発現量を測定する工程と、を含み、前記発現量が、前記被験物質の非存在下における U S P 7 遺伝子又はタンパク質の発現量と比較して低下したことが、前記被験物質が I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法。

[ 1 3 ] 被験物質の存在下で T h 2 細胞を培養する工程と、前記 T h 2 細胞のグランザイム A 遺伝子座におけるユビキチン化されたヒストン H 2 A の量を測定する工程と、を含み、前記ユビキチン化されたヒストン H 2 A の量が、前記被験物質の非存在下におけるユビキチン化されたヒストン H 2 A の量と比較して増加したことが、前記被験物質が I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法。

## 発明の効果

[0010] 本発明によれば、I L - 3 3 関連疾患を効果的に予防又は治療する技術を提供することができる。

## 図面の簡単な説明

[0011] [図1]実験例 1 の実験スケジュールを示す模式図である。

[図2]実験例 1 において、気管支肺胞洗浄液 ( B A L F ) 中の細胞を解析した結果を示すグラフである。

[図3]実験例 1 において、気流閉塞を測定した結果を示すグラフである。

[図4] ( a ) ~ ( d ) は、実験例 2 において、マウスの肺の組織切片をヘマトキシリン・エオシン染色した結果を示す顕微鏡写真である。

[図5] (a) ~ (d) は、実験例3において、マウスの肺の組織切片をPAS染色した結果を示す顕微鏡写真である。

[図6] 実験例4の実験スケジュールを示す模式図である。

[図7] 実験例4におけるRNA-seqの結果を示すボルカノプロットである。

[図8] (a) 及び (b) は、実験例4における定量的RT-PCRの結果を示すグラフである。(a) はUsp7遺伝子の発現量を測定した結果であり、(b) はGzma遺伝子の発現量を測定した結果である。

[図9] (a) は、実験例5におけるフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。(b) は、(a) の結果をまとめたグラフである。

[図10] 実験例6におけるウエスタンブロッティングの結果を示す写真である。

### 発明を実施するための形態

#### [0012] [遺伝子名及びタンパク質名の表記]

本明細書では、ヒト遺伝子及びヒトタンパク質は、大文字のアルファベットで表すものとする。また、マウス遺伝子は、先頭文字を大文字のアルファベットで、それ以降を小文字のアルファベットで表すものとする。また、マウスタンパク質は大文字のアルファベットで表すものとする。しかしながら、場合により、ヒト遺伝子、マウス遺伝子、その他の種の遺伝子を厳密に区別せずに大文字のアルファベットで表す場合がある。また、ヒトタンパク質、マウスタンパク質、その他の種のタンパク質を厳密に区別せずに大文字のアルファベットで表す場合がある。

#### [0013] [IL-33関連疾患の予防又は治療剤]

1実施形態において、本発明は、USP7阻害剤を有効成分とする、IL-33関連疾患の予防又は治療剤を提供する。

#### [0014] 実施例において後述するように、発明者らは、アレルギーに関連する2型ヘルパーT細胞(Th2細胞)がUSP7タンパク質の制御下でグランザイムAを産生することを明らかにした。さらに、グランザイムAは、IL-3

3 関連疾患における中心的な役割を担うサイトカインである I L - 3 3 を切断することを明らかにした。I L - 3 3 は切断されることにより活性型 I L - 3 3 になり、切断前と比較して炎症を誘導する程度が約 3 0 倍にもなることが知られている。

[0015] したがって、U S P 7 の発現→グランザイム A の発現上昇→グランザイム A による I L - 3 3 の切断・活性化→炎症反応の誘導の反応経路におけるいずれかの反応を阻害することにより、I L - 3 3 関連疾患を予防又は治療することができる。

[0016] T h 2 細胞とは、C D 4 陽性 T 細胞（いわゆるヘルパー T 細胞）の亜群であり、抗原タンパク質との接触経歴を持たない T 細胞（ナイーブ T 細胞）が I L - 4 や I L - 1 3 等のサイトカインの刺激を受けることにより分化した細胞である。

[0017] ヒト U S P 7 遺伝子の c D N A 配列の N C B I アクセッション番号は N M \_ 0 0 1 2 8 6 4 5 7 . 1、N M \_ 0 0 1 2 8 6 4 5 8 . 1、N M \_ 0 0 1 3 2 1 8 5 8 . 1、N M \_ 0 0 3 4 7 0 . 2 等であり、ヒト U S P 7 タンパク質のアミノ酸配列の N C B I アクセッション番号は N P \_ 0 0 1 3 0 8 7 8 7 . 1、X P \_ 0 1 6 8 7 9 1 4 2 . 1、N P \_ 0 0 3 4 6 1 . 2、N P \_ 0 0 1 2 7 3 3 8 6 . 1、N P \_ 0 0 1 2 7 3 3 8 7 . 1、X P \_ 0 1 6 8 7 9 1 4 1 . 1 等であり、マウス U S P 7 遺伝子の c D N A 配列の N C B I アクセッション番号は N M \_ 0 0 1 0 0 3 9 1 8 . 2 等であり、マウス U S P 7 タンパク質のアミノ酸配列の N C B I アクセッション番号は N P \_ 0 0 1 0 0 3 9 1 8 . 2 等である。

[0018] また、ヒトグランザイム A 遺伝子（G Z M A 遺伝子）の c D N A 配列の N C B I アクセッション番号は N M \_ 0 0 6 1 4 4 . 3 等であり、ヒトグランザイム A タンパク質のアミノ酸配列の N C B I アクセッション番号は N P \_ 0 0 6 1 3 5 . 1 等であり、マウスグランザイム A 遺伝子（G z m a 遺伝子）の c D N A 配列の N C B I アクセッション番号は N M \_ 0 1 0 3 7 0 . 2 等であり、マウスグランザイム A タンパク質のアミノ酸配列の N C B I アク

セッション番号はNP\_\_034500. 1等である。

[0019] また、ヒトIL-33遺伝子（IL33遺伝子）のcDNA配列のNCBIアクセッション番号はNM\_\_001199640. 1、NM\_\_001199641. 1、NM\_\_001314044. 1、NM\_\_001314045. 1、NM\_\_001314046. 1等であり、ヒトIL-33タンパク質のアミノ酸配列のNCBIアクセッション番号はXP\_\_016870774. 1、NP\_\_001300977. 1、NP\_\_254274. 1、NP\_\_001340731. 1、NP\_\_001300976. 1、NP\_\_001186569. 1、NP\_\_001300975. 1、NP\_\_001186570. 1、NP\_\_001300973. 1、NP\_\_001300974. 1等であり、マウスIL-33遺伝子（Il33遺伝子）のcDNA配列のNCBIアクセッション番号はNM\_\_001164724. 1、NM\_\_133775. 2等であり、マウスIL-33タンパク質のアミノ酸配列のNCBIアクセッション番号はNP\_\_001158196. 1、NP\_\_598536. 2等である。

[0020] 本実施形態の予防又は治療剤において、IL-33関連疾患としては、アレルギー性気道炎症、好酸球性副鼻腔炎、好酸球性食道炎等が挙げられる。また、アレルギー性気道炎症としては喘息が挙げられ、中でも、好酸球性喘息が挙げられる。例えば、末梢血中の好酸球が150個/ $\mu$ L以上である喘息を、好酸球性喘息であると判断することができる。一態様において、IL-33関連疾患は、末梢血中の好酸球が500個/ $\mu$ L以上である好酸球性喘息である。

[0021] また、好酸球性副鼻腔炎は、両側副鼻腔及び鼻腔に著明な好酸球浸潤を伴う多発性の鼻茸（鼻ポリープ）ができる線維化疾患の一種であり、その病態形成機構は明らかにされていない。好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸を手術で除去しても再発しやすく、難治性の慢性副鼻腔炎として临床上大きな問題となっている。また、好酸球性食道炎とは、好酸球が、食道の粘膜に集中し慢性的に炎症を起こす疾患である。

- [0022] USP 7 阻害剤の投与が有効な IL-33 関連疾患患者としては、血液中又は気管支肺胞洗浄液中の IL-33 の濃度又は好酸球数が健常人よりも高い患者が挙げられる。本実施形態の予防又は治療剤は、例えば、末梢血中の好酸球が 150 個/ $\mu$ L 以上である IL-33 関連疾患患者や、末梢血中の好酸球が 500 個/ $\mu$ L 以上である IL-33 関連疾患患者に有効である。
- [0023] USP 7 阻害剤は、血液中又は気管支肺胞洗浄液中の IL-33 の濃度を測定する試薬と共に IL-33 関連疾患の予防又は治療用キットを構成していてもよい。IL-33 の濃度を測定する試薬としては、抗 IL-33 抗体、抗 IL-33 抗体が固定化されたイムノプレート、抗 IL-33 抗体が固定化されたフローストリップ等が挙げられる。
- [0024] USP 7 阻害剤は、血液中又は気管支肺胞洗浄液中の好酸球数を測定する試薬と共に IL-33 関連疾患の予防又は治療用キットを構成していてもよい。好酸球数を測定する試薬としては、ヘマトキシリン・エオシン染色液、ギムザ染色液、フィールド染色液、ライト染色液、好酸球マーカーに特異的な抗体等が挙げられる。
- [0025] 本実施形態の予防又は治療剤は、気道における炎症をターゲットとしているため、吸入投与等の局所的な投与方法も現実的な選択肢である。したがって、本実施形態の予防又は治療剤は、簡便に投与することができ、全身性の副作用を起こす可能性も低い。
- [0026] 本実施形態において、USP 7 阻害剤は、USP 7 遺伝子に対する阻害性核酸であってもよい。阻害性核酸としては、small interfering RNA (siRNA)、short hairpin RNA (shRNA) 等が挙げられる。これらの阻害性核酸を哺乳動物細胞（例えば、Th2 細胞）において発現する発現ベクターを USP 7 阻害剤として用いてもよい。
- [0027] siRNA は、RNA 干渉による遺伝子サイレンシングのために用いられる 21～23 塩基対の低分子 2 本鎖 RNA である。細胞内に導入された siRNA は、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) と結合する。この

複合体は s i R N A と相補的な配列を持つ m R N A に結合し切断する。これにより、配列特異的に遺伝子の発現を抑制する。

[0028] s i R N A は、センス鎖及びアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドを D N A / R N A 自動合成機でそれぞれ合成し、例えば、適当なアニーリング緩衝液中、90～95℃程度で約1分程度変性させた後、30～70℃程度で1～8時間程度アニーリングさせることにより調製することができる。

[0029] s h R N A は、R N A 干渉による遺伝子サイレンシングのために用いられるヘアピン型の R N A 配列である。s i R N A 又は s h R N A は、s i R N A 又は s h R N A をコードする発現コンストラクトを導入した発現ベクターの形態で患者へ投与することにより、U S P 7 遺伝子の発現抑制を意図する対象細胞（例、T h 2 細胞）に導入し、短鎖 R N A の発現効率が高い R N A p o l y m e r a s e I I I I ( p o I I I I ) 系の U 6 プロモーター又は H 1 プロモーターで発現させてもよい。発現ベクターとしては、プラスミドベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター等を利用することができる。

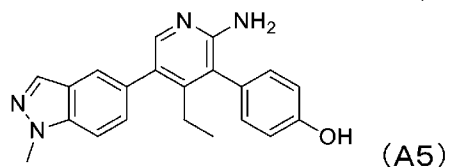
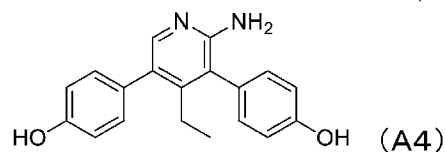
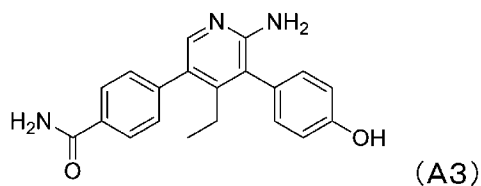
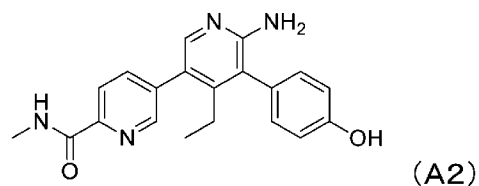
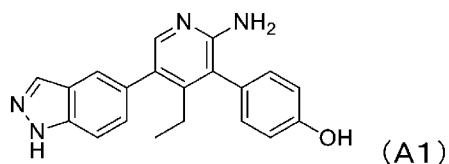
[0030] あるいは、s h R N A 配列を有するオリゴヌクレオチドを D N A / R N A 自動合成機で合成し、s i R N A と同様の方法によりセルフアニーリングさせることによって調製してもよい。細胞内に導入された s h R N A のヘアピン構造は、s i R N A へと切断され、R N A 誘導サイレンシング複合体 ( R I S C ) と結合する。この複合体は s i R N A と相補的な配列を持つ m R N A に結合し切断する。これにより、配列特異的に遺伝子の発現を抑制する。

[0031] U S P 7 阻害剤は低分子化合物であってもよい。より具体的には、下記式 ( A 1 ) ～ ( A 5 ) 、 ( B 1 ) ～ ( B 2 ) 、 ( C 1 ) ～ ( C 5 ) 、 ( D 1 ) ～ ( D 6 ) 、 ( E 1 ) ～ ( E 8 ) 、 ( F 1 ) ～ ( F 5 ) 、 ( G 1 ) ～ ( G 4 ) 、 ( H 1 ) ～ ( H 8 ) 、 ( I 1 ) ～ ( I 1 4 ) のいずれかで表される化合物又はその誘導体若しくはそれらの薬理学的に許容される塩若しくはそれらの溶媒和物が挙げられる。

[0032] すなわち、U S P 7 阻害剤は、下記式 ( A 1 ) ～ ( A 5 ) 、 ( B 1 ) ～ (

B 2)、(C 1)～(C 5)、(D 1)～(D 6)、(E 1)～(E 8)、(F 1)～(F 5)、(G 1)～(G 4)、(H 1)～(H 8)、(I 1)～(I 14)のいずれかで表される化合物であってもよいし、下記式(A 1)～(A 5)、(B 1)～(B 2)、(C 1)～(C 5)、(D 1)～(D 6)、(E 1)～(E 8)、(F 1)～(F 5)、(G 1)～(G 4)、(H 1)～(H 8)、(I 1)～(I 14)のいずれかで表される化合物の誘導体であってもよいし、下記式(A 1)～(A 5)、(B 1)～(B 2)、(C 1)～(C 5)、(D 1)～(D 6)、(E 1)～(E 8)、(F 1)～(F 5)、(G 1)～(G 4)、(H 1)～(H 8)、(I 1)～(I 14)のいずれかで表される化合物又はその誘導体の薬理的に許容される塩であってもよいし、上記の化合物、誘導体、塩の溶媒和物であってもよい。

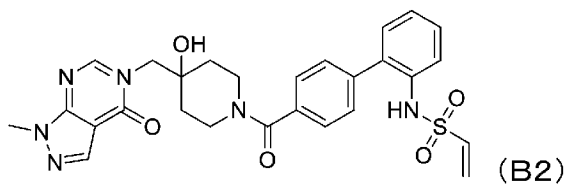
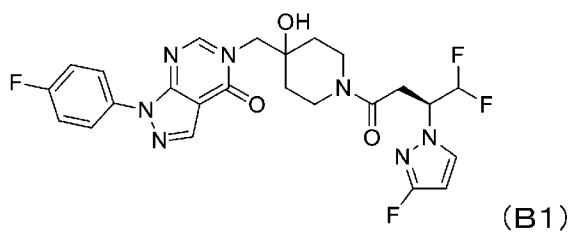
[0033] [化1]



[0034] 上記式(A 1)～(A 3)で表される化合物は、上記非特許文献1等に記載された化合物であり、上記式(A 4)～(A 5)で表される化合物は、上記非特許文献4等に記載された化合物である。

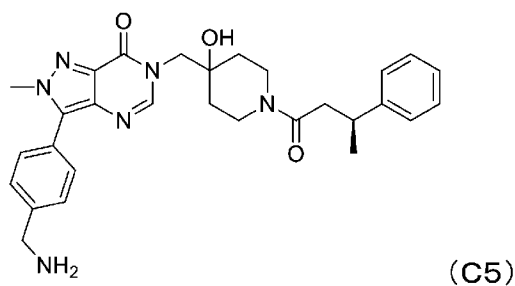
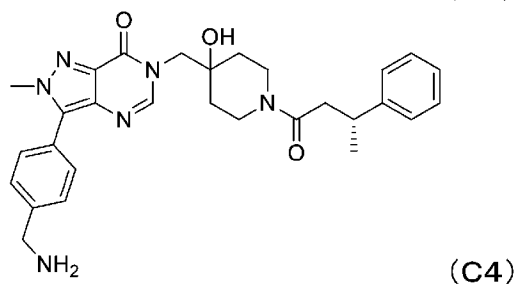
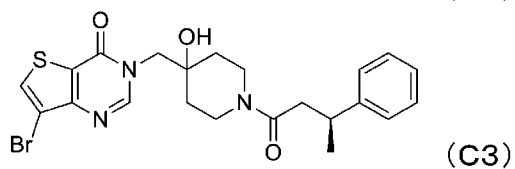
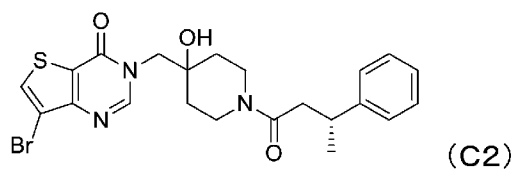
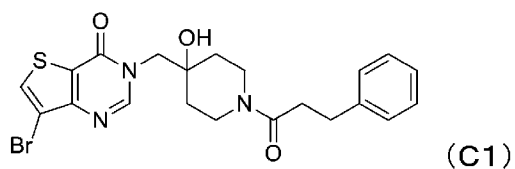
[0035]

[化2]



[0036] 上記式 (B 1) ~ (B 2) で表される化合物は、上記非特許文献 2 等に記載された化合物である。

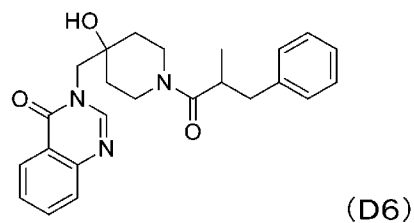
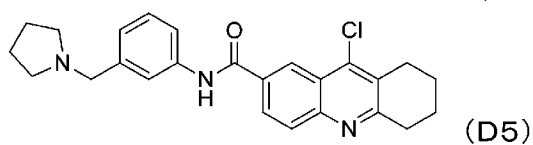
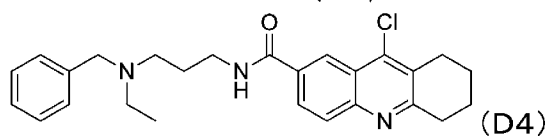
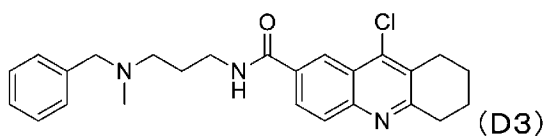
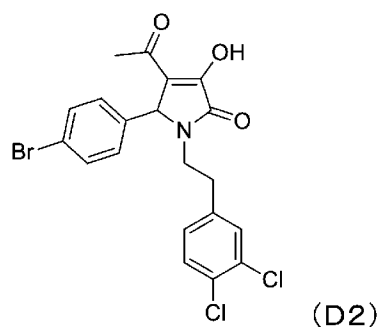
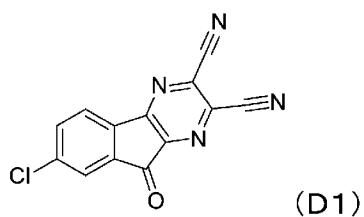
[0037] [化3]



[0038] 上記式 (C 1) ~ (C 5) で表される化合物は、上記非特許文献 3 等に記載された化合物である。

[0039]

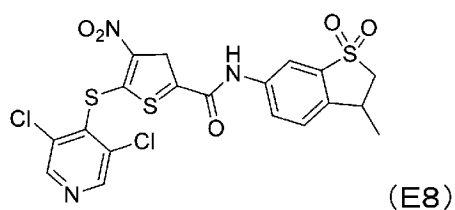
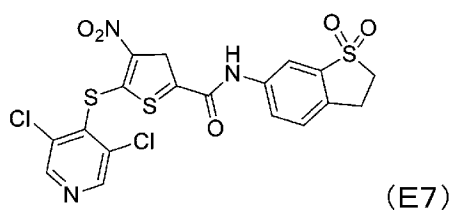
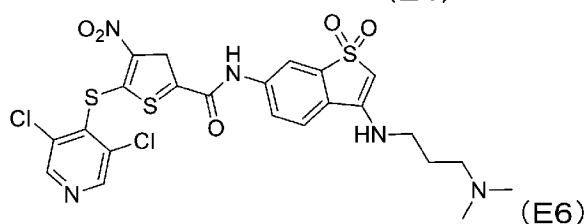
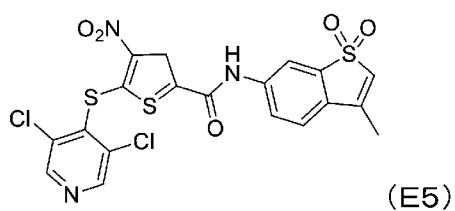
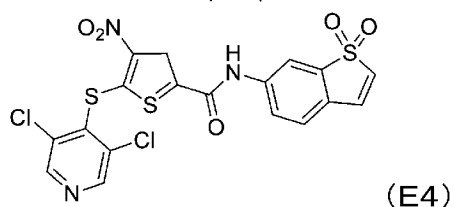
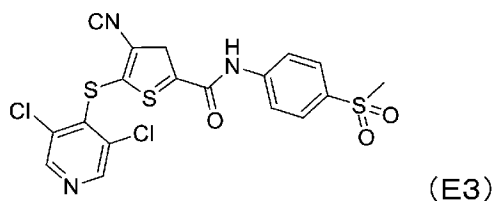
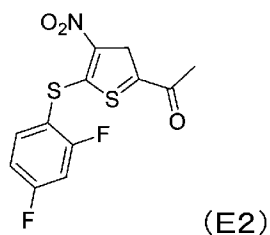
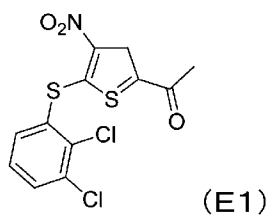
[化4]



[0040] 上記式（D 1）で表される化合物は、上記非特許文献 4、7 等に記載された化合物である。上記式（D 2）、（D 5）、（D 6）で表される化合物は、上記非特許文献 4 等に記載された化合物である。上記式（D 3）で表される化合物は、上記非特許文献 4、8 等に記載された化合物である。上記式（D 4）で表される化合物は、上記非特許文献 8 等に記載された化合物である。

[0041]

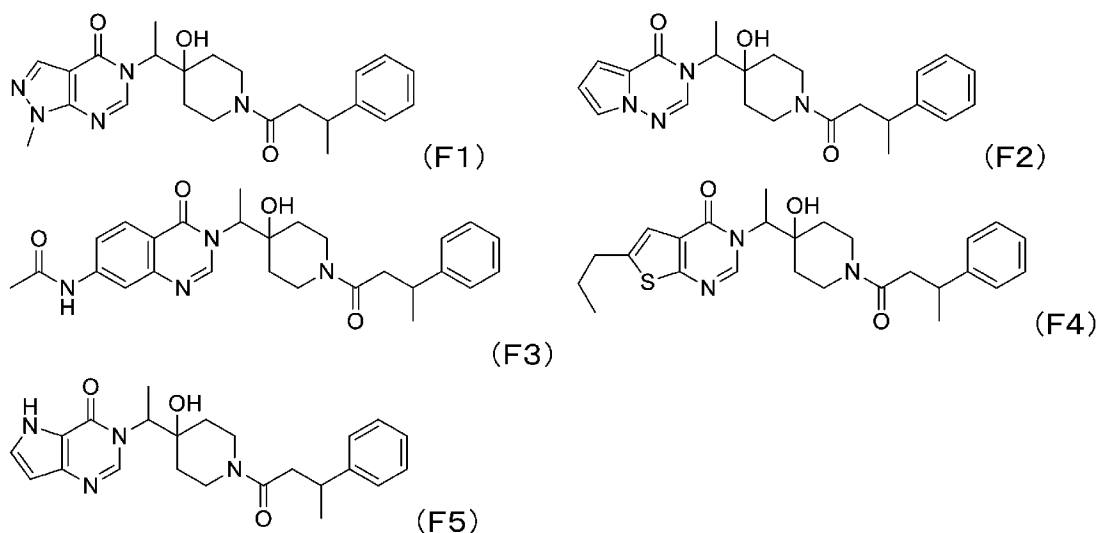
[化5]



[0042] 上記式 (E 1) で表される化合物は、上記非特許文献 4、9、10 等に記載された化合物である。上記式 (E 2) で表される化合物は、上記非特許文献 4、5、6、10 等に記載された化合物である。上記式 (E 3) で表される化合物は、上記非特許文献 4、9 等に記載された化合物である。上記式 (E 4) ~ (E 8) で表される化合物は、上記非特許文献 4 等に記載された化合物である。

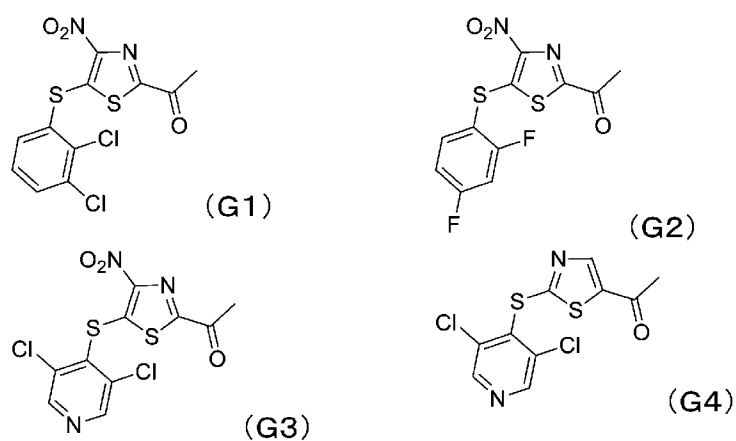
[0043]

[化6]



[0044] 上記式 (F 1) ~ (F 5) で表される化合物は、上記非特許文献 4 等に記載された化合物である。

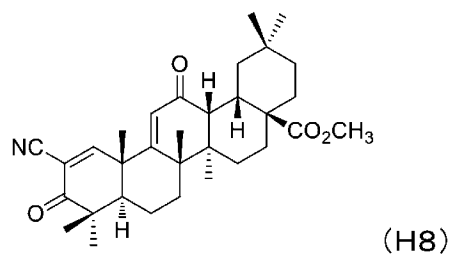
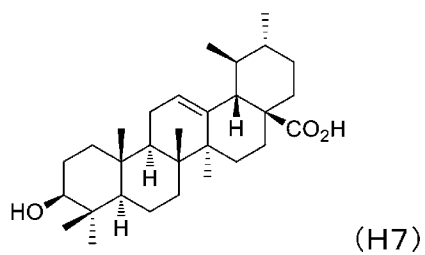
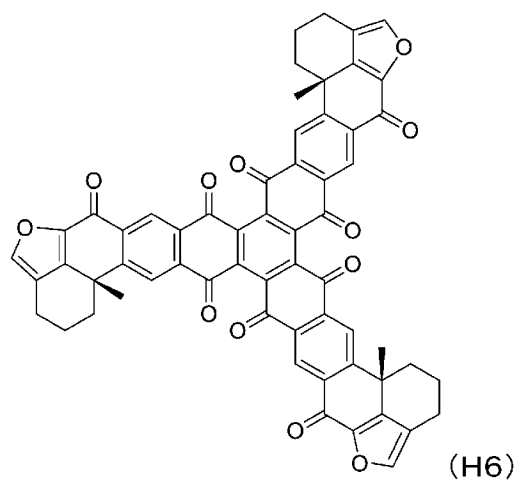
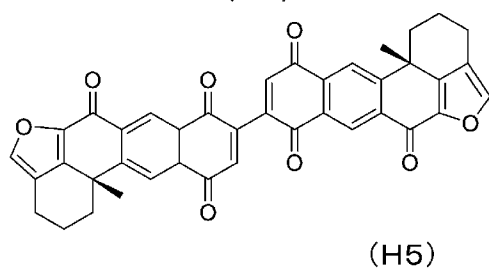
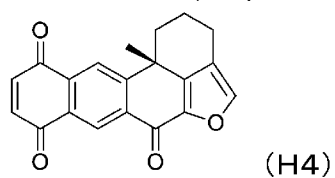
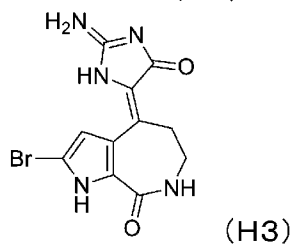
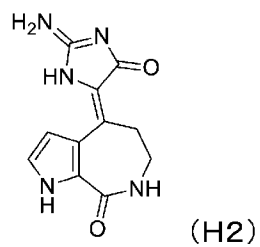
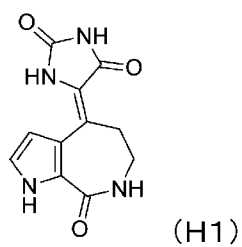
[0045] [化7]



[0046] 上記式 (G 1) ~ (G 4) で表される化合物は、上記非特許文献 4 等に記載された化合物である。

[0047]

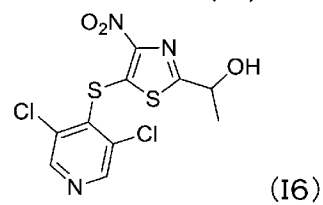
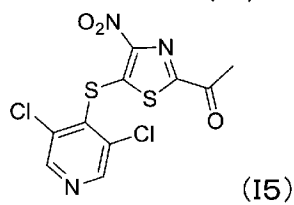
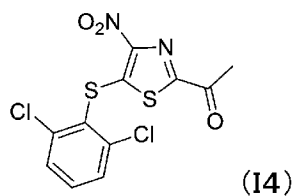
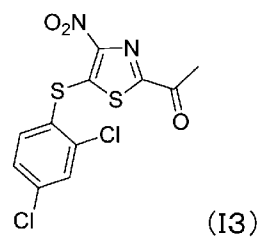
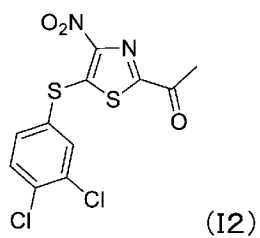
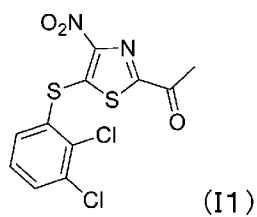
[化8]



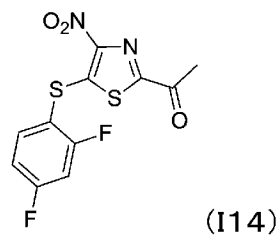
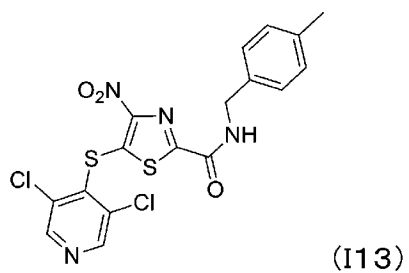
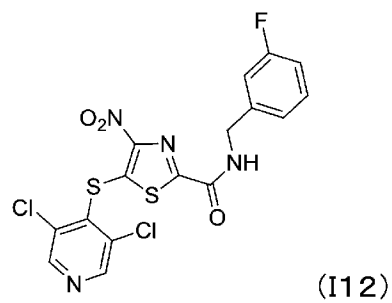
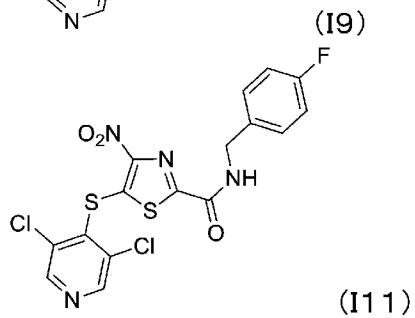
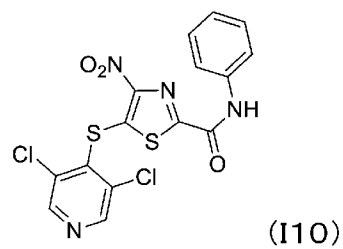
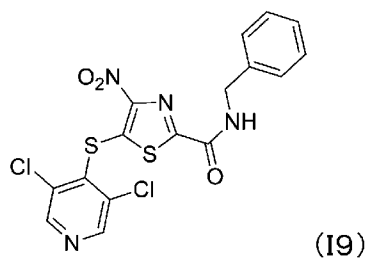
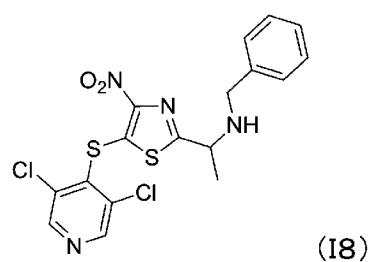
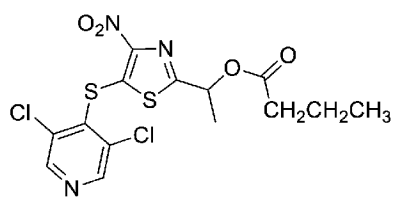
[0048] 上記式 (H 1) ~ (H 8) で表される化合物は、上記非特許文献 4 等に記載された化合物である。

[0049]

[化9]



[0050] [化10]



[0051] 上記式 (I1) ~ (I14) で表される化合物は、上記非特許文献 10 等

に記載された化合物である。

[0052] 上記式 (A 1) ~ (A 5)、(B 1) ~ (B 2)、(C 1) ~ (C 5)、(D 1) ~ (D 6)、(E 1) ~ (E 8)、(F 1) ~ (F 5)、(G 1) ~ (G 4)、(H 1) ~ (H 8)、(I 1) ~ (I 14) のいずれかで表される化合物の誘導体としては、例えば上記式 (A 1) ~ (A 5)、(B 1) ~ (B 2)、(C 1) ~ (C 5)、(D 1) ~ (D 6)、(E 1) ~ (E 8)、(F 1) ~ (F 5)、(G 1) ~ (G 4)、(H 1) ~ (H 8)、(I 1) ~ (I 14) のいずれかで表される化合物において、1 又は複数の水素原子がハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、チオール基、スルホ基、炭素数 1 ~ 3 のアルキル基で置換された化合物が挙げられる。

[0053] また、薬理学的に許容される塩としては、アルカリ金属類、アルカリ土類金属類、アンモニウム、アルキルアンモニウム等との塩、鉱酸又は有機酸との塩が挙げられる。より具体的には、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アンモニウム塩、アルミニウム塩、トリエチルアンモニウム塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩、ギ酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、エチルコハク酸塩、ラクトビオン酸塩、グルコン酸塩、グルコヘプトン酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、アジピン酸塩、システインとの塩、N-アセチルシステインとの塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩、ヨウ化水素酸塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、ピクリン酸塩、チオシアン酸塩、ウンデカン酸塩、アクリル酸ポリマーとの塩、カルボキシビニルポリマーとの塩等が挙げられる。

[0054] また、溶媒和物としては、薬学的に許容される溶媒和物であれば特に制限されず、例えば、水和物、有機溶媒和物等が挙げられる。

[0055] 実施例において後述するように、Th 2 細胞の USP 7 遺伝子を欠損させると、グランザイム A の発現が有意に抑制される。したがって、USP 7 阻

害剤はグランザイム A 発現抑制剤であるといえることができる。ここで、USP 7 阻害剤は、上述したものと同様であり、USP 7 遺伝子に対する阻害性核酸であってもよいし、USP 7 タンパク質の活性を阻害する低分子化合物であってもよい。

[0056] また、USP 7 を阻害すると、グランザイム A 遺伝子又はタンパク質の発現が抑制され、その結果 IL-33 タンパク質の活性化が抑制される。したがって、USP 7 阻害剤は IL-33 活性化抑制剤であるといえることができる。

[0057] また、実施例において後述するように、グランザイム A は IL-33 タンパク質を切断し活性化する。したがって、グランザイム A 阻害剤は、IL-33 活性化抑制剤であるといえることができる。ここで、グランザイム A 阻害剤は、グランザイム A 遺伝子に対する阻害性核酸であってもよいし、グランザイム A タンパク質のプロテアーゼ活性を阻害する低分子化合物であってもよいし、グランザイム A タンパク質のプロテアーゼ活性を阻害する抗グランザイム A 抗体であってもよい。そのような阻害抗体は、例えば、グランザイム A の触媒ドメインに結合し、グランザイム A による基質タンパク質の切断を阻害する。前記阻害抗体は、グランザイム A の触媒ドメインを含む断片によりマウス等を免疫し、周知のハイブリドーマ技術により、免疫した抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立し、その中から、グランザイム A のプロテアーゼ活性を阻害するモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することにより取得することができる。グランザイム A の触媒ドメインは、上述のグランザイム A の配列情報等に基づき、当業者であれば容易に特定することができる。また、抗グランザイム A 抗体は抗体断片であってもよい。抗グランザイム A 抗体又はその断片は、ヒト型化されていることが好ましい。ヒト型抗体又はその断片は、ヒトに投与しても免疫原性が低いため、アナフィラキシーショック等の副作用を抑制することができる。

[0058] ヒト型抗体としては、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体等が挙げら

れる。ここで、キメラ抗体とは、可変領域が非ヒト動物由来の抗体であり、定常領域の少なくとも一部がヒト由来の抗体である抗体を意味する。また、ヒト化抗体とは、重鎖及び軽鎖の相補性決定領域のみが非ヒト動物由来の抗体であり、定常領域及びフレームワーク領域がヒト由来の抗体である抗体を意味する。また、完全ヒト抗体とは、相補性決定領域を含めて全体がヒト由来の抗体を意味する。

[0059] したがって、1実施形態において、本発明は、グランザイムA阻害剤を有効成分とする、IL-33関連疾患の予防又は治療剤を提供する。グランザイムA阻害剤は、血中投与でIL-33関連疾患の予防又は治療の薬効が期待でき、有用である。

[0060] ここで、IL-33関連疾患は上述したものと同様であり、アレルギー性気道炎症、好酸球性副鼻腔炎又は好酸球性食道炎等が挙げられる。また、アレルギー性気道炎症としては喘息が挙げられ、中でも、好酸球性喘息が挙げられる。例えば、末梢血中の好酸球が150個/ $\mu$ L以上である喘息を、好酸球性喘息であると判断することができる。一態様において、IL-33関連疾患は、末梢血中の好酸球が500個/ $\mu$ L以上である好酸球性喘息である。

[0061] グランザイムA阻害剤の投与が有効なIL-33関連疾患患者としては、血液中又は気管支肺胞洗浄液中のIL-33の濃度又は好酸球数が健常人よりも高い患者が挙げられる。具体的には、グランザイムA阻害剤の投与は、例えば、末梢血中の好酸球が150個/ $\mu$ L以上であるIL-33関連疾患患者や、末梢血中の好酸球が500個/ $\mu$ L以上であるIL-33関連疾患患者に有効である。

[0062] グランザイムA阻害剤は、血液中又は気管支肺胞洗浄液中のIL-33の濃度を測定する試薬と共にIL-33関連疾患の予防又は治療用キットを構成していてもよい。IL-33の濃度を測定する試薬については、上述したものと同様である。

[0063] グランザイムA阻害剤は、血液中又は気管支肺胞洗浄液中の好酸球数を測

定する試薬と共に I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療用キットを構成していてもよい。好酸球数を測定する試薬については、上述したものと同様である。

[0064] 上述した U S P 7 阻害剤又はグランザイム A 阻害剤は、薬学的に許容される担体と混合された医薬組成物として製剤化されていることが好ましい。医薬組成物は、経口的に使用される剤型であってもよく、非経口的に使用される剤型であってもよい。経口的に使用される剤型としては、例えば錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤等が挙げられる。非経口的に使用される剤型としては、例えば注射剤、吸入剤、坐剤、貼付剤等が挙げられる。

[0065] 薬学的に許容される担体としては、例えば、滅菌水、生理食塩水等の溶媒；ゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴム等の結合剤；結晶性セルロース等の賦形剤；アルギン酸等の膨化剤等が挙げられる。また、核酸が有効成分である場合には、薬学的に許容される担体として脂質等が挙げられる。脂質としてはカチオン性脂質が挙げられる。

[0066] 医薬組成物は添加剤を更に含んでいてもよい。添加剤としては、ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤；ショ糖、乳糖、サッカリン等の甘味剤；ペパーミント、アカモノ油等の香味剤；ベンジルアルコール、フェノールの安定剤；リン酸塩、酢酸ナトリウム等の緩衝剤；安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等の溶解補助剤；酸化防止剤；防腐剤等が挙げられる。

[0067] 医薬組成物は、上記の担体及び添加剤を適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することができる。

[0068] 患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等のほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、又は経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、患者の症状、投与方法等により変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。

[0069] USP 7 阻害剤又はグランザイム A 阻害剤の投与量は、USP 7 阻害剤又はグランザイム A 阻害剤の種類、患者の症状等により変動するが、経口投与の場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、1 日あたり約 0.1～500 mg、好ましくは約 1.0～250 mg、より好ましくは約 1.0～100 mg 程度を、1 日 1 回、又は数回に分けて投与することが適切であると考えられる。

[0070] 非経口的に投与する場合、その投与量は、USP 7 阻害剤又はグランザイム A 阻害剤の種類、患者の症状、対象臓器、投与方法等により変動するが、全身投与を行う場合は、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、1 日あたり約 0.1～500 mg、好ましくは約 1.0～250 mg、より好ましくは約 1.0～100 mg 程度を、1 日 1 回、又は数回に分けて投与することが適切であると考えられる。局所投与を行う場合は、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、1 日あたり約 0.001～10 mg、好ましくは約 0.01～5 mg、より好ましくは約 0.02～2 mg 程度を、1 日 1 回、又は数回に分けて投与することが適切であると考えられる。

[0071] [IL-33 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法]

（第 1 実施形態）

第 1 実施形態のスクリーニング方法は、被験物質の存在下で USP 7 タンパク質の活性を測定する工程を含み、前記活性が、前記被験物質の非存在下における USP 7 タンパク質の活性と比較して低下したことが、前記被験物質が IL-33 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、IL-33 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法である。

[0072] 第 1 実施形態のスクリーニング方法は、USP 7 タンパク質を用いて試験管レベルで行ってもよいし、USP 7 タンパク質を発現する細胞を用いて培養細胞レベルで行ってもよい。

[0073] USP 7 タンパク質の活性としては、例えば、自己ユビキチン化した MDM2 タンパク質を脱ユビキチン化する活性、ユビキチン化させた p53 タンパク質を脱ユビキチン化する活性等が挙げられる。MDM2 タンパク質のユ

ビキチン化の程度、p53タンパク質のユビキチン化の程度は、ウェスタンブロッティング等により測定することができる。

[0074] 第1実施形態のスクリーニング方法において、被験物質としては、例えば、天然化合物ライブラリ、合成化合物ライブラリ、既存薬ライブラリ等を用いることができる。

[0075] また、USP7発現細胞としては、ヒト由来の細胞、非ヒト動物由来の細胞を用いることができる。非ヒト動物由来の細胞としては、例えば、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞等が挙げられる。USP7発現細胞は、USP7遺伝子の発現ベクターを導入した細胞であってもよいし、例えばTh2細胞等のUSP7遺伝子を発現する細胞であってもよい。

[0076] 被験物質の存在下でUSP7タンパク質の活性を測定した結果、被験物質の非存在下におけるUSP7タンパク質の活性と比較して低下した場合に、被験物質がIL-33関連疾患の予防又は治療剤であると判断することができる。

[0077] また、陰性対照と比較してUSP7タンパク質の活性を低下させた被験物質を候補物質として選択した後、当該候補物質をIL-33関連疾患モデル動物に投与して評価し、その結果、IL-33関連疾患の予防又は治療効果が確認された被験物質を、IL-33関連疾患の予防又は治療剤として選択してもよい。ここで、陰性対照としては、予めUSP7タンパク質の活性に影響を与えないことが明らかとなっている化合物等を用いることができる。また、IL-33関連疾患モデル動物としては、例えば、実施例において後述するアレルギー性気道炎症モデルが挙げられる。

[0078] (第2実施形態)

第2実施形態のスクリーニング方法は、被験物質の存在下でグランザイムAタンパク質及びIL-33タンパク質をインキュベートする工程と、切断された前記IL-33タンパク質を定量する工程と、を含み、切断された前記IL-33タンパク質の量が前記被験物質の非存在下における切断された前記IL-33タンパク質の量と比較して減少したことが、前記被験物質が

IL-33 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、IL-33 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法である。

[0079] 第2実施形態のスクリーニング方法は、グランザイムAタンパク質及びIL-33タンパク質を用いて試験管レベルで行うことが好ましい。IL-33タンパク質は、例えば精製を容易にする観点から、GST-タグ、His×6タグ等のタグを有していてもよい。また、グランザイムAタンパク質及びIL-33タンパク質の反応温度、反応時間は適宜調整することができ、例えば25～40℃で10分～24時間等の条件が挙げられる。

[0080] 第2実施形態のスクリーニング方法において、被験物質としては、第1実施形態と同様のものを用いることができる。また、切断された前記IL-33タンパク質の定量は、ウエスタンブロッティング等により測定することができる。

[0081] 切断されたIL-33タンパク質としては、例えば、切断前と比較して分子量が小さくなったIL-33タンパク質のバンドの強度を定量すればよい。なお、タグのないIL-33タンパク質の切断前の分子量は30kDa程度であり、グランザイムAによる切断後の分子量は17～20kDa程度である。

[0082] 被験物質の存在下で切断されたIL-33タンパク質を定量した結果、被験物質の非存在下における、切断された前記IL-33タンパク質の量と比較して減少した場合に、被験物質がIL-33関連疾患の予防又は治療剤であると判断することができる。

[0083] また、陰性対照と比較して切断されたIL-33タンパク質の量を減少させた被験物質（IL-33タンパク質の切断を抑制した被験物質）を候補物質として選択した後、当該候補物質をIL-33関連疾患モデル動物に投与して評価し、その結果、IL-33関連疾患の予防又は治療効果が確認された被験物質を、IL-33関連疾患の予防又は治療剤として選択してもよい。ここで、陰性対照としては、予めグランザイムAタンパク質のIL-33タンパク質切断活性に影響を与えないことが明らかとなっている化合物等を

用いることができる。また、I L - 3 3 関連疾患モデル動物としては、例えば、実施例において後述するアレルギー性気道炎症モデルが挙げられる。

[0084] (第3実施形態)

第3実施形態のスクリーニング方法は、被験物質の存在下でT h 2細胞を培養する工程と、前記T h 2細胞によるグランザイムA遺伝子又はタンパク質の発現量を測定する工程と、を含み、前記発現量が、前記被験物質の非存在下におけるグランザイムA遺伝子又はタンパク質の発現量と比較して低下したことが、前記被験物質がI L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法である。

[0085] 第3実施形態のスクリーニング方法は、細胞レベルで実施するものである。T h 2細胞としては、哺乳動物由来の細胞が挙げられ、例えばヒト細胞、マウス細胞等が挙げられる。T h 2細胞はナイーブC D 4 陽性T細胞から分化誘導した細胞であってもよい。

[0086] 第3実施形態のスクリーニング方法において、被験物質としては、第1実施形態と同様のものを用いることができる。被験物質の存在下でT h 2細胞を培養するとは、T h 2細胞の培地に被験物質を添加して培養することであってもよいし、リポフェクション、エレクトロポレーション等によりT h 2細胞の内部に被験物質を導入し、培養することであってもよい。

[0087] グランザイムA遺伝子の発現量は、例えばR T - P C R、定量的R T - P C R等、D N Aマイクロアレイ等により測定することができる。また、グランザイムAタンパク質の発現量は、例えばE L I S A、ウェスタンブロッティング等により測定することができる。

[0088] 被験物質の存在下でT h 2細胞によるグランザイムA遺伝子又はタンパク質の発現量を測定した結果、被験物質の非存在下における発現量と比較して低下した場合に、被験物質がI L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤であると判断することができる。

[0089] また、陰性対照と比較してT h 2細胞によるグランザイムA遺伝子又はタ

ンパク質の発現量を低下させた被験物質を候補物質として選択した後、当該候補物質を I L - 3 3 関連疾患モデル動物に投与して評価し、その結果、 I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療効果が確認された被験物質を、 I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤として選択してもよい。ここで、陰性対照としては、予め T h 2 細胞によるグランザイム A 遺伝子又はタンパク質の発現量に影響を与えないことが明らかとなっている化合物等を用いることができる。また、 I L - 3 3 関連疾患モデル動物としては、例えば、実施例において後述するアレルギー性気道炎症モデルが挙げられる。

[0090] (第4実施形態)

第4実施形態のスクリーニング方法は、被験物質の存在下で T h 2 細胞を培養する工程と、前記 T h 2 細胞による U S P 7 遺伝子又はタンパク質の発現量を測定する工程と、を含み、前記発現量が、前記被験物質の非存在下における U S P 7 遺伝子又はタンパク質の発現量と比較して低下したことが、前記被験物質が I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、 I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法である。

[0091] 第4実施形態のスクリーニング方法は、細胞レベルで実施するものである。T h 2 細胞としては、第3実施形態と同様のものを用いることができる。第4実施形態のスクリーニング方法において、被験物質としては、第1実施形態と同様のものを用いることができる。

[0092] 被験物質の存在下で T h 2 細胞を培養するとは、第3実施形態と同様であり、T h 2 細胞の培地に被験物質を添加して培養することであってもよいし、リポフェクション、エレクトロポレーション等により T h 2 細胞の内部に被験物質を導入し、培養することであってもよい。

[0093] U S P 7 遺伝子の発現量は、例えば R T - P C R、定量的 R T - P C R 等、D N A マイクロアレイ等により測定することができる。また、U S P 7 タンパク質の発現量は、例えば E L I S A、ウエスタンブロッティング等により測定することができる。

[0094] 被験物質の存在下で T h 2 細胞による U S P 7 遺伝子又はタンパク質の発

現量を測定した結果、被験物質の非存在下における発現量と比較して低下した場合に、被験物質が I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤であると判断することができる。

[0095] また、陰性対照と比較して T h 2 細胞による U S P 7 遺伝子又はタンパク質の発現量を低下させた被験物質を候補物質として選択した後、当該候補物質を I L - 3 3 関連疾患モデル動物に投与して評価し、その結果、 I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療効果が確認された被験物質を、 I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤として選択してもよい。ここで、陰性対照としては、予め T h 2 細胞による U S P 7 遺伝子又はタンパク質の発現量に影響を与えないことが明らかとなっている化合物等を用いることができる。また、 I L - 3 3 関連疾患モデル動物としては、例えば、実施例において後述するアレルギー性気道炎症モデルが挙げられる。

[0096] (第5実施形態)

第5実施形態のスクリーニング方法は、被験物質の存在下で T h 2 細胞を培養する工程と、前記 T h 2 細胞のグランザイム A 遺伝子座におけるユビキチン化されたヒストン H 2 A の量を測定する工程と、を含み、前記ユビキチン化されたヒストン H 2 A の量が、前記被験物質の非存在下におけるユビキチン化されたヒストン H 2 A の量と比較して増加したことが、前記被験物質が I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、 I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法である。

[0097] 第5実施形態のスクリーニング方法は、細胞レベルで実施するものである。T h 2 細胞としては、第3実施形態と同様のものを用いることができる。第5実施形態のスクリーニング方法において、被験物質としては、第1実施形態と同様のものを用いることができる。

[0098] 被験物質の存在下で T h 2 細胞を培養するとは、第3実施形態と同様であり、T h 2 細胞の培地に被験物質を添加して培養することであってもよいし、リポフェクション、エレクトロポレーション等により T h 2 細胞の内部に被験物質を導入し、培養することであってもよい。

[0099] グランザイムA遺伝子座におけるユビキチン化されたヒストンH2Aの量の測定は、例えばクロマチン免疫沈降（ChIP）法等により行うことができる。ChIP法としては、ChIP-qPCR法、ChIP-on-chip法、ChIP-Seq法等を利用することができる。

[0100] 被験物質の存在下で、Th2細胞のグランザイムA遺伝子座におけるユビキチン化されたヒストンH2Aの量を測定した結果、被験物質の非存在下における、ユビキチン化されたヒストンH2Aの量と比較して増加した場合に、被験物質がIL-33関連疾患の予防又は治療剤であると判断することができる。

[0101] また、陰性対照と比較してTh2細胞のグランザイムA遺伝子座におけるユビキチン化されたヒストンH2Aの量を増加させた被験物質を候補物質として選択した後、当該候補物質をIL-33関連疾患モデル動物に投与して評価し、その結果、IL-33関連疾患の予防又は治療効果が確認された被験物質を、IL-33関連疾患の予防又は治療剤として選択してもよい。ここで、陰性対照としては、予めTh2細胞のグランザイムA遺伝子座におけるユビキチン化されたヒストンH2Aの量に影響を与えないことが明らかとなっている化合物等を用いることができる。また、IL-33関連疾患モデル動物としては、例えば、実施例において後述するアレルギー性気道炎症モデルが挙げられる。

[0102] [その他の実施形態]

1実施形態において、本発明は、USP7阻害剤の有効量を、治療を必要とする患者に投与する工程を含む、IL-33関連疾患の予防又は治療方法を提供する。

[0103] 患者としては、血液中又は気管支肺胞洗浄液中のIL-33の濃度又は好酸球数が健常人よりも高い患者が挙げられる。より具体的には、例えば、末梢血中の好酸球が150個/ $\mu$ L以上である患者、あるいは末梢血中の好酸球が500個/ $\mu$ L以上である患者等が挙げられる。

[0104] したがって、本実施形態の治療方法は、IL-33関連疾患患者の血液中

又は気管支肺胞洗浄液中の I L - 3 3 の濃度又は好酸球数を測定する工程と、前記 I L - 3 3 の濃度又は好酸球数が健常人よりも高い場合に、前記患者に U S P 7 阻害剤の有効量を投与する工程を含む、I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療方法であってもよい。I L - 3 3 の濃度又は好酸球数の測定は、患者から採取した試料（血液、気管支肺胞洗浄液）を用いてインビトロで行われる。例えば、I L - 3 3 関連疾患（例、アレルギー性気道炎症（例、好酸球性喘息）、好酸球性副鼻腔炎、好酸球性食道炎）患者集団について、各患者の末梢血中の好酸球数を測定し、末梢血中の好酸球数が健常人よりも高い（例、150個/ $\mu$ L以上、500個/ $\mu$ L以上）患者を選択し、選択された患者に対してU S P 7 阻害剤の有効量を投与する。

[0105] 1実施形態において、本発明は、グランザイムA阻害剤の有効量を、治療を必要とする患者に投与する工程を含む、I L - 3 3 活性化抑制方法を提供する。

[0106] 患者としては、血液中又は気管支肺胞洗浄液中の I L - 3 3 の濃度又は好酸球数が健常人よりも高い患者が挙げられる。より具体的には、例えば、末梢血中の好酸球が150個/ $\mu$ L以上である患者、あるいは末梢血中の好酸球が500個/ $\mu$ L以上である患者等が挙げられる。

[0107] したがって、本実施形態の治療方法は、I L - 3 3 関連疾患患者の血液中又は気管支肺胞洗浄液中の I L - 3 3 の濃度又は好酸球数を測定する工程と、前記 I L - 3 3 の濃度又は好酸球数が健常人よりも高い場合に、前記患者にグランザイムA阻害剤の有効量を投与する工程を含む、I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療方法であってもよい。I L - 3 3 の濃度又は好酸球数の測定は、患者から採取した試料（血液、気管支肺胞洗浄液）を用いてインビトロで行われる。例えば、I L - 3 3 関連疾患（例、アレルギー性気道炎症（例、好酸球性喘息）、好酸球性副鼻腔炎、好酸球性食道炎）患者集団について、各患者の末梢血中の好酸球数を測定し、末梢血中の好酸球数が健常人よりも高い（例、150個/ $\mu$ L以上、500個/ $\mu$ L以上）患者を選択し、選択された患者に対してグランザイムA阻害剤の有効量を投与する。

- [0108] 1実施形態において、本発明は、IL-33関連疾患の予防又は治療のためのUSP7阻害剤を提供する。
- [0109] 1実施形態において、本発明は、IL-33活性化抑制のためのグランザイムA阻害剤を提供する。
- [0110] 1実施形態において、本発明は、IL-33関連疾患の予防剤又は治療剤を製造するためのUSP7阻害剤の使用を提供する。
- [0111] 1実施形態において、本発明は、IL-33活性化抑制剤を製造するためのグランザイムA阻害剤の使用を提供する。
- [0112] これらの実施形態において、IL-33関連疾患としては上述したものと同様のものが挙げられる。また、USP7阻害剤、グランザイムA阻害剤としては、上述したものと同様のものが挙げられる。

## 実施例

- [0113] [材料及び方法]

(マウス)

C57BL/6マウスはクレアジャパン社より購入した。Us p 7<sup>fl/fl</sup>マウスは古関明彦博士（理化学研究所）より分与された。Us p 7<sup>fl/fl</sup>マウスはRosa:Cre-ERTマウス（タコニック社）、OTII-TCR- $\alpha\beta$ Tgマウスと交配した。

- [0114] オボアルブミン（OVA）タンパク質の323-339残基に特異的なTCRを有するOTII-TCR- $\alpha\beta$ Tgマウスはジャクソンラボラトリーズ社より購入した。
- [0115] 全てのマウスは6～10週齢で使用し、特定病原菌フリー（SPF）条件下で維持した。マウスを用いる全ての実験プロトコールは千葉大学動物委員会により承認を得たうえで実施した。また、全ての動物の飼育は千葉大学の指針にしたがって行った。

- [0116] (抗体)

細胞質内及び細胞表面の染色に用いた抗体は次の通りであった。Brilliant Violet (BV) 421標識抗IFN- $\gamma$ モノクローナル

抗体（クローンXMG1. 2、バイオレジェンド社）、フィコエリスリン（PE）標識抗グランザイムA抗体（3G8. 5、バイオレジェンド社）

[0117] （インビトロTh細胞分化培養）

Usp7<sup>+/+</sup>Cre-ERT2<sup>+</sup>マウス（WTマウス）又はUsp7<sup>fl/fl</sup>Cre-ERT2<sup>+</sup>マウス（cKOマウス）の胸腺由来のナイーブCD4陽性T細胞（CD4<sup>lo</sup>CD62L<sup>hi</sup>）を、マグネティックセルソーター（商品名「autoMACS」、ミルテニーバイオテック社）を用いて精製した。

[0118] Th2細胞を分化誘導する場合には、ナイーブCD4陽性T細胞を、IL-2（25U/mL）、IL-4（100U/mL）、抗IFN- $\gamma$ モノクローナル抗体、抗CD28モノクローナル抗体及び抗TCR $\beta$ モノクローナル抗体の存在下で培養した。

[0119] （免疫蛍光染色及びフローサイトメトリー解析）

Th細胞を刺激しサイトカインの細胞内染色を行った。具体的には、培養したTh細胞を、イオノマイシン（500nM）、ホルボール12-ミリステート13-アセテート（50ng/mL）及びモネンシン（2 $\mu$ M、シグマ社）で4時間刺激した。続いて、4%パラホルムアルデヒドを用いて細胞を室温で10分間固定し、0.5%Triton Xを含む透過処理液（50mM NaCl、5mM EDTA、0.02%アジ化ナトリウム、pH 7.5）中、氷上で10分間処理した。続いて、細胞を3%ウシ血清アルブミン（BSA）で15分間ブロッキングした。続いて、適切な抗体で30分以上染色した後、フローサイトメーター（商品名「FACSVerse」又は商品名「FACSCantoII」、いずれもBDバイオサイエンス社）を用いて解析した。データ解析はFlowJoソフトウェア（BDバイオサイエンス社）を用いて行った。

[0120] （定量的RT-PCR解析）

全RNA抽出、cDNA合成は定法により行った。定量的RT-PCRはStepOnePlus Real-Time PCR System（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いてスレッシュホールドサ

イクル比較法により行った。プライマー及びTaqManプローブはロシュ社より購入した。標的遺伝子の発現はHprt遺伝子の発現に対して標準化した。

[0121] (RNAシーケンシング)

RNAシーケンシング(RNA-Seq)は次のようにして行った。全RNAをTRIzol試薬(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を用いて抽出した。cDNAライブラリ調製では、TruSeq RNA Sample Prep Kit v2(イルミナ社)を使用説明書にしたがって使用した。

[0122] ライブラリ断片のシーケンシングはHiSeq 1500 System(イルミナ社)を用いて行った。データ解析では、リード配列(50bp)を、Bowtie(バージョン0.12.8)及びTophat(バージョン1.3.2)ソフトウェアを用いてmm10マウス参照ゲノム(カリフォルニア大学、2011年12月)にアラインメントした。

[0123] 各遺伝子のFPKM(fragments per kilobase of exon per million reads mapped)は、Cufflinks(バージョン2.0.2)ソフトウェアを用いて計算した。

[0124] (Th2細胞の移植により誘導された気道炎症モデル)

WTマウス又はUsp7<sup>fl/fl</sup>Cre-ERT2+OVA特異的OT1 TCRマウス由来のナイーブCD4陽性T細胞を、Th2条件で培養した。最初の24時間は4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT)処理した。6日後、培養した細胞を尾静脈投与によりC57BL/6マウスに1×10<sup>4</sup>個/マウスで移植した。細胞移植後、1、3、4日目にオバルブミン(OVA)を鼻腔内投与した。細胞移植後5日目にマウスを安楽死させ解析した。

[0125] (気管支肺胞洗浄液の採取)

最後のOVA投与から24時間後に気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取

した。BALF中の細胞はCytospin4（サーモフィッシュサイエントフィック社）を用いてスライドガラス上に遠心し、Diff-Quick Stain kit（シスメックス社）を用いて染色した。顕微鏡を用いてスライド1枚当たり200個の白血球を計測した。

[0126]（気道過敏反応）

最後のOVA投与から24時間後に、コンピューター制御された小動物ベンチレーター（SCIREQ）を用いて、メタコリン（シグマ社）により誘導された気流閉塞を測定することにより、気道過敏反応を検討した。

[0127]（肺の組織学的解析）

肺組織の病理学的変化は、ヘマトキシリン・エオシン（H&E）染色及び過ヨウ素酸－シッフ（PAS）染色によって評価した。

[0128]（統計学的解析）

データはGraphPad Prismソフトウェア（バージョン6）を用いて解析した。2グループの比較はtwo-tailed unpaired t testにより計算した。3グループ以上の比較はtwo-way analysis of variance（ANOVA）と共にテューキーの多重比較検定又はシダックの多重比較検定により行った。0.05以下のp値を有意であると判断した。

[0129] [実験例1]

（Th2特異的なUsp7遺伝子の欠損はアレルギー性気道炎症における好酸球の浸潤の減少及び気道過敏反応の改善につながった）

図1は実験スケジュールを示す模式図である。まず、Usp7<sup>+/+</sup>Cre-ERT2+OT11 Tgマウス（WTマウス）の胸腺由来のナイーブCD4陽性T細胞、Usp7<sup>f1/f1</sup>Cre-ERT2+OT11 Tgマウス（KOマウス）の胸腺由来のナイーブCD4陽性T細胞、及び、C57BL/6マウス由来の抗原提示細胞を準備した。OT11 Tgマウスはオブアルブミン（OVA）に対するT細胞受容体（TCR）を有する。

[0130] 続いて、これらの細胞をインビトロで6日間共培養した。図1中、「4-

「OHT」は4-ヒドロキシタモキシフェンを示し、「Lo h 1 5」はオブアルブミンの第323～339番目のアミノ酸配列からなるペプチド（ISQAVHAAHAEINEAGR、配列番号1）を示す。4-OHTは100 nMで添加し、Lo h 1 5は300 nMで添加した。

[0131] 続いて、6日目に、Th2細胞を尾静脈注射によりC57BL/6マウスに $1 \times 10^6$ 個/マウスで移植した。細胞移植後、1、3、4日目にOVA又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を鼻腔内投与により投与した。OVAは100  $\mu$ g/マウスで投与した。Th2細胞の移植後5日目に各マウスを解析した。

[0132] 図2は、気管支肺胞洗浄液（BALF）中の細胞を解析した結果を示すグラフである。図2中、「WT PBS」は、WTマウス由来のTh2細胞を移植し、PBSを投与したマウスの結果であることを示し、「KO PBS」は、KOマウス由来のTh2細胞を移植し、PBSを投与したマウスの結果であることを示し、「WT OVA」は、WTマウス由来のTh2細胞を移植し、OVAを投与したマウスの結果であることを示し、「KO OVA」は、KOマウス由来のTh2細胞を移植し、OVAを投与したマウスの結果であることを示し、「Eos i .」は好酸球を示し、「Neut .」は好中球を示し、「L y m p .」はリンパ球を示し、「Mac .」はマクロファージを示し、「Total」は全白血球を意味する。

[0133] その結果、KO OVA群において、好酸球及び全白血球の数が有意に減少したことが明らかとなった。

[0134] また、図3はメサコリンを投与して気道の収縮を誘導し、気流閉塞を測定した結果を示すグラフである。図3中、「WT PBS」は、WTマウス由来のTh2細胞を移植し、PBSを投与したマウスの結果であることを示し、「KO PBS」は、KOマウス由来のTh2細胞を移植し、PBSを投与したマウスの結果であることを示し、「WT OVA」は、WTマウス由来のTh2細胞を移植し、OVAを投与したマウスの結果であることを示し、「KO OVA」は、KOマウス由来のTh2細胞を移植し、OVAを投

与したマウスの結果であることを示す。

[0135] その結果、K O O V A群において、気道過敏反応が有意に改善したことが明らかとなった。

[0136] 以上の結果から、T h 2特異的にU s p 7を欠損させると、アレルギー性気道炎症における好酸球の浸潤が有意に減少し、また、気道過敏反応が有意に改善したことが明らかとなった。

[0137] [実験例2]

(T h 2特異的なU s p 7遺伝子の欠損はアレルギー性気道炎症における炎症性細胞の浸潤の減少につながった)

実験例1でT h 2細胞を移植した各群のマウスの肺の組織学的解析を行った。図4(a)～(d)はマウスの肺の組織切片をヘマトキシリン・エオシン染色した結果を示す顕微鏡写真である。図4(a)～(d)中、「WT」はU s p 7<sup>+/+</sup>C r e - E R T 2 + O T I I T gマウス(WTマウス)由来のT h 2細胞を移植したマウスの結果であることを示し、「K O」は、U s p 7<sup>fl/fl</sup>C r e - E R T 2 + O T I I T gマウス由来のT h 2細胞を移植したマウスの結果であることを示し、「P B S i . n .」はP B Sを経鼻腔的に投与したマウスの結果であることを示し、「O V A i . n .」は、O V Aを経鼻腔的に投与したマウスの結果であることを示す。スケールバーは1000μmである。

[0138] その結果、図4(a)、(b)に示すように、P B S投与群の肺はほぼ正常な状態であった。これに対し、図4(c)に示すように、O V Aを投与したWT群の肺では、大量の炎症性細胞の浸潤が認められた。図4(c)中、炎症性細胞の浸潤が認められた領域を矢印で示す。また、図4(d)に示すように、O V Aを投与したK O群の肺では、炎症性細胞の浸潤が認められたものの、図4(c)と比較して、アレルギー性気道炎症が顕著に改善された状態を示した。

[0139] [実験例3]

(T h 2特異的なU s p 7遺伝子の欠損はアレルギー性気道炎症における粘

液産生の減少につながった)

実験例1でTh2細胞を移植した各群のマウスの肺の組織学的解析を行った。図5(a)～(d)はマウスの肺の組織切片をPAS染色した結果を示す顕微鏡写真である。図5(a)～(d)中、「WT」は $Usp7^{+/+}Cre-ERT2+OTI1$  Tgマウス(WTマウス)由来のTh2細胞を移植したマウスの結果であることを示し、「KO」は、 $Usp7^{f1/f1}Cre-ERT2+OTI1$  Tgマウス由来のTh2細胞を移植したマウスの結果であることを示し、「PBS i. n.」はPBSを経鼻腔的に投与したマウスの結果であることを示し、「OVA i. n.」は、OVAを経鼻腔的に投与したマウスの結果であることを示す。スケールバーは $100\mu m$ である。

[0140] その結果、図5(a)、(c)に示すように、PBS投与群の肺はほぼ正常な状態であった。これに対し、図5(b)に示すように、OVAを投与したWT群の肺では、大量の粘液の産生が認められた。図5(b)中、粘液の産生が認められる領域を矢印で示す。また、図5(d)に示すように、OVAを投与したKO群の肺ではほとんど粘液の産生が認められず、アレルギー性気道炎症が顕著に改善された状態を示した。

[0141] 以上、実験例1～3の結果から、Th2細胞特異的な $Usp7$ 遺伝子の欠損は、OVAに暴露した場合のアレルギー性気道炎症の病態の改善につながる事が明らかとなった。

[0142] [実験例4]

( $Usp7$ 遺伝子の欠損は、Th2細胞における $Gzma$ 遺伝子及び $Il13$ 遺伝子の発現の減少につながった)

RNAシーケンシング(RNA-Seq)により $Usp7$ 遺伝子の欠損の影響を解析した。図6は実験スケジュールを示す模式図である。まず、 $Usp7^{+/+}Cre-ERT2+OTI1$  Tgマウス(WTマウス)の胸腺由来のナイーブCD4陽性T細胞、及び、 $Usp7^{f1/f1}Cre-ERT2+OTI1$  Tgマウス(KOマウス)の胸腺由来のナイーブCD4陽性T細胞を調製した。

[0143] 続いて、これらの細胞をTh2条件で5日間培養した。最初の24時間は4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT)処理した。その後、抗TCR $\beta$ 抗体(クローンH57-597)で刺激を行い、刺激の4時間後に各細胞を回収し、RNA-Seq解析を行った。

[0144] 図7はRNA-seqの結果を示すボルカノプロットである。縦軸はp値を示し、横軸はWTマウス及びKOマウスにおける各遺伝子の発現量の比を示す。グラフの上部ほどWTマウスとKOマウスで発現量の差が大きいことを示す。図7中、丸で囲んだプロットは、WTマウスと比較してKOマウスで発現量が顕著に低い遺伝子を示す。

[0145] これらの遺伝子のうち、グランザイムAをコードするGzma遺伝子の発現量が、WTマウスと比較してKOマウスで顕著に減少したことが明らかとなった。

[0146] 図8(a)及び(b)は、定量的RT-PCRによりRNA-Seqの結果を確認した結果を示すグラフである。図8(a)はUsp7遺伝子の発現量を測定した結果であり、図8(b)はGzma遺伝子の発現量を測定した結果である。図8(a)及び(b)中、「WT」はUsp7<sup>+/+</sup>Cre-ERT2+OTII Tgマウス(WTマウス)由来の細胞の結果であることを示し、「KO」はUsp7<sup>f1/f1</sup>Cre-ERT2+OTII Tgマウス(KOマウス)由来の細胞の結果であることを示す。

[0147] その結果、Gzma遺伝子の発現量はWTマウスと比較してKOマウスで確かに減少していることが確認された。

[0148] Gzma遺伝子に加えて、Th2サイトカインの一種であるIL-13をコードするIl13遺伝子も、重要な遺伝子として検出された。

[0149] [実験例5]

(Usp7遺伝子の欠損は、インビトロにおいて、グランザイムAの産生の減少につながった)

続いて、実験例4と同様にして、Usp7<sup>+/+</sup>Cre-ERT2+OTII Tgマウス(WTマウス)由来のナイーブCD4陽性T細胞、及び、Usp

p7<sup>fl/fl</sup>/C<sub>re</sub>-ERT2<sup>+</sup>OT1 Tgマウス（KOマウス）由来のナイーブCD4陽性T細胞をTh2条件で培養し、得られたTh2細胞におけるグランザイムAタンパク質の産生量をフローサイトメトリーにより解析した。

[0150] 図9（a）はフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。図9（a）中、縦軸はグランザイムAの産生量を示し、横軸はインターフェロン（IFN）- $\gamma$ の産生量を示す。図9（b）は、図9（a）の結果をグラフにしたものである。

[0151] その結果、KOマウス由来のTh2細胞では、WTマウス由来のTh2細胞と比較して、グランザイムA陽性細胞の割合が有意に減少したことが明らかとなった。

[0152] [実験例6]

（グランザイムAはIL-33を切断し成熟型IL-33を生成する）

ヒトIL-33を、濃度を変えたグランザイムAと混合し、37℃で1時間インキュベートした。続いて、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）及び抗ヒトIL-33抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い、ヒトIL-33の切断を検出した。

[0153] また、比較のために、グランザイムAにプロテアーゼインヒビターを混合したサンプルも用意した。また、比較のために、グランザイムAの代わりにグランザイムB、オブアルブミン、パパイン、アスペルギルス属菌体、室内塵ダニ（House dust mite、HDM）を反応させたサンプルも用意した。

[0154] 図10はウエスタンブロッティングの結果を示す写真である。図10中、「full-length IL-33」は全長のIL-33のバンドの位置を示し、「cleaved IL-33」は切断されたIL-33のバンドの位置を示す。

[0155] また、図10中、「GzmA」はグランザイムAを示し、「AEBSF」はセリンプロテアーゼ阻害剤である4-（2-アミノエチル）ベンゼンスル

ホニルフルオリド塩酸塩を示し、「E-64」はシステインプロテアーゼ阻害剤を示し、「GzmB」はグランザイムBを示し、「OVA」はオブアルブミンを示し、「Pa.」はパパインを示し、「Asp.」はアスペルギルス属菌体を示し、「H. D. M.」は室内塵ダニを示す。

[0156] グランザイムAは100～2500mMの濃度で使用した。また、グランザイムBは100～2500mMの濃度で使用した。また、OVAは5mg/mLの濃度で使用した。また、パパインは10μg/mLの濃度で使用した。また、アスペルギルス属菌体は3.2μg/mLの濃度で使用した。また、室内塵ダニは400μg/mLの濃度で使用した。また、AEBSFは5mMの濃度で使用した。また、E-64は50μMの濃度で使用した。

[0157] その結果、グランザイムAをヒトIL-33に添加した場合に、切断されたIL-33がグランザイムAの濃度依存的に増加したことが明らかとなった。更に、グランザイムAにセリンプロテアーゼ阻害剤を添加すると、切断されたIL-33のバンドが消失することが明らかとなった。この結果は、グランザイムAがヒトIL-33を切断することを示す。

[0158] 以上実験例4～6の結果から、グランザイムAがアレルギー性気道炎症の病態に関わっていることが明らかとなった。また、グランザイムAはIL-33を切断することが明らかとなった。

### 産業上の利用可能性

[0159] 本発明によれば、IL-33関連疾患を効果的に予防又は治療する技術を提供することができる。

### 請求の範囲

- [請求項1] Ubiquitin Specific Peptidase 7 (USP7) 阻害剤を有効成分とする、インターロイキン (IL) - 33 関連疾患の予防又は治療剤。
- [請求項2] 前記 IL - 33 関連疾患が、アレルギー性気道炎症、好酸球性副鼻腔炎又は好酸球性食道炎である、請求項 1 に記載の予防又は治療剤。
- [請求項3] 前記アレルギー性気道炎症が、好酸球性喘息である、請求項 2 に記載の予防又は治療剤。
- [請求項4] 前記 USP7 阻害剤が、USP7 遺伝子に対する阻害性核酸である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。
- [請求項5] グランザイム A 発現抑制剤である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。
- [請求項6] IL - 33 活性化抑制剤である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。
- [請求項7] グランザイム A 阻害剤を有効成分とする、IL - 33 関連疾患の予防又は治療剤。
- [請求項8] グランザイム A 阻害剤を有効成分とする、IL - 33 活性化抑制剤。
- [請求項9] 被験物質の存在下で USP7 タンパク質の活性を測定する工程を含み、  
前記活性が、前記被験物質の非存在下における USP7 タンパク質の活性と比較して低下したことが、前記被験物質が IL - 33 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、IL - 33 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法。
- [請求項10] 被験物質の存在下でグランザイム A タンパク質及び IL - 33 タンパク質をインキュベートする工程と、  
切断された前記 IL - 33 タンパク質を定量する工程と、を含み、  
切断された前記 IL - 33 タンパク質の量が前記被験物質の非存在

下における切断された前記 I L - 3 3 タンパク質の量と比較して減少したことが、前記被験物質が I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、 I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法。

[請求項11] 被験物質の存在下で T h 2 細胞を培養する工程と、  
前記 T h 2 細胞によるグランザイム A 遺伝子又はタンパク質の発現量を測定する工程と、を含み、  
前記発現量が、前記被験物質の非存在下におけるグランザイム A 遺伝子又はタンパク質の発現量と比較して低下したことが、前記被験物質が I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、 I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法。

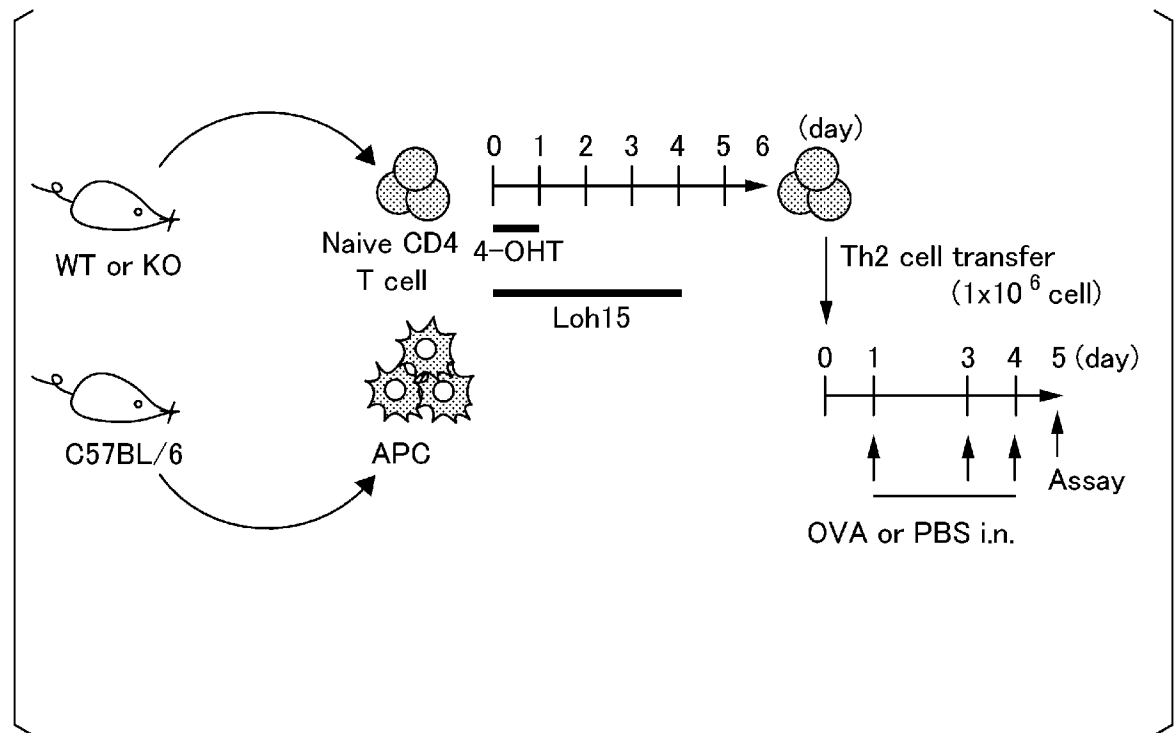
[請求項12] 被験物質の存在下で T h 2 細胞を培養する工程と、  
前記 T h 2 細胞による U S P 7 遺伝子又はタンパク質の発現量を測定する工程と、を含み、  
前記発現量が、前記被験物質の非存在下における U S P 7 遺伝子又はタンパク質の発現量と比較して低下したことが、前記被験物質が I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、 I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法。

[請求項13] 被験物質の存在下で T h 2 細胞を培養する工程と、  
前記 T h 2 細胞のグランザイム A 遺伝子座におけるユビキチン化されたヒストン H 2 A の量を測定する工程と、を含み、  
前記ユビキチン化されたヒストン H 2 A の量が、前記被験物質の非存在下におけるユビキチン化されたヒストン H 2 A の量と比較して増加したことが、前記被験物質が I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤であることを示す、 I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法。

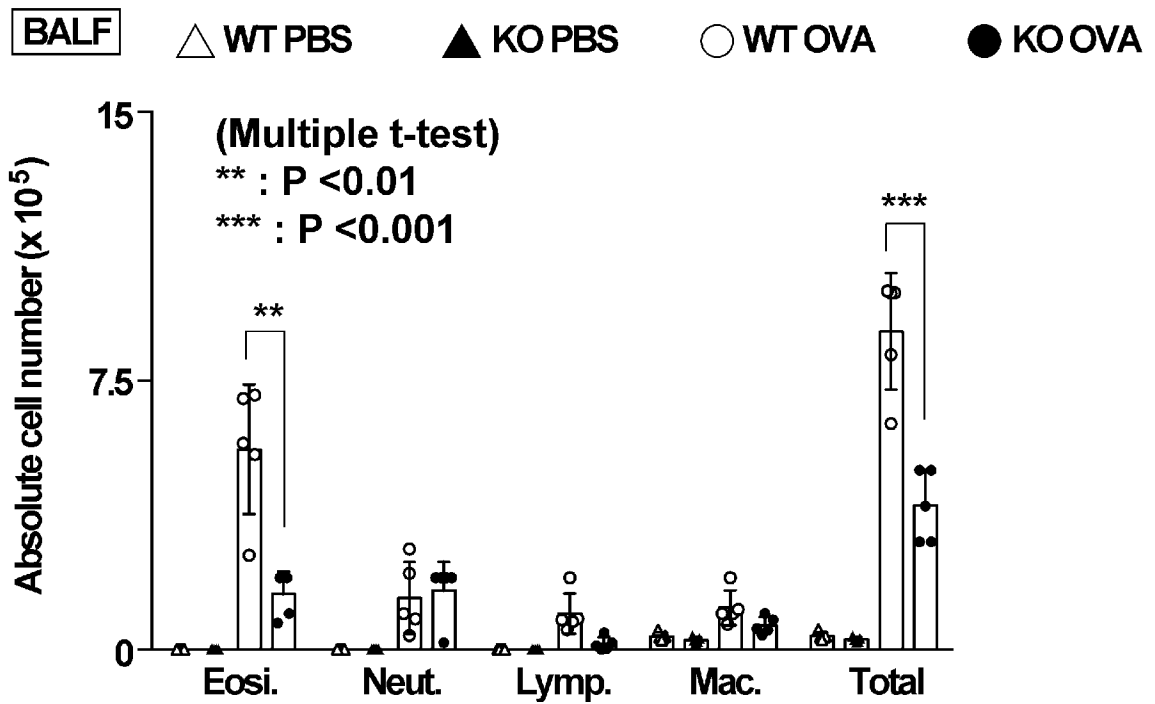
[請求項14] U S P 7 阻害剤の有効量を、治療を必要とする患者に投与する工程を含む、 I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療方法。

- [請求項15] 前記 I L - 3 3 関連疾患が、アレルギー性気道炎症、好酸球性副鼻腔炎又は好酸球性食道炎である、請求項 1 4 に記載の予防又は治療方法。
- [請求項16] 前記アレルギー性気道炎症が、好酸球性喘息である、請求項 1 5 に記載の予防又は治療方法。
- [請求項17] 前記 U S P 7 阻害剤が、U S P 7 遺伝子に対する阻害性核酸である、請求項 1 4 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の予防又は治療方法。
- [請求項18] I L - 3 3 関連疾患の予防又は治療のための U S P 7 阻害剤。
- [請求項19] 前記 I L - 3 3 関連疾患が、アレルギー性気道炎症、好酸球性副鼻腔炎又は好酸球性食道炎である、請求項 1 8 記載の U S P 7 阻害剤。
- [請求項20] 前記アレルギー性気道炎症が、好酸球性喘息である、請求項 1 9 記載の U S P 7 阻害剤。
- [請求項21] U S P 7 遺伝子に対する阻害性核酸である、請求項 1 8 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の U S P 7 阻害剤。
- [請求項22] I L - 3 3 関連疾患の予防剤又は治療剤を製造するための U S P 7 阻害剤の使用。
- [請求項23] 前記 I L - 3 3 関連疾患が、アレルギー性気道炎症、好酸球性副鼻腔炎又は好酸球性食道炎である、請求項 2 2 記載の使用。
- [請求項24] 前記アレルギー性気道炎症が、好酸球性喘息である、請求項 2 3 記載の使用。
- [請求項25] 前記 U S P 7 阻害剤が、U S P 7 遺伝子に対する阻害性核酸である、請求項 2 2 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の使用。

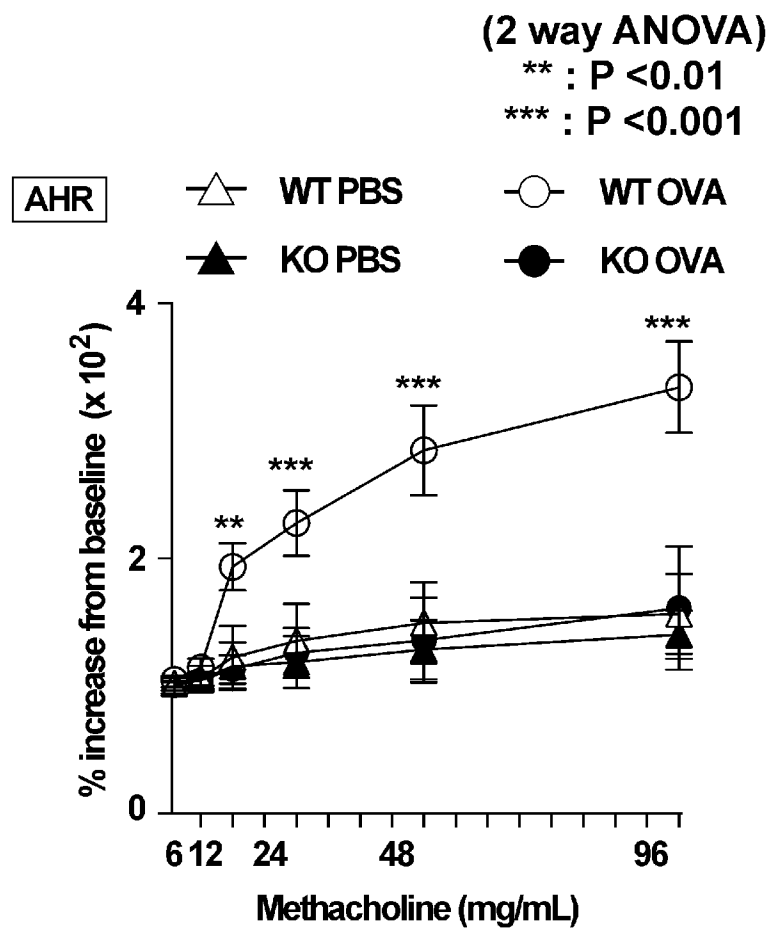
[図1]



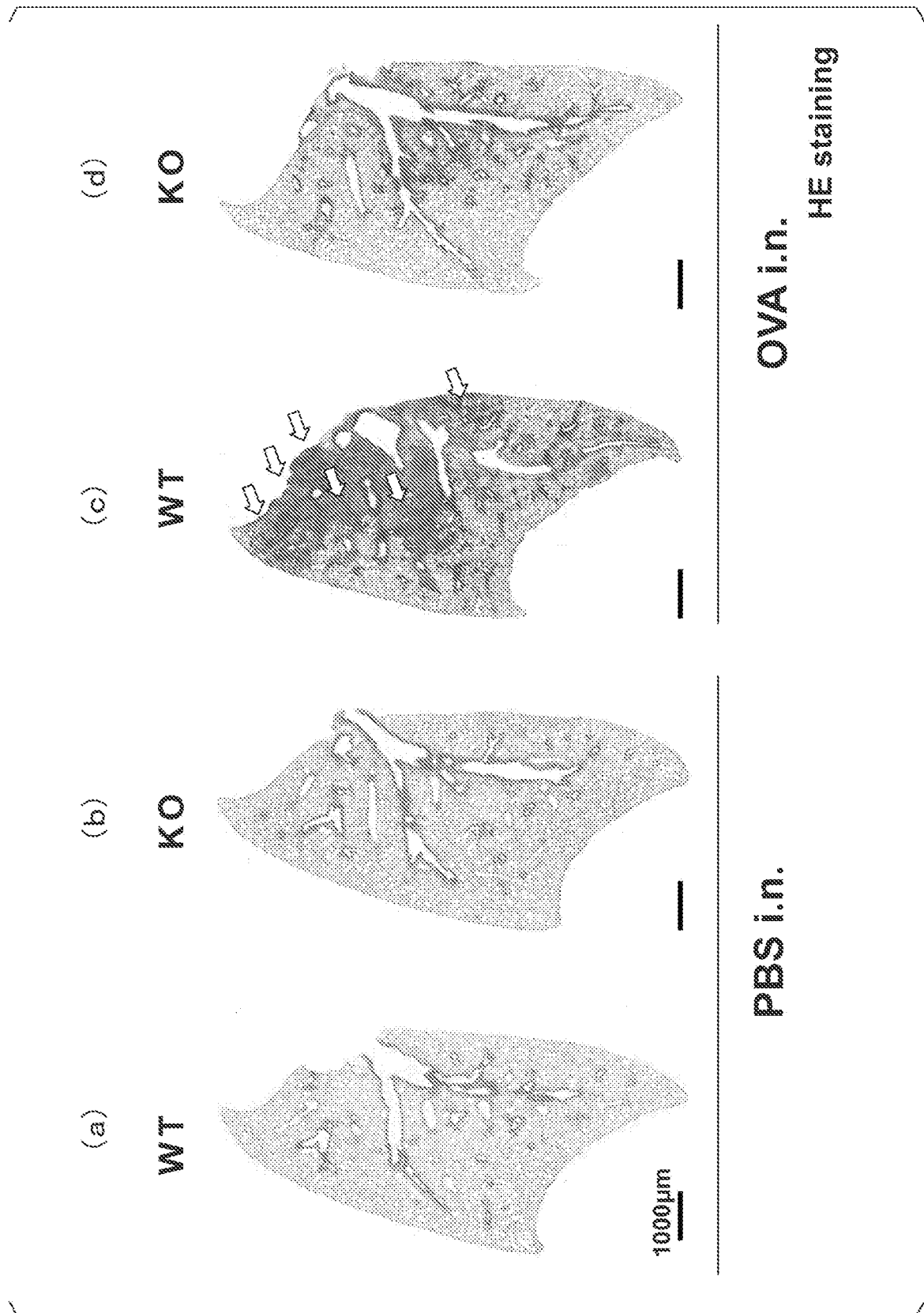
[図2]



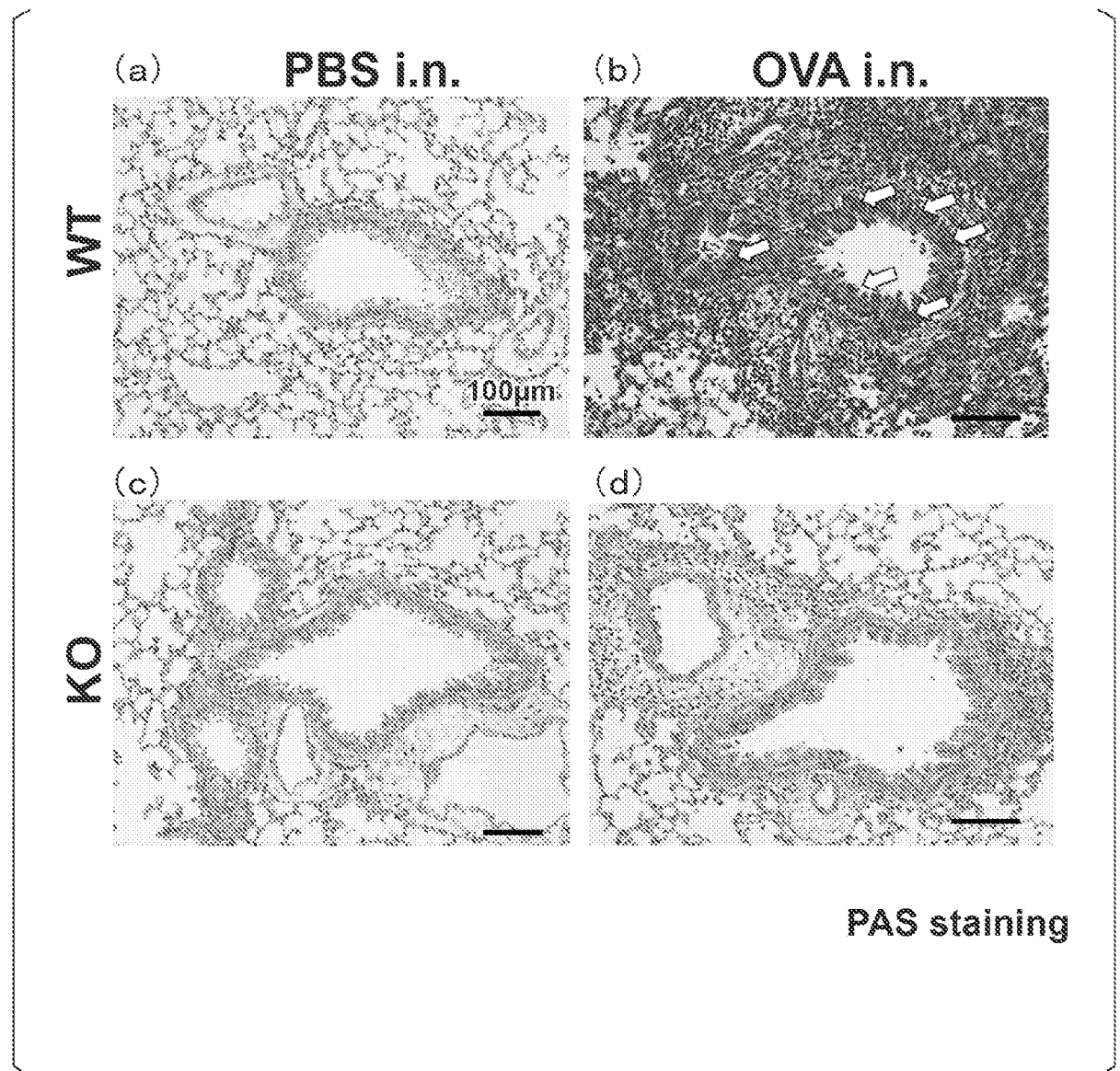
[図3]



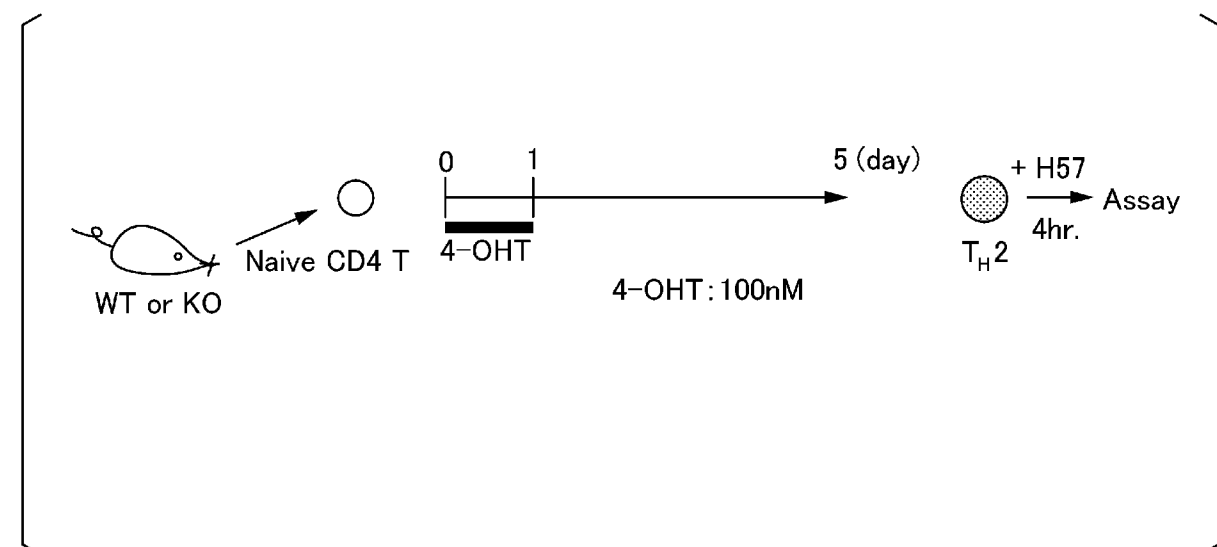
[図4]



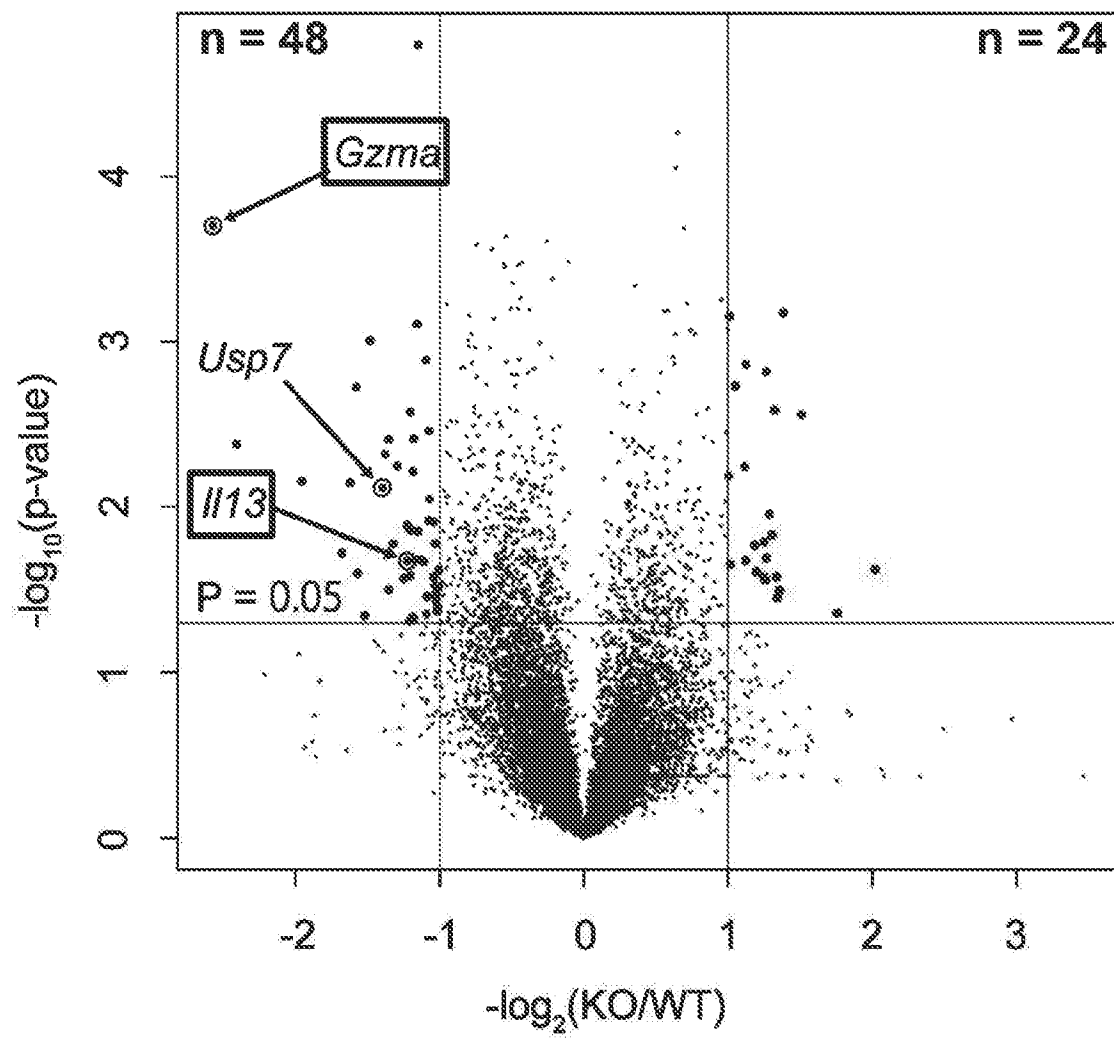
[図5]



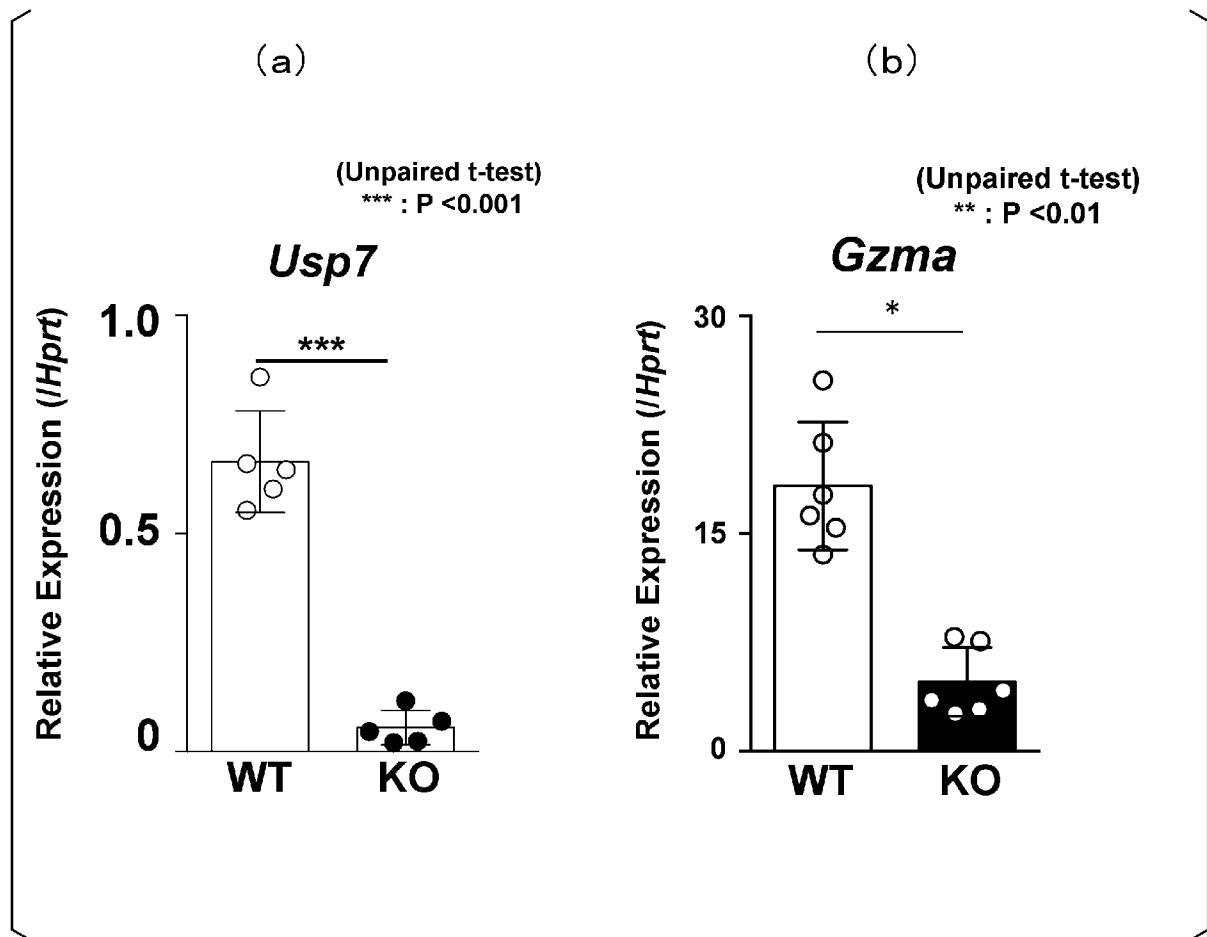
[図6]



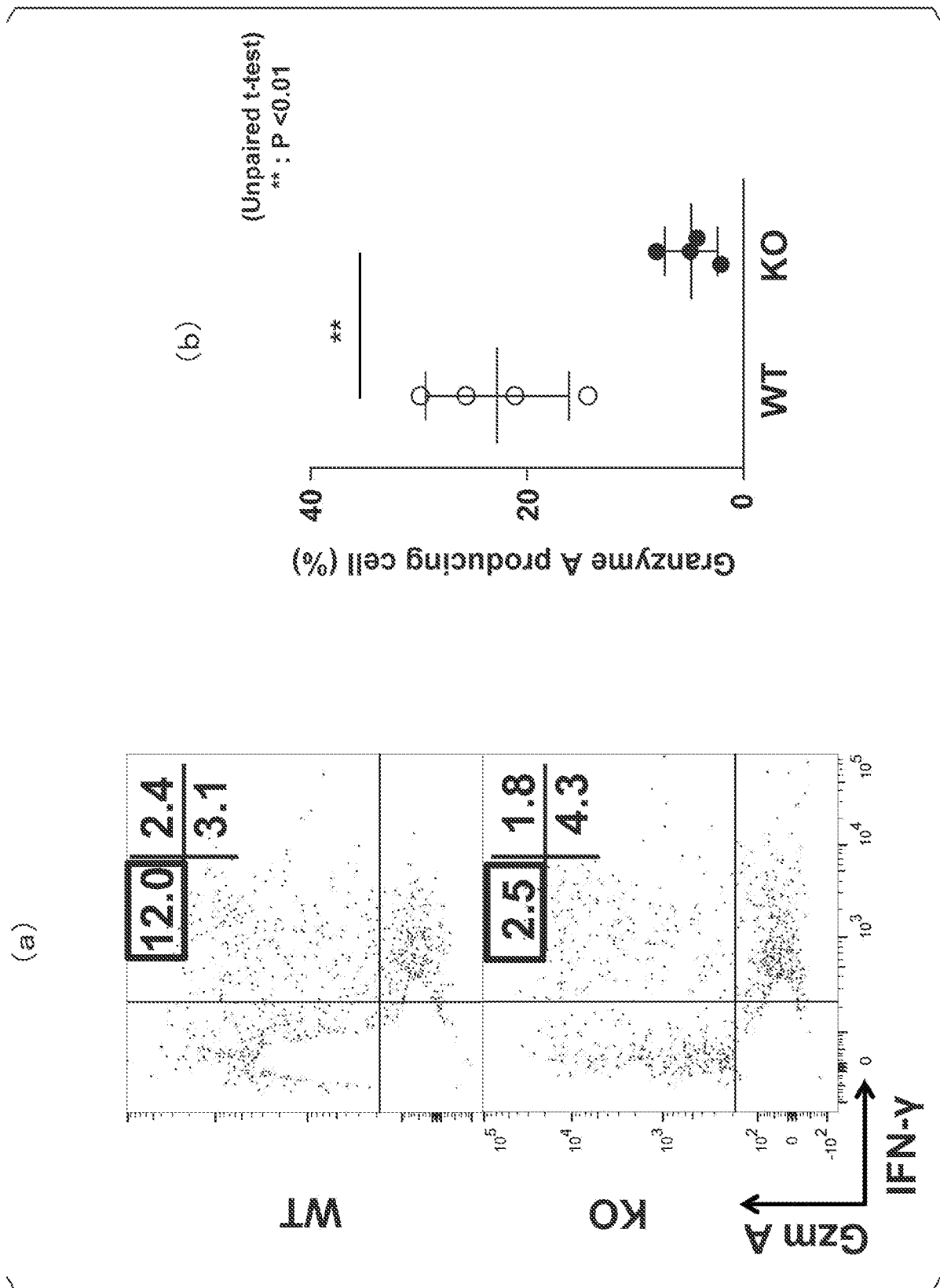
[図7]



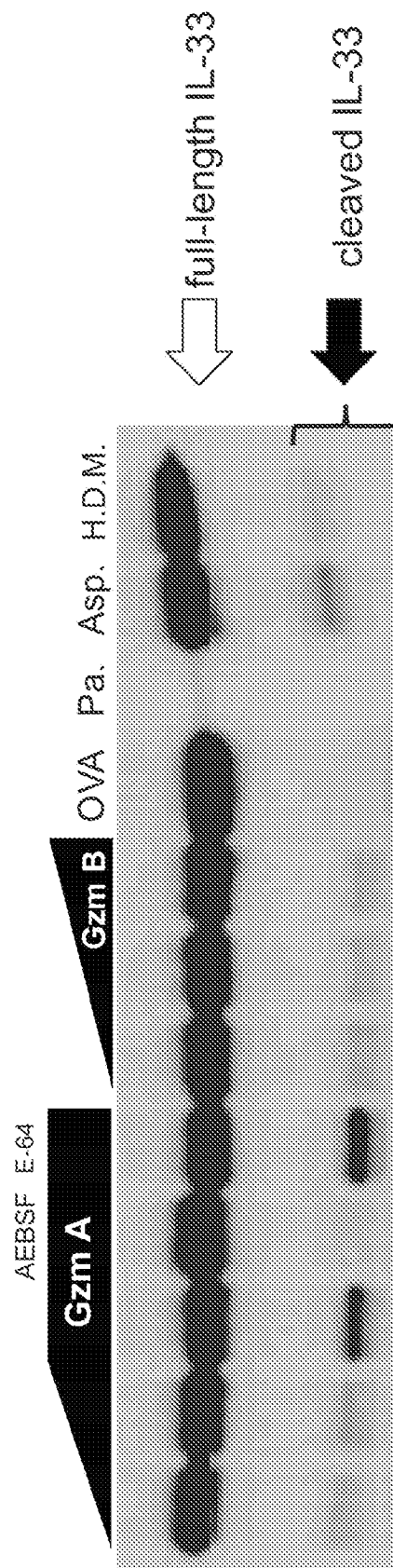
[図8]



[図9]



[図10]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/012841

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 45/00(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 11/02(2006.01)i; A61P 11/06(2006.01)i; A61P 37/08(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i; C12Q 1/6851(2018.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i; GOIN 33/15(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i  
 FI: A61K45/00 ZNA; A61P11/00; A61P11/02; A61P37/08; A61P11/06; A61K31/7088; A61P43/00 111; A61K48/00; C12Q1/68; C12Q1/02; C12Q1/6869 Z; C12Q1/686 Z; C12Q1/6851 Z; G01N33/15 Z

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)

A61K45/00; A61K48/00; A61P11/00; A61P11/02; A61P11/06; A61P37/08; A61P43/00; C12Q1/02; C12Q1/68; C12Q1/6851; C12Q1/686; C12Q1/6869; G01N33/15; A61K31/7088

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

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| Published examined utility model applications of Japan   | 1922-1996 |
| Published unexamined utility model applications of Japan | 1971-2020 |
| Registered utility model specifications of Japan         | 1996-2020 |
| Published registered utility model applications of Japan | 1994-2020 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                           | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | SU, D. et al., "Ubiquitin-specific protease 7 sustains DNA damage response and promotes cervical carcinogenesis", J Clin Invest, 2018, vol. 128, no. 10, pp. 4280-96, ISSN 0021-9738, p. 4286, left column, fig. 3-6, 8, suppl. file 3, etc. | 18-21                 |
| A         | p. 4286, left column, fig. 3-6, 8, suppl. file 3, etc.                                                                                                                                                                                       | 1-5, 7-17, 22-25      |

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

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "I" 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                                              |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                                                                | "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                                                                     |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date                                                                               | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "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) | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                    |
| "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                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                  |

Date of the actual completion of the international search  
10 June 2020 (10.06.2020)

Date of mailing of the international search report  
23 June 2020 (23.06.2020)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
  
Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/012841

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                    | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | KATEGAYA, L. et al., "USP7 small-molecule inhibitors interfere with ubiquitin binding", Nature, 2017, vol. 550, pp. 534-8, ISSN 0028-0836, abstract, fig. 3, etc.                                                                                     | 18-21                 |
| A         | abstract, fig. 3, etc.                                                                                                                                                                                                                                | 1-5, 7-10, 22-25      |
| X         | TURNBULL, A. P. et al., "Molecular basis of USP7 inhibition by selective small-molecule inhibitors", Nature, 2017, vol. 550, pp. 481-6, ISSN 0028-0836, abstract, fig. 1, etc.                                                                        | 18-21                 |
| A         | abstract, fig. 1, etc.                                                                                                                                                                                                                                | 1-5, 7-10, 22-25      |
| X         | GAVORY, G. et al., "Discovery and characterization of highly potent and selective allosteric USP7 inhibitors", Nat Chem Biol, 2018, vol. 14, pp. 118-25, ISSN 1552-4450, abstract, table 1, etc.                                                      | 18-21                 |
| A         | abstract, table 1, etc.                                                                                                                                                                                                                               | 1-5, 7-10, 22-25      |
| X         | WU, J. et al., "Chemical Approaches to Intervening in Ubiquitin Specific Protease 7 (USP7) Function for Oncology and Immune Oncology Therapies", J Med Chem, 2018, vol. 61, pp. 422-43, ISSN 0022-2623, abstract, fig. 8-13, etc.                     | 18-21                 |
| A         | abstract, fig. 8-13, etc.                                                                                                                                                                                                                             | 1-5, 7-10, 22-25      |
| X         | TIAN, X. et al., "Characterization of Selective Ubiquitin and Ubiquitin-Like Protease Inhibitors Using a Fluorescence-Based Multiplex Assay Format", Assay Drug Dev Technol, 2011, vol. 9, no. 2, pp. 165-73, ISSN 1540-658X, abstract, table 1, etc. | 18-21                 |
| A         | abstract, table 1, etc.                                                                                                                                                                                                                               | 1-5, 7-10, 22-25      |
| X         | ALTUN, M. et al., "Activity-Based Chemical Proteomics Accelerates Inhibitors Development for Deubiquitylating Enzymes", Chem Biol, 2011, vol. 18, pp. 1401-12, ISSN 1074-5521, abstract, fig. 1, etc.                                                 | 18-21                 |
| A         | abstract, fig. 1, etc.                                                                                                                                                                                                                                | 1-5, 7-10, 22-25      |
| X         | COLLAND, F. et al., "Small-molecule inhibitor of USP7/HAUSP ubiquitin protease stabilizes and activates p53 in cells", Mol Cancer Ther, 2009, vol. 8, no. 8, pp. 2286-95, ISSN 1535-7163, abstract, fig. 1, etc.                                      | 18-21                 |
| A         | abstract, fig. 1, etc.                                                                                                                                                                                                                                | 1-5, 7-10, 22-25      |
| X         | REVERDY, C. et al., "Discovery of Specific Inhibitors of Human USP7/HAUSP deubiquitinating Enzyme", Chem Biol, 2012, vol. 19, pp. 467-77, ISSN 1074-5521, abstract, fig. 1, etc.                                                                      | 18-21                 |
| A         | abstract, fig. 1, etc.                                                                                                                                                                                                                                | 1-5, 7-10, 22-25      |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/012841

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                             | Relevant to claim No.           |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| X         | WEINSTOCK, J. et al., "Selective Dual Inhibitors of the Cancer-Related Deubiquitylating Protease USP7 and USP47", ACS Med Chem Lett, 2012, vol. 3, pp. 789-92, ISSN 1948-5875, abstract, table 1, etc.         | 18-21                           |
| A         | etc. abstract, table 1, etc.                                                                                                                                                                                   | 1-5, 7-10, 22-25                |
| X         | CHEN, C. et al., "Synthesis and biological evaluation of thiazole derivatives as novel USP7 inhibitors", Bioorg Med Chem Lett, 2017, vol. 27, pp. 845-9, ISSN 0960-894X, abstract, table 1, etc.               | 18-21                           |
| A         | abstract, table 1, etc.                                                                                                                                                                                        | 1-5, 7-10, 22-25                |
| X         | KEMP, M., "Recent Advances in the Discovery of Deubiquitinating Enzyme Inhibitors", Prog Med Chem, 2016, vol. 55, pp. 149-92, ISSN 0079-6468, abstract, fig. 14-16, etc.                                       | 18-21                           |
| A         | abstract, fig. 14-16, etc.                                                                                                                                                                                     | 1-5, 7-10, 22-25                |
| X         | HOLGADO, A. et al., "IL-33trap is a novel IL-33-neutralizing biologic that inhibits allergic airway inflammation", J Allergy Clin Immunol, 13 March 2019, vol. 144, pp. 204-15, ISSN 0091-6749, abstract, etc. | 6                               |
| A         | abstract, etc.                                                                                                                                                                                                 | 1-5, 7-17, 22-25                |
| O, X      | 熊谷仁, 脱ユビキチン化酵素 USP7 はアレルギー性気道炎症を制御する, 千葉医学雑誌, 10 June 2019, vol. 95, pp. 93-6, ISSN 0303-5476, p. 96, column 30, entire text                                                                                   | 1-3, 9, 12, 14-16, 18-20, 22-24 |
| O, Y      | p. 96, column 30, entire text                                                                                                                                                                                  | 4-8, 17, 21, 25                 |
| O, A      | p. 96, column 30, entire text, (KUMAGAI, Hitoshi, "A deubiquitinating enzyme, USP7 regulates allergic airway inflammation", Chiba medical journal)                                                             | 10, 11, 13                      |

| <p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 45/00(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 11/02(2006.01)i; A61P 11/06(2006.01)i; A61P 37/08(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i; C12Q 1/6851(2018.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i</p> <p>FI: A61K45/00 ZNA; A61P11/00; A61P11/02; A61P37/08; A61P11/06; A61K31/7088; A61P43/00 111; A61K48/00; C12Q1/68; C12Q1/02; C12Q1/6869 Z; C12Q1/686 Z; C12Q1/6851 Z; G01N33/15 Z</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                    |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|---|---------------------|------------------|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|---|---------------------|------------------|
| <p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K45/00; A61K48/00; A61P11/00; A61P11/02; A61P11/06; A61P37/08; A61P43/00; C12Q1/02; C12Q1/68; C12Q1/6851; C12Q1/686; C12Q1/6869; G01N33/15; A61K31/7088</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2020年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                    |                  | 日本国実用新案公報       | 1922-1996年                                                      | 日本国公開実用新案公報                     | 1971-2020年                                      | 日本国実用新案登録公報                                                                                                                                                                        | 1996-2020年                                                          | 日本国登録実用新案公報                                                   | 1994-2020年                              |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| 日本国実用新案公報                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 1922-1996年                                                                                                                                                                         |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| 日本国公開実用新案公報                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1971-2020年                                                                                                                                                                         |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| 日本国実用新案登録公報                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1996-2020年                                                                                                                                                                         |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| 日本国登録実用新案公報                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1994-2020年                                                                                                                                                                         |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| <p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の<br/>カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する<br/>請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>SU, D. et al., Ubiquitin-specific protease 7 sustains DNA damage response and promotes cervical carcinogenesis, J Clin Invest, 2018, Vol. 128, No. 10, pp. 4280-96, ISSN 0021-9738</td> <td>18-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>p. 4286左欄、Fig. 3-6, 8, Suppl. File 3, 等</td> <td>1-5, 7-17, 22-25</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>KATEGAYA, L. et al., USP7 small-molecule inhibitors interfere with ubiquitin binding, Nature, 2017, Vol. 550, pp. 534-8, ISSN 0028-0836</td> <td>18-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Abstract, Fig. 3, 等</td> <td>1-5, 7-17, 22-25</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>TURNBULL, A.P. et al., Molecular basis of USP7 inhibition by selective small-molecule inhibitors, Nature, 2017, Vol. 550, pp. 481-6, ISSN 0028-0836</td> <td>18-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Abstract, Fig. 1, 等</td> <td>1-5, 7-17, 22-25</td> </tr> </tbody> </table> |                                                                                                                                                                                    |                  | 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                               | 関連する<br>請求項の番号                  | X                                               | SU, D. et al., Ubiquitin-specific protease 7 sustains DNA damage response and promotes cervical carcinogenesis, J Clin Invest, 2018, Vol. 128, No. 10, pp. 4280-96, ISSN 0021-9738 | 18-21                                                               | A                                                             | p. 4286左欄、Fig. 3-6, 8, Suppl. File 3, 等 | 1-5, 7-17, 22-25          | X | KATEGAYA, L. et al., USP7 small-molecule inhibitors interfere with ubiquitin binding, Nature, 2017, Vol. 550, pp. 534-8, ISSN 0028-0836 | 18-21 | A | Abstract, Fig. 3, 等 | 1-5, 7-17, 22-25 | X | TURNBULL, A.P. et al., Molecular basis of USP7 inhibition by selective small-molecule inhibitors, Nature, 2017, Vol. 550, pp. 481-6, ISSN 0028-0836 | 18-21 | A | Abstract, Fig. 1, 等 | 1-5, 7-17, 22-25 |
| 引用文献の<br>カテゴリー*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                  | 関連する<br>請求項の番号   |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | SU, D. et al., Ubiquitin-specific protease 7 sustains DNA damage response and promotes cervical carcinogenesis, J Clin Invest, 2018, Vol. 128, No. 10, pp. 4280-96, ISSN 0021-9738 | 18-21            |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | p. 4286左欄、Fig. 3-6, 8, Suppl. File 3, 等                                                                                                                                            | 1-5, 7-17, 22-25 |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | KATEGAYA, L. et al., USP7 small-molecule inhibitors interfere with ubiquitin binding, Nature, 2017, Vol. 550, pp. 534-8, ISSN 0028-0836                                            | 18-21            |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Abstract, Fig. 3, 等                                                                                                                                                                | 1-5, 7-17, 22-25 |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | TURNBULL, A.P. et al., Molecular basis of USP7 inhibition by selective small-molecule inhibitors, Nature, 2017, Vol. 550, pp. 481-6, ISSN 0028-0836                                | 18-21            |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Abstract, Fig. 1, 等                                                                                                                                                                | 1-5, 7-17, 22-25 |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                    |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| <table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>"&amp;" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                    |                  | * 引用文献のカテゴリー    | "T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの | "A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの | "X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの | "E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                                                                                                                                             | "Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの | "L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） | "&" 同一パテントファミリー文献                       | "O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 |   | "P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献                                                                                                |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| * 引用文献のカテゴリー                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | "T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの                                                                                                                    |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| "A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | "X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                                                                                                                                    |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| "E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | "Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの                                                                                                                |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| "L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | "&" 同一パテントファミリー文献                                                                                                                                                                  |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| "O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                    |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| "P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                    |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| 国際調査を完了した日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 国際調査報告の発送日                                                                                                                                                                         |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| 10.06.2020                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 23.06.2020                                                                                                                                                                         |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁(ISA/JP)<br>〒100-8915<br>日本国<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 権限のある職員（特許庁審査官）<br><br>伊藤 基章 4U 4146<br><br>電話番号 03-3581-1101 内線 3439                                                                                                              |                  |                 |                                                                 |                                 |                                                 |                                                                                                                                                                                    |                                                                     |                                                               |                                         |                           |   |                                                                                                                                         |       |   |                     |                  |   |                                                                                                                                                     |       |   |                     |                  |

| C. 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                  |                  |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                | 関連する<br>請求項の番号   |
| X               | GAVORY, G. et al., Discovery and characterization of highly potent and selective allosteric USP7 inhibitors, Nat Chem Biol, 2018, Vol. 14, pp. 118-25, ISSN 1552-4450<br>Abstract、Table 1、等                                                      | 18-21            |
| A               | Abstract、Table 1、等                                                                                                                                                                                                                               | 1-5, 7-17, 22-25 |
| X               | WU, J. et al., Chemical Approaches to Intervening in Ubiquitin Specific Protease 7 (USP7) Function for Oncology and Immune Oncology Therapies, J Med Chem, 2018, Vol. 61, pp. 422-43, ISSN 0022-2623<br>Abstract、Fig. 8-13、等                     | 18-21            |
| A               | Abstract、Fig. 8-13、等                                                                                                                                                                                                                             | 1-5, 7-17, 22-25 |
| X               | TIAN, X. et al., Characterization of Selective Ubiquitin and Ubiquitin-Like Protease Inhibitors Using a Fluorescence-Based Multiplex Assay Format, Assay Drug Dev Technol, 2011, Vol. 9, No. 2, pp. 165-73, ISSN 1540-658X<br>Abstract、Table 1、等 | 18-21            |
| A               | Abstract、Table 1、等                                                                                                                                                                                                                               | 1-5, 7-17, 22-25 |
| X               | ALTUN, M. et al., Activity-Based Chemical Proteomics Accelerates Inhibitors Development for Deubiquitylating Enzymes, Chem Biol, 2011, Vol. 18, pp. 1401-12, ISSN 1074-5521<br>Abstract、Fig. 1、等                                                 | 18-21            |
| A               | Abstract、Fig. 1、等                                                                                                                                                                                                                                | 1-5, 7-17, 22-25 |
| X               | COLLAND, F. et al., Small-molecule inhibitor of USP7/HAUSP ubiquitin protease stabilizes and activates p53 in cells, Mol Cancer Ther, 2009, Vol. 8, No. 8, pp. 2286-95, ISSN 1535-7163<br>Abstract、Fig. 1、等                                      | 18-21            |
| A               | Abstract、Fig. 1、等                                                                                                                                                                                                                                | 1-5, 7-17, 22-25 |
| X               | REVERDY, C. et al., Discovery of Specific Inhibitors of Human USP7/HAUSP deubiquitinating Enzyme, Chem Biol, 2012, Vol. 19, pp. 467-77, ISSN 1074-5521<br>Abstract、Fig. 1、等                                                                      | 18-21            |
| A               | Abstract、Fig. 1、等                                                                                                                                                                                                                                | 1-5, 7-17, 22-25 |
| X               | WEINSTOCK, J. et al., Selective Dual Inhibitors of the Cancer-Related Deubiquitylating Protease USP7 and USP47, ACS Med Chem Lett, 2012, Vol. 3, pp. 789-92, ISSN 1948-5875<br>Abstract、Table 1、等                                                | 18-21            |
| A               | Abstract、Table 1、等                                                                                                                                                                                                                               | 1-5, 7-17, 22-25 |
| X               | CHEN, C. et al., Synthesis and biological evaluation of thiazole derivatives as novel USP7 inhibitors, Bioorg Med Chem Lett, 2017, Vol. 27, pp. 845-9, ISSN 0960-894X<br>Abstract、Table 1、等                                                      | 18-21            |
| A               | Abstract、Table 1、等                                                                                                                                                                                                                               | 1-5, 7-17, 22-25 |
| X               | KEMP, M., Recent Advances in the Discovery of Deubiquitinating Enzyme Inhibitors, Prog Med Chem, 2016, Vol. 55, pp. 149-92, ISSN 0079-6468<br>Abstract、Fig. 14-16、等                                                                              | 18-21            |
| A               | Abstract、Fig. 14-16、等                                                                                                                                                                                                                            | 1-5, 7-17, 22-25 |
| X               | HOLGADO, A. et al., IL-33trap is a novel IL-33-neutralizing biologic that inhibits allergic airway inflammation, J Allergy Clin Immunol, 2019.03.13, Vol. 144, pp. 204-15, ISSN 0091-6749<br>Abstract、等                                          | 6                |
| A               | Abstract、等                                                                                                                                                                                                                                       | 1-5, 7-17, 22-25 |

| C. 関連すると認められる文献 |                                                                                                          |                                 |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                        | 関連する<br>請求項の番号                  |
| 0, X            | 熊谷仁, 脱ユビキチン化酵素USP7はアレルギー性気道炎症を制御する, 千葉医学雑誌, 2019.06.10, Vol. 95, pp. 93-6, ISSN 0303-5476<br>p.96、30欄、全文 | 1-3, 9, 12, 14-16, 18-20, 22-24 |
| 0, Y            | p.96、30欄、全文                                                                                              | 4-8, 17, 21, 25                 |
| 0, A            | p.96、30欄、全文                                                                                              | 10, 11, 13                      |

国際調査報告  
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号  
PCT/JP2020/012841

| 引用文献 | 公表日 | パテントファミリー文献 | 公表日 |
|------|-----|-------------|-----|
|      |     |             |     |