

(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
2019年12月12日(12.12.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/235581 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) C07K 16/40 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01) C12Q 1/48 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

特願 2018-167326 2018年9月6日(06.09.2018) JP
特願 2018-229845 2018年12月7日(07.12.2018) JP
特願 2019-089270 2019年5月9日(09.05.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/022582

(22) 国際出願日: 2019年6月6日(06.06.2019)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

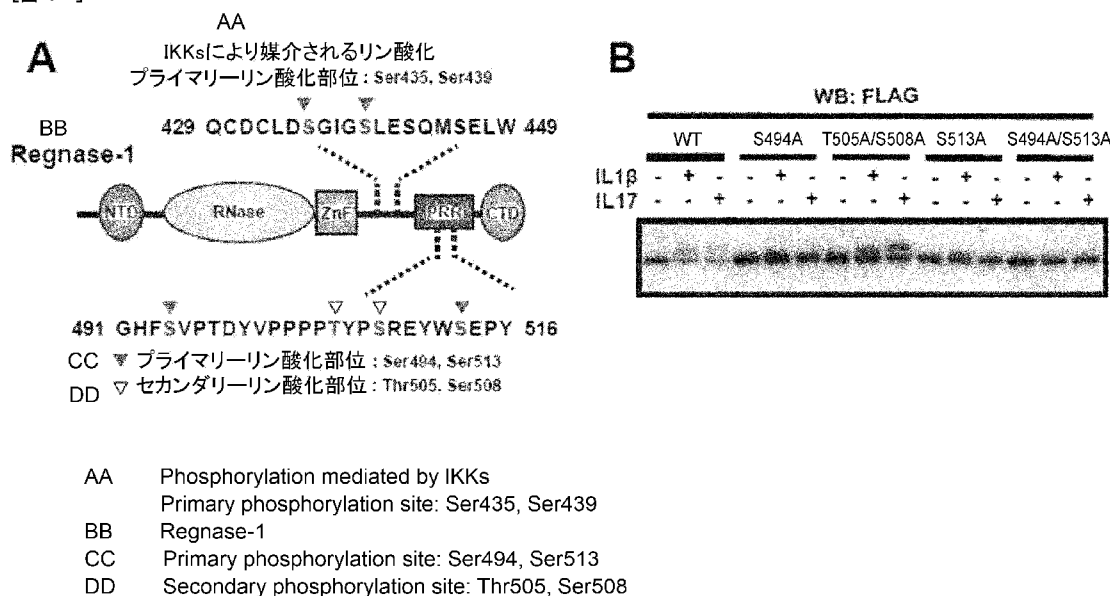
(30) 優先権データ:
特願 2018-108400 2018年6月6日(06.06.2018) JP

(72) 発明者: 審良 静男 (AKIRA, Shizuo); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 佐藤 荘 (SATO Takashi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 田中 宏樹 (TANAKA, Hiroki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 齊藤 恵子 (SAITO, Keiko); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(54) Title: METHOD FOR TREATING AND/OR PREVENTING Regnase-1-RELATED DISEASE

(54) 発明の名称: Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防方法

[図13-1]



(57) Abstract: The present inventor found that inhibition of the phosphorylation of, for example, a Ser residue in Regnase-1 is effective for treating and/or preventing a disease, etc. The present inventor also found that inhibition of the binding of, for example, at least one factor selected from the group consisting of TBK1, IKKi, Act-1, IKK and IRAK to Regnase-1 is effective for treating and/or preventing a disease, etc.

[続葉有]

〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原 2 0 0 番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 山岸 祐介 (YAMAGISHI, Yusuke); 138623 バイオポリスドライブ 3 シナプス #07-11/16 中外ファーマボディ・リサーチ・ピーティーイー・リミテッド内 Singapore (SG).

(74) 代理人: 春名 雅夫, 外(HARUNA, Masao et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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).

規則4. 17に規定する申立て:

- 一 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4. 17(ii))

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 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))

(57) 要約: 例えば、Regnase-1 における Ser 残基のリン酸化を阻害することが疾患の治療および／または予防等に有効であることを見出した。また、例えば TBK1、IKKi、Act-1、IKK および IRAK からなる群より選択される少なくとも一つの因子と Regnase-1 との結合を阻害することが疾患の治療および／または予防等に有効であることを見出した。

明 細 書

発明の名称：

Regnase-1 が関与する疾患の治療および／または予防方法

技術分野

[0001] 本発明は、Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防方法等に関する。

背景技術

[0002] Regnase-1（「Zc3h12a」または「MCPIP-1」としても知られ、本明細書においてこれらのように記載することがある。）は、CCCH型zincフィンガードメインとPIN様ドメインを持つRegnaseファミリーに属し、mRNAを認識して分解するヌクレアーゼである（非特許文献1）。Regnase-1は、インターロイキン（IL）-6やIL-12p40のmRNAを不安定化し、それらの転写後制御に関与している（非特許文献2）。マウスRegnase-1のSer（セリン）435およびSer439がIL-1 β 刺激により誘導されるI κ Bキナーゼ（IKK）によるリン酸化部位であること、これらのアミノ酸残基をAla（アラニン）に置換したRegnase-1は、IL-1 β 刺激による分解に耐性を有すること、並びに、前記アラニンに置換されたRegnase-1を発現させた細胞では、野生型のRegnase-1を発現させた細胞に比べてIL-1 β 刺激後のIL-6 mRNAの発現が抑制されることが報告されている（非特許文献3）。Regnase-1のヘテロK0マウスは、実験的自己免疫性脳脊髄炎および乾癬のモデル実験においてその病態が悪化することが報告されている（非特許文献4、5）。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Akira, S. Regnase-1, a ribonuclease involved in the regulation of immune responses. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology 78, 51-60 (2013).

非特許文献2：Matsushita, K. et al. Zc3h12a is an RNase essential for

controlling immune responses by regulating mRNA decay. Nature 458, 1185-1190 (2009).

非特許文献3: Iwasaki, H. et al. The IkappaB kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1. Nat Immunol 12, 1167-1175 (2011).

非特許文献4: Garg, A.V. et al. MCP1 Endoribonuclease Activity Negatively Regulates Interleukin-17-Mediated Signaling and Inflammation. Immunity 43, 475-487 (2015).

非特許文献5: L. Monin et al. MCP1/Regnase-1 Restricts IL-17A- and IL-17C-Dependent Skin Inflammation. J. Immunol. 198, 767-775 (2017).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0004] しかしながら、Regnase-1のリン酸化を阻害することにより、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、線維化疾患などを治療または予防する方法は知られていなかった。本発明は、一局面において、Regnase-1のリン酸化を阻害することによる疾患の治療方法等を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0005] 本発明者らは、上記課題を解決するために、Regnase-1をリン酸化し得るキナーゼを探索し、それらキナーゼによりリン酸化を受けるRegnase-1のアミノ酸残基を見出した。そして、これらのアミノ酸残基の中でも、特定の残基のリン酸化の阻害が、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、線維化疾患などの治療および／または予防に有効であることを見出し、本発明を完成するに至った。

- [0006] 本発明は、非限定の具体的な一態様において以下を包含する。

〔a 1〕 Ser残基のリン酸化をRegnase-1選択的に阻害することによる、Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防方法。

〔a 2〕 Ser残基のリン酸化をRegnase-1選択的に阻害することによる、炎症抑制方法。

〔a 3〕 Ser残基のリン酸化をRegnase-1選択的に阻害することによる、細胞、組織または臓器の線維化；または上皮の過形成を抑制する方法。

〔a 4〕 Ser残基のリン酸化をRegnase-1選択的に阻害することによる、Regnase-1の不安定化および／または細胞内での分解を抑制する方法。

〔a 5〕 前記Regnase-1の不安定化および／または細胞内での分解が、IL-17、IL-1、IL-36およびTLRリガンドからなる群より選択される少なくとも一つの分子が関与するシグナル伝達の下流におけるRegnase-1の不安定化および／または細胞内での分解である、〔a 4〕に記載の方法。

〔a 6〕 Ser残基のリン酸化をRegnase-1選択的に阻害することによる、炎症性因子の産生抑制方法。

〔a 7〕 Ser残基のリン酸化をRegnase-1選択的に阻害することによる、IL6、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つのmRNAの発現を抑制する方法。

〔a 8〕 前記Ser残基が、Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基である、〔a 1〕～〔a 7〕のいずれかに記載の方法。

〔a 9〕 前記配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置が、(i) 配列番号1の513、494、439、および435位；または、(ii) 配列番号2の516、497、442、および438位である、〔a 1〕～〔a 8〕のいずれかに記載の方法。

〔a 10〕 前記Ser残基が、Regnase-1のアミノ酸配列に含まれるYWSEP（配列番号：3）、HFSVP（配列番号：4）およびDSGIGS（配列番号：5）からなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸配列に含まれるSer残基である、〔a 1〕～〔a 9〕のいずれかに記載の方法。

〔a 11〕 前記Regnase-1が哺乳動物のRegnase-1である、〔a 1〕～〔a 10〕のいずれかに記載の方法。

〔a 12〕 前記Ser残基が以下(i)および(ii)のSer残基である、〔a 1〕～〔a 11〕のいずれかに記載の方法：

(i) Regnase-1における配列番号1の513および494位のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のSer残基；および

(i i) Regnase-1における配列番号1の439および435位のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のSer残基。

[0007] また本発明は、非限定の具体的な一態様において以下を包含する。

[A 1] TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害することによる、Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防方法。

[A 2] TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害することによる、炎症抑制方法。

[A 3] TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害することによる、細胞、組織または臓器の線維化；または上皮の過形成を抑制する方法。

[A 4] TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害することによる、Regnase-1の不安定化および／または細胞内での分解を抑制する方法。

[A 5] 前記Regnase-1の不安定化および／または細胞内での分解が、IL-17、IL-1、IL-36およびTLRリガンドからなる群より選択される少なくとも一つの分子が関与するシグナル伝達の下流におけるRegnase-1の不安定化および／または細胞内での分解である [A 4] に記載の方法。

[A 6] TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害することによる、炎症性因子の産生抑制方法。

[A 7] TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害することによる、IL6、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つのmRNAの発現を抑制する方法。

〔A 8〕 Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害する、〔A 1〕～〔A 7〕のいずれかに記載の方法。

〔A 9〕 TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子が、TBK1、IKKi、およびAct-1からなる群より選択される少なくとも一つの結合分子である、〔A 1〕～〔A 8〕のいずれかに記載の方法。

〔A 10〕 前記Regnase-1が哺乳動物のRegnase-1である、〔A 1〕～〔A 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 11〕 TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子が、TBK1およびIKKである、〔A 1〕～〔A 10〕のいずれかに記載の方法。

[0008] また本発明は、非限定の具体的な一態様において以下を包含する。

〔B 1〕 Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子を含有する、Regnase-1が関与する疾患を治療および／または予防するための組成物。

〔B 2〕 Regnase-1のアミノ酸配列に含まれるYWSEP（配列番号：3）、HFSVP（配列番号：4）およびDSGIGS（配列番号：5）からなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸配列に含まれるSer残基のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子を含有する、Regnase-1が関与する疾患を治療および／または予防するための組成物。

〔B 3〕 TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害するRegnase-1結合分子を含有する、Regnase-1が関与する疾患を治療および／または予防するための組成物。

〔B 4〕 Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残

基のリン酸化を阻害する、〔B 3〕に記載の組成物。

〔B 5〕前記Regnase-1が関与する疾患が、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、線維化疾患、およびRNAウイルス感染症からなる群より選択される少なくとも一つの疾患である、〔B 1〕～〔B 4〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 6〕前記Regnase-1が関与する疾患が、IL6、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つの因子が、疾患の形成、増悪および／または継続に関与する疾患である、〔B 1〕～〔B 5〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 7〕前記Regnase-1が関与する疾患が、IL-17、IL-1、IL-36およびTLRリガンドからなる群より選択される少なくとも一つの因子が、疾患の形成、増悪および／または継続に関与する疾患である、〔B 1〕～〔B 6〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 8〕前記Regnase-1が関与する疾患が、腎臓、肺、皮膚、血管、眼、脳および神経からなる群より選択される少なくとも一つの組織または臓器における疾患である、〔B 1〕～〔B 7〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 9〕前記Regnase-1が関与する疾患がTH17細胞関連疾患である、〔B 1〕～〔B 8〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 10〕前記Regnase-1が関与する疾患が、多発性硬化症、乾癬、強皮症、腎炎、ブドウ膜炎、肺線維症、腎臓線維症、血管線維症、ケロイド、関節リウマチ、全身性エリトマトーデス、シェーグレン症候群、肺炎、皮膚炎、血管炎、神経炎、関節炎、眼炎症、脳脊髄炎および喘息からなる群より選択される少なくとも一つの疾患である、〔B 1〕～〔B 9〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 11〕前記Regnase-1が関与する疾患が、細胞、組織または臓器の線維化を伴う疾患である、〔B 1〕～〔B 10〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 12〕前記Regnase-1が関与する疾患が、上皮の過形成を伴う疾患である、〔B 1〕～〔B 10〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 1 3〕 IL6、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つのmRNAの発現を抑制するための、〔B 1〕～〔B 1 2〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 1 4〕 炎症性因子の産生を抑制するための、〔B 1〕～〔B 1 3〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 1 5〕 Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子を含有する、炎症を抑制するための組成物。

〔B 1 6〕 Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子を含有する、細胞、組織もしくは臓器の線維化、または上皮の過形成を抑制するための組成物。

〔B 1 7〕 Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子を含有する、IL6、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つのmRNAの発現を抑制するための組成物。

〔B 1 8〕 Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子を含有する、炎症性因子の産生を抑制するための組成物。

〔B 1 9〕 前記配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置が、(i) 配列番号1の513、494、439、および435位；または、(ii) 配列番号2の516、497、442、および438位である、〔B 1〕～〔B 1 8〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 2 0〕 前記配列番号1の513および494位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害するRe

gnase-1結合分子を含有する、〔B 1〕～〔B 1 9〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 2 1〕前記配列番号1の513および494位のそれぞれに相当する位置が、（i）配列番号1の513および494位；または、（i i）配列番号2の516および497位である、〔B 2 0〕に記載の組成物。

〔B 2 2〕TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子が、TBK1、IKKi、およびAct-1からなる群より選択される少なくとも一つの結合分子である、〔B 3〕～〔B 2 1〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 2 3〕前記Regnase-1が哺乳動物のRegnase-1である、〔B 1〕～〔B 2 2〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 2 4〕Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基が、以下（i）および（i i）のSer残基である、〔B 1〕～〔B 2 3〕のいずれかに記載の組成物：

（i）Regnase-1における配列番号1の513および494位のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のSer残基；および

（i i）Regnase-1における配列番号1の439および435位のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のSer残基。

〔B 2 5〕TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子が、TBK1およびIKKである、〔B 1〕～〔B 2 4〕のいずれかに記載の組成物。

〔B 2 6〕前記Regnase-1結合分子が、〔H 1〕～〔H 2 4〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子である、〔B 1〕～〔B 2 5〕のいずれかに記載の組成物。

[0009] また本発明は、非限定の具体的な一態様において以下を包含する。

〔D 1〕配列番号1の513、494、439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を指標

とする、Regnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法。

〔D 2〕以下（a）および（b）の工程を含む、〔D 1〕に記載の方法：

（a）Regnase-1をリン酸化し得るキナーゼとRegnase-1とを被験物質の存在下で混合し、前記キナーゼによるRegnase-1のリン酸化を検出する工程；

（b）被験物質の非存在下と比較して、前記キナーゼによるRegnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定する工程。

〔D 3〕前記キナーゼが、配列番号 1 の513、494、439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基をリン酸化し得るキナーゼである、〔D 1〕又は〔D 2〕に記載の方法。

〔D 4〕前記キナーゼが、TBK1、IKKi、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つのキナーゼである、〔D 1〕～〔D 3〕のいずれかに記載の方法。

〔D 5〕前記工程（a）におけるRegnase-1のリン酸化の検出が、配列番号 1 の513、494、439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を検出し得る抗体を用いて行われる、〔D 1〕～〔D 4〕のいずれかに記載の方法。

〔D 6〕前記Regnase-1がヒトRegnase-1であり、前記配列番号 1 の513、494、439および435位のそれぞれに相当する位置が、配列番号 2 の516、497、442および438位である、〔D 1〕～〔D 5〕のいずれかに記載の方法。

〔D 7〕配列番号 1 の513および494位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を指標とする、〔D 1〕～〔D 6〕のいずれかに記載の方法。

〔D 8〕前記被験物質がRegnase-1結合分子である、〔D 2〕～〔D 7〕のいずれかに記載の方法。

[0010] また本発明は、非限定の具体的な一態様において以下を包含する。

〔E 1〕Regnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定するための組成物であって、予め定められた量のキナーゼおよびRegnase-1を含む、前記組成物。

〔E 2〕前記キナーゼがTBK1、IKKi、IKKおよびIRAKからなる群より選択され

る少なくとも一つのキナーゼである、〔E 1〕に記載の組成物。

〔E 3〕前記Regnase-1のリン酸化が、配列番号 1 の513、494、439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化である、〔E 1〕または〔E 2〕に記載の組成物。

〔E 4〕前記Regnase-1がヒトRegnase-1であり、前記配列番号 1 の513、494、439および435位のそれぞれに相当する位置が、配列番号 2 の516、497、442および438位である、〔E 1〕～〔E 3〕のいずれかに記載の組成物。

〔E 5〕前記Regnase-1のリン酸化が、配列番号 1 の513、および494位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化である、〔E 1〕～〔E 4〕のいずれかに記載の組成物。

〔E 6〕さらにRegnase-1結合分子を含む、〔E 1〕～〔E 5〕のいずれかに記載の組成物。

[0011] また本発明は、非限定の具体的な一態様において以下を包含する。

〔F 1〕以下（a）および（b）の工程を含む、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害する物質を特定するための方法：

（a）TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子と Regnase-1 とを被験物質の存在下で混合し、前記結合分子とRegnase-1との結合活性を測定する工程；

（b）被験物質の非存在下と比較して、前記結合分子とRegnase-1との結合活性を低減させ得る物質を特定する工程。

〔F 2〕TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子が、TBK1、IKKi、およびAct-1からなる群より選択される少なくとも一つの結合分子である、〔F 1〕に記載の方法。

〔F 3〕TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害する物質を特定するための組成物であって、予め定められた量の結合分子およびRegnase-1を含む、前記組成物。

〔F 4〕〔D 1〕～〔D 8〕のいずれかに記載の方法と〔F 1〕または〔F 2〕に記載の方法を含む、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害し、Regnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法。

〔F 5〕前記被験物質がRegnase-1結合分子である、〔F 1〕、〔F 2〕および〔F 4〕のいずれかに記載の方法。

[0012] また本発明は、非限定の具体的な一態様において以下を包含する。

〔G 1〕配列番号 1 の513、494、439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基がリン酸化されたRegnase-1を特異的に認識する抗体。

〔G 2〕配列番号 1 の513および494位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基がリン酸化されたRegnase-1を特異的に認識する抗体。

〔G 3〕配列番号 1 の513位に相当するSer残基がリン酸化されたRegnase-1を特異的に認識する抗体。

〔G 4〕配列番号 1 の439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基がリン酸化されたRegnase-1を特異的に認識する抗体。

〔G 5〕配列番号 1 の439および435位のそれぞれに相当する位置のSer残基がリン酸化されたRegnase-1を特異的に認識する抗体。

〔G 6〕配列番号 2 の516、497、442および438位から選択される少なくとも一つの位置のSer残基がリン酸化されたヒトRegnase-1を特異的に認識する抗体。

〔G 7〕配列番号 2 の516および497位から選択される少なくとも一つの位置のSer残基がリン酸化されたヒトRegnase-1を特異的に認識する抗体。

〔G 8〕配列番号 2 の516位のSer残基がリン酸化されたヒトRegnase-1を特異的に認識する抗体。

〔G 9〕配列番号 2 の442および438位から選択される少なくとも一つの位置

のSer残基がリン酸化されたヒトRegnase-1を特異的に認識する抗体。

〔G 1 0〕 配列番号 2 の442および438位のSer残基がリン酸化されたヒトRegnase-1を特異的に認識する抗体。

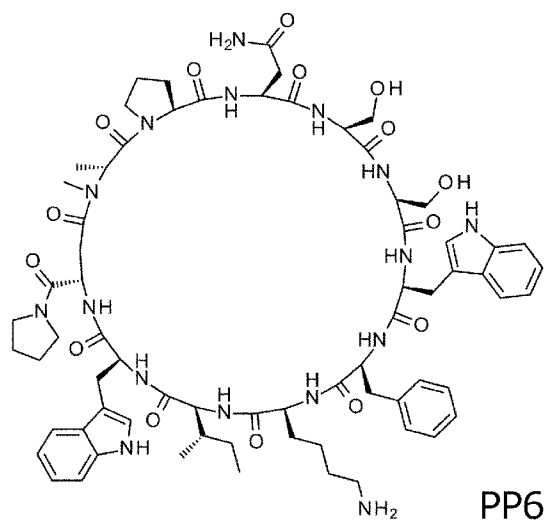
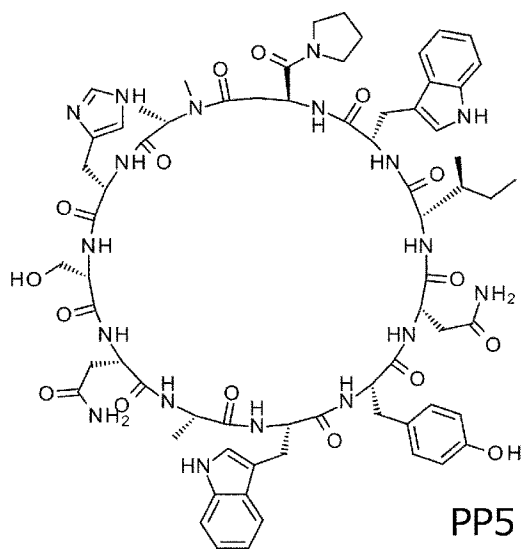
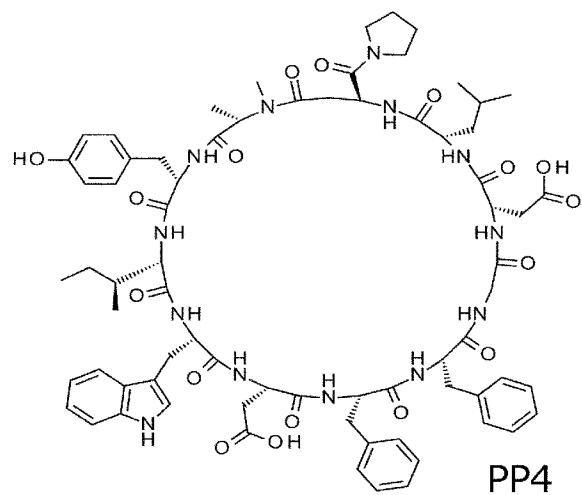
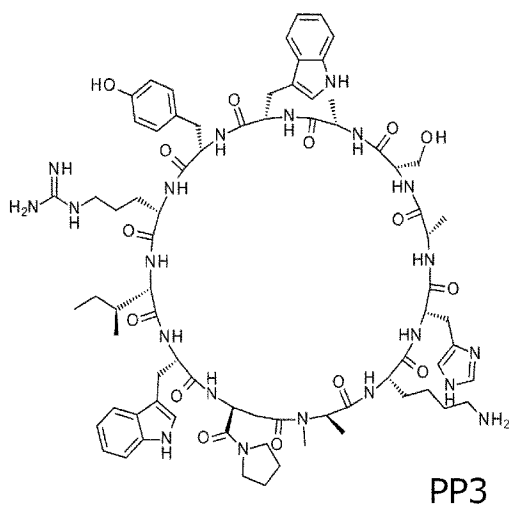
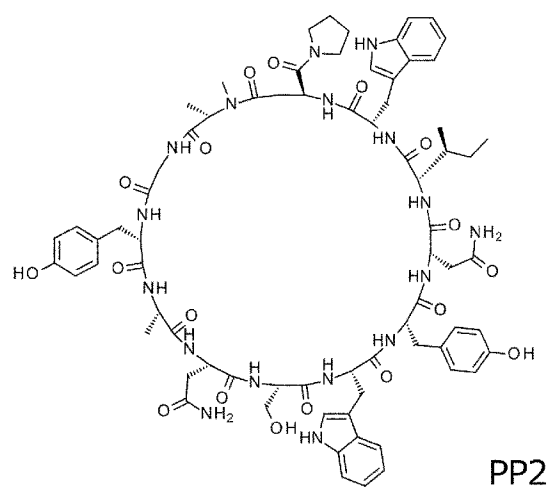
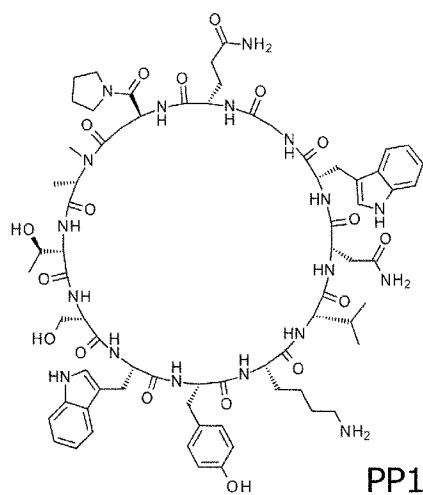
〔G 1 1〕 ヒトRegnase-1およびマウスRegnase-1のいずれにも結合できる、

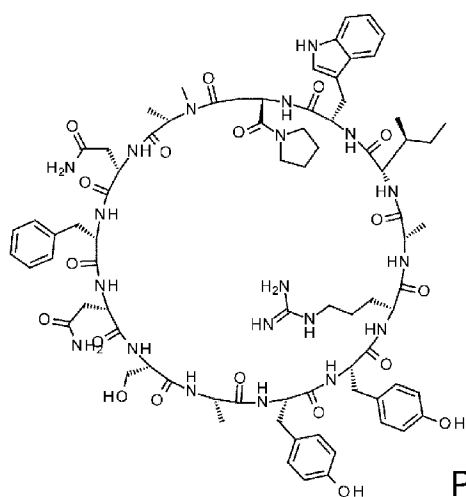
〔G 1〕 ～ 〔1 0〕 のいずれかに記載の抗体。

[0013] また本発明は、非限定の具体的な一態様において以下を包含する。

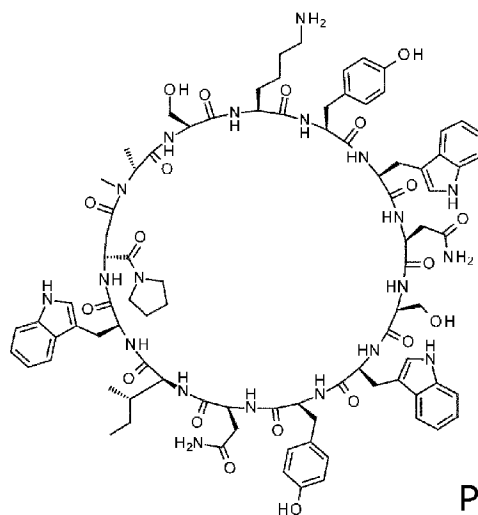
〔H 1〕 Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子。

〔H 2〕 Regnase-1への結合について、以下のPP1～PP25、PP7+tag、PP10+tagおよびPP23+tag：

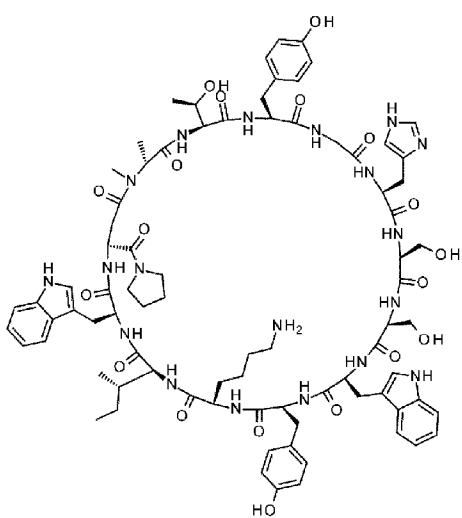




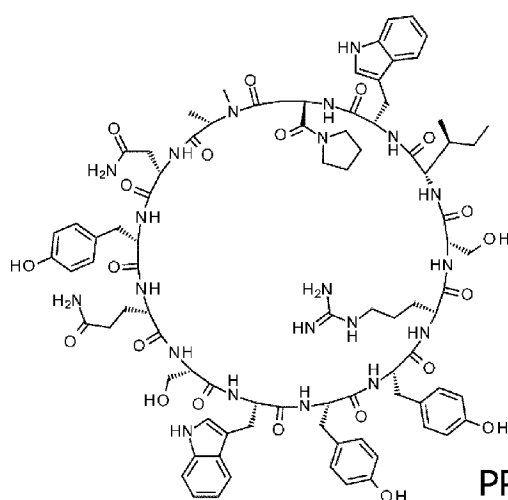
PP7



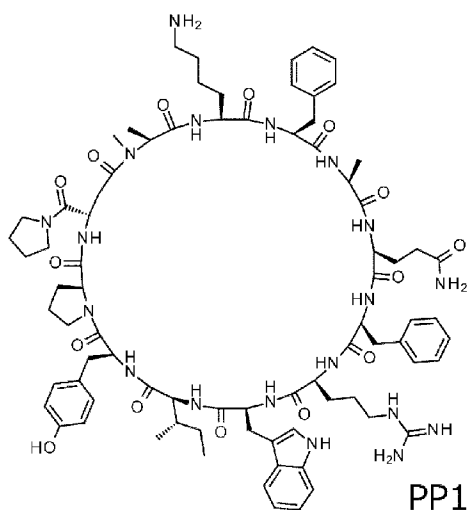
PP8



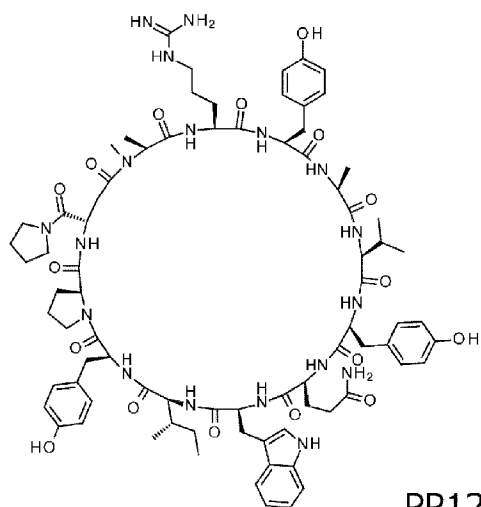
PP9



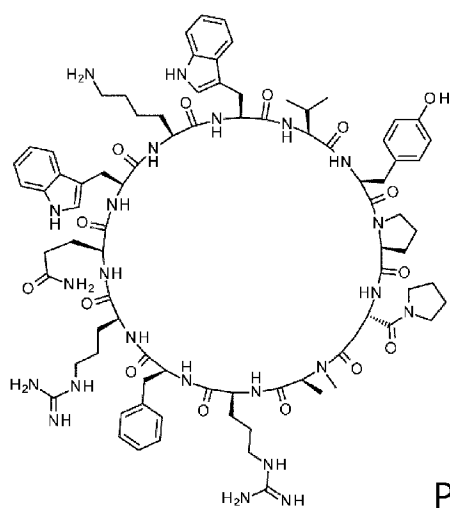
PP10



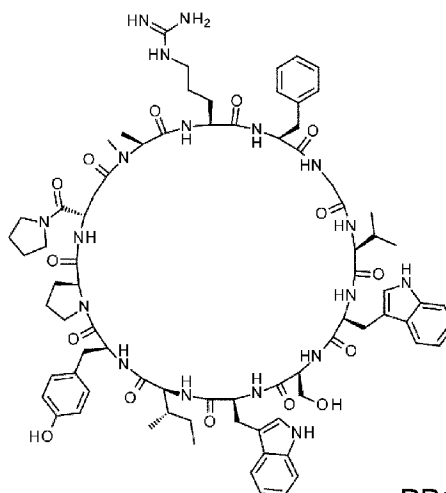
PP11



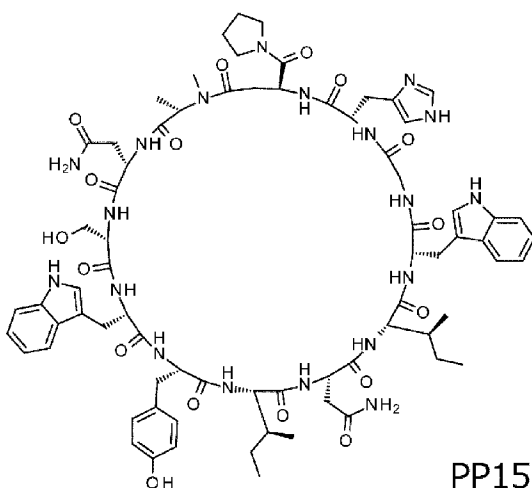
PP12



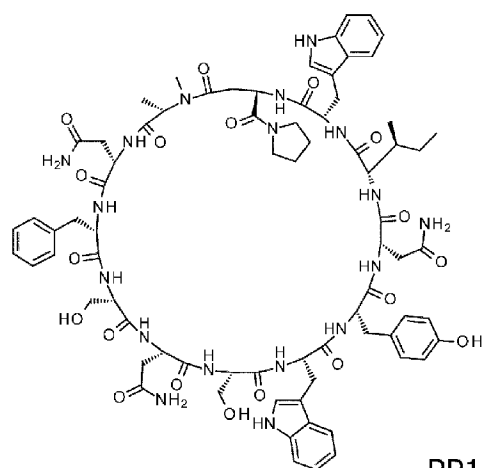
PP13



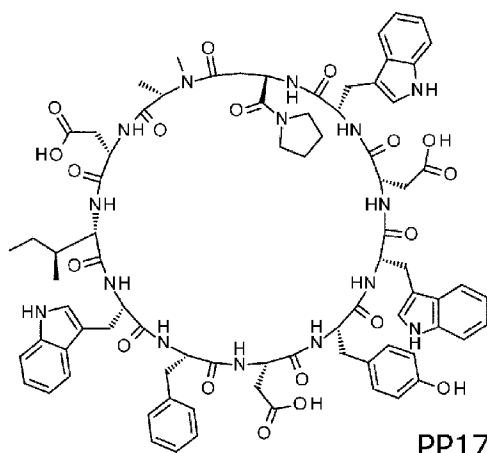
PP14



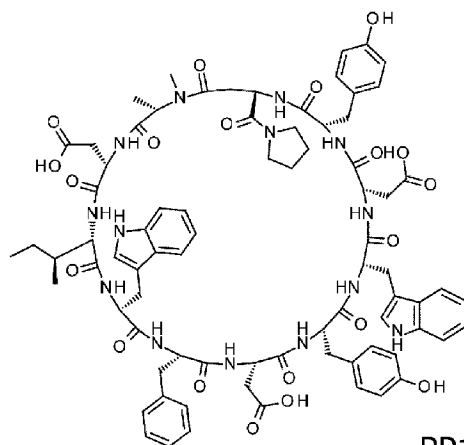
PP15



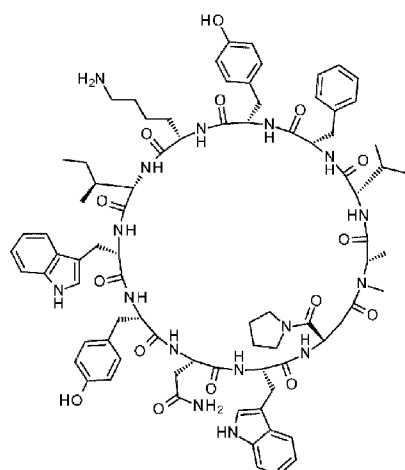
PP16



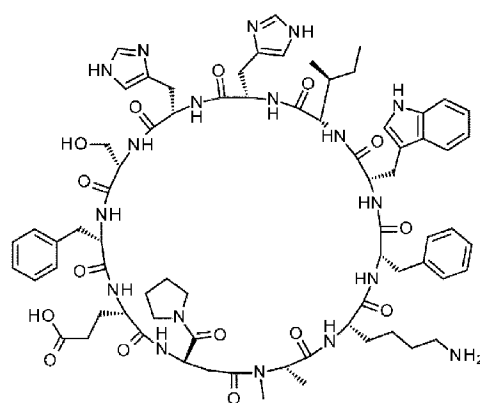
PP17



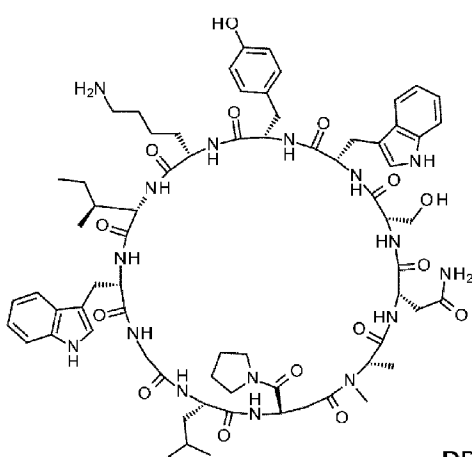
PP18



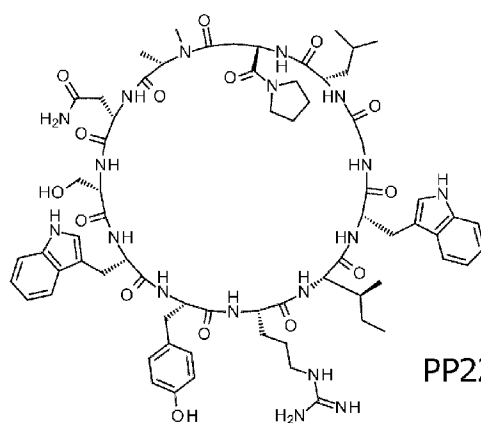
PP19



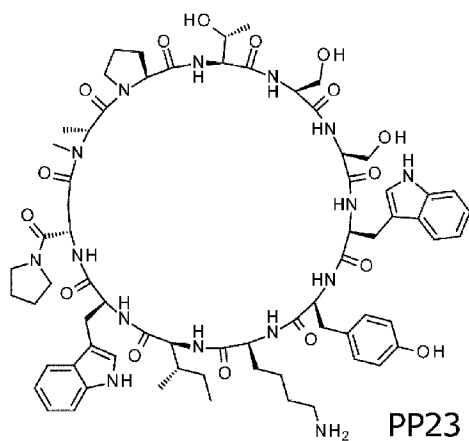
PP20



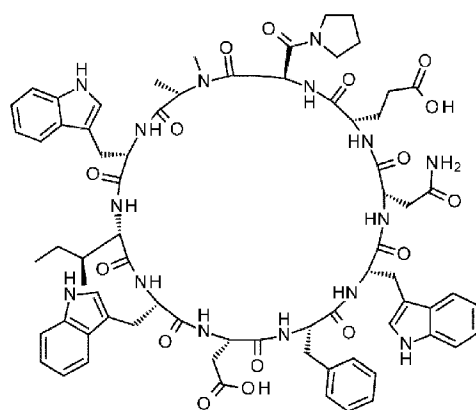
PP21



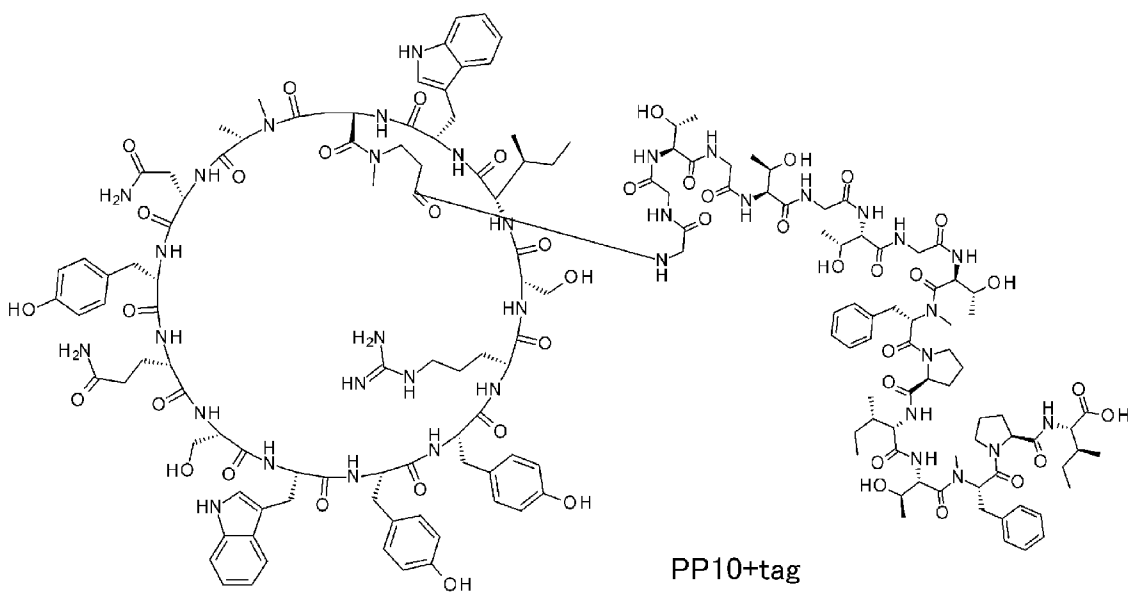
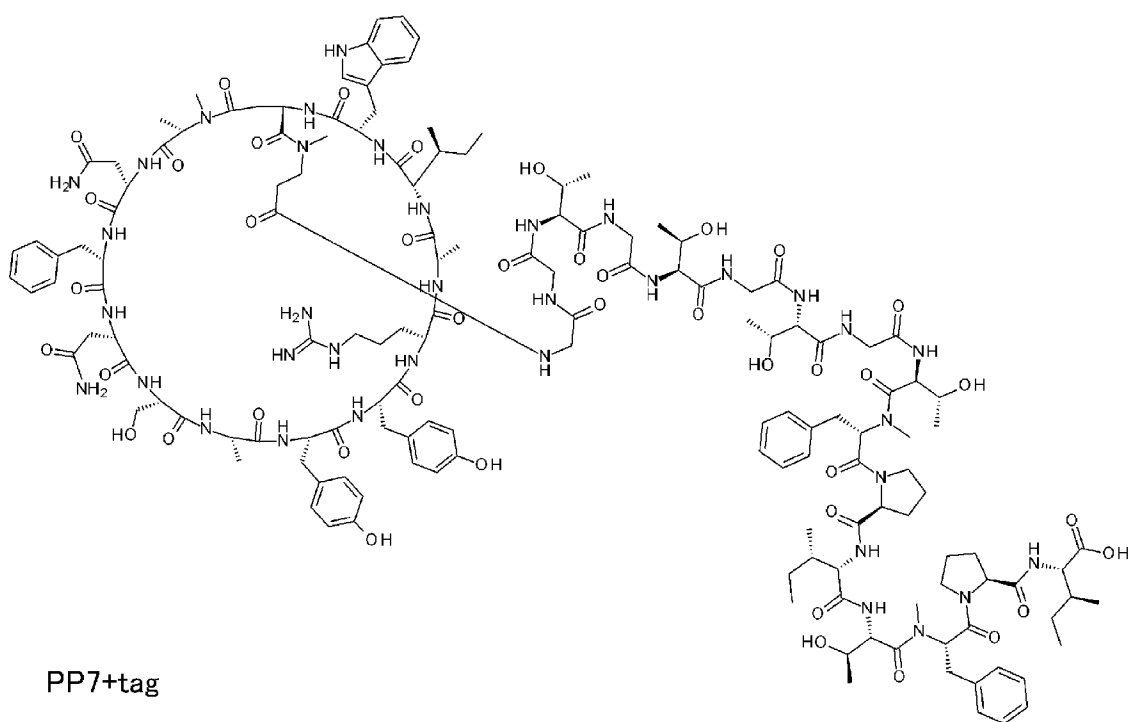
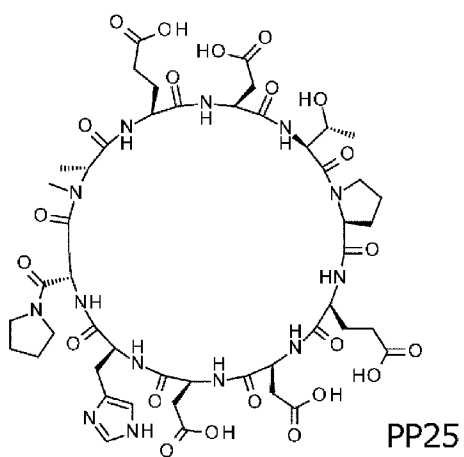
PP22

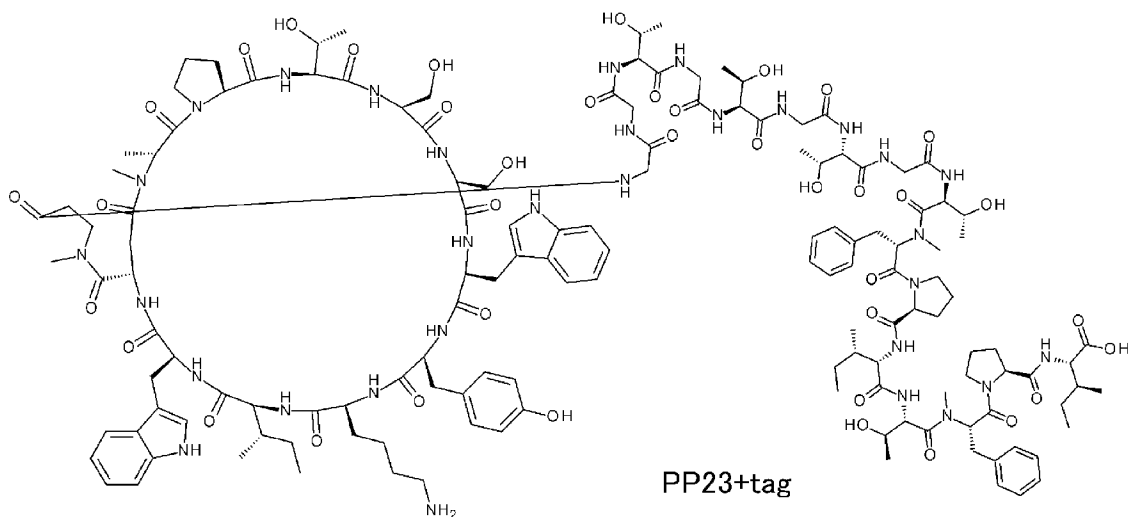


PP23



PP24





より選択される少なくとも1つの化合物と競合する、または以下の抗体

- (i) 配列番号：20に記載のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：21に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体 (REA0023)、
- (i i) 配列番号：22に記載のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：23に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体 (REA0027)、
- (i i i) 配列番号：24に記載のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：25に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体 (REB0007)、
- (i v) 配列番号：26に記載のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：27に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体 (REB0014) および
- (v) 配列番号：28に記載のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：29に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体 (REB0022)

より選択される少なくとも1つの抗体と競合する、

〔H1〕に記載のRegnase-1結合分子。

〔H3〕Regnase-1への結合について、化合物PP7と競合する、〔H1〕または〔H2〕に記載のRegnase-1結合分子。

〔H4〕Regnase-1への結合について、化合物PP23と競合する、〔H1〕～〔H3〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H5〕Regnase-1への結合について、化合物PP10と競合する、〔H1〕～〔H4〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H6〕Regnase-1への結合について、化合物PP7と競合しない、〔H1〕、

〔H 2〕、〔H 4〕、または〔H 5〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 7〕 Regnase-1への結合について、化合物PP23と競合しない、〔H 1〕～〔H 3〕、〔H 5〕、または〔H 6〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 8〕 Regnase-1への結合について、化合物PP10と競合しない、〔H 1〕～〔H 4〕、〔H 6〕、または〔H 7〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 9〕 Regnase-1に特異的に結合する、〔H 1〕～〔H 8〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 1 0〕 前記配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置が、(i) 配列番号1の513、494、439、および435位；または、(i i) 配列番号2の516、497、442、および438位である、〔H 1〕～〔H 9〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 1 1〕 以下(i) および(i i) のSer残基のリン酸化を阻害する、〔H 1〕～〔H 1 0〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子：

(i) Regnase-1における配列番号1の513および494位のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のSer残基；および

(i i) Regnase-1における配列番号1の439および435位のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のSer残基。

〔H 1 2〕 Regnase-1における配列番号1の513および494位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害する、〔H 1〕～〔H 1 1〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 1 3〕 配列番号1の439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害する、〔H 1〕～〔H 1 2〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 1 4〕 化合物PP1～PP25、PP7+tag、PP10+tagおよびPP23+tagより選択さ

れる化合物、または抗体REA0023、REA0027、REB0007、REB0014およびREB0022より選択される抗体が結合するRegnase-1上の結合部位と同じ部位でRegnase-1に結合する、〔H 1〕～〔H 1 3〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 1 5〕化合物PP7が結合するRegnase-1上の結合部位と同じ部位でRegnase-1に結合する、〔H 1〕～〔H 1 4〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 1 6〕化合物PP23が結合するRegnase-1上の結合部位と同じ部位でRegnase-1に結合する、〔H 1〕～〔H 1 5〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 1 7〕化合物PP10が結合するRegnase-1上の結合部位と同じ部位でRegnase-1に結合する、〔H 1〕～〔H 1 6〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 1 8〕前記Ser残基が、Regnase-1のアミノ酸配列に含まれるYWSEP（配列番号：3）、HFSVP（配列番号：4）およびDSGIGS（配列番号：5）からなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸配列に含まれるSer残基である、〔H 1〕～〔H 1 7〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 1 9〕TBK1、IKKi、Act-1、IKK、およびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの分子とRegnase-1との結合を阻害する、〔H 1〕～〔H 1 8〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 2 0〕前記リン酸化が、IL-17およびIL-1からなる群より選択される少なくとも一つの分子により誘導され得るリン酸化である、〔H 1〕～〔H 1 9〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 2 1〕TBK1、IKKi、Act-1、IKK、およびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの分子とRegnase-1との結合を阻害するRegnase-1結合分子。

〔H 2 2〕配列番号：1に示される544～596番目のアミノ酸配列、または配列番号：2に示される547～599番目のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸残基に結合する、〔H 1〕～〔H 2 1〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 2 3〕環状ポリペプチドである、〔H 1〕～〔H 2 2〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

〔H 2 4〕抗体である、〔H 1〕～〔H 2 2〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

[0014] また本発明は、非限定の具体的な一態様において以下を包含する。

〔I 1〕〔B 1〕～〔B 2 6〕のいずれかに記載の組成物または〔H 1〕～〔H 2 4〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子を、それを必要とする対象に投与することを含む、Regnase-1が関与する疾患を治療および／または予防する方法（ここで、それを必要とする対象とは、当該Regnase-1が関与する疾患に罹患しているか、または、罹患する恐れのある対象であってよい。）。

〔I 2〕Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防のための医薬の製造における、〔B 1〕～〔B 2 6〕のいずれかに記載の組成物または〔H 1〕～〔H 2 4〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子の使用。

〔I 3〕Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防において使用するための、〔B 1〕～〔B 2 6〕のいずれかに記載の組成物または〔H 1〕～〔H 2 4〕のいずれかに記載のRegnase-1結合分子。

図面の簡単な説明

[0015] [図1-1]マウスRegnase-1（配列番号：1）とヒトRegnase-1（配列番号：2）のアミノ酸配列の比較を示す。Q5D1E7およびQ5D1E8は、Uniprotの受託番号を表す。

[図1-2] (A) Regnase-1 S435A/S439Aアミノ酸置換変異（Regnase-1AA/AA）マウスの作製方法を示す。野生型Regnase-1遺伝子（上）、ターゲティングベクター（中央）、および推定変異アリル（下）の模式図を示す。ターゲティングベクターは、exon 6におけるS435AおよびS439A変異を含んでいる。(B) Regnase-1AA/AAマウスゲノム中のRegnase-1 exon 6のシーケンシング結果を示す。配列クロマトグラムは、Ser435およびSer439のTCAとTCCがそれぞれGCAとGCCへ置換されていることを示す。

[図1-3] (C) LPS（100 ng/ml）で0～240分間刺激された野生型およびRegnase

-1AA/AAマクロファージにおける、NF κ B、phospho-NF κ B、I κ B、phospho-I κ B、MAPK p38、phospho-MAPK p38、ERK1、phospho-ERK1、JNK、およびphospho-JNKのイムノブロット解析結果を示す。

[図1-4] (D) 低濃度のLPS (10 ng/ml)、CpG (0.1 μ M)、またはPam3Csk4 (10 ng/ml) で24時間刺激された野生型およびRegnase-1AA/AAマクロファージによる、IL-6、IL-12、およびTNF- α 産生結果を示す。細胞上清におけるサイトカイン産生をELISAにより評価した結果である。エラーバーは平均値 $\pm$ SEMを表す。***P < 0.005。

[図2-1] (A) 野生型 (黒丸; n = 15) およびRegnase-1AA/AAマウス (黒四角; n = 12) のEAE臨床スコアを示す。(B) 脊髄へのCD4+ T細胞浸潤の組織学的解析結果を示す。凍結切片を、ヘマトキシリン-エオシン (上列) および抗CD3 ϵ (下列) で染色した結果である。矢印は炎症性細胞浸潤を示す。スケールバー、200 μ m。(C) 免疫の15日後の脊髄細胞 (細胞 1.0×10^5 個) におけるCD4+ T細胞の数を示す。フローサイトメトリーを用いた解析結果である。(D) (i) 野生型またはRegnase-1AA/AAマウス (各群においてn = 8) に対する野生型骨髓細胞の静脈内注射、(ii) 野生型マウス (各群においてn = 12) に対する野生型またはRegnase-1AA/AA骨髓細胞の静脈内注射によって作製されたキメラマウスのEAE臨床スコアを示す。

[図2-2] (EおよびF) 野生型およびRegnase-1AA/AAマウスにおける内皮細胞炎症の組織学的解析を示す。病原性CD4+ T細胞 (細胞 1.5×10^7 個/マウス) の静脈内注射の12時間後に脾臓 (E) および第5腰髄 (F) の切片を調製し、抗IV型コラーゲン抗体および抗phospho-STAT3抗体で染色した結果である。黒色および白色の矢印は、それぞれphospho-STAT3陽性および陰性の内皮細胞を示す。スケールバー、50 μ m。(GおよびH) 血管内皮細胞 (IV型コラーゲン陽性) における抗phospho-STAT3陽性細胞の相対数を、脾臓 (H) および第5腰髄 (I) において測定した結果を示す。(I) 野生型およびRegnase-1AA/AA MEFにおけるIL-6、Regnase-1、CXCL-1、CXCL2、およびCCL-20 mRNAのqPCR解析を示す。TNF- α (20 ng/ml) およびIL-17A (50 ng/ml) により0~24時間にわたって細

胞を刺激した結果である。エラーバーは平均値±SEMを表す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.005$ 。

[図3-1] (A) *in vitro*条件下でナイーブCD4⁺ T細胞から分化したCD4⁺ T細胞サブセット (TH1、TH17、およびiTreg) のフローサイトメトリー解析結果を示す。(B) 野生型およびRegnase-1AA/AA 肝類洞壁内皮細胞 (LSEC) におけるIL-6、TNF- α 、CXCL-1、およびCXCL2 mRNAのqPCR解析を示す。TNF- α (20 ng/ml) およびIL-17A (50 ng/ml) により0~24時間にわたって細胞を刺激した結果である。

[図3-2] (C) IL-6 (20 ng/ml)、TNF- α (20 ng/ml)、IL-17A (50 ng/ml)、IL-6+IL-17A、またはTNF- α +IL-17Aへの24時間にわたる曝露に応答した、マウスLSECによるIL-6、CXCL-1、およびCXCL-2の産生を示す。細胞上清におけるタンパク質産生量をELISAにより評価した結果である。

[図4] (A) イミキモド誘発乾癬モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの耳介塗布部の厚さを示す (平均値±標準誤差; 各群5例)。(B) イミキモド誘発乾癬モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの頸背部皮膚の肉眼的所見を示す (平均値±標準誤差; 各群5例)。

[図5] (A) イミキモド誘発乾癬モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの耳介塗布部皮膚の病理組織像を示す (ヘマトキシリン-エオジン染色標本) (好中球浸潤 (*); 微小膿瘍 (矢頭))。(B) イミキモド誘発乾癬モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの耳介塗布部表皮の厚さを示す (平均値±標準偏差; 各群5例)。

[図6] イミキモド誘発乾癬モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの耳介塗布部皮膚の各種遺伝子発現量変化を示す (B2m発現量により正規化)。

[図7] (A) 抗糸球体基底膜抗体誘発腎炎モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの血清クレアチニン値ならびに尿総蛋白対クレアチニン値比を示す (マン・ホイットニーのU検定; ****: $p < 0.0001$)。(B) 抗糸球体基底膜抗体誘発腎炎モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異

マウスの腎臓重量当たりのハイドロキシプロリン量を示す（マン・ホイットニーのU検定；***: $p < 0.001$ ）。

[図8](A) 抗糸球体基底膜抗体誘発腎炎モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの腎臓のCol1a1並びにActa-2の発現量変化を示す（GAPDH発現量により正規化、マン・ホイットニーのU検定；**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ ）。(B) 抗糸球体基底膜抗体誘発腎炎モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの腎臓の各種遺伝子発現量変化を示す（GAPDH発現量により正規化、マン・ホイットニーのU検定；**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$ ）。(C) 抗糸球体基底膜抗体誘発腎炎モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの血中血球数の変化を示す（血液1 μL あたりの白血球数、好中球数、単球数を示した。）（マン・ホイットニーのU検定；**: $p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$ ）。

[図9](A) 抗糸球体基底膜抗体誘発腎炎モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの腎臓の病理組織像を示す（ヘマトキシリン-エオジン染色標本）。(B) 抗糸球体基底膜抗体誘発腎炎モデルにおける野生型マウス及びRegnase-1 AA変異マウスの糸球体病変の割合を示す（平均値及び標準偏差；各群15例）。(C) 抗糸球体基底膜抗体誘発腎炎モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの肺の病理組織像を示す（ヘマトキシリン-エオジン染色標本）。

[図10](A) ブレオマイシン誘発強皮症モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの皮膚重量当たりのハイドロキシプロリン量を示す。(B) ブレオマイシン誘発強皮症モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの肺の病理組織像を示す（ヘマトキシリン-エオジン染色標本）。(C) ブレオマイシン誘発強皮症モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの肺のCol1a1の発現量変化を示す（GAPDH発現量により正規化、マン・ホイットニーのU検定；**: $p < 0.01$ ）。

[図11-1]実験的自己免疫性ぶどう膜炎モデルマウスにおける病態解析の結果を示す。図中のWTNCは病態非誘導野生型マウス、WTDCは病態誘導野生型マウス。

ス、AANCは病態非誘導Regnase-1 AA変異マウス、AADCは病態誘導Regnase-1 AA変異マウスの結果をそれぞれ示す。(A) ペプチド投与量140 nmolの条件におけるマウスの両眼の炎症スコアを示す。グラフの横軸はペプチド投与後の日数を、縦軸は炎症スコア（平均±標準誤差）をそれぞれ表す。(B) ペプチド投与量280 nmolの条件におけるマウスの両眼の炎症スコアを示す。グラフの横軸はペプチド投与後の日数を、縦軸は炎症スコア（平均±標準誤差）をそれぞれ表す。

[図11-2] (C) ペプチド投与量140 nmolの条件におけるマウスの両眼の構造障害スコアを示す。グラフの横軸はペプチド投与後の日数を、縦軸は構造障害スコア（平均±標準誤差）をそれぞれ表す。(D) ペプチド投与量280 nmolの条件におけるマウスの両眼の構造障害スコアを示す。グラフの横軸はペプチド投与後の日数を、縦軸は構造障害スコア（平均±標準誤差）をそれぞれ表す。

[図12-1] (A) IL-17刺激した野生型およびRegnase-1AA/AA MEFにおけるRegnase-1のイムノブロット解析の結果を示す。2つの矢印は、Regnase-1のリン酸化型（上）および非リン酸化型（下）を示す。(B) IL-17刺激した野生型および各分子欠損MEFにおけるRegnase-1のイムノブロット解析の結果を示す。

(C) BX795 (50 μ M) 存在下でIL-17刺激した野生型MEFにおけるRegnase-1のイムノブロット解析の結果を示す。

[図12-2] (D) TBK1およびIKKiによるRegnase-1のin vitro条件下でのリン酸化を示す。FLAGタグ付Regnase-1 AA変異型を発現するRegnase-1欠損MEFから得られた精製Regnase-1を、 γ -ホスファターゼの存在下/非存在下で3時間にわたって組換えTBK1および/またはIKKiとともにインキュベートした。ウエスタンブロッティング (i) および[32P]-オートラジオグラフィー (ii) により、Regnase-1リン酸化を解析した。矢印はリン酸化Regnase-1を示す。(E) FLAG Regnase-1、Mycタグ付Act-1、Mycタグ付Act-1変異型 (Myc-Act1 Δ SEFIR)、HAタグ付TBK1、およびHAタグ付IKKiをトランスフェクトしたHEK293細胞におけるFLAGタグ付Regnase-1のイムノブロット解析結果を示す。(F) 全長

またはN末端もしくはC末端切断型のRegnase-1とAct1の共免疫沈降法の結果を示す。FLAGタグ付Regnase-1バリエーションをMycタグ付Act1と共免疫沈降した。溶出タンパク質を、抗FLAG抗体および抗Myc抗体を用いるイムノブロット解析に供した。(GおよびH) FLAGタグ付Regnase-1、Mycタグ付Act-1バリエーション(全長およびC末端切断型)、HAタグ付TBK1、およびHAタグ付IKKiの共免疫沈降法の結果を示す。HEK293トランスフェクタントからの細胞溶解物を記載のように混合し、抗Myc被覆ビーズ(G)または抗FLAG M2アガロースビーズ(H)によって共免疫沈降した。溶出タンパク質を、抗FLAG抗体、抗Myc抗体、抗HA抗体、および抗アクチン抗体を用いるイムノブロット解析に供した。

[図12-3] (I) IL-17Aで刺激した野生型およびRegnase-1AA/AA MEFにおけるRegnase-1、I κ B、phospho-I κ B、NF κ B、およびphospho-NF κ B発現のイムノブロット解析結果を示す。(J) IL-1 β で刺激した野生型、Regnase-1AA/AA、TBK1/IKKi二重欠損、Act1欠損、およびIRAK1/IRAK2二重欠損MEFにおけるRegnase-1発現のイムノブロット解析結果を示す。

[図13-1] (A) Regnase-1のドメイン概略図ならびにIKK (IKK α およびIKK β) およびTBK1/IKKiによるリン酸化部位のマッピングを示す。(B) Regnase-1変異型(野生型、S494A、T505A/S508A、S513A、およびS494A/S513A)をトランスフェクトしたHeLa細胞におけるRegnase-1のイムノブロット解析結果を示す。IL-1 β (10 ng/ml) およびIL-17A (50 ng/ml) で1時間にわたって細胞を刺激した。

[図13-2] (C) (i) GST融合Regnase-1 (440~598) のコンストラクトの図を示す。(ii) 野生型および変異(S494E/S513EまたはS494E/T505E/S508E/S513E) Regnase-1 (440~598) のゲル濾過結果を示す。各溶出ピークの分子量を、分子量スタンダードマーカを用いて推定し、多量体(Mw: ∞)、六量体(Mw:120 kDa)、三量体(Mw:60 kDa)または単量体(Mw:20 kDa)として定義した。(iii) 溶出した画分(多量体 + 六量体、三量体、および単量体)を、総溶出タンパク質に対するパーセンテージとして定量した結果を示す。

[図13-3] (D) Regnase-1のイムノブロッティング結果を示す。Regnase-1は、

IL-1 β (10 ng/ml) およびIL-17A (50 ng/ml) で1時間刺激された、FLAGタグ付Regnase-1 AA変異型を発現するRegnase-1欠損MEFから得た。精製済のRegnase-1を、未変性PAGEおよびウエスタンブロッティングによって解析した。(E) TBK1およびIKKiによりリン酸化されたRegnase-1のイムノブロット解析結果を示す。精製済のRegnase-1を、3時間にわたり、 γ -ホスファターゼの存在下/非存在下で、GST融合TBK1および/またはIKKiとともにインキュベートした。未変性PAGEおよびSDS-PAGEによってタンパク質を分離し、Regnase-1のウエスタンブロッティングによって解析した。

[図14-1] (AおよびB) 細胞内オルガネラ画分のイムノブロット解析結果を示す。細胞ホモジネート、可溶性細胞質画分、ミクロソーム、および粗面ER膜における、Regnase-1、リボソームタンパク質L7a (rpL7a; ERマーカー)、およびGAPDH (細胞質マーカー)。画分を、IL-1 β (10 ng/ml) およびIL-17A (50 ng/ml) でそれぞれ1時間刺激されたRegnase-1AA/AA MEFから (A)、ならびに、TNF- α (20 ng/ml) およびIL-17A (50 ng/ml) でそれぞれ1時間刺激されたRegnase-1AA/AAおよびAct1欠損MEFから (B) 調製した。矢印は、Regnase-1のリン酸化型 (上) および非リン酸化型 (下) を示す。(C) IL-17A (50 ng/ml) で0~8時間刺激された野生型およびRegnase-1AA/AA MEFから調製した粗面ER膜におけるRegnase-1およびrpL7aのイムノブロット解析結果を示す。

[図14-2] (D) IL-17A (50 ng/ml) を用いてまたは用いずに1時間刺激された、FLAGタグ付Regnase-1 AA変異型を発現するRegnase-1欠損MEFの細胞オルガネラ画分から、FLAGタグ付Regnase-1を免疫沈降させた。免疫沈降物を、Regnase-1、TBK1、phospho-TBK1、IKKi、およびphospho-IKKiのイムノブロット解析に供した。(E) 野生型およびAct1欠損MEFから単離されたER膜画分におけるRegnase-1、phospho-TBK1、phospho-IKKi、およびrpL7aのイムノブロット解析結果を示す。IL-17A (50 ng/ml) で0、1、および8時間にわたって細胞を刺激した。

[図15-1] (A) TNF- α で2時間、続いてIL-17Aで0~4時間経時的に刺激された野生型MEFのイムノブロッティングおよび定量的PCR (qPCR) 解析結果を示す

。(i) 細胞溶解物をRegnase-1のイムノブロッティングによって解析した。

(ii) 上記のとおりTNF- α およびIL-17Aの組み合わせによって刺激された野生型細胞におけるIL-6 mRNA発現を示す。(B) TNF- α で2時間、続いてIL-17Aで0~4時間刺激された野生型ならびにRegnase-1AA/AAおよびTBK1/IKKi二重欠損MEFにおけるIL-6 mRNA発現を示す。

[図15-2] (C) (i) 対照 (Act1+IKKi)、Regnase-1、またはRegnase-1+Act1+IKKiの発現プラスミドと共にpTRE-tight-IL6-CDS+3' UTRベクターを同時トランスフェクトされたTet-off HEK293細胞における、IL-6 (上方) およびActb (下方) mRNAレベルのオートラジオグラフィ結果を示す。ドキシサイクリンによる0~4時間の処理の後の細胞から総mRNAを調製した後、[32P]標識プローブを用いたノーザンブロッティングに供した。(ii) ドキシサイクリン処理中のTet-off HEK293細胞における相対的IL-6 mRNAレベルを示す。(D) Regnase-1AA/AA MEFにおけるRegnase-1のイムノブロット解析結果を示す。細胞をIL-17A (50 ng/ml) で1時間処理した後、何も含まない培地 (対照)、シクロヘキシミド (100 μ M) を含む培地、またはシクロヘキシミドとオカダ酸 (0.5 μ M) の両方を含む培地中で、0~240分間インキュベートした。(E) TNF- α (20 ng/ml) およびIL-17A (50 ng/ml) で2時間処理した後に、ActD (5 μ g/ml) またはActDとオカダ酸 (0.5 μ M) の両方を含む培地中で0~180分間インキュベートしたRegnase-1AA/AA MEFにおける、IL-6およびTNF mRNAレベルのqPCR解析結果を示す。qPCRデータ (A、B、およびE) は、4回の独立した実験から集めた。エラーバーは平均値 $\pm$ SEMを表す。***P < 0.005。

[図16-1] (A) FLAGタグ付Regnase-1 Δ CTD/ Δ CTDを安定に発現するRegnase-1欠損MEFの溶解物のイムノブロット解析結果を示す。細胞を、IL-17Aを用いてまたは用いずに1時間刺激し、抗FLAG抗体でプローブした。(B) TNF- α 、IL-17A、TNF- α +IL-17A、およびIL-1 β で0~4時間刺激したRegnase-1 Δ CTD/ Δ CTD MEFにおける、Regnase-1および β -アクチンのイムノブロット解析結果を示す。Regnase-1を矢印で示した。(C) HEK293細胞における、Act-1、TBK-1、およびIKKiとFLAGタグ付野生型Regnase-1またはRegnase-1 Δ CTD共発現結果を

示す。細胞溶解物を、抗FLAG抗体を用いるイムノブロット解析に供した。(D) FLAGタグ付野生型Regnase-1、Regnase-1 Δ CTD、およびMycタグ付Act-1の共免疫沈降結果を示す。HEK293トランスフェクタントからの細胞溶解物を記載のとおり混合し、抗FLAG M2アガロースビーズによって共免疫沈降した。溶出タンパク質を、抗FLAG抗体、抗Myc抗体、および抗アクチン抗体を用いるイムノブロット解析に供した。

[図16-2] (E) 0、1、および4時間の50 ng/ml IL-17Aによる刺激の後に野生型およびRegnase-1 Δ CTD/ Δ CTD MEFから単離された細胞内オルガネラ（ホモジネート、サイトゾル、およびミクロソーム）における、Regnase-1、Rpl7a、GAPDH、およびphospho-TBK-1のイムノブロット解析結果を示す。(FおよびG) ポリソーム画分のイムノブロット解析結果を示す。(F) MEFの細胞溶解物からのスクロース勾配画分の(260 nmでの) UV吸光度プロフィールを示す。(G) 野生型およびRegnase-1 Δ CTD/ Δ CTD細胞溶解物から単離されたスクロース勾配画分におけるRegnase-1およびRpl7aのイムノブロット解析結果を示す。Rpl7aを矢印で示した。

[図16-3] (H) 野生型、Regnase-1 Δ CTD/+、およびRegnase-1 Δ CTD/ Δ CTD MEFにおけるIL-6、TNF、LCN-2、およびGM-CSF mRNAのqPCR解析結果を示す。TNF- α (20 ng/ml) およびIL-17A (50 ng/ml) により細胞を0~24時間刺激した。

(I) 28日間にわたる、野生型（黒丸；n = 8）およびRegnase-1 Δ CTD/ Δ CTD マウス（黒四角；n = 8）のEAE臨床スコアを示す。(JおよびK) 免疫化から28日後の脊髓細胞（細胞 1.0×10^6 個）のフローサイトメトリー解析結果を示す。(J) 野生型およびRegnase-1 Δ CTD/ Δ CTDマウス由来の脊髓におけるCD4+ T細胞（上方）およびF4/80+マクロファージ（下方）の集団を示す。(K) (I) におけるCD4+ T細胞およびF4/80マクロファージの細胞数を示す（各群においてn = 5）。エラーバーは平均値 $\pm$ SEMを表す。*P < 0.05、**P < 0.01、および***P < 0.005。

[図16-4] (L) IL-1 β 、IL-17A、またはTNF- α で0~4時間刺激したRegnase-1 S513A MEFにおける、Regnase-1および β -アクチンのイムノブロット解析結果

を示す。(M) 野生型、Regnase-1AA/AA、およびRegnase-1 S513A MEFにおけるRegnase-1のイムノブロット解析結果を示す。転写抑制剤であるシクロヘキシミドの存在下、TNF- α 、IL-1 β 、LPS、またはIL-17Aで細胞を0~120分間刺激した。

[図16-5] (N) イムノブロットで測定され、 β -アクチン（コントロール）で標準化されたRegnase-1タンパク質の定量結果を示す。また、そこから算出されたRegnase-1タンパク質の半減期を示す。

[図17-1] (A) 野生型Regnase-1（上方）および1bp欠失Regnase-1（下方）の模式図を示す。CRISPR-Cas9ターゲティング部位は、Regnase-1のプロリンに富む領域に位置している。フレームシフト変異および該変異から146塩基下流の未成熟終止コドンによって導入されたアミノ酸配列を下線で示す。(B) CRISPR-Cas9システムによって変異させたマウスゲノム中のRegnase-1 exon 6のシーケンシング。配列クロマトグラムは、フレームシフト変異を開始するための、Pro517におけるシトシン塩基の欠失を示している。(C) 野生型Regnase-1（上方）およびS513A変異Regnase-1（下方）の模式図を示す。CRISPR-Cas9ターゲティング部位は、Regnase-1のSer513に位置している。(D) CRISPR-Cas9システムによって変異させたマウスゲノム中のRegnase-1 exon 6のシーケンシング。配列クロマトグラムは、Tyr511のTACからTATへの置換（ナンセンス変異）およびSer513のTCTからGCTへの置換（S513A変異）をそれぞれ示している。

[図17-2] (C) 野生型、Regnase-1 Δ CTD変異型、およびTBK1/IKKi二重欠損MEFにおけるIL-6、TNF、CXCL-1、CXCL-2、CCL-5、CCL20、LCN-2、およびGM-CSF発現のqPCR解析結果を示す。エラーバーは平均値 $\pm$ SEMを表す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、および*** $P < 0.005$ 。

[図17-3] (D) 24時間にわたるIL-6 (20 ng/ml)、TNF- α (20 ng/ml)、IL-17A (50 ng/ml)、IL-6 + IL-17A、またはTNF- α + IL-17Aへの曝露に応答した野生型およびRegnase-1 Δ CTD/ Δ CTD MEFによるIL-6、CXCL-1、およびCXCL-2の産生。細胞上清におけるタンパク質産生量をELISAにより評価した。エラ

ーバーは平均値±SEMを表す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、および*** $P < 0.005$ 。

[図17-4] (E) 野生型、Regnase-1 Δ CTD/ Δ CTD、およびRegnase-1 S513A MEFにおけるIL-6、TNF、Regnase-1、およびLCN-2 mRNAのqPCR解析結果を示す。TNF- α およびIL-17Aにより細胞を0~24時間刺激した。(F) 野生型、Regnase-1 Δ CTD/ Δ CTD、およびTBK1/IKKi二重欠失MEFにおけるIL-6、TNF、CXCL-1、CXCL-2、CCL-5、CCL-20、LCN-2、およびGM-CS mRNAのqPCR解析結果を示す。TNF- α (20 ng/ml) により2時間、その後IL-17A (50 ng/ml) により0~4時間、細胞を刺激した。

[図18] (A) EAE免疫化から28日後の野生型およびRegnase-1 Δ CTD/ Δ CTDマウスに由来する(1) リンパ節細胞(細胞 1.0×10^6 個)および(2) 脾細胞(細胞 1.0×10^6 個)における、CD4⁺ T細胞サブセット (TH1およびTH17) のフローサイトメトリー解析結果を示す。(B) (A) におけるTH1細胞およびTH17細胞の細胞数を示す(各群において $n = 5$)。エラーバーは平均値±SEMを表す。* $P < 0.05$ 。

[図19-1]各標的遺伝子のルシフェラーゼアッセイの結果を示す。測定されたホタルルフィシエラーゼ活性を内部標準であるウミシイタケルシフェラーゼ活性およびpGL3-emptyプラスミドで標準化した値を示す。エラーバーは2組の標準偏差(S.D.)を表す。

[図19-2]図19-1の続きを示す図である。

[図19-3]図19-2の続きを示す図である。

[図19-4]図19-3の続きを示す図である。

[図19-5]図19-4の続きを示す図である。

[図20]ウエスタンブロッティングによるリン酸化Regnase-1の検出結果を示す。

[図21] (A) (i) 以下の変異MEF細胞株から調製された細胞オルガネラ画分(細胞ホモジネート、細胞質画分、およびミクロソーム)におけるRegnase-1のイムノブロット解析: IL-1 β (10 ng/ml) またはIL-17A (50 ng/ml) で1時間

刺激された、野生型、Regnase-1 S513A (Ser513をAlaで置換)、およびRegnase-1 Δ CTD (C末端ドメインを欠く)。(ii) ミクロソームに結合したRegnase-1のタンパク質レベルを、全細胞ホモジネートに対するパーセンテージとして評価した。(B) TNF- α (20 ng/ml) およびIL-17A (50 ng/ml) で0~4時間にわたって同時刺激された、野生型、Regnase-1 S513A、およびRegnase-1 Δ CTD MEFにおける、IL-6およびTNF mRNAのqPCR解析。

[図22] (A) イミキモド誘発乾癬モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 S513A変異マウスの耳介塗布部の厚さを示す(平均値 $\pm$ 標準誤差; 各群6例)。(B) イミキモド誘発乾癬モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 S513A変異マウスの頸背部皮膚の肉眼的所見のトータルスコアを示す(平均値 $\pm$ 標準誤差; 各群6例)。

[図23]ペプチド化合物の合成スキームを示す。主に、(1)レジン上でのペプチドの伸長反応、(2)レジンからのペプチドの切り出し、(3)ペプチドの環化反応、(4)ペプチド側鎖の官能基の脱保護、(5)ペプチドの精製、の5工程を含む。

[図24]AlphaScreenによるリン酸化Regnase-1の検出結果を示す。ATP存在下でキナーゼ (IKK β またはTBK1) とRegnase-1を反応させて、Regnase-1のリン酸化を行った。上記反応後のRegnase-1に、リン酸化Regnase-1に対する抗体を反応させ、その結合量をAlphaScreenにより測定した。図の左はIKK β を、図の右はTBK1をそれぞれ用いた際の結果を示す。

[図25-1]化合物による全長Regnase-1 (FL_Reg1) のリン酸化阻害の結果を示す。FL_Reg1と化合物 (PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, またはPP6) を混合した後、TBK1によるRegnase-1のリン酸化を行い、生成されたリン酸化Regnase-1をAlphaScreenにより測定した。

[図25-2]化合物による全長Regnase-1 (FL_Reg1) のリン酸化阻害の結果を示す。FL_Reg1と化合物 (PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, またはPP6) を混合した後、IKK β によるRegnase-1のリン酸化を行い、生成されたリン酸化Regnase-1をAlphaScreenにより測定した。

[図26-1]化合物によるC末端ドメイン欠損Regnase-1 (Δ CTD_Reg1) のリン酸化阻害の結果を示す。 Δ CTD_Reg1と化合物 (PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, またはPP6) を混合した後、TBK1によるRegnase-1のリン酸化を行い、生成されたリン酸化Regnase-1をAlphaScreenにより測定した。

[図26-2]化合物によるC末端ドメイン欠損Regnase-1 (Δ CTD_Reg1) のリン酸化阻害の結果を示す。 Δ CTD_Reg1と化合物 (PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, またはPP6) を混合した後、IKK β によるRegnase-1のリン酸化を行い、生成されたリン酸化Regnase-1をAlphaScreenにより測定した。

[図27-1]化合物によるキナーゼとRegnase-1の結合阻害の結果を示す。全長Regnase-1 (FL_Reg1) と化合物 (PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, またはPP6) を混合した後、TBK1を添加して、TBK1とRegnase-1との結合をAlphaScreenにより測定した。

[図27-2]化合物によるキナーゼとRegnase-1の結合阻害の結果を示す。全長Regnase-1 (FL_Reg1) と化合物 (PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, またはPP6) を混合した後、IKK β を添加して、IKK β とRegnase-1との結合をAlphaScreenにより測定した。

[図28]野生型Regnase-1のRNA分解活性に対する化合物の影響を示す。RNAと野生型Regnase-1の混合液に化合物 (PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, またはPP6) を加えて反応させた後、反応液中のRNA濃度を測定した。

[図29]変異型Regnase-1 (D141N) のRNA分解活性に対する化合物の影響を示す。RNAと変異型Regnase-1 (D141N) の混合液に化合物 (PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, またはPP6) を加えて反応させた後、反応液中のRNA濃度を測定した。

[図30]野生型Regnase-1のRNA分解活性に対する化合物の影響を示す。RNAと野生型Regnase-1の混合液に化合物 (PP7~PP25の各化合物) を加えて反応させた後、反応液中のRNA濃度を測定した。

[図31]変異型Regnase-1 (D226N, D244N) のRNA分解活性に対する化合物の影響を示す。RNAと変異型Regnase-1 (D226N, D244N) の混合液に化合物 (PP7~PP25の各化合物) を加えて反応させた後、反応液中のRNA濃度を測定した。

[図32]抗Regnase-1抗体のヒトRegnase-1ペプチドおよびヒト全長Regnase-1への結合を示す。抗Regnase-1抗体としては、REA0023、REA0027、REB0007、REB0014、REB0022を用いた。図中のペプチド1 (CLDSGIGSLESQMSELWGVRGG) およびペプチド2 (AFPPREYWSEPYPLPPPTC-NH₂) はいずれもヒトRegnase-1の部分ペプチドである。FL_Reg1はヒト全長Regnase-1を表す。

[図33]抗Regnase-1抗体のRegnase-1リン酸化阻害活性を評価した結果を示す。(A) 各キナーゼ (IKK β あるいはTBK1) によるRegnase-1のリン酸化をウェスタンブロッティングにより検出した結果を示す。(B) IKK β によるRegnase-1のリン酸化に対する、抗Regnase-1抗体 (REA0023、REA0027) の阻害活性を示す。終濃度16.7 μ g/ml、5.0 μ g/mlの抗Regnase-1抗体について、いずれも評価が行われている。(C) TBK1によるRegnase-1のリン酸化に対する、抗Regnase-1抗体 (REB0007、REB0014、REB0022) の阻害活性を示す。終濃度16.7 μ g/ml、5.0 μ g/mlの抗Regnase-1抗体について、いずれも評価が行われている。

[図34]野生型Regnase-1のRNA分解活性に対する抗Regnase-1抗体の影響を示す。RNAと野生型Regnase-1の混合液に抗Regnase-1抗体 (REA0023、REA0027、REB0007、REB0014、REB0022) を加えて反応させた後、反応液中のRNA濃度を測定した。

[図35]変異型Regnase-1 (D226N, D244N) のRNA分解活性に対する抗Regnase-1抗体の影響を示す。RNAと変異型Regnase-1 (D226N, D244N) の混合液に抗Regnase-1抗体 (REA0023、REA0027、REB0007、REB0014、REB0022) を加えて反応させた後、反応液中のRNA濃度を測定した。

[図36]実験的自己免疫性ぶどう膜炎T細胞移入モデルにおける野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスの病態解析の結果を示す。(A) 眼底検査における炎症スコア (平均 $\pm$ 標準誤差; 各群7例) を示す。統計解析は各個体のAUCを算出し、マン・ホイットニーのU検定で実施した(***: $P < 0.001$)。(B) 病理組織学的解析における構造障害スコアを示す。統計解析は、マン・ホイットニーのU検定で実施した(*: $P < 0.05$)。

[図37]イミキモド誘発乾癬モデルにおける野生型マウスおよびS513A変異マウスの耳介塗布部皮膚の各種遺伝子発現変化を示す（B2m発現量により正規化、平均±標準誤差）。図中のNon-diseaseは病態を誘導していないマウスを示す。

[図38]野生型（黒丸；n = 10）およびRegnase-1 S513A変異マウス（黒四角；n = 10）のEAE臨床スコアを示す。

[図39]環状ポリペプチドのC末端にGG-TFP I-t a gを結合させた化合物の合成スキームを示す。

[図40]Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl))-resin)-bMeAla-OAllyl（化合物RS3）の合成スキームを示す。

[図41]環化体Aから環化体Bを合成する工程を示す。

[図42]環化体Bから環化体+GG-TFP I-t a g化合物を合成する工程を示す。

[図43]環化体+GG-TFP I-t a g化合物の構造情報を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 1. 定義

本明細書でいう用語「Regnase-1」（Zc3h12aまたはMCPIP-1としても知られる。）は、別段示さない限り、霊長類（例えば、ヒト）、げっ歯類（例えば、マウス、ラット）などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物供給源からの任意の天然型Regnase-1のことをいう。この用語は、「全長」のプロセッシングを受けていないRegnase-1も、細胞中でのプロセッシングの結果生じるRegnase-1も包含する。例示的なマウスRegnase-1のアミノ酸配列はUniprot受託番号Q5D1E7（配列番号：1）として、例示的なヒトRegnase-1のアミノ酸配列はUniprot受託番号：Q5D1E8（配列番号：2）として公開されている。Regnase-1について記載した文献は、例えば、W02010/098429；Nature immunology, Vol.12, NUMBER 12, DECEMBER 2011, p.1167-1175；Nature 458, 2009, p.1185-1190；Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume LXXVIII, 2013, p.51-60；Biochimica et Biophysica Acta 1823, 2012, p.1905-191

3が挙げられる。本明細書におけるRegnase-1は、哺乳動物のRegnase-1であることが好ましい。

[0017] 本明細書で用いられる「Regnase-1が関与する疾患」とは、Regnase-1が疾患の形成、増悪および／または継続に関与する疾患を意味する。「疾患の形成、増悪および／または継続に関与する疾患」には、疾患の形成、増悪および／または継続に直接的に関与する疾患だけでなく、間接的に関与する疾患も含まれる。限定されないが、「Regnase-1が関与する疾患」は、例えば、Regnase-1の不安定化および／または細胞内での分解が、疾患の形成、増悪および／または継続に関与する疾患を意味してよい。「Regnase-1が関与する疾患」には、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、線維化疾患、およびRNAウイルス感染症が包含される。「Regnase-1が関与する疾患」は、TH17細胞関連疾患であってもよい。

[0018] 本明細書で用いられる「炎症性疾患」とは、個体の免疫系の過剰活性化から生じる疾患または疾病である。炎症性疾患は、炎症を起こす病理的段階、典型的には白血球の流入および／または好中球走化性によって生じ得るがこれに限定されない。そのような疾患の例には、炎症性皮膚疾患（乾癬及びアトピー性皮膚炎が含まれる）；全身性硬化症；腎炎；炎症性腸疾患（クローン病及び潰瘍性大腸炎）に関連する反応；手術組織再灌流傷害、心筋不全等の心筋虚血症状、心不全、心臓手術後の灌流及び経皮経管冠動脈形成後の灌流、発作、及び腹部大動脈瘤を含む虚血灌流疾患；発作後の脳水腫；頭蓋外傷；血液量減少性ショック；呼吸停止；成人呼吸窮迫症候群；急性肺障害；ベーチェット病；皮膚筋炎；多発性筋炎；多発性硬化症；皮膚炎；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；眼炎症；糖尿病網膜症；糖尿病黄斑浮腫；骨関節炎；ルーブス腎炎；糖尿病性腎症；リウマチ様関節炎、シェーグレン症候群、血管炎等の自己免疫疾患；脊椎関節炎（強直性脊椎炎および乾癬性関節炎が含まれる）；白血球漏出を含む疾患；中枢神経系（CNS）炎症性疾患、敗血症又は心的外傷の後の多臓器傷害；アルコール性肝炎；細菌性肺炎；糸球体腎炎を含む抗原－抗体複合媒介疾患；敗血症；サルコイドーシス；組織／臓器

移植後の移植片拒絶反応；移植片対宿主病；加齢性黄斑変性；川崎病；好酸性食道炎；神経炎；胸膜炎、肺肺炎、肺炎、慢性気管支炎、気管支拡張症、びまん性汎細気管支炎、過敏性肺炎、特発性肺線維症（IPF）、および嚢胞性線維症等を含む肺の炎症が含まれる。好ましい症状には、急性肺傷害、成人呼吸窮迫症候群、虚血性灌流（外科組織灌流傷害、心筋虚血症、及び急性心筋不全が含まれる）、血液量減少性ショック、喘息、細菌性肺炎及び潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患が含まれる。炎症性疾患は、自己免疫疾患、アレルギー疾患、線維化疾患等の他の分類の疾患と一部において重複し、逆も同様である。

[0019] 本明細書で用いられる「自己免疫疾患」は、その個体自身の組織から生じかつその個体自身の組織に対して向けられる疾患または障害のことをいう。本明細書で、自己免疫疾患は、悪性またはがん性の疾患または状態を明確に除外するものであり、特にB細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病（acute lymphoblastic leukemia: ALL）、慢性リンパ球性白血病（chronic lymphocytic leukemia: CLL）、ヘアリー細胞白血病、および慢性骨髄芽球性白血病を除外する。自己免疫疾患または障害の例は、これらに限定されるものではないが、以下のものを含む：乾癬および皮膚炎（例えば、アトピー性皮膚炎）を含む炎症性皮膚疾患などの炎症性反応；全身性強皮症および硬化症；炎症性腸疾患に関連する反応（例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎）；呼吸窮迫症候群（成人呼吸窮迫症候群；adult respiratory distress syndrome: ARDSを含む）；皮膚炎；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；眼炎症；大腸炎；糸球体腎炎；例えば湿疹および喘息ならびにT細胞の浸潤および慢性炎症反応を伴う他の状態などのアレルギー性状態；アテローム硬化；白血球接着不全症；関節リウマチ；全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus: SLE）（ループス腎炎、皮膚ループスを含むがこれらに限定されない）；糖尿病（例えば、I型糖尿病またはインスリン依存性糖尿病）；多発性硬化症；レイノー症候群；自己免疫性甲状腺炎；橋本甲状腺炎；アレルギー性脳脊髄炎；自己免疫性脳脊髄炎；シェーグレン症候群；若年発症糖尿病；ならびに典型

的に結核、サルコイドーシス、多発性筋炎、肉芽腫症、および血管炎において見られるサイトカインおよびTリンパ球によって媒介される急性および遅延型過敏症に関連する免疫反応；悪性貧血（アジソン病）；白血球の漏出を伴う疾患；中枢神経系（central nervous system: CNS）炎症性障害；多臓器損傷症候群；溶血性貧血（クリオグロブリン血症またはクームス陽性貧血を含むがこれらに限定されない）；重症筋無力症；抗原-抗体複合体介在性疾患；抗糸球体基底膜疾患；抗リン脂質症候群；アレルギー性神経炎；グレーブス病；ランバート-イートン筋無力症候群；水疱性類天疱瘡；天疱瘡；自己免疫性多腺性内分泌障害；ライター病；スティフマン症候群；ベーチェット病；巨細胞性動脈炎；免疫複合体性腎炎；IgA腎症；IgM多発性ニューロパシー；免疫性血小板減少性紫斑病（immune thrombocytopenic purpura: ITP）または自己免疫性血小板減少症。自己免疫疾患は、炎症性疾患、アレルギー疾患、線維化疾患等の他の分類の疾患と一部において重複し、逆も同様である。

[0020] 本明細書で用いられる「アレルギー疾患」は、アレルギーから生じるあらゆる症状、組織損傷、又は組織機能の消失を意味する。アレルギー疾患は、即時型および遅延型に分類される過敏症、またはアレルギーⅠ型～Ⅴ型に分類されるアレルギー疾患を含む。そのような疾患の例としては、Ⅰ型アレルギー（例えば、全身性アナフィラキシー、気管支喘息および花粉症を含む）、Ⅱ型アレルギー（例えば、血液型不適合輸血における溶血および自己免疫性溶血性貧血を含む）、Ⅲ型アレルギー（例えば、血清病、糸球体腎炎および関節リウマチを含む）およびⅤ型アレルギー（例えば、接触性皮膚炎、肉芽腫および移植における拒絶反応を含む）を含むが、これらに限定されない。アレルギー疾患の例としては、喘息；アレルギー性脳脊髄炎；自己免疫性脳脊髄炎；アレルギー性神経炎；接触型過敏症；遅延型過敏症；気道過敏症；アトピー性皮膚炎；花粉症をはじめとした抗原特異的アレルギー；アレルギー性鼻炎；蕁麻疹が挙げられる。アレルギー疾患は、自己免疫疾患、炎症性疾患、線維化疾患等の他の分類の疾患と一部において重複し、逆も同様である。

[0021] 本明細書で用いられる「TH17細胞関連疾患」は、疾患の形成、増悪および／または継続に、TH17細胞が一定の役割を果たしている疾患である。このような疾患としては、炎症性疾患、自己免疫疾患、またはアレルギー疾患のうち、TH17細胞が該疾患の形成、増悪および／または継続に関連している疾患が例示され、中でも、多発性硬化症、関節リウマチ、強皮症、乾癬、腎炎（例えば糸球体腎炎）、喘息、接触型過敏症、遅延型過敏症、および気道過敏症が例示される。

[0022] 本明細書で用いられる「線維化疾患」は、細胞、臓器または組織における線維性結合組織の異常または過剰な形成を伴う状態をいう。線維化疾患は、例えば、身体的傷害、炎症、感染等に起因する、細胞、組織または臓器における回復または反応過程の一部として起こり得る。本明細書において、用語「線維化疾患」は、用語「線維症」、「線維化障害」および「線維化症状」と互換的に使用され得る。

[0023] 線維化疾患としては、以下のものが例示されるがこれらに限定するものではない：血管線維症、肺線維症（例えば、特発性肺線維症）、皮膚線維症（例えば、強皮症、外傷後、手術による皮膚の痕跡化、ケロイド、および皮膚のケロイド形成）、強皮症、全身性強皮症、肝臓線維症（例えば、肝炎Cウイルス感染後または肝臓移植後）、腎臓線維症（例えば、巣状分節状糸球体硬化症における間質性線維症および腎性全身線維症）、筋骨格線維症、心臓線維症（例えば、心内膜心筋線維症、特発性心筋症）、脾臓線維症、眼の線維症（例えば、眼の硬化、緑内障、結膜および角膜瘢痕、並びに翼状片）、進行性の全身性硬化症（PSS）、慢性移植対宿主疾患、ペイロニー疾患、結合組織病、膀胱鏡後の尿道狭窄症、縦隔線維症、特発性および薬理的誘導性の腹膜後方線維症、進行性の重度の線維症、増殖性線維症、腫瘍性線維症、および人工臓器の外科的移植により生じる線維症。線維症と関連した他の疾患、障害、および症状は、例えば、肝臓の線維症をもたらし得る硬変、びまん性肺疾患、精管切除後の疼痛症候群、肺の線維症をもたらし得る結核、脾臓の肥大および最終的には線維症をたらし得る鎌状赤血球細胞貧血、リウマチ関節炎、および腸

壁の線維症をもたらす腸組織の反復性の炎症および治癒を引き起こし得るクローン疾患を含む。線維化疾患は、ウイルス肝炎、アルコール依存症、血色素症の合併症、ウィルソン疾患、住血吸虫症、胆管障害、毒素への暴露、および代謝障害としてもおこる。線維化疾患は、自己免疫疾患、アレルギー疾患、炎症性疾患等の他の分類の疾患と一部において重複し、逆も同様である。

[0024] 本明細書で用いられる「RNAウイルス」は、RNAゲノムを有するウイルスを意味する。RNAウイルスには、一本鎖RNAウイルス（プラス鎖RNAウイルスおよびマイナス鎖RNAウイルスを含む）、および二本鎖RNAウイルスが含まれる。用語「RNAウイルス感染症」は、RNAウイルスが宿主の表面、局所、若しくは全身へ侵入することにより生じるあらゆる障害を意味する。宿主は、本明細書で用いられる個体であってよい。

[0025] 本明細書で用いられる「治療」（および、その文法上の派生語、例えば「治療する」、「治療すること」など）は、治療される個体の自然経過を改変することを企図した臨床的介入を意味し、予防のためにも、臨床的病態の経過の間にも実施され得る。治療の望ましい効果は、これらに限定されるものではないが、疾患の発生または再発の防止、症状の軽減、疾患による任意の直接的または間接的な病理的影響の減弱、転移の防止、疾患の進行速度の低減、疾患状態の回復または緩和、および寛解または改善された予後を含む。いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、疾患の発症を遅らせる、または疾患の進行を遅くするために用いられる。

[0026] 本明細書において、ある分子の「リン酸化を阻害する」とは、ある分子がリン酸化される程度を低減させること、またはある分子がリン酸化されないようにすることを意味する。

[0027] 本明細書において「リン酸化をRegnase-1選択的に阻害する」とは、Regnase-1のリン酸化を阻害する一方で、その他の分子のリン酸化を阻害しないこと、または、Regnase-1以外の分子のリン酸化を阻害する程度が、Regnase-1のリン酸化を阻害する程度に比べて小さいこと（例えば、50%以下、40%以下、3

0%以下、20%以下、または10%以下であってよい。)を意味する。限定はされないが、一態様においては、Regnase-1結合分子を用いてRegnase-1のリン酸化を阻害することにより、Regnase-1選択的にリン酸化を阻害してよい。なお、Regnase-1をリン酸化するキナーゼ自体の活性を阻害することにより、同キナーゼの基質 (Regnase-1以外の分子を含む。) のリン酸化を基質非選択的に阻害する態様は、「リン酸化をRegnase-1選択的に阻害する」ことに含まれない。

[0028] 本明細書における「に相当する位置」は、由来 (共有源) が異なるRegnase-1やプロセッシングを受けたRegnase-1のアミノ酸配列中のアミノ酸残基を、マウスRegnase-1 (配列番号1) の参照により特徴づけるために用いられ得る。相当する位置を決めるためのアラインメントは、当該技術分野における技術の範囲内にある種々の方法、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign (DNASTAR) ソフトウェア、またはGENETYX (登録商標) (株式会社ゼネティックス) などの、公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列のアラインメントをとるための適切なパラメータを決定することができる。

[0029] GENETYX (登録商標) を使用して作成したマウスとヒトのRegnase-1のアミノ酸配列のアラインメントを図1-1に示す。マウスRegnase-1の一部のアミノ酸残基のそれぞれについて、それらに相当する位置のヒトRegnase-1におけるアミノ酸残基を表1に示す。

[0030] [表1]

マウス Regnase-1 (配列番号: 1) の代表的なアミノ酸残基と位置、およびそれぞれに相当するヒト Regnase-1 (配列番号: 2) のアミノ酸残基と位置

マウス Regnase-1	ヒト Regnase-1
Ser435	Ser438
Ser439	Ser442
Ser494	Ser497
Ser513	Ser516

[0031] 本明細書において「炎症を抑制する」とは、炎症が発生しないか、治療さ

れない対照群と比較して炎症がゆっくり進行するか、既に生じている炎症を弱めるか、炎症範囲を減少させることを意味してよい。限定はされないが、炎症抑制の指標の一つとして、炎症性因子の産生抑制を用いてよい。

[0032] 本明細書における「炎症性因子」には、炎症性サイトカインおよび白血球遊走因子が包含される。炎症性因子の例は、本明細書に開示される。

[0033] 本明細書においてRegnase-1の「標的となる」、「標的とする」とは、ある分子がRegnase-1のRNase活性により分解され得ることを意味し、あるmRNAがRegnase-1の標的となり得るか否かは、例えば、本明細書の「活性測定法」の項目に記載した方法で確認することができる。

[0034] 本明細書において「線維化を抑制する」とは、線維化が生じた組織における線維化病変を減少もしくは消失させるか、またはそれ以上の線維化の進行を遅延もしくは阻止する（線維化病変の増大を抑制する）ことを意味する。

[0035] 本明細書において「上皮過形成」とは、上皮組織において正常に配列された正常細胞の数が異常に増加した状態をいう。上皮過形成は、乾癬を含む多くの障害の特徴として知られる。本明細書において「上皮過形成を抑制する」とは、上皮組織において増加した正常細胞の数を減少させるか、または、それ以上の増殖を遅延もしくは阻止することを意味する。

[0036] 本明細書において「ケラチノサイトの増殖抑制」とは、ケラチノサイトの数を減少させるか、または、それ以上の増殖を遅延もしくは阻止することを意味する。ある物質がケラチノサイトの増殖を抑制させるか否かは、例えば、組織学的検査を用いて検証することができる。

[0037] 本明細書において「Regnase-1の細胞内での分解」とは、細胞内におけるRegnase-1のタンパク質量が減少すること、または細胞内からRegnase-1が消失することを意味し、ユビキチン-プロテアソーム系を介した分解が含まれる。例示的には、被験物質処理をしていない細胞と比べて、被験物質処理をした細胞において、Regnase-1のタンパク質量が多い場合には、被験物質処理によりRegnase-1の細胞内での分解が抑制されているとみなしてよい。

[0038] 本明細書において「Regnase-1の不安定化」とは、対照（例えば非リン酸化

Regnase-1を利用できる。)と比較してRegnase-1のRNase活性が低下することを意味する。例えば、Regnase-1が存在するものの標的mRNAを分解する能力を失っている場合には、そのRegnase-1は不安定化されていると表現する。限定はされないが、Regnase-1の不安定化は、本明細書に記載した方法（例えば、活性測定法の項目を参照）で確認することができ、例えばIL-6のmRNAを標的としてよい。このようなRNase活性が低下したRegnase-1を「不活性体」と呼ぶことがある。

[0039] 本明細書において「Regnase-1の不安定化を抑制する」とは、Regnase-1が不安定化することを抑制すること、またはRegnase-1の不活性体の発生を抑制することを意味してよい。

[0040] 本明細書において「Regnase-1オリゴマーの解離阻害」とは、in vitroまたはin vivoにおいて、Regnase-1オリゴマーが解離して、より少ない数で形成される会合体または単量体になることを抑制または阻害することをいう。例示的には、Regnase-1の六量体やそれ以上の会合体が解離して、三量体や単量体になることを抑制または阻害することが挙げられる。

[0041] 本明細書において「Regnase-1の小胞体からの遊離阻害」とは、in vitroまたはin vivoにおいて、Regnase-1が小胞体から遊離することを抑制または阻害することをいう。「小胞体」を「ER」と記載することがある。本明細書において「小胞体」とは、好ましくは粗面小胞体を意味する。

[0042] 本明細書において「リン酸化を阻害する物質を特定するための方法」には、リン酸化を阻害する物質をスクリーニングする方法、ある物質がリン酸化を阻害する物質であることを確認する方法などが含まれるが、これらに限定されない。

[0043] 本明細書において「結合分子」とは、ある分子と結合し得る分子を意味する。例えば、AがBと結合し得る場合、AはBの結合分子であると表現する。

[0044] 本明細書において「Regnase-1結合分子」は、Regnase-1に結合できる分子を意味する。例示的には、合成低分子化合物、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、炭水化物、核酸、およびこれらの誘導体が含まれるが、こ

れらに限定されない。「Regnase-1結合分子」は、Regnase-1に特定の結合できる分子であってよい。

[0045] 本明細書において「ポリペプチド」とは、4以上のアミノ酸および／またはアミノ酸類縁体がアミド結合および／またはエステル結合により連結されている物質をいう。天然ポリペプチド、合成ポリペプチド、組換えポリペプチド等のいずれであってもよい。ポリペプチドには、抗体および環状ポリペプチドが包含される。

[0046] 用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限りは、これらに限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、改変抗体、および抗体断片を含む、種々の抗体構造を包含する。

[0047] 用語「改変抗体」は、改変が加えられていない親抗体からアミノ酸や糖鎖修飾状態等が改変された抗体をいう。例えば、抗原に対するアフィニティを高めるための改変、血中における半減期を延長させるための改変、C1q結合性や補体依存性細胞傷害（CDC）を変えるための改変、抗体の細胞内移行能を高めるための改変などが挙げられる。本明細書においては、例えば、非タンパク質部分（例えば、薬剤、ポリエチレングリコール（PEG）、または核酸など）が付加された抗体誘導体も、改変抗体に含まれる。

[0048] 用語「抗体断片」は、完全抗体が結合する抗原に結合する当該完全抗体の一部分を含む、当該完全抗体以外の分子のことをいう。抗体断片の例は、これらに限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab' -SH、F(ab')₂；ダイアボディ；線状抗体；単鎖抗体分子（例えば、scFv）；および、抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

[0049] 用語「全長抗体」、「完全抗体」、および「全部抗体」は、本明細書では相互に交換可能に用いられ、天然型抗体構造に実質的に類似した構造を有する、またはFc領域を含む重鎖を有する抗体のことをいう。

[0050] 用語「環状ポリペプチド」とは、4個以上のアミノ酸および／またはアミノ酸類縁体により形成される環状構造を含むポリペプチドを意味する。環状

ポリペプチドは、環状部以外に直鎖部を有してもよい。環化部の結合様式は特に限定されず、アミド結合又はエステル結合以外の結合であってもよい。環化部の結合様式としては、例えば、アミド結合、炭素－炭素結合、ジスルフィド結合、エステル結合、チオエステル結合、チオエーテル結合、ラクタム結合、アゾリン骨格を介した結合、トリアゾール構造を介した結合、フルオロフォア構造を介した結合などの共有結合が好ましく例示される。環化に用いられるカルボキシ基やアミノ基等の官能基の位置は、主鎖上のものでも、側鎖上のものでもよく、環化可能な位置にあれば、特に制限されない。本明細書において「環化部の結合様式」とは、環化反応により環化が形成された部位の結合様式のことである。

[0051] 本明細書における「アミノ酸」には、天然アミノ酸、および非天然アミノ酸が含まれる。本明細書における「天然アミノ酸」とは、G l y（グリシン）、A l a（アラニン）、S e r（セリン）、T h r（スレオニン）、V a l（バリン）、L e u（ロイシン）、I l e（イソロイシン）、P h e（フェニルアラニン）、T y r（チロシン）、T r p（トリプトファン）、H i s（ヒスチジン）、G l u（グルタミン酸）、A s p（アスパラギン酸）、G l n（グルタミン）、A s n（アスパラギン）、C y s（システイン）、M e t（メチオニン）、L y s（リシン）、A r g（アルギニン）、P r o（プロリン）を指す。非天然アミノ酸は特に限定されないが、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、D型アミノ酸、N置換アミノ酸、 α , α -二置換アミノ酸、側鎖が天然アミノ酸と異なるアミノ酸などが例示される。本明細書におけるアミノ酸としては、任意の立体配置が許容される。アミノ酸の側鎖の選択は特に制限を設けない。本明細書において、主鎖アミノ基が置換されているアミノ酸のことを「N置換アミノ酸」という。限定を意図しないが、N置換アミノ酸には、Nアルキルアミノ酸が含まれ、中でもNメチルアミノ酸が好ましく例示される。本明細書における「アミノ酸類縁体」とは、好ましくはヒドロキシカルボン酸、より好ましくは α -ヒドロキシカルボン酸を意味する。 α -ヒドロキシカルボン酸の側鎖は、アミノ酸と同様に特に限定されない

。

- [0052] 本明細書において、タンパク質、ポリペプチド、およびペプチドを構成するアミノ酸をアミノ酸残基ということがある。セリン残基を「Ser残基」、スレオニン残基を「Thr残基」ということがある。また、例えばあるアミノ酸配列中の513番目のセリン残基をS513またはSer513と表記することがあり、同セリン残基をアラニンに置換することをS513AまたはSer513Alaのように記載することがある。
- [0053] 用語「アフィニティ」は、分子（例えば、抗体）の結合部位1個と、分子の結合パートナー（例えば、抗原）との間の、非共有結合的な相互作用の合計の強度のことをいう。別段示さない限り、本明細書で用いられる「結合アフィニティ」は、ある結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原）の間の1 : 1相互作用を反映する、固有の結合アフィニティのことをいう。分子XのそのパートナーYに対するアフィニティは、一般的に、解離定数 (KD) により表すことができる。アフィニティは、当該技術分野において知られた通常の方法によって測定され得る。結合アフィニティを測定するための具体的な実例となるおよび例示的な態様については、下で述べる。
- [0054] 用語「Regnase-1に特異的に結合できる分子」、および「Regnase-1を特異的に認識できる分子」は相互に交換可能に用いられ、これらは、十分なアフィニティでRegnase-1に特異的に結合することのできる分子であって、その結果その分子がRegnase-1を標的化したときに診断剤および／または治療剤として有用であるような、分子のことをいう。一態様において、無関係な非Regnase-1タンパク質への「Regnase-1に特異的に結合できる分子」の結合の程度は、例えば、表面プラズモン共鳴アッセイ、放射免疫測定法 (radioimmunoassay: RIA)、酵素免疫測定法などにより測定したとき、Regnase-1への結合の約10%未満である。特定の態様において、「Regnase-1に特異的に結合できる分子」は、1 μ M以下、100nM以下、10nM以下、1nM以下、0.1nM以下、0.01nM以下、または0.001nM以下（例えば、 10^{-8} M以下、例えば 10^{-8} M $\sim$ 10^{-13} M、例えば、 10^{-9} M $\sim$ 10^{-13} M）の解離定数 (KD) を有する。一態様において、無関係な非Regnase-

1タンパク質への「Regnase-1に特異的に結合できる分子」の結合の程度は、例えば、表面プラズモン共鳴アッセイにより本明細書に記載の方法で測定したとき、Regnase-1への結合の約10%未満である。特定の態様において、「Regnase-1に特異的に結合できる分子」は、異なる種からのRegnase-1の間で保存されているRegnase-1のエピトープに結合するが、これに限定されない。特定の態様において、「Regnase-1に特異的に結合できる分子」は、マウスおよびヒトのRegnase-1に結合するが、これに限定されない。

[0055] 本明細書において、特定部位が「リン酸化されたRegnase-1に特異的に結合できる分子」、および「リン酸化されたRegnase-1を特異的に認識できる分子」は相互に交換可能に用いられ、一態様において、特定部位がリン酸化されていないRegnase-1への結合の程度は、例えば、表面プラズモン共鳴アッセイ、放射免疫測定法（radioimmunoassay: RIA）、ウェスタンブロッティングなどの方法により測定したとき、特定部位がリン酸化されているRegnase-1への結合の約10%未満であってよい。

[0056] 本明細書における「Regnase-1に特異的に結合できる分子」には、抗体や環状ポリペプチドなどのポリペプチドが包含されるが、これらに限定されない。

[0057] 本明細書における「Toll様受容体（TLR）リガンド」は、TLR1リガンド、TLR2リガンド、TLR7リガンド、またはTLR4リガンド（リポ多糖（LPS））が包含されるが、これらに限定されない。

[0058] ある剤（例えば、薬学的製剤）の「有効量」は、所望の治療的または予防的結果を達成するために有効である、必要な用量におけるおよび必要な期間にわたっての、量のことをいう。

[0059] 用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」は、相互に交換可能に用いられ、外来核酸を導入された細胞（そのような細胞の子孫を含む）のことをいう。宿主細胞は「形質転換体」および「形質転換細胞」を含み、これには初代の形質転換細胞および継代数によらずその細胞に由来する子孫を含む。子孫は、親細胞と核酸の内容において完全に同一でなくて

もよく、変異を含んでいてもよい。オリジナルの形質転換細胞がスクリーニングされたまたは選択された際に用いられたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫も、本明細書では含まれる。

[0060] 用語「個体」または「被験体」は哺乳動物である。哺乳動物は、これらに限定されるものではないが、飼育動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ）、霊長類（例えば、ヒト、およびサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、ならびに、げっ歯類（例えば、マウスおよびラット）を含む。特定の態様では、個体または被験体は、ヒトである。

[0061] 用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体のことをいう。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、生じ得る変異抗体（例えば、自然に生じる変異を含む変異抗体、またはモノクローナル抗体調製物の製造中に発生する変異抗体。そのような変異体は通常若干量存在している。）を除いて、同一でありおよび／または同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。したがって、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られるものである、という抗体の特徴を示し、何らかの特定の方法による抗体の製造を求めるものと解釈されるべきではない。例えば、本発明にしたがって用いられるモノクローナル抗体は、これらに限定されるものではないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含んだトランスジェニック動物を利用する方法を含む、様々な手法によって作成されてよい。

[0062] 用語「ポリクローナル抗体」は、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含む集団をいう。修飾語「ポリクローナル」は、抗体の特徴を示すのであって、何らかの特定の方法による抗体の製造を求めるものと解釈されるべきではない。

[0063] 用語「TBK1」は、TANK結合キナーゼ1としても知られるセリン／スレオニ

ンキナーゼであり、ヒトTBK1およびマウスTBK1のアミノ酸配列の一例は、それぞれUniprot受託番号Q9UHD2、Q9WUN2から入手できる。

[0064] 用語「IKKi」は、inducible I κ BキナーゼやIKK-Eとも呼ばれるキナーゼであり、ヒトIKKiおよびマウスIKKiのアミノ酸配列の一例は、それぞれUniprot受託番号Q14164、Q9R0T8から入手できる。

[0065] 用語「Act-1」は、TRAF3IP2、CIKS、またはNuclear factor NF-kappa-B activator 1とも呼ばれるアダプター分子である。ヒトAct-1のアミノ酸配列の一例は、Uniprot受託番号043734から入手できる。

[0066] 用語「IKK」は、I κ Bキナーゼと同義で用いられ、IKKにはIKK α および／またはIKK β が含まれる。本明細書におけるIKKとしては、IKK β が好ましく例示される。

[0067] 用語「IRAK」は、IL-1受容体関連キナーゼ (IL-1R-associated kinase) と同義で用いられ、IRAKにはIRAK1およびIRAK2が含まれる。本明細書におけるIRAKとしては、IRAK1およびIRAK2が好ましく例示される。

[0068] 用語「薬学的製剤」は、その中に含まれた有効成分の生物学的活性が効果を発揮し得るような形態にある調製物であって、かつ製剤が投与される被験体に許容できない程度に毒性のある追加の要素を含んでいない、調製物のことをいう。

[0069] 「薬学的に許容される担体」は、被験体に対して無毒な、薬学的製剤中の有効成分以外の成分のことをいう。薬学的に許容される担体は、これらに限定されるものではないが、緩衝液、賦形剤、安定化剤、または保存剤を含む。

[0070] 本明細書で用いられる用語「ベクター」は、それが連結されたもう1つの核酸を増やすことができる、核酸分子のことをいう。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、および、それが導入された宿主細胞のゲノム中に組み入れられるベクターを含む。あるベクターは、自身が動作的に連結された核酸の、発現をもたらすことができる。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」とも称される。

[0071] 2. 治療方法および治療用組成物等

本項目において、「治療および／または予防方法」を単に「治療方法」と称することがある。また、「治療および／または予防用組成物」を単に「治療用組成物」と称することがある。

[0072] 一局面において、本発明は、Regnase-1の特定部位のリン酸化を阻害することが、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、線維化疾患、RNAウイルス感染症、TH17細胞関連疾患などの治療および／または予防に有効であることを見出したことに基づく。一局面において、本発明は、Regnase-1の特定部位のリン酸化を阻害することが、以下(i)～(xi)からなる群より選択される少なくとも一つに有効であることを見出したことに基づく：(i) Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防；(ii) 炎症の抑制；(iii) 細胞、組織または臓器の線維化の抑制；(iv) 上皮過形成の抑制；(v) IL6、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つのmRNAの発現の抑制；(vi) Regnase-1の不安定化の抑制；(vii) 炎症性因子の産生抑制；(viii) Regnase-1の細胞内での分解の抑制；(ix) Regnase-1の小胞体からの遊離の阻害；(x) Regnase-1オリゴマーの解離の阻害；(xi) ケラチノサイトの増殖抑制。一局面において、本発明は、IL-17刺激によるRegnase-1のリン酸化に(a)TBK1またはIKKi、および(b)Act-1が関与していることを見出したことに基づく。

[0073] Regnase-1は、そのmRNAの迅速な誘導にも関わらず、マクロファージや線維芽細胞などの様々な細胞に未刺激の状態でも存在しており、不要な炎症反応を抑制する働きをしていると考えられる(Nature immunology, Vol.12, NUMBER 12, DECEMBER 2011, p.1167-1175)。一方、Toll様受容体 (TLR) リガンドおよびIL-1ファミリーなどのMyD88を介する外界の刺激に応答して、Regnase-1はI κ Bキナーゼ (IKK) によりリン酸化され、ユビキチン依存的な分解を受けると考えられる(Nature immunology, Vol.12, NUMBER 12, DECEMBER 2011, p.1167-1175)。並行して、IKKによりリン酸化されたI κ B も同様に分解され、NF- κ Bが放出された結果、NF- κ B が核内に移行して、Regnase-1を含む様

々な炎症関連遺伝子が誘導される。このようにして誘導されたRegnase-1が標的mRNAを分解し、過剰な炎症の持続を抑制するといったネガティブフィードバック機構により生体反応を制御していると考えられる。

[0074] 特定の理論に拘束されることを意図しないが、本発明者らは、以下のように考えた。すなわち、本明細書に開示される結果から、S435AおよびS439Aの変異を有するマウスRegnase-1はリン酸化を受け不活性体に変化するものの、その分解が抑制される。その後、一部のRegnase-1が脱リン酸化されることで、RNase活性を有する活性体のRegnase-1が生じると考えられた。このようなRegnase-1変異体を発現する動物に各種疾患を誘導した実験（多発性硬化症のモデルとされるEAE、並びに、乾癬、糸球体腎炎、および強皮症のモデル）の結果、Regnase-1の不安定化および／または細胞内での分解を抑制することの治療的有用性が実証された。一方で、S435AおよびS439Aの変異を有するRegnase-1であってもリン酸化を受けて不活性体に変化することから、これを抑制することができればより強い治療効果が期待できると考えた。なお、以下においてIL-17およびIL-1刺激による研究結果を示しているが、後述するようにLPS（TLR4のリガンドとして知られる。）刺激においてもIL-17およびIL-1刺激と同様のリン酸化パターンを示すこと、Regnase-1AA/AA細胞に対してPam3-Csk4（TLR1およびTLR2のリガンドとして知られる。）刺激をすると、Regnase-1の標的であるIL-6およびIL-12の産生量が減少すること、並びに、乾癬モデルの誘発に用いられたイミキモドはTLR7のアゴニストであることが知られていることから、TLRリガンドが関与する疾患においても、Regnase-1の不安定化および／または細胞内での分解を抑制することが有効であると考えられた。

[0075] これらの知見から、一局面において、本発明者らは、Regnase-1がIKKによりリン酸化される部位（配列番号1の435および439位に相当するSer残基）のリン酸化を阻害することが、以下(i)～(viii)からなる群より選択される少なくとも一つに有効であることを見出した：(i) Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防；(ii) 炎症の抑制；(iii) 細胞、組織または臓器の線

維化の抑制；(iv) 上皮過形成の抑制；(v) IL6、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つのmRNAの発現の抑制；(vi) 炎症性因子の産生抑制；(vii) Regnase-1の細胞内での分解の抑制；(viii) ケラチノサイトの増殖抑制。

[0076] 特定の理論に拘束されることを意図しないが、本発明者らは以下（１）～（４）のように考えた。

[0077] （１）本発明者らは、IL-17およびIL-1刺激によりリン酸化を受けることが確認されたマウスRegnase-1のアミノ酸残基のうち、配列番号１のSer494、Thr505、Ser508およびSer513に着目した。各アミノ酸残基のリン酸化がRegnase-1の不安定化に与える影響の検証を目的の一つとして、これら４残基のリン酸化を阻害するために、それぞれをアラニン（Ala）に置換したRegnase-1変異体を作成した。これらのRegnase-1変異体を利用してIL-17およびIL-1刺激後のRegnase-1のリン酸化をウエスタンブロッティング法により検証した結果、T505A/S508Aの変異を有するRegnase-1ではリン酸化を示すバンドシフトが検出されたものの、S494A、S513A、並びにS494AおよびS513Aの変異を有するRegnase-1では前記バンドシフトは検出されなかった。このことから、前記バンドシフトには、Regnase-1における配列番号１の494および／または513に相当する位置のSer残基のリン酸化が寄与していると考えられた。

[0078] （２）本発明者らは、IL-17およびIL-1刺激により生じる前記と同様のシフトしたバンドに相当するリン酸化Regnase-1が、標的mRNAの分解能力が低下した不活性体であることを、IL-6 mRNAを標的とした実験により示した。したがって、Regnase-1のSer494およびSer513のリン酸化を阻害することで、不活性体であるリン酸化Regnase-1の生成を抑制でき（Regnase-1の不安定化を抑制でき）、Regnase-1の活性を維持させることができると考えられた。

[0079] （３）本明細書において初めて開示された研究結果に基づき、前記Ser494およびSer513の細胞内での役割について、本発明者らは次のように考えた。Regnase-1はリボソーム含有オルガネラである小胞体においてオリゴマー形態で存在している。細胞刺激によって引き起こされるRegnase-1のリン酸化は、

Regnase-1オリゴマーを解離させ、小胞体からの遊離とそれに続く細胞質への移行を促す。また、リン酸化されたRegnase-1はRNase活性を失う。そして、リン酸化されたRegnase-1は細胞質でプロテアソームにより分解される。IL-17および／またはIL-1刺激によるRegnase-1のリン酸化において中心的な役割を担うアミノ酸残基である、配列番号1における494および／または513位に相当する位置のSer残基のリン酸化を阻害することにより、細胞刺激によって引き起こされるRegnase-1オリゴマーの解離を抑制し、小胞体からの遊離を阻害し、また、Regnase-1の分解を抑制することができる。Regnase-1は、小胞体において標的mRNAを分解する。そのため、配列番号1における494および／または513位に相当する位置のSer残基のリン酸化を阻害し、Regnase-1の小胞体からの遊離（また、それに続く細胞質への移行）を阻害することにより、刺激後もなおRegnase-1による標的mRNA分解活性が発揮され得る（Regnase-1の不安定化を抑制することができる）。

[0080] （4）また、本発明者らは、TBK1およびIKKiが前記Ser494およびSer513をリン酸化するキナーゼであるという本明細書に開示される知見に基づき、TBK1およびIKKiによりリン酸化されないようにしたRegnase-1 Δ CTDを発現する動物を用いて研究を進めた。その結果、前記Ser513およびSer494のリン酸化を阻害することが、Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防に強い効果を発揮することを示した。この治療および／または予防効果は、前記Ser435およびSer439をAlaに置換することによりこれらの残基のリン酸化を阻害したときの効果よりも大きかった。また、この過程で、Act-1が、TBK1やIKKiを介したRegnase-1のリン酸化に寄与していることが示された。また、IL-1刺激の際に前記Ser494およびSer513をリン酸化するキナーゼとしてはIRAKが想定された。

[0081] これらの知見から、一局面において、本発明者らは、Regnase-1における配列番号1の513および494位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害すること、および／または、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なく

とも一つとRegnase-1の相互作用を阻害することにより、以下(i)～(ix)からなる群より選択される少なくとも一つに有効であることを見出した：(i) Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防；(ii) 炎症の抑制；(iii) 細胞、組織または臓器の線維化の抑制；(iv) 上皮過形成の抑制；(v) IL6、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つのmRNAの発現の抑制；(vi) 炎症性因子の産生抑制；(vii) Regnase-1の不安定化の抑制；(viii) Regnase-1の細胞内での分解の抑制；(ix) ケラチノサイトの増殖抑制。

[0082] 特定の理論に拘束されることを意図しないが、本発明者らは以下のようにも考える。IL-36刺激によるシグナルは、IL-1やTLRリガンドによる刺激と同様にMyD88を介した経路を利用する。IL-1やTLRリガンド刺激によるRegnase-1の不安定化および分解は、MyD88を介したIKKおよびIRAKの活性化を経て、これらのキナーゼによりRegnase-1がリン酸化されることにより進行すると考えられる。そのため、IL-36刺激においてもIKKおよびIRAKの活性化を経由したRegnase-1のリン酸化が起こり、Regnase-1の不安定化および／または分解が生じると考えられる。現に、IL-36刺激によりRegnase-1が分解されることが報告されており、IL-36が関連する疾患とRegnase-1の関連性も示されている (Journal of Investigative Dermatology (2018) 138, 1439-1442)。このことから、IL-36が関与する疾患に対しても、Regnase-1の不安定化および／または細胞内での分解を抑制することが有効であると考えられ、そのためにRegnase-1のリン酸化阻害が有力な手段となり得る。

[0083] 特定の理論に拘束されることを意図しないが、本発明者らは以下のようにも考える。Regnase-1は抗RNAウイルス活性を示すことが報告されている (J Immunol 2014; 193:4159-4168; Proc Natl Acad Sci USA 2013; 110: 19083-19088; Nucleic Acids Res 2013; 41:3314-3326; Nature 2009; 461: 399-401)。本発明は、一態様において、Regnase-1の不安定化および／または細胞内での分解を抑制することができるため、Regnase-1のRNase活性が維持され、RNAウイルス感染症に対しても有効であると考えられる。

- [0084] いくつかの態様において、本発明の方法は、Ser残基のリン酸化をRegnase-1選択的に阻害することによる方法であってよい。あるいは本発明の方法は、Ser残基のリン酸化をRegnase-1選択的に阻害する工程を含んでもよい。
- [0085] いくつかの態様において、本発明の組成物は、Regnase-1のSer残基のリン酸化を阻害してよく、一態様においてRegnase-1選択的にリン酸化を阻害してよい。いくつかの態様において、本発明の組成物は、Regnase-1のSer残基のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子を含んでよい。
- [0086] いくつかの態様において、本発明の方法または組成物は、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子（本明細書において、これらの分子を「Regnase-1作用分子」とも称する。）とRegnase-1との結合を阻害してよく、一態様において、本発明の方法または組成物は、Regnase-1と、以下(i)～(xi)のいずれかの結合分子との結合を阻害してよい：(i) TBK1、IKKi、Act-1およびIKKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子；(ii) TBK1、IKKi、Act-1およびIRAK からなる群より選択される少なくとも一つの結合分子；(iii) TBK1、IKKiおよびAct-1からなる群より選択される少なくとも一つの結合分子；(iv) TBK1およびIKKi；(v) Act-1；(vi) TBK1、IKKiおよびAct-1；(vii) TBK1；(viii) IKKi；(ix) IRAK；(x) IKK；(xi) TBK1およびIKK。限定はされないが、前記(i)～(xi)におけるIKKとしてはIKK β が例示される。
- [0087] いくつかの態様において、本発明の組成物は、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害するRegnase-1結合分子を含有してよい。
- [0088] いくつかの態様において、本発明の方法または組成物は、以下(i)～(xi)からなる群より選択される少なくとも一つのための方法または組成物であってよい：(i) Regnase-1が関与する疾患を治療および／または予防するため；(ii) 炎症を抑制するため；(iii) 細胞、組織または臓器の線維化を抑制するため；(iv) 上皮の過形成を抑制するため；(v) IL6、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBE GF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つのmRNA

の発現を抑制するため；(vi) Regnase-1の不安定化を抑制するため；(vii) 炎症性因子の産生を抑制するため；(viii) Regnase-1の細胞内での分解を抑制するため；(ix) Regnase-1の小胞体からの遊離を阻害するため；(x) Regnase-1オリゴマーの解離を阻害するため；(xi) ケラチノサイトの増殖を抑制するため。

[0089] 限定はされないが、いくつかの態様においては、本発明の方法または組成物は、前記(i)～(xi)から選択される二以上、三以上、四以上、または五以上のための方法または組成物であってもよい。

[0090] ある物質または組成物が、Regnase-1の小胞体からの遊離を阻害するか否かは、例えば、実施例に記載の方法（細胞内区画を単離し、ウエスタンブロッティングを用いてそれらのタンパク質分布を解析する方法）により確認できる。ある物質が、Regnase-1オリゴマーの解離を阻害するか否かは、例えば、実施例に記載の非変性PAGE解析を用いて確認できる。

[0091] いくつかの態様において、本発明におけるSer残基は、Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置、または二以上の位置のSer残基であってよく、(i) 配列番号1の513、494、439、および435位；または、(ii) 配列番号2の516、497、442、および438位からなる群より選択される少なくとも一つの位置、または二以上の位置のSer残基であってもよい。

[0092] いくつかの態様において、本発明におけるSer残基は、Regnase-1における配列番号1の513および494位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置、または両方の位置のSer残基であってよく、(i) 配列番号1の513および494位；または、(ii) 配列番号2の516および497位からなる群より選択される少なくとも一つの位置、または両方の位置のSer残基であってもよい。

[0093] いくつかの態様において、本発明におけるSer残基は、Regnase-1における配列番号1の513位に相当するSer残基であってよく、(i) 配列番号1の513位；または、(ii) 配列番号2の516位のSer残基であってもよい。

[0094] いくつかの態様において、本発明におけるSer残基は、Regnase-1における配列番号1の439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置、または両方の位置のSer残基であってよく、(i) 配列番号1の439および435位；または、(ii) 配列番号2の442および438位からなる群より選択される少なくとも一つの位置、または両方の位置のSer残基であってもよい。

[0095] いくつかの態様において、本発明におけるSer残基は、以下の(i)および(ii)の両方のSer残基であることができる：

(i) Regnase-1における配列番号1の513および494のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のSer残基；

(ii) Regnase-1における配列番号1の439および435のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のSer残基。

特定の理論に拘束されることを意図しないが、Regnase-1において、TBK1およびIKKiによってリン酸化される前記(i)および、IKKによってリン酸化される前記(ii)の両方のSer残基のリン酸化を抑制することにより、本発明の効果をより強く発揮することができ得る。例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、線維化疾患、RNAウイルス感染症、TH17細胞関連疾患などの治療および／または予防においてより高い効果を得ることができる。

[0096] いくつかの態様において、本発明におけるSer残基は、Regnase-1のアミノ酸配列に含まれるYWSEP（配列番号：3）、HFSVP（配列番号：4）およびDSGIGS（配列番号：5）からなる群より選択される少なくとも一つ、または二以上のアミノ酸配列に含まれるSer残基であってよい。

[0097] いくつかの態様において、本発明におけるSer残基のリン酸化を阻害することが可能な物質は、本明細書に記載のPP1～PP25より選択される少なくとも1つの化合物（環状ポリペプチド）であり得る。PP1～PP25は、順に、配列番号：11～16、30～48に記載のアミノ酸配列を有する。

またいくつかの態様において、本発明におけるSer残基のリン酸化を阻害することが可能な物質は、本明細書に記載のPP7+tag、PP10+tagおよびPP23+tag

より選択される少なくとも1つの化合物（直鎖部を有する環状ポリペプチド）であり得る。PP7+tag、PP10+tagおよびPP23+tagは、順に、配列番号：57～59に記載のアミノ酸配列を有する。

[0098] いくつかの態様において、本発明におけるSer残基のリン酸化を阻害することが可能な物質は、抗体である。抗体は、例えば以下に記載のアミノ酸配列を含む抗Regnase-1抗体の中から選択することができる。

配列番号：20に記載のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：21に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むREA0023。

配列番号：22に記載のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：23に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むREA0027。

配列番号：24に記載のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：25に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むREB0007。

配列番号：26に記載のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：27に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むREB0014。

配列番号：28に記載のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：29に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むREB0022。

[0099] いくつかの態様において、本発明におけるリン酸化は、IL-17、IL-1、IL-36およびTLRリガンドからなる群；または、IL-17、IL-1、およびTLRリガンドからなる群より選択される少なくとも一つの分子により誘導され得るリン酸化であってよく、好ましくはIL-17およびIL-1からなる群より選択される少なくとも一つの分子、より好ましくは、IL-17により誘導され得るリン酸化であってよい。限定はされないが、一態様において、前記IL-17；IL-1；IL-36；およびTLRリガンドは、それぞれ独立して、IL-17A；IL-1 β ；IL-36 α ；および、TLR1のリガンド、TLR2のリガンド、TLR4のリガンド、TLR7のリガンド、またはLPSであってよい。ここでの前記分子により刺激される細胞は特に限定されないが、非造血細胞であってよく、マクロファージ、線維芽細胞（例えば、実験的にはマウス胎仔線維芽細胞（MEF）が使用できる。）、内皮細胞（例えば、実験的には肝類洞壁内皮細胞（LSEC）が使用できる。）が例示され

る。

[0100] 別の態様において、本発明におけるリン酸化は、TBK1(TANK-binding kinase 1)、IKKi(inducible I κ B kinase)、IRAK(IL-1R-associated kinase)1、IRAK2、およびIKK(I κ B kinase)からなる群より選択される少なくとも一つのキナーゼによるリン酸化であってよく、TBK1、IKKiおよびIKKからなる群より選択される少なくとも一つのキナーゼによるリン酸化であってよく、IKKによるリン酸化であってもよく、IRAKによるリン酸化であってもよく、TBK1および／またはIKKiによるリン酸化であってもよい。

[0101] 本発明におけるRegnase-1のリン酸化阻害の程度は特に限定されず、被験物質なしの陰性対照と比較して、被験物質を添加した場合のRegnase-1のリン酸化の程度が低減されていれば、リン酸化が阻害されているとされてよい。例示的には、前記のリン酸化の程度が、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、または10%以下に低減されていてよい。

[0102] 本発明における、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合阻害の程度は特に限定されず、被験物質なしの陰性対照と比較して、被験物質を添加した場合の結合分子とRegnase-1との結合の程度が低減されていれば、結合分子とRegnase-1との結合が阻害されているとされてよい。例示的には、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下に低減されていてよい。

[0103] 本発明における被験物質としては、特に限定されるものではなく、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出物などが挙げられ、好ましくは抗体および環状ポリペプチドが挙げられる。

[0104] いくつかの態様において、本発明の方法および／または組成物は、Regnase-1が関与する疾患を治療および／または予防するためのものであってよい。

[0105] 「Regnase-1が関与する疾患」としては、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、線維化疾患、RNAウイルス感染症、およびTH17細胞関連疾患からなる群より選択される少なくとも一つの疾患であってよい。一態様において

、「Regnase-1が関与する疾患」は、線維化症および／または上皮過形成を伴う炎症性疾患；自己免疫疾患；アレルギー疾患；RNAウイルス感染症；およびTH17細胞関連疾患からなる群より選択される少なくとも一つの疾患であってよい。このような疾患に対して、本発明の方法および／または組成物を適用することにより、抗炎症作用と共に、線維化抑制作用や上皮過形成抑制作用が発揮され得る。「Regnase-1が関与する疾患」としては、多発性硬化症、乾癬、強皮症、腎炎（糸球体腎炎が例示されるがこれに限定されない。）、ブドウ膜炎、肺線維症、腎臓線維症、血管線維症、ケロイド、関節リウマチ、全身性エリトマトーデス、シェーグレン症候群、肺炎、皮膚炎、血管炎、神経炎、関節炎、眼炎症、脳脊髄炎および喘息が例示されるが、これらに限定されない。

[0106] 限定はされないが、一態様において、「Regnase-1が関与する疾患」は、以下の組織または臓器における疾患であってよい：腎臓、肺、皮膚、肝臓、心臓、膵臓、骨髄、血管（血管内皮細胞を含む。）、神経、眼、子宮、脳および前立腺。例示的には、腎臓、皮膚、肺、血管、眼、脳および神経からなる群より選択される少なくとも一つの組織または臓器が挙げられるが、これらに限定されない。

[0107] 限定はされないが、一態様において、「Regnase-1が関与する疾患」は、以下(i)～(viii)からなる群より選択される少なくとも一つの疾患であってよい：(i) Regnase-1の標的となり得るmRNAの発現が疾患の形成、増悪および／または継続に関与する疾患；(ii) TH17細胞が疾患の形成、増悪および／または継続に関与する疾患；(iii) IL-17、IL-1およびTLRリガンドからなる群より選択される少なくとも一つが疾患の形成、増悪および／または継続に関与する疾患；(iv) IL-17およびIL-1からなる群より選択される少なくとも一つが疾患の形成、増悪および／または継続に関与する疾患；(v) 細胞、組織、または臓器の線維化を伴う疾患；(vi) 上皮の過形成を伴う疾患；(vii) IL6、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つの分子が疾患の形成、増悪および／または継続に関与する

疾患；(viii)IL-17、IL-1、IL-36およびTLRリガンドからなる群より選択される少なくとも一つが疾患の形成、増悪および／または継続に関与する疾患。限定はされないが、一態様において、前記IL-17、IL-1、IL-36およびTLRリガンドは、それぞれ独立して、IL-17A；IL-1 β ；IL-36 α ；および、TLR1のリガンド、TLR2のリガンド、TLR4のリガンド、TLR7のリガンド、またはLPSであってよい。

[0108] 前記(i)における「Regnase-1の標的となり得るmRNA」としては、Regnase-1により分解され得るものである限り限定されない。Regnase-1により分解され得るmRNAとしては、以下が例示される：FABP5、ACKR3、CTGF、ADAMTS1、ATF2、CD80、CYR61、DDR1、DUOX、DUSP6、CSF3、HBEGF、ID3、IL19、MAP3K8、IL1a、MCOIN3、MITF、ORC1、PDGFB、PTGS1、SESN1、PTGER4、SHQ1、SULF1、TNFRSF9、ZC3H12C、RAR β およびTMEM9（実施例参照）；CXCL1、CXCL2、CXCL3、NFKB1、NFKBID、PTGS2、ID1、MAFK、ZC3H12A、TM2D3、およびIL6（Cell, 2015 May 21;161(5):1058-1073）；REL、TNFRSF4、IL2、ICOS、CD44、TNFRSF1B、IL1b、およびNFATC1（Cell, 2013 May 23;153(5):1036-49）；GATA3（J Allergy Clin Immunol, 2017 Oct 27, pii: S0091-6749(17)31654-8）；CEBPB（PLoS One, 2017 Mar 22;12(3):e0174381.）；FURIN、IL12RB1、RC3H1、RC3H2、およびIL18R1（J Immunol, 2017 Dec 15;199(12):4066-4077.）；BCL2L1、RELB、BIRC3、およびBCL3（Cancer Res, 2016 Mar 15;76(6):1429-40.）；IL12b、およびCALCR（Nature, 2009 Apr 30;458(7242):1185-90）；TFRC、およびEGLN3（Cell Rep, 2017 May 23;19(8):1614-1630.）。「Regnase-1の標的となり得るmRNA」としては、IL6、IL12b、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つであってもよい。これらのmRNAに対応するタンパク質の情報は、データベースUniprotから入手できる。Regnase-1の標的となり得るmRNAか否かは、前記で引用される文献に記載の公知の方法や本明細書に記載の方法を用いて確認することができる。一態様において、前記「Regnase-1の標的となり得るmRNA」は、非造血細胞から産生される分子のmRNAであってよい。本明細書においてmRNAの各名称を表記

する際には、大文字と小文字を区別せずに使用することがある（例えば、「HBEFG」と「Hbefg」は同じmRNAを表す。）。

[0109] 限定を意図しないが、前記Regnase-1に分解され得るmRNAとしては、IL6、IL1a、IL1b、IL12b、CXCL1、CXCL2、およびCXCL3（炎症性因子）；CTGF、DDR1およびPDGFB（臓器線維化関連因子）；並びに、IL2およびHBEGF（細胞増殖因子）であってよく、IL6およびIL1a；CXCL1およびCXCL2；HBEGF；並びに、CTGF、DDR1およびPDGFBが好ましく例示される。前記のmRNAとそれから産生されるタンパク質の対応を次に示す：IL6（IL-6）、IL1a（IL-1 α ）、IL1b（IL-1 β ）、IL12b（IL-12サブユニット β ）、CXCL1（CXCL-1）、CXCL2（CXCL-2）、CXCL3（CXCL-3）；CTGF（Connective tissue growth factor）、DDR1（Epithelial discoidin domain-containing receptor 1）、PDGFB（Platelet-derived growth factor subunit B（PDGF-2））；IL2（IL-2）、HBEGF（Proheparin-binding EGF-like growth factor）。

[0110] いくつかの態様において、本発明は、以下の(i)～(iii)のいずれかに記載の標的mRNAを分解してよい。一態様においては、Regnase-1のリン酸化を阻害すること；および／または、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害することによって以下の(i)～(iii)のいずれかに記載の標的mRNAを分解してよい。

[0111] (i) 線維化関連因子

例えば、CTGF、DDR1およびPDGFBが挙げられる。本発明者らは、臓器線維化の指標であるCTGF、DDR1およびPDGFBがRegnase-1の標的になり得ることを初めて見出した。加えて、動物モデルにおいて、Regnase-1のリン酸化阻害が、これら因子の発現を抑制すること、並びに、臓器の線維化を抑制することを見出した。一局面において、本発明はこれらの知見に基づくものであり、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つ、二以上、またはすべてのmRNAの発現を抑制する方法または組成物を提供する。別の局面においては、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つ、二以上、またはすべてのmRNAの発現を抑制することによる、細胞、組織

または臓器の線維化を抑制する方法または組成物が提供される。

[0112] (ii) 炎症性因子

例えば、IL2, IL6, IL12b, IL12p40, IL1a, IL1b, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL5 CCL30, GMCSF, PTGS2, NFKBIZ, NFKBID, ICOS, OX40, c-Rel, NFATC1, Gata3, C/EBPb, IL-18R, CXL2L1, RELB, Ackr3, Adamts1, Atf2, CD80, Cyr61, Duox, Dusp6, Csf3, ID3, IL19, Map3k8, Ptgs1, Ptger4, Tnfrsf9およびzc3h12cが挙げられる。中でも、IL6、IL1a、IL1b、IL2、IL12b、CXCL1、CXCL2およびCXCL3が好ましく例示される。本発明者らは、Ackr3, Adamts1, Atf2, CD80, Cyr61, Duox, Dusp6, Csf3, ID3, IL19, Map3k8, Ptgs1, Ptger4, Tnfrsf9およびzc3h12cがRegnase-1の標的となり得ることを初めて見出した。また、動物モデルにおいて、Regnase-1のリン酸化阻害が、IL6、IL1a、CXCL1およびCXCL2の発現を抑制すること、並びに、炎症を抑制することを見出した。一局面において、本発明はこれらの知見に基づくものであり、IL6、IL1a、IL1b、IL2、IL12b、CXCL1、CXCL2およびCXCL3からなる群；または、IL6、IL1a、CXCL1およびCXCL2からなる群より選択される少なくとも一つ、または二以上のmRNAの発現を抑制する方法または組成物を提供する。別の局面においては、IL6、IL1a、IL1b、IL2、IL12b、CXCL1、CXCL2およびCXCL3からなる群；または、IL6、IL1a、CXCL1およびCXCL2からなる群より選択される少なくとも一つ、または二以上のmRNAの発現を抑制することによる炎症抑制方法または組成物が提供される。

[0113] (iii) 細胞増殖因子

例えば、ID1, TM2D3, CD44, BIRC3, BCL3, Fabp5, Hbfgf, mcoln3, Mitf, Orc1, Sesn1, Sulf1, Rarb, Tmem9が挙げられる。本発明者らは、細胞増殖因子であるID1, TM2D3, CD44, BIRC3, BCL3, Fabp5, Hbfgf, mcoln3, Mitf, Orc1, Sesn1, Sulf1, Rarb, およびTmem9がRegnase-1の標的になり得ることを初めて見出した。加えて、動物モデルにおいて、Regnase-1のリン酸化阻害が、HBEFGの発現を抑制すること、並びに、ケラチノサイトの増殖を抑制することを見出した。一局面において、本発明はこれらの知見に基づくものであり

、HBEGFのmRNAの発現を抑制する方法または組成物を提供する。別の局面においては、HBEGFのmRNAの発現を抑制することによる上皮過形成を抑制する方法または組成物が提供される。なお、HBEGF mRNAに対応するタンパク質は、Pro heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) として知られる。

[0114] 限定はされないが、いくつかの態様において、本発明の方法および／または組成物は、Regnase-1の標的となり得るmRNAの発現を抑制してよい。一態様において、前記「Regnase-1の標的となり得るmRNA」として列記された分子からなる群より選択される少なくとも一つのmRNAの発現を抑制してよく、中でも、炎症性因子；細胞増殖因子；および、線維化関連因子からなる群より選択される少なくとも一つのmRNAの発現を抑制してよい。一態様において、このような分子は、非造血細胞から産生される分子であってよい。

[0115] 限定はされないが、いくつかの態様において、本発明の方法および／または組成物は、IL6、IL12b、IL1a、CXCL1、CXCL2、CCL5、CCL20、LCN2、GMCSF、HBEGF、SPRR2I、KERATIN 6A、COL1A1、ACTA2、CTGF、DDR1、およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つのmRNAの発現を抑制してよく、IL6、IL12b、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つのmRNAの発現を抑制してもよい。

[0116] 限定はされないが、いくつかの態様において、本発明の方法および／または組成物は、以下の(i)～(iv)からなる群より選択される少なくとも一つの特徴を有してよい：(i)炎症性因子の産生を抑制できる；(ii)細胞増殖因子の産生を抑制できる；(iii)線維化関連因子の産生を抑制できる；(iv)STAT-3の活性化を阻害できる。

[0117] 本明細書における「炎症性細胞」には、T細胞および好中球が含まれるが、これらに限定されない。

[0118] いくつかの態様において、本発明の方法および／または組成物は、以下の組織または臓器における症状を治療および／または予防するために用いてよい：腎臓、肺、皮膚、肝臓、心臓、脾臓、骨髄、血管（血管内皮細胞を含む。）、神経、眼、子宮、脳および前立腺。例示的には、腎臓、皮膚、肺、血

管、眼、脳および神経からなる群より選択される少なくとも一つの組織または臓器が挙げられるが、これらに限定されない。前記症状としては、限定されないが、炎症、自己免疫反応、線維化、上皮過形成が例示される。

[0119] いくつかの態様において、本発明におけるRegnase-1の不安定化および／または細胞内での分解は、IL-17、IL-1、IL-36およびTLRリガンドからなる群；IL-17、IL-1、およびTLRリガンドからなる群；または、IL-17およびIL-1からなる群のいずれかの群より選択される少なくとも一つのシグナルの下流におけるRegnase-1の不安定化および／または細胞内での分解であってよい。限定はされないが、一態様において、前記IL-17；IL-1；IL-36；およびTLRリガンドは、それぞれ独立して、IL-17A；IL-1 β ；IL-36 α ；および、TLR1のリガンド、TLR2のリガンド、TLR4のリガンド、TLR7のリガンド、またはLPSであってよい。

[0120] いくつかの態様において、本発明の組成物はその有効量を哺乳動物に投与してよく、好ましい哺乳動物はヒトである。

[0121] 本発明のRegnase-1結合分子のいずれも、治療および／または予防的な方法において使用されてよい。一局面において、医薬品としての使用のためのRegnase-1結合分子が提供される。一局面において、本発明のRegnase-1結合分子は、Regnase-1のSer残基のリン酸化を阻害するものであってもよい。一局面において、本発明のRegnase-1結合分子は、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害するものであってもよい。さらなる局面において、Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防における使用のためのRegnase-1結合分子が提供される。特定の態様において、治療および／または予防方法における使用のための、本発明のRegnase-1結合分子が提供される。特定の態様において、本発明は、Regnase-1が関与する疾患を有する個体を治療する方法および／またはRegnase-1が関与する疾患を発症する可能性のある個体を予防する方法であって、当該個体に本発明のRegnase-1結合分子の有効量を投与する工程を含む方法における使用のための、本発明のRegnase-1結合分子を提供する。こ

のような態様の1つにおいて、方法は、当該個体に少なくとも1つの（例えば後述するような）追加治療剤の有効量を投与する工程を、さらに含む。さらなる態様において、本発明は、(i)線維化の抑制、(ii)上皮過形成の抑制、および／または(iii)炎症の抑制における使用のための、本発明におけるRegnase-1結合分子を提供する。特定の態様において、本発明は、個体における前記(i)、(ii) および／または(iii)の方法であって、前記(i)、(ii)および／または(iii)のために当該個体に、本発明におけるRegnase-1結合分子の有効量を投与する工程を含む方法における使用のための、Regnase-1結合分子を提供する。上記態様の任意のものによる「個体」は、好適にはヒトである。

[0122] さらに局面において、本発明は医薬品の製造または調製における、本発明におけるRegnase-1結合分子の使用を提供する。一態様において、医薬品は、Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防のためのものである。さらなる態様において、医薬品は、Regnase-1が関与する疾患を治療する方法であって、前記疾患を有する個体に医薬品の有効量を投与する工程を含む方法における使用のためのものである。このような態様の1つにおいて、方法は、当該個体に少なくとも1つの（例えば後述するような）追加治療剤の有効量を投与する工程を、さらに含む。さらなる態様において、医薬品は、(i)線維化の抑制、(ii)上皮過形成の抑制、および／または(iii)炎症の抑制のためのものである。さらなる態様において、医薬品は、個体において前記(i)、(ii)および／または(iii)の方法であって、前記(i)、(ii)および／または(iii)のために当該個体に医薬品の有効量を投与する工程を含む方法における使用のためのものである。上記態様の任意のものによる「個体」は、ヒトであってもよい。

[0123] さらに局面において、本発明はRegnase-1が関与する疾患を治療および／または予防する方法を提供する。一態様において、方法は、そのようなRegnase-1が関与する疾患を有するまたは将来有する可能性のある個体に、本発明におけるRegnase-1結合分子の有効量を投与する工程を含む。そのような態様の1つにおいて、方法は、当該個体に少なくとも1つの（後述するような）追

加治療剤の有効量を投与する工程を、さらに含む。上記態様の任意のものによる「個体」は哺乳動物であってよく、好ましくはヒトであってもよい。

[0124] さらに局面において、本発明は個体における(i)線維化の抑制、(ii)上皮過形成の抑制、および／または(iii)炎症の抑制ための方法を提供する。一態様において、方法は、前記(i)、(ii)および／または(iii)のために個体に、本発明におけるRegnase-1結合分子の有効量を投与する工程を含む。一態様において、「個体」は哺乳動物、好ましくはヒトである。

[0125] さらに局面において、本発明は、本発明における任意のRegnase-1結合分子を含む、医薬組成物を提供する（例えば上述の治療的および／または予防的方法の任意のものにおける使用のための）。一態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、Regnase-1のSer残基のリン酸化を阻害することができる。別の一態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害することができる。一態様において、医薬組成物は、本発明におけるRegnase-1結合分子の任意のものと、薬学的に許容される担体とを含む。別の態様において、医薬組成物は、本発明におけるRegnase-1結合分子の任意のものと、少なくとも1つの（例えば後述するような）追加治療剤とを含む。

[0126] 本発明のRegnase-1結合分子は、療法において、単独または他の剤との組み合わせのどちらでも使用され得る。例えば、本発明のRegnase-1結合分子は、少なくとも1つの追加の治療剤と同時に投与されてもよい。

[0127] 本発明のRegnase-1結合分子（および、任意の追加治療剤）は、経口投与、非経口投与、肺内投与、および経鼻投与、また局所的処置のために望まれる場合は病巣内投与を含む、任意の好適な手段によって投与され得る。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与を含む。投薬は、投与が短期か長期かに一部応じて、例えば、静脈内注射または皮下注射などの注射によるなど、任意の好適な経路によってなされ得る。これらに限定されるものではないが、単回投与または種々の時点にわたる反復投与、ボー

ラス投与、および、パルス注入を含む、種々の投薬スケジュールが本明細書の考慮の内である。

[0128] (医薬組成物)

本発明は、本発明のRegnase-1結合分子を含有する医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、本発明のRegnase-1結合分子に加えて、薬学的に許容し得る担体を導入し、公知の方法で製剤化することが可能である。製剤化には通常用いられる賦形剤、結合剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤や、必要により安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、pH調製剤、防腐剤、抗酸化剤などを使用することができ、一般に医薬品製剤の原料として用いられる成分を配合して常法により製剤化される。例えば、経口製剤を製造するには、本発明にかかる化合物またはその薬学的に許容される塩と賦形剤、さらに必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤などを加えた後、常法により散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、被覆錠剤、カプセル剤等とする。

[0129] これらの成分としては例えば、大豆油、牛脂、合成グリセライド等の動植物油；流動パラフィン、スクワラン、固形パラフィン等の炭化水素；ミリスチン酸オクチルドデシル、ミリスチン酸イソプロピル等のエステル油；セトステアリルアルコール、ベヘニルアルコール等の高級アルコール；シリコン樹脂；シリコン油；ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬化ひまし油、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックコポリマー等の界面活性剤；ヒドロキシエチルセルロース、ポリアクリル酸、カルボキシビニルポリマー、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、メチルセルロースなどの水溶性高分子；エタノール、イソプロパノールなどの低級アルコール；グリセリン、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、ソルビトールなどの多価アルコール；グルコース、ショ糖などの糖；無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、ケイ酸アルミニウムなどの無機粉体、精製水などがあげられる。

- [0130] 賦形剤としては、例えば乳糖、コーンスターチ、白糖、ブドウ糖、マンニトール、ソルビット、結晶セルロース、二酸化ケイ素などが挙げられる。
- [0131] 結合剤としては、例えばポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、メチルセルロース、エチルセルロース、アラビアゴム、トラガント、ゼラチン、シェラック、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリプロピレングリコール・ポリオキシエチレン・ブロックポリマー、メグルミンなどが挙げられる。
- [0132] 崩壊剤としては、例えば澱粉、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、クエン酸カルシウム、デキストリン、ペクチン、カルボキシメチルセルロース・カルシウム等が挙げられる。
- [0133] 滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、シリカ、硬化植物油等が挙げられる。
- [0134] 着色剤としては医薬品に添加することが許可されているものが、矯味矯臭剤としては、ココア末、ハッカ脳、芳香散、ハッカ油、竜脳、桂皮末等が用いられる。
- [0135] これらの錠剤・顆粒剤には糖衣、その他必要により適宜コーティングすることはもちろん差支えない。また、シロップ剤や注射用製剤等の液剤を製造する際には、本発明にかかる化合物またはその薬理学的に許容される塩に pH 調整剤、溶解剤、等張化剤などと、必要に応じて溶解補助剤、安定化剤などを加えて、常法により製剤化する。
- [0136] 例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせて、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考えられる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロー

ス、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を担体として挙げることができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

[0137] 注射用の水溶液または点眼用の基剤としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80（登録商標）、HCO-50と併用してもよい。

[0138] 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

[0139] 投与は好ましくは経口投与であるが、投与方法は経口投与に拘らない。非経口投与としては、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型、点眼型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、硝子体内注射などにより全身または局部的に投与することができる。

[0140] また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。本発明の方法で製造されたペプチド化合物を含有する医薬組成物の投与量としては、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001から100000 mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限される

ものではない。点眼剤としては、例えば0.0001%～10% (w/v)、好ましくは0.01%～5% (w/v) の濃度で1日1回～数回、又は数日の間隔を空けて投与することができるが、これらに限定されるものではない。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

[0141] 3. Regnase-1結合分子

一局面において本発明は、Regnase-1のリン酸化阻害、および／または、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKとRegnase-1との結合阻害が、ある種の疾患の治療および／または予防に有効であるという知見に部分的に基づくものである。いくつかの態様において、Regnase-1のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子が提供される。ある態様において、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子（Regnase-1作用分子）とRegnase-1との結合を阻害するRegnase-1結合分子が提供される。本発明のRegnase-1結合分子は、例えば、Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防のために有用である。

[0142] 特定の理論に拘束されることを意図しないが、一局面において、本発明は、本発明者らが、Regnase-1がTBK1、IKKiおよびAct-1と相互作用することを初めて見出し、さらにはこれらの相互作用によるRegnase-1のリン酸化を阻害することがRegnase-1による標的mRNAの分解を介した抗炎症、線維化抑制、上皮過形成抑制などの効果発揮に重要な役割を果たしていることまでをも見出したことに基づくものである。また、S513Aおよび／またはS494Aの変異を有するRegnase-1を用いた実験から、Regnase-1を不活性体へ導くリン酸化部位（配列番号1のSer513およびSer494）が、IL-17およびIL-1のいずれの刺激においても共通していると考えられた。そのため、IL-1の下流でRegnase-1をリン酸化するキナーゼとして機能するIRAKとの相互作用によるRegnase-1のリン酸化を阻害することが上記と同様の効果をもたらすことが理解できる。そのため、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの分子とRegnase-1との相互作用を阻害できるいかなる方法、分子お

よび組成物も、本発明の態様の一部に含まれ得る。当業者であれば、本明細書の開示に基づき、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの分子とRegnase-1との相互作用を阻害できる物質を特定し、製造することができる。例示的には、Regnase-1に結合し得る物質を添加した系において、TBK1、IKKiまたはAct-1とRegnase-1の相互作用を表面プラズモン共鳴（SPR）などの公知の手法を用いて解析することにより目的の物質を特定し、製造することができる。

[0143] 特定の理論に拘束されることを意図しないが、一局面において、本発明は、本発明者らが、Regnase-1の特定のSer残基（配列番号1の513、494、439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つ；好ましくは、513、および494位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つ；好ましくは、以下（i）および（i i）の両方：

（i）配列番号1の513および494位のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方；および

（i i）配列番号1の439および435位のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方。）のリン酸化を阻害することがRegnase-1による標的mRNAの分解を介した抗炎症、線維化抑制、上皮過形成抑制などの効果発揮に重要な役割を果たしていることを見出したことに基づくものである。そのため、該Ser残基のリン酸化を阻害できるいかなる方法、分子および組成物も、本発明の態様の一部に含まれ得る。当業者であれば、本明細書の開示に基づき、該Ser残基のリン酸化を阻害できる物質を特定し、製造することができる。例示的には、Regnase-1に結合し得る物質を添加した系において、本明細書に開示した方法または公知の手法を用いて、TBK1またはIKKiによるRegnase-1のリン酸化阻害を解析することにより目的の物質を特定し、製造することができる。

[0144] 一局面において、本発明は、Regnase-1のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子を提供する。一局面において、本発明は、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1と

の結合を阻害するRegnase-1結合分子を提供する。

[0145] いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、Regnase-1に含まれるSer残基またはThr残基のリン酸化を阻害してよく、Ser残基のリン酸化を阻害することが好ましい。

[0146] いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子によってリン酸化が阻害され得るRegnase-1のアミノ酸残基は、配列番号1（マウスRegnase-1）のうち、Ser28, Ser124, Thr115, Ser288, Ser494, Ser508, Ser513, Thr109, Ser404, Ser435, Ser454, Ser470, Ser482, Thr498, Thr505, Ser592, Ser21, Ser268, Ser386, Ser439, およびSer474のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つ、二つ以上、または三つ以上の位置のアミノ酸残基であってよい。いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子によってリン酸化が阻害され得るRegnase-1のアミノ酸残基が複数ある場合、そのようなアミノ酸残基は、配列番号1（マウスRegnase-1）のうち、Ser513およびSer494のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のアミノ酸残基、並びにSer439およびSer435のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のアミノ酸残基であることができる。

[0147] いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、Regnase-1のSer残基のリン酸化を阻害してよい。いくつかの態様において、該Ser残基としては、既に記載した本発明におけるSer残基であってよい。いくつかの態様において、該リン酸化は、既に記載した本発明におけるリン酸化であってよい。

[0148] またいくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子によってリン酸化が阻害されるRegnase-1のSer残基は、Regnase-1のアミノ酸配列に含まれるYWSEP（配列番号：3）、HFSVP（配列番号：4）およびDSGIGS（配列番号：5）からなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸配列に含まれるSer残基であることができる。

[0149] いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、Regnase-1への結合について、本明細書に記載のPP1～PP25より選択される少なくとも1つの化合物、例えばPP7、PP23およびPP10からなる群より選択される少なくとも1

つの化合物と競合する化合物であり得る。ある態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、PP7、PP23およびPP10からなる群より選択される少なくとも1つの化合物と競合しない化合物であり得る。ある態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、PP7およびPP23と競合する化合物であって、PP10と競合しない化合物であり得る。

そのようなRegnase-1結合分子は、Regnase-1に特異的に結合する分子であることが好ましく、PP1～PP25より選択される化合物、例えばPP7、PP23およびPP10からなる群より選択される少なくとも1つの化合物が結合するRegnase-1の部位と同じ部位でRegnase-1と結合する分子であることが好ましい。

さらに本発明におけるRegnase-1結合分子は、Regnase-1への結合について、本明細書に記載のPP7+tag、PP10+tagおよびPP23+tagより選択される少なくとも1つの化合物と競合する化合物をも包含する。

[0150] いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、Regnase-1への結合について、本明細書に記載のREA0023、REA0027、REB0007、REB0014、REB0022より選択される少なくとも1つの抗体と競合する化合物であり得る。

そのようなRegnase-1結合分子は、Regnase-1に特異的に結合する分子であることが好ましく、REA0023、REA0027、REB0007、REB0014、REB0022より選択される抗体が結合するRegnase-1の部位と同じ部位でRegnase-1と結合する分子であることが好ましい。

[0151] Regnase-1への結合について、あるRegnase-1結合分子が他のRegnase-1結合分子と競合するか否かは、例示的には、本明細書の「9. 測定法（アッセイ）」の「B. 結合測定法およびその他の測定法」の項に記載される競合アッセイにより確認することができる。

[0152] いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、配列番号：1に示される544～596番目のアミノ酸配列、または配列番号：2に示される547～599番目のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸残基に結合する。

[0153] いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、配列番号：1に示される1～543番目のアミノ酸配列、または配列番号：2に示される1～546

番目のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸残基に結合する。

[0154] いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、配列番号：1に示される301～596番目のアミノ酸配列、または配列番号：2に示される301～599番目のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸残基に結合する。

[0155] いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、配列番号：1に示される1～300番目のアミノ酸配列、または配列番号：2に示される1～300番目のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸残基に結合する。

[0156] いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、Regnase-1のRNase活性を実質的に阻害しない、または減少させない。特定の態様において、本発明のRegnase-1結合分子の存在下では、当該分子の非存在下と比較して、Regnase-1のRNase活性が50%以上、60%以上、あるいは70%以上残存している。さらなる態様において、本発明のRegnase-1結合分子の存在下では、当該分子の非存在下と比較して、Regnase-1のRNase活性が80%以上、85%以上、90%以上、あるいは95%以上残存している。RNase活性の測定は、例えば、本明細書の「9. 測定法（アッセイ）」の「C. 活性測定法」の項に記載された方法にしたがって行うことができる。

[0157] いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、以下(i)～(xi)のいずれかの結合分子とRegnase-1との結合を阻害してよい：(i) TBK1、IKKi、Act-1およびIKKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子；(ii) TBK1、IKKi、Act-1およびIRAK からなる群より選択される少なくとも一つの結合分子；(iii) TBK1、IKKiおよびAct-1からなる群より選択される少なくとも一つの結合分子；(iv) TBK1およびIKKi；(v) Act-1；(vi) TBK1、IKKiおよびAct-1；(vii) TBK1；(viii) IKKi；(ix) IRAK；(x) IKK；(xi) TBK1およびIKK。前記(i)～(xi)におけるIKKはIKK β であってもよい。

[0158] いくつかの態様において、本発明におけるRegnase-1結合分子は、以下(i)～(xi)からなる群より選択される少なくとも一つに有効であるという性質を有してよい：(i) Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防；(ii) 炎症の抑制；(iii) 細胞、組織または臓器の線維化の抑制；(iv) 上皮過形

成の抑制；(v) IL6、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つのmRNAの発現の抑制；(vi) Regnase-1の不安定化の抑制；(vii) 炎症性因子の産生抑制；(viii) Regnase-1の細胞内での分解の抑制；(ix) Regnase-1の小胞体からの遊離の阻害；(x) Regnase-1オリゴマーの解離の阻害；(xi) ケラチノサイトの増殖抑制。

[0159] 限定を意図しないが、いくつかの態様において、本発明におけるRegnase-1結合分子はポリペプチドであってよく、ポリペプチドは、環状ポリペプチドであってよい。いくつかの態様において、本発明における環状ポリペプチドの分子量は、500～4000、500～3000、または500～2000であってよい。

[0160] いくつかの態様において、本発明における環状ポリペプチドには、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、およびアミノ酸類縁体からなる群より選択される少なくとも一種が含まれてよい。これらのアミノ酸の比率は特に限定されない。

[0161] いくつかの態様において、本発明における環状ポリペプチドに含まれるアミノ酸およびアミノ酸類縁体の総数は、4～20、4～15、6～15、8～15、9～13、または10～13であってよい。ある態様において、本発明における環状ポリペプチドは、環状部に含まれるアミノ酸およびアミノ酸類縁体の総数が5～15、7～12、10～13、または9～11であってよい。

[0162] いくつかの態様において、本発明における環状ポリペプチドが直鎖部を有する場合、該直鎖部のアミノ酸及び／またはアミノ酸類縁体の数は0～17であることが好ましく、0～8であることがより好ましく、0～5がさらに好ましく、0～3が特に好ましい。なお、非限定の一態様において、本明細書における「直鎖部」には天然アミノ酸や非天然アミノ酸（化学修飾や骨格変換されたアミノ酸を含む）が含まれる場合がある。

[0163] 本発明の環状ポリペプチドの直鎖部は、一態様において、タグとリンカーから構成される直鎖部であってもよい。本発明におけるタグは、例えばTh

r、MePhe、ProおよびIleから選択されるアミノ酸残基の少なくとも1つ、2つ、3つまたは4つを含むことができる。そのようなタグとして、より好ましくは、Thr-MePhe-Pro-Ile（配列番号：61）からなる配列を1つ、2つまたは3つ以上含むタグ、さらに好ましくは本明細書において「TFIPタグ」とも称されるタグを例示することができるがこれらに限定されない。本発明においては、本明細書に記載のFLAGタグ、GSTタグ、HAタグ、Mycタグに加え、当業者に公知の様々なタグを好適に用いることができる。

本発明の直鎖部を構成するリンカーとしてはGly-GlyリンカーやGlyとSerから構成されるリンカー（例えば、Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号：62）の1～3回の繰り返し）、ThrとGlyから構成されるリンカー（例えば、Thr-Glyの1～3回の繰り返し）を例示することができるがこれらに限定されない。

本発明における直鎖部は、そのC末端のアミノ酸残基が保護基で保護されたものであってもよい。

[0164] いくつかの局面において、本発明におけるポリペプチドは、細胞内移行能を高めるための修飾がされていてもよい。このような修飾としては、公知の方法が利用できるため特に限定されないが、細胞膜透過性ペプチドを結合する方法が例示される。細胞膜透過性ペプチドとしては、公知の配列が使用できるが、例えばHIV Tatタンパク質に由来するTatペプチド（GRKKRRQRRPPQ[配列番号：10]）（Brooks, H. et al. Advanced Drug Delivery Reviews, Vol 57, Issue 4, 2005, p.559-577）、または、6～12残基のアルギニンからなるポリアルギニン（Nakase, I. et al. Advanced Drug Delivery Reviews, Vol 60, 2008, p.598-607）が挙げられる。また、脂肪酸またはスチルベン誘導体を連結することにより、ペプチドが細胞質側にアクセスすることが可能になることが報告されている（Covic, L. ら（2002）Nat Med. 8:1161；Endres, P. J. ら（2006）Molecular Imaging 4:485；およびGoubaeva, F. ら, J. Biol. Chem. 278:19634）。このような方法を用い

ることで、ポリペプチドを細胞内に移行させることができる。

[0165] いくつかの態様において、本発明における環状ポリペプチドは、本明細書に記載のPP1～PP25より選択される少なくとも1つの化合物であることができる。

またいくつかの態様において、本発明における環状ポリペプチドは、本明細書に記載のPP7+tag、PP10+tagおよびPP23+tagより選択される少なくとも1つの化合物（直鎖部を有する環状ポリペプチド）であることができる。

[0166] 限定を意図しないが、いくつかの態様において、本発明におけるポリペプチドは、抗体（抗Regnase-1抗体）であってよい。すなわち、いくつかの態様において本発明の抗体は、本明細書に記載の抗体REA0023、REA0027、REB0007、REB0014、REB0022の中から選択される少なくとも1つの抗体であることができる。

[0167] 本発明のさらなる局面において、抗Regnase-1抗体は、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一態様において、抗Regnase-1抗体は、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、またはF(ab')₂断片などの、抗体断片である。別の態様において、抗体は、例えば、IgG抗体や、他の抗体クラスまたはアイソタイプの、全長抗体である。別の態様において、抗体は、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）である。

[0168] （細胞内標的への薬剤送達）

本発明の特定の態様は、細胞内のRegnase-1に標的化できるような抗体またはその抗原結合断片を提供する。当業者に公知の手法を用いて、抗体を改変や修飾等することにより、Regnase-1のリン酸化を阻害する抗体を細胞内に送達することができる。一態様において、本発明の抗体は、イントラボディ（細胞内発現抗体）として細胞内で発現され得る。本明細書で用いられる用語「イントラボディ」は、例えばMarasco, Gene Therapy 4: 11-15 (1997); Kontermann, Methods 34: 163-170 (2004); 米国特許第6,004,940号および第6,329,173号; 米国特許出願公開第2003/0104402号、ならびにPCT公開 W02003/077945に記載される、細胞内で発現され、標的分子に選択的に結合することが

できる、抗体またはその抗原結合断片のことをいう。例えば、細胞内抗体を生成する遺伝子療法の使用に関する、1996年3月14日公開のW096/007321も参照のこと。

[0169] イントラボディの細胞内発現は、（通常その抗体または抗原結合断片をコードする遺伝子に付随する野生型リーダー配列および分泌シグナルを欠く）所望の抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸を標的細胞に導入することによって達成され得る。本発明の抗体のすべてまたは一部分をコードする1つまたは複数の核酸は、細胞内標的ポリペプチドに結合し標的ポリペプチドの活性を調整することができる1つまたは複数のイントラボディが発現されるように、標的細胞に送達され得る。以下を含む（がこれらに限定されない）細胞に核酸を導入する任意の標準的な方法が使用され得る：マイクロインジェクション、バリスティックインジェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、リボソーム、ならびに目的の核酸を保持するレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、およびワクシニアベクターを用いたトランスフェクション。

[0170] 特定の態様において、（任意でベクター中に含まれる）核酸は、*in vivo*および*ex vivo*方法によって患者の細胞に導入され得る。*in vivo*送達の1つの例において、核酸は、患者に、例えば治療的介入が必要とされる部位に、直接注射される。*in vivo*送達のさらなる例において、核酸は、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、I型単純ヘルペスウイルス、またはアデノ随伴ウイルス）を用いたトランスフェクションおよび脂質ベースのシステム（脂質に媒介された遺伝子移入のために有用な脂質は、例えばDOTMA、DOPE、およびDC-Cholである）を用いて細胞に導入される。特定の遺伝子マーキングおよび遺伝子療法プロトコルの総説については、Anderson et al., Science 256:808-813 (1992)およびW093/25673ならびにそれらで引用されている参考文献を参照のこと。*ex vivo*処置の例においては、患者の細胞が取り出され、それらの単離された細胞に核酸が導入され、そして改変された細胞が患者に直接投与されるかまたは、例えば患者に移植される多孔質膜内に封入される（例え

ば、米国特許第4,892,538号および第5,283,187号を参照のこと）。核酸のex vivo送達において共通して使用されているベクターは、レトロウイルスベクターである。

[0171] 別の態様において、インターナライズ抗体（内在化抗体）が提供される。抗体は、細胞への抗体の送達を向上させる特定の特徴を備えることが可能であり、またはそのような特徴を備えるように改変され得る。これを達成する手法は、当技術分野で公知である。例えば、細胞の内部に浸透および細胞質に分布可能なヒト化軽鎖可変領域（VL）単ドメインを有する、完全型免疫グロブリン形態の抗体（C y t o t r a n s m a b）が知られている（例えばW02016/013870を参照のこと）。重鎖可変領域（VH）ライブラリを用いてRegnase-1に対して特異的結合能を有する重鎖可変領域（VH）を選別し、これを前記細胞の内部に浸透および細胞質に分布する完全型免疫グロブリン形態の抗体のVHと置き換えることによって、細胞の内部に浸透して細胞質にあるRegnase-1に特異的に結合できる完全型免疫グロブリン形態の抗Regnase-1抗体（i M a b : i n t e r n a l i z i n g & i n t e r f e r i n g m o n o c l o n a l a n t i b o d y）を作製できる（例えばW02016/013870を参照のこと）。また、例えば、抗体にホスホロチオエート核酸またはホスホロチオエートポリマー骨格を結合することにより、抗体の細胞内送達が可能となることが知られている（例えばW02015/031837を参照のこと）。細胞の内部に浸透して細胞質にあるRegnase-1に特異的に結合できる抗体は、Regnase-1に対する抗体にホスホロチオエート核酸またはホスホロチオエートポリマー骨格を共有結合または非共有結合することにより作製できる。また、例えば、抗体のカチオン化は、その細胞取り込みを促進することが知られている（例えば、米国特許第6,703,019号を参照のこと）。リポフェクションまたはリポソームもまた、抗体を細胞内へと送達するために使用され得る。抗体断片を使用する場合、標的タンパク質に特異的に結合する最小の阻害性の断片を使用してもよい。例えば、抗体の可変領域配列に基づき、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するペプチド分子が設計され得る。その

ようなペプチドは、化学的に合成され得および／または組換えDNA技術によって作製され得る。例えば、Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 7889-7893 (1993) を参照のこと。あるいは、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し、抗体断片を生成させるか、もしくはこれらの抗体断片または低分子化抗体をコードするDNAを構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させて作製され得る（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerr a, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

[0172] 標的細胞への抗体の侵入は、当技術分野で公知の他の方法によって強化され得る。例えば、HIV Tatまたはアンテナペディアホメオドメインタンパク質由来のものなど、特定の配列は、細胞膜をまたいだ異種タンパク質の効率的な取り込みをもたらすことができる。例えば、Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4325-4329 (1999) を参照のこと。

[0173] 限定されないが、いくつかの態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの分子のドミナントネガティブ体であってよい。このようなドミナントネガティブ体としては、Regnase-1に結合するものの、Regnase-1をリン酸化する能力を欠失しているものであれば、特に限定されない。例示的には、TBK1またはIKKiのドミナントネガティブ体の場合、キナーゼ活性を欠失してよく、Act-1のドミナントネガティブ体の場合、TBK1および／またはIKKiとの結合能を欠失してよい。

[0174] 4. Regnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法

上述したとおり、本発明者らによる鋭意研究の結果、Regnase-1のリン酸化を阻害することが、ある種の疾患の治療および／または予防に有効であるこ

とが見出された。特に、配列番号1における513および／または494位に相当するSer残基のリン酸化が、Regnase-1オリゴマーの解離（例えば、モノマー化）、小胞体からの遊離、Regnase-1の不活性体の生成（Regnase-1の不安定化）、およびその後のRegnase-1の分解を誘導すると考えられた。

[0175] いくつかの態様において、本発明の特定するための方法は、配列番号1の513、494、439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を指標とする、Regnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法であってよい。一態様において、本発明のリン酸化を阻害する物質の特定方法は、配列番号1の513および494位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を指標としてよい。

[0176] 一態様において、本発明のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法は、以下の（i）および（i i）の両方のSer残基のリン酸化を指標としてよい。

（i）Regnase-1における配列番号1の513および494のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のSer残基；

（i i）Regnase-1における配列番号1の439および435のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のSer残基。

[0177] いくつかの態様において、本発明のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法は、以下（a）および（b）の工程を含んでよい：

（a）Regnase-1をリン酸化し得るキナーゼとRegnase-1とを被験物質の存在下で混合し、前記キナーゼによるRegnase-1のリン酸化を検出する工程；

（b）被験物質の非存在下と比較して、前記キナーゼによるRegnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定する工程。

[0178] あるいは、いくつかの態様において、本発明のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法は、以下（a）および（b）の工程を含んでよい：

（a）Regnase-1をRegnase-1のリン酸化を可能にする条件下で被験物質と接触させ、Regnase-1のリン酸化を検出する工程、

(b) 被験物質の非存在下と比較して、Regnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定する工程。

[0179] いくつかの態様において、本発明のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法は、被験物質の存在下および非存在下において、Regnase-1における特定のアミノ酸残基のリン酸化の程度を比較し、リン酸化の程度を低下させる被験物質を選択することにより行ってよい。

[0180] いくつかの態様において、本発明のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法における被験物質は、Regnase-1結合分子であってよい。

[0181] いくつかの態様において、本発明のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法は、Regnase-1に対する特異的な結合能を有する物質をスクリーニングする方法を含んでよい。

[0182] ある物質が、Regnase-1における配列番号1の513、494、439または435位に相当するSer残基のリン酸化を阻害するか否かは、例えば、リン酸化された前記Ser残基を認識する抗体を用いて、本明細書に開示した方法を用いて確認できる。

[0183] いくつかの態様において、本発明のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法は、配列番号1の513、494、439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を検出し得る抗体を用いて行われてよい。

[0184] いくつかの態様において、本発明のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法は、ヒトRegnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定する方法であってよい。一態様において、本発明の特定するための方法は、配列番号2の516、497、442および438位のSer残基のリン酸化を指標とする、Regnase-1のリン酸化を阻害する物質の特定方法であってよい。

[0185] いくつかの態様において、上記「Regnase-1のリン酸化を阻害する物質」は、Regnase-1結合分子であってよい。したがって本発明の特定するための方法は、その一態様として、被験物質のRegnase-1に対する結合活性を測定する工程、および／または、Regnase-1に対する結合活性を有する被験物質を特定も

しくは選択する工程をさらに含んでもよい。

[0186] 一局面において、本発明は、リン酸化Regnase-1を特異的に認識する抗体を提供する。前記のとおりこのような抗体は、Regnase-1のリン酸化を阻害する物質の特定の際に利用可能である。

[0187] いくつかの態様において、本発明の抗体は、Ser残基がリン酸化されたRegnase-1を認識する抗体であってよく、配列番号1の513、494、439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基がリン酸化されたRegnase-1を特異的に認識する抗体であってよい。

[0188] 一態様において、本発明の抗体は、リン酸化されたヒトRegnase-1に結合できる抗体であってよく、リン酸化されたマウスRegnase-1およびリン酸化されたヒトRegnase-1のいずれにも結合できる抗体であってよい。

[0189] 一局面において、本発明は、Regnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定するための組成物を提供する。このような組成物は、予め定められた量のキナーゼおよび／または予め定められた量のRegnase-1を含んでよい。

[0190] いくつかの態様において、本発明の特定するための方法で使用されるキナーゼ、または本発明の組成物に含まれるキナーゼは、Regnase-1における配列番号1の513、494、439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基をリン酸化し得るキナーゼであってよい。このようなキナーゼとしては、TBK1、IKKi、IRAKおよびIKKからなる群より選択される少なくとも一つのキナーゼが例示され、TBK1、IKKiおよびIKKからなる群；TBK1、IKKiおよびIRAKからなる群；またはTBK1およびIKKiからなる群より選択される少なくとも一つのキナーゼであってよい。

[0191] いくつかの態様において、本発明におけるリン酸化は、配列番号1の513、494、439および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つのSer残基のリン酸化であってよく、配列番号1の513、および494位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化であってよく、配列番号2の516、497、442および4

38位からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化であってよく、配列番号2の516および497位からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化であってよく、配列番号2の516位のSer残基のリン酸化であってよく、配列番号2の442および438位からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化であってよい。

[0192] いくつかの態様において、本発明の組成物は、Regnase-1結合分子を含んでよく、予め定められた量のRegnase-1結合分子を含んでもよい。

[0193] いくつかの態様において、本発明におけるRegnase-1はヒトRegnase-1であってよい。

[0194] いくつかの態様において、本発明の組成物は、予め定められた量のキナーゼおよび予め定められた量のRegnase-1を含んでよい。いくつかの態様において、本発明の組成物に含まれるRegnase-1は、脱リン酸化Regnase-1、または脱リン酸化処理されたRegnase-1であってよい。

[0195] 本発明における「予め定められた量」は特に限定されず、アッセイをする前に定められた量であってよい。

[0196] 5. 結合分子とRegnase-1との結合を阻害する物質を特定するための方法

本発明者らによる鋭意研究の結果、TBK1およびIKKi、またはAct-1とRegnase-1との結合を阻害することが、ある種の疾患の治療および／または予防に有効であることが見出された。一局面において、本発明は、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害する物質の特定方法を提供する。

[0197] いくつかの態様において、本発明の結合を阻害する物質を特定するための方法は、以下の（a）および（b）の工程を含んでよい：

（a）TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子と Regnase-1 とを被験物質の存在下で混合し、前記結合分子とRegnase-1との結合活性を測定する工程；

（b）被験物質の非存在下と比較して、前記結合分子とRegnase-1との結合活性を低減させ得る物質を特定する工程。

[0198] 本発明における結合活性は、後述の方法により測定することができる。

[0199] 本明細書において、「結合を阻害する」とは、第一の分子と第二の分子の結合活性を低減させること、または両分子が結合しないようにすることを意味する。

[0200] いくつかの態様において、上記「TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害する物質」は、Regnase-1結合分子であってよい。したがって本発明の特定するための方法は、その一態様として、被験物質のRegnase-1に対する結合活性を測定する工程、および／または、Regnase-1に対する結合活性を有する被験物質を特定もしくは選択する工程をさらに含んでもよい。

[0201] あるいはいくつかの態様において、上記「TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害する物質」は、Regnase-1のリン酸化を阻害する物質であってよい。したがって本発明の特定するための方法は、その一態様として、被験物質のRegnase-1のリン酸化活性を測定する工程、および／または、当該活性を有する被験物質を特定もしくは選択する工程をさらに含んでもよい。

あるいは一態様において、本発明のTBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害する物質を特定するための方法は、前記のRegnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法と組み合わせて用いてもよい。

[0202] 一局面において、本発明はTBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害する物質を特定するための組成物を提供する。一態様において、本発明の組成物は、予め定められた量の結合分子およびRegnase-1を含んでよく、予め定められた量の結合分子および予め定められた量のRegnase-1を含んでもよい。

[0203] いくつかの態様において、本発明の特定するための方法は以下(i)～(x)のいずれかとRegnase-1との結合を阻害する物質を特定するための方法であってよく、本発明の組成物は以下(i)～(x)のいずれかの結合分子とRegnase-1を含

んでよい：(i) TBK1、IKKi、Act-1およびIKKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子；(ii) TBK1、IKKi、Act-1およびIRAK からなる群より選択される少なくとも一つの結合分子；(iii) TBK1、IKKiおよびAct-1からなる群より選択される少なくとも一つの結合分子；(iv) TBK1およびIKKi；(v) Act-1；(vi) TBK1、IKKiおよびAct-1；(vii) TBK1；(viii) IKKi；(ix) IRAK；(x) IKK；(xi) TBK1およびIKK。前記(i)～(xi)におけるIKKはIKK β であってもよい。

[0204] いくつかの態様において、本発明の特定するための方法に用いられるRegnase-1、または本発明の組成物に含まれるRegnase-1は、脱リン酸化Regnase-1、または脱リン酸化処理されたRegnase-1であってよい。

[0205] 6. Regnase-1への結合について参照物質と競合する物質を特定するための方法

7. 参照物質が結合するRegnase-1上の部位と同じ部位に結合する物質を特定するための方法

一局面において本発明は、Regnase-1への結合について参照物質と競合する被験物質を特定するための方法に関する。一局面において本発明は、参照物質が結合するRegnase-1上の部位と同じ部位に結合する被験物質を特定するための方法に関する。当該方法を用いれば、Regnase-1のSer残基のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子を取得することができる。このような分子は、Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防において使用することができる。

[0206] このような物質を同定するために、例えば競合アッセイが使用され得る。すなわち、本発明におけるRegnase-1への結合について参照物質と競合する物質を特定するための方法は、例示的には、本明細書の「9. 測定法（アッセイ）」の「B. 結合測定法およびその他の測定法」の項に記載される競合アッセイを行うことを含むことができる。

Regnase-1に結合する参照物質の量は、Regnase-1への結合に対して参照物質と競合する候補競合物質（被験物質）、より具体的にはRegnase-1上の参照

物質が結合する部位への結合に対して競合する候補競合物質（被験物質）の結合能に間接的に相関している。すなわち、参照物質が結合するRegnase-1上の部位と同じ部位に結合する被験物質の量や親和性が大きくなるほど、参照物質のRegnase-1への結合量は低下し、Regnase-1への被験物質の結合量は増加する。具体的には、Regnase-1に対し、適当な標識をした参照物質と評価すべき被験物質を同時に添加し、標識を利用して結合している参照物質を検出する。Regnase-1に結合した参照物質の量は、該物質を予め標識しておくことで、容易に測定できる。この標識は特には制限されないが、手法に応じた標識方法を選択する。標識方法は、具体的には蛍光標識、放射標識、酵素標識などが挙げられる。

[0207] あるいは本発明においては、参照物質が結合するRegnase-1上の部位と同じ部位に結合する物質を、公知のエピトープマッピング法によって取得することもできる（エピトープマッピングについては、本明細書の「9. 測定法（アッセイ）」の「B. 結合測定法およびその他の測定法」の項も参照）。具体的には、Regnase-1やその部分ペプチド等を用いるエピトープマッピング法により参照物質が結合するRegnase-1上の部位（エピトープ）を解析し、同定されたエピトープを含むペプチドを用いて、これに結合する物質を調製することにより、参照物質が結合するRegnase-1上の部位と同じ部位に結合する物質を得ることもできる。したがって、本発明における参照物質が結合するRegnase-1上の部位と同じ部位に結合する物質を特定するための方法は、例示的にはエピトープマッピング法を行うことを含むことができる。

[0208] このようにして得られる物質は、Regnase-1のSer残基のリン酸化阻害活性に関して、実施例で取得した化合物PP1～PP25、PP7+tag、PP10+tag、PP23+tagまたは抗体REA0023、REA0027、REB0007、REB0014、REB0022と同様の阻害作用を発揮することが期待される。このように、Regnase-1への結合について実施例で単離した化合物PP1～PP25、PP7+tag、PP10+tag、PP23+tagまたは抗体REA0023、REA0027、REB0007、REB0014、REB0022と競合する物質であって、Regnase-1のSer残基のリン酸化阻害活性を有する物質、あるいは、実施例で取得

した化合物PP1～PP25、PP7+tag、PP10+tag、PP23+tagまたは抗体REA0023、REA0027、REB0007、REB0014、REB0022が結合するRegnase-1の部位と実質的に同じ部位に結合する物質であって、Regnase-1のSer残基のリン酸化阻害活性を有する物質は、本発明におけるRegnase-1結合分子として好適に使用することができる。

[0209] 本発明における被験物質としては、特に限定されるものではなく、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出物などが挙げられ、好ましくは抗体および環状ポリペプチドが挙げられる。

[0210] 非限定の一態様において、Regnase-1結合分子、及び／又は参照物質が結合するRegnase-1上の部位は、配列番号：1に示される544～596番目のアミノ酸配列、または配列番号：2に示される547～599番目のアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列に含まれる少なくとも1つのアミノ酸残基を含むことができる。

[0211] 非限定の一態様において、Regnase-1結合分子、及び／又は参照物質が結合するRegnase-1上の部位は、配列番号：1に示される1～543番目のアミノ酸配列、または配列番号：2に示される1～546番目のアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列に含まれる少なくとも1つのアミノ酸残基を含むことができる。

[0212] 非限定の一態様において、Regnase-1結合分子、及び／又は参照物質が結合するRegnase-1上の部位は、配列番号：1に示される301～596番目のアミノ酸配列、または配列番号：2に示される301～599番目のアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列に含まれる少なくとも1つのアミノ酸残基を含むことができる。

[0213] 非限定の一態様において、Regnase-1結合分子、及び／又は参照物質が結合するRegnase-1上の部位は、配列番号：1に示される1～300番目のアミノ酸配列、または配列番号：2に示される1～300番目のアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列に含まれる少なくとも1つのアミノ酸残基を含むことがで

きる。

[0214] 本発明における参照物質は、Regnase-1に結合してリン酸化を阻害することができるものであれば特に限定されない。非限定の一態様において、参照物質として以下のPP1～PP25、PP7+tag、PP10+tag、PP23+tagより選択される少なくとも1つの化合物または本明細書に記載のREA0023、REA0027、REB0007、REB0014、REB0022より選択される少なくとも1つの抗体を利用することができる。

[0215] 本発明においては、上記競合アッセイにより選択された被験物質による、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子（Regnase-1作用分子）のリン酸化活性を測定する工程、および、リン酸化活性を阻害したまたは減少させた被験物質を選択する工程をさらに含んでもよい。リン酸化活性の測定は、例えば、本明細書の「9. 測定法（アッセイ）」の「A. リン酸化阻害の検出方法」の項に記載された方法にしたがって行うことができる。

あるいは本発明においては、上記競合アッセイにより選択された被験物質による、Regnase-1のRNase活性を測定する工程、およびRNase活性を阻害しないまたは減少させない被験物質を選択する工程をさらに含んでもよい。RNase活性の測定は、例えば、本明細書の「9. 測定法（アッセイ）」の「C. 活性測定法」の項に記載された方法にしたがって行うことができる。

[0216] 本発明における被験物質としては、特に限定されるものではなく、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出物などが挙げられ、好ましくは抗体および環状ポリペプチドが挙げられる。

[0217] 8. 本発明のRegnase-1結合分子の製造方法

本発明のRegnase-1結合分子の製造方法は、特に限定されないが、例えば、後述するポリペプチドの化学合成方法、または細胞を用いた組換えポリペプチド発現方法を利用することができる。また、一態様において、同製造方法は、前記の本発明におけるRegnase-1のリン酸化を阻害する物質の特定方法を

含んでもよく、例示的にはこれによってRegnase-1のリン酸化を阻害する、Regnase-1結合分子を製造することができる。また、一態様において、同製造方法は、前記の本発明におけるRegnase-1への結合について参照物質（例えば上述の化合物PP1～PP25、PP7+tag、PP10+tag、PP23+tagまたは抗体REA0023、REA0027、REB0007、REB0014、REB0022のいずれか）と競合する物質を特定する方法を含んでもよい。

[0218] 本発明のRegnase-1結合分子を製造する方法は、Regnase-1結合分子を同定する方法を含んでよい。Regnase-1結合分子を同定する方法は、当業者に公知の手法を用いることができる。例えば、動物にRegnase-1またはそのペプチド断片を免疫し、Regnase-1に結合する抗体を同定してよい。これらの方法は、本明細書にも記載されている。また、ペプチドライブラリーを用いて、Regnase-1に結合するペプチドを同定してよい。このような同定方法は、例えばW02013/100132、W02012/033154などで公知である。

[0219] A. ポリペプチドの化学合成方法

本発明におけるRegnase-1に結合するポリペプチドの化学合成方法としては、液相合成法、FmocやBoc等を用いた固相合成法、及びこれらの組み合わせ等が例示される。Fmoc合成では、主鎖アミノ基がFmoc基により保護され、側鎖官能基が必要に応じてピペリジンなどの塩基性で切断されない保護基で保護され、主鎖カルボン酸を保護しないアミノ酸を基本単位とする。基本単位としては、その他、Fmoc保護されたアミノ基とカルボン酸基を有する組み合わせであれば、特に限定されない。例えばジペプチドを基本単位としてもよい。N末端に配置させる基本単位は、Fmocアミノ酸以外であってもよい。例えば、Bocアミノ酸であってもよく、アミノ基を有しないカルボン酸類縁体であってもよい。主鎖カルボン酸基を固相担体の官能基との化学反応により固相に担持させる。続いてピペリジンやDBUなどの塩基によりFmoc基を脱保護し、新たに生じたアミノ基と続いて添加される基本単位のカルボン酸を有する保護アミノ酸とを縮合反応させることで、ペプチド結合を生成させる。縮合反応では、DICとHOBtの組み合わせ、DICとHOAtの組み合わせ、HATUとDIPEAと

の組み合わせなど様々な組み合わせが可能である。脱Fmoc基とそれに続くペプチド結合生成反応の繰り返しにより、望みのペプチド配列を生成させることができる。望みの配列が得られた後、固相からの切り出しと必要に応じて導入した側鎖官能基の保護基の脱保護が行われる。また、固相からの切り出しを行う前にペプチドの構造変換や環化を行うことも可能である。固相からの切り出しと、脱保護は同一の条件、例えば90:10のTFA/H₂Oで行ってもよいし、必要に応じて別々の条件で脱保護しても良い。固相からの切り出しは、1% TFAなどの弱酸での切り出しが可能なものもあれば、保護基としてPdなどを利用して、両者の化学反応の直行性を利用することが可能である。これらの工程の間もしくは最後に、環化などの工程を実施することもできる。例えば、側鎖カルボン酸とN末端主鎖のアミノ基とを縮合させることや、側鎖アミノ基とC末端主鎖のカルボン酸を縮合させることができる。この際、C末端側のカルボン酸と環化させる側鎖カルボン酸の間、もしくはN末端側の主鎖アミノ基またはヒドロキシ基と環化させる側鎖アミノ基の間で反応直行性が必要であり、前述のとおり保護基の直行性を考慮して保護基の選択が行われる。また、N末端にクロロアセチル基を位置づけることにより、システイン残基の側鎖のチオール基との間で環化させることも可能である。このようにして得られた反応物を逆相カラムや、分子ふるいカラムなどで精製することができる。これらの詳細は、例えばメルク株式会社が平成14年5月1日に発行した固相合成ハンドブックなどに記載されている。

[0220] B. 細胞を用いた組換えポリペプチド発現方法

Regnase-1に結合するポリペプチドは組み換えの方法や構成を用いて製造することができる。一態様において、当該ポリペプチドが抗体の場合、例えば、米国特許第4,816,567号に記載されるとおり、本明細書に記載の抗Regnase-1抗体をコードする、単離された核酸が提供される。そのような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列および／またはVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖および／または重鎖）をコードしてもよい。さらなる態様において、このような核酸を含む1つまたは複数のベクター（例えば、発現ベクター）

が提供される。さらなる態様において、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。このような態様の1つでは、宿主細胞は、(1)抗体のVLを含むアミノ酸配列および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または、(2)抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第一のベクターと抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第二のベクターを含む（例えば、形質転換されている）。一態様において、宿主細胞は、真核性である（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）またはリンパ系の細胞（例えば、Y0、NS0、Sp2/0細胞）。一態様において、抗Regnase-1抗体の発現に好適な条件下で、上述のとおり当該抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養すること、および任意で、当該抗体を宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から回収することを含む、抗Regnase-1抗体を作製する方法が提供される。

[0221] 抗Regnase-1抗体の組換え製造のために、（例えば、上述したものなどの）抗体をコードする核酸を単離し、さらなるクローニングおよび／または宿主細胞中での発現のために、1つまたは複数のベクターに挿入する。そのような核酸は、従来の手順を用いて容易に単離および配列決定されるだろう（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることで）。

[0222] 抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞は、本明細書に記載の原核細胞または真核細胞を含む。例えば、抗体は、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能が必要とされない場合は、細菌で製造してもよい。細菌での抗体断片およびポリペプチドの発現に関して、例えば、米国特許第5,648,237号、第5,789,199号、および第5,840,523号を参照のこと。（加えて、大腸菌における抗体断片の発現について記載したCharlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp.245-254も参照のこと。）発現後、抗体は細菌細胞ペーストから可溶性フラクション中に単離されてもよく、またさらに精製することができる。

[0223] 原核生物に加え、部分的なまたは完全なヒトのグリコシル化パターンを伴う抗体の産生をもたらす、グリコシル化経路が「ヒト化」されている菌類および酵母の株を含む、糸状菌または酵母などの真核性の微生物は、抗体コードベクターの好適なクローニングまたは発現宿主である。Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)および Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) を参照のこと。

[0224] 脊椎動物細胞もまた宿主として使用できる。例えば、浮遊状態で増殖するように適応された哺乳動物細胞株は、有用であろう。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40で形質転換されたサル腎CV1株 (COS-7) ; ヒト胎児性腎株 (Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977) などに記載の293または293細胞) ; 仔ハムスター腎細胞 (BHK) ; マウスセルトリ細胞 (Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980) などに記載のTM4細胞) ; サル腎細胞 (CV1) ; アフリカミドリザル腎細胞 (VERO-76) ; ヒト子宮頸部癌細胞 (HELA) ; イヌ腎細胞 (MDCK) ; Buffalo系ラット肝細胞 (BRL 3A) ; ヒト肺細胞 (W138) ; ヒト肝細胞 (Hep G2) ; マウス乳癌 (MMT 060562) ; TRI細胞 (例えば、Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982) に記載) ; MRC5細胞 ; および、FS4細胞などである。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHFR- CHO細胞 (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)) を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 ; およびY0、NS0、およびSp2/0などの骨髓腫細胞株を含む。抗体産生に好適な特定の哺乳動物宿主細胞株の総説として、例えば、Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003) を参照のこと。

[0225] 9. 測定法 (アッセイ)

本発明におけるRegnase-1結合分子は、当該技術分野において知られている種々の測定法によって同定され、スクリーニングされ、または物理的／化学的特性および／または生物学的活性について明らかにされてもよい。

[0226] 本発明におけるアッセイでは、タグ付きRegnase-1やタグ付きキナーゼを適

宜利用してよい。前記タグとしては、FLAG、GST、HA、Mycなどが使用可能であるがこれらに限定されない。

[0227] A. リン酸化阻害の検出方法

ある物質が、Regnase-1のリン酸化を阻害するか否かの検出方法は、特に限定されないが、放射性同位体標識したATPを用いる方法、および、リン酸化Regnase-1を特異的に認識する抗体を用いる方法が例示され、細胞を用いる方法、細胞溶解物 (cell lysate) を用いる方法、無細胞アッセイ (cell free assay) などが適用可能である。実験に利用可能なキナーゼとしては、TBK1, IKKi, IKK, IRAK1, IRAK2などが例示される。

[0228] 放射性同位体標識したATPを用いる方法としては、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを用いてある種のキナーゼによりRegnase-1のリン酸化反応を行った後、リン酸化Regnase-1をオートラジオグラフィーにより可視化する方法が例示されるが、より具体的には、後述する実施例に記載の方法が例示される。

[0229] また、リン酸化Regnase-1を特異的に認識する抗体を用いることで、Regnase-1の特定のアミノ酸残基のリン酸化を阻害するか否かを検出できる。例えば、配列番号：2の516位のSerがリン酸化されたヒトRegnase-1を特異的に認識する抗体を用いることで、ウエスタンブロッティング等により前記Ser516のリン酸化を検出することができる。より具体的には、後述する実施例に記載の方法が例示される。

[0230] いくつかの態様において、本発明が提供するリン酸化されたRegnase-1を特異的に認識する抗体は、リン酸化されたRegnase-1に結合し、リン酸化されていないRegnase-1に結合しない抗体であってよく、または、リン酸化されていないRegnase-1に対する結合と比較して、リン酸化されたRegnase-1に対して強く結合する抗体であってもよい。前記抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。いくつかの態様において、前記抗体は、以下(i)～(viii)からなる群より選択される少なくとも一つのRegnase-1を特異的に認識する抗体であってよい：

(i)配列番号1のSer435および／またはSer439がリン酸化されたマウスRegnas

e-1 ;

(ii) 配列番号 1 のSer494がリン酸化されたマウスRegnase-1 ;

(iii) 配列番号 1 のSer513がリン酸化されたマウスRegnase-1 ;

(iv) 配列番号 2 のSer438および／またはSer442がリン酸化されたヒトRegnase-1 ;

(v) 配列番号 2 のSer437がリン酸化されたヒトRegnase-1 ;

(vi) 配列番号 2 のSer516がリン酸化されたヒトRegnase-1 ;

(vii) 配列番号 1 のSer435、Ser439、Ser494およびSer513がリン酸化されたマウスRegnase-1 ;

(viii) 配列番号 2 のSer438、Ser442、Ser437およびSer516がリン酸化されたマウスRegnase-1。

[0231] いくつかの態様において、本発明の抗体は、ヒトRegnase-1のリン酸化を検出し得る抗体であってよく、マウスRegnase-1およびヒトRegnase-1のいずれのリン酸化をも検出し得る抗体であってもよく、前記(i)および(iv) ; 前記(ii)および(v) ; 前記(iii)および(iv) ; または前記(vii)および(viii)のRegnase-1を特異的に認識する抗体であってよい。

[0232] リン酸化されたRegnase-1を特異的に認識する抗体は、特定のアミノ酸残基がリン酸化されているRegnase-1、好ましくは部分ペプチドを抗原として、公知の方法により作製することができる。例えば、通常の方法を用いて、前記抗原によりウサギなどの動物を免疫し、該動物の血清から抗体を得ることができるが、この方法に限定されない。より具体的には、後述する実施例に記載の方法が例示される。

[0233] 上記の方法により得られた抗体が、リン酸化されたRegnase-1を特異的に認識するか否かは、リン酸化Regnase-1および非リン酸化Regnase-1に対する結合活性をウエスタンブロッティングなどの手法を用いて評価することにより確認することができる。

[0234] 一局面において、本発明は、上記のようなリン酸化Regnase-1を特異的に認識する抗体を提供する。

[0235] B. 結合測定法およびその他の測定法

一局面において、本発明のRegnase-1結合分子は、例えばELISA、ウェスタンブロットティング法、表面プラズモン共鳴アッセイ等の公知の方法によって、そのRegnase-1結合活性に関して試験される。

[0236] 別の局面において、Regnase-1への結合に関してある参照物質と競合するRegnase-1結合分子を同定するために、競合アッセイが使用され得る。特定の態様において、そのような競合分子は、前記参照物質によって結合されるのと同じRegnase-1上の部位（エピトープ、例えば、線状または立体構造エピトープ）に結合する。ポリペプチドが結合するエピトープをマッピングする、詳細な例示的方法は、Morris (1996) “Epitope Mapping Protocols,” in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)に提供されている。

[0237] このような参照物質として、例えば、本明細書に記載のPP1～PP25、PP7+tag、PP10+tag、PP23+tagより選択される少なくとも1つの化合物または本明細書に記載のREA0023、REA0027、REB0007、REB0014、REB0022より選択される少なくとも1つの抗体を利用することができるが、これに限定されない。参照物質として、例えば、本明細書に記載のPP7、PP23およびPP10からなる群より選択される少なくとも1つの化合物を利用してもよい。

[0238] 例示的な競合アッセイにおいて、固定化されたRegnase-1は、Regnase-1に結合する第1の標識された物質およびRegnase-1への結合に関して第1の物質と競合する能力に関して試験される第2の未標識のRegnase-1結合分子を含む溶液中でインキュベートされる。対照として、固定化されたRegnase-1が、第1の標識された物質を含むが第2の未標識のRegnase-1結合分子を含まない溶液中でインキュベートされる。第1の物質のRegnase-1に対する結合を許容する条件下でのインキュベーションの後、余分な未結合の物質が除去され、固定化されたRegnase-1に結合した標識の量が測定される。固定化されたRegnase-1に結合した標識の量が対照サンプルと比較して試験サンプルにおいて実質的に減少している場合、それは第2の分子がRegnase-1への結合に関して第1の物

質と競合していることを示す。Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照のこと。

[0239] 別の例示的な競合測定法では、BIAcore(登録商標)解析を用いて、被験物質が第2(参照)物質によるRegnase-1への結合と競合する能力を決定する。BIAcore(登録商標)機器(例えば、BIAcore(登録商標)3000)をメーカーの推奨にしたがって操作する更なる局面において、当技術分野で公知の標準的な技術を用いてRegnase-1をCM5 BIAcore(登録商標)チップ上に捕捉し、Regnase-1でコーティングされた表面を作成する。典型的には、200~800共鳴単位のRegnase-1をチップに結合させる(容易に測定可能なレベルの結合をもたらすが、使用される被験物質の濃度で容易に飽和可能な量)。互いと競合する能力について評価される2つの物質(すなわち、被験物質と参照物質)を、適切な緩衝液中に結合部位のモル比1:1で混合して、混合物を生成する。結合部位に基づいて該濃度を算出する場合、被験物質または参照物質の分子量は、対応する物質の総分子量を該物質上のRegnase-1結合部位の数で割ったものとする。該混合物中の各該物質(すなわち、被験物質と参照物質)の濃度は、BIAcore(登録商標)チップ上に捕捉されたRegnase-1分子上の該物質の結合部位を容易に飽和するように十分に高くなければならない。混合物中の被験物質と参照物質は、(結合に基づいて)同じモル濃度であり、典型的には(結合部位に基づいて)1.00~1.5マイクロモルである。被験物質だけ、および参照物質だけを含有する別個の溶液も調製する。これらの溶液中の被験物質および参照物質は、該混合物と同じ緩衝液中にあり、同じ濃度および条件とすることができる。被験物質と参照物質を含有する該混合物に、Regnase-1でコーティングしたBIAcore(登録商標)チップ上を通過させて、結合の総量を記録する。次いで、チップに結合したRegnase-1に損傷を与えることなく結合した被験物質または参照物質を除去するように、チップを処理する。典型的には、これは、チップを30mM HClで60秒間処理することによって行われる。その後、被験物質だけの溶液に、Regnase-1でコーティングした表面上を通過させて、結合の量を記録す

る。再度、チップに結合させたRegnase-1に損傷を与えることなく結合した物質の全てを除去するように、チップを処理する。その後、参照物質だけの溶液に、Regnase-1でコーティングした表面上を通過させて、結合の量を記録する。次に、被験物質と参照物質の混合物の結合の理論上の最大値を算出するが、これは、Regnase-1表面上を単独で通過したときの各物質(すなわち、試験および参照)の結合の合計である。該混合物の実際の記録された結合がこの理論上の最大値よりも小さい場合には、被験物質と参照物質がRegnase-1への結合に関して互いと競合している。したがって、一般的に、競合する被験物質は、上記のBIAcore(登録商標)ブロッキング測定法の間に、参照物質の存在下で、記録される結合が、組み合わせた被験物質と参照物質の理論上の結合最大値(上記で定義した通り)の80%と0.1%の間(例えば、80% $\sim$ 4%)、特に、理論上の結合最大値の75%と0.1%の間(例えば、75% $\sim$ 4%)、より具体的には理論上の結合最大値の70%と0.1%の間(例えば、70% $\sim$ 4%)となるように該測定法においてRegnase-1に結合する、物質である。

[0240] 別の例示的な競合測定法では、BIAcore(登録商標)解析を用いて、被験物質が第2(参照)物質によるRegnase-1への結合と競合する能力を決定する。BIAcore(登録商標)機器(例えば、BIAcore(登録商標)3000)をメーカーの推奨にしたがって操作する更なる局面において、当技術分野で公知の標準的な技術を用いて参照物質をBIAcore(登録商標)チップ上に捕捉し、参照物質でコーティングされた表面を作成する。典型的には、200 $\sim$ 800共鳴単位の参照物質をチップに結合させる(容易に測定可能なレベルのRegnase-1結合をもたらす量)。参照物質と競合する能力について評価される被験物質とRegnase-1を、適切な緩衝液中に混合して、混合物を生成する。Regnase-1だけを含有する別個の溶液も調製する。これらの溶液中のRegnase-1は、該混合物と同じ緩衝液中にあり、同じ濃度および条件とすることができる。Regnase-1だけを含有する溶液に、参照物質でコーティングしたBIAcore(登録商標)チップ上を通過させて、結合の総量を記録する。チップの再生のためには、チップ表面にコーティングされた参照物質を除去するように、チップを処理する。例えば、Protein A

が共有結合にて固相化されたBIAcore(登録商標)チップに抗体を介して参照物質がコーティングされていた場合、10mM Glycine-HClで処理し、Protein Aに結合した抗体を除去することで行われる。その後、被験物質とRegnase-1を含有する該混合物に、参照物質でコーティングしたBIAcore(登録商標)チップ上を通過させて、結合の総量を記録する。Regnase-1だけを含有する溶液を通過させた際に記録した結合の総量と比較して、被験物質とRegnase-1を含有する該混合物を通過させた際に記録した結合の総量の方が小さい場合には、その被験物質と参照物質は競合する物質である。限定はされないが、被験物質と参照物質が競合するとは、(Regnase-1だけを含有する溶液を通過させた際の結合の総量)にて(被験物質とRegnase-1を含有する試験混合物を通過させた際の結合の総量)を割った値が、0.8以下、0.7以下、0.6以下、又は0.5以下であることを意味してよい。

[0241] BIAcore(登録商標)チップ上に参照物質を捕捉するために、参照物質にタグを結合させてもよく、そのようなタグとしては本明細書に記載のTFPI-tagやFLAG-tagが例示される。参照物質とタグはリンカーを介して連結されていてもよく、そのようなリンカーとしてはGly-GlyリンカーやGlyとSerから構成されるリンカー(例えば、Gly-Gly-Gly-Ser(配列番号: 62)の1~3回の繰り返し)、ThrとGlyから構成されるリンカー(例えば、Thr-Glyの1~3回の繰り返し)が例示される。限定されないが、タグ付きの参照物質としては、本明細書で開示されるPP7+tag、PP23+tag及びPP10+tagが例示される。タグ付き参照物質を、タグに対する抗体を介して前記チップ上に捕捉してもよい。タグ付き参照物質をチップ上に捕捉するためのより詳細な方法は、本実施例に記載される。

[0242] C. 活性測定法

一局面において、Regnase-1結合分子の生物活性を同定するための測定法が提供される。生物学的活性は、例えば、標的mRNAを分解する活性(RNase活性)、または標的mRNAの発現を抑制する活性を含んでよい。また、このような生物学的活性をin vivoおよび／またはin vitro条件下で有するRegnase-1結

合分子が、提供される。

[0243] 本明細書において「mRNAの発現を抑制する」とは、mRNA量を低下させることを意味し、mRNAを分解することによりmRNA量を低下させることが含まれる。

[0244] 特定の態様において、本発明のRegnase-1結合分子は、このような生物学的活性について試験される。標的mRNAを分解する活性は、本明細書に記載の方法を用いることにより測定できる。例示的には、Regnase-1存在下でHEK293細胞に標的mRNAとしてのIL-6 mRNAおよび3' UTRを過剰発現させ、ノーザンブロットティングにより、被験物質の存在下および非存在下における、IL-6 mRNAレベルの差を評価することにより測定してよい。標的はIL-6 mRNAに限定されない。他には、疾患モデル動物に被験物質を投与し、動物から採取された組織における標的mRNA発現レベルを定量的PCR解析により測定してもよい。

[0245] D. アフィニティの測定法

一態様において、解離定数 (KD) は、放射性標識抗原結合測定法 (radiolabeled antigen binding assay: RIA) によって測定される。一態様において、RIAは、目的の抗体のFabバージョンおよびその抗原を用いて実施される。例えば、抗原に対するFabの溶液中結合アフィニティは、非標識抗原の漸増量系列の存在下で最小濃度の (¹²⁵I) 標識抗原によりFabを平衡化させ、次いで結合した抗原を抗Fab抗体でコーティングされたプレートにより捕捉することによって測定される。(例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)を参照のこと)。測定条件を構築するために、MICROTITER (登録商標) マルチウェルプレート (Thermo Scientific) を50mM炭酸ナトリウム (pH9.6) 中5μg/mlの捕捉用抗Fab抗体 (Cappel Labs) で一晩コーティングし、その後室温 (およそ23℃) で2~5時間、PBS中2% (w/v) ウシ血清アルブミンでブロックする。非吸着プレート (Nunc #269620) において、100 pMまたは26 pMの [¹²⁵I]-抗原を、(例えば、Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997) における抗VEGF抗体、Fab-12の評価と同じように) 目的のFabの段階希釈物と混合する。次いで、目的のFabを一晩インキュベートするが、このイン

キュベーションは、平衡が確実に達成されるよう、より長時間（例えば、約65時間）継続され得る。その後、混合物を、室温でのインキュベーション（例えば、1時間）のために捕捉プレートに移す。次いで溶液を除去し、プレートをPBS中0.1%のポリソルベート20（TWEEN-20（登録商標））で8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 μ l/ウェルのシンチラント（MICROSCINT-20（商標）、Packard）を添加し、TOPCOUNT（商標）ガンマカウンター（Packard）においてプレートを10分間カウントする。最大結合の20%以下を与える各Fabの濃度を、競合結合アッセイにおいて使用するために選択する。

[0246] 別の態様によれば、KDは、BIACORE（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイを用いて測定される。例えば、BIACORE（登録商標）-2000またはBIACORE（登録商標）-3000（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ）を用いる測定法が、およそ10反応単位（response unit: RU）の抗原が固定されたCM5チップを用いて25°Cで実施される。一態様において、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIACORE, Inc.）は、供給元の指示にしたがいN-エチル-N' - (3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドヒドロクロリド（EDC）およびN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を用いて活性化される。抗原は、およそ10反応単位（RU）のタンパク質の結合を達成するよう、5 μ l/分の流速で注入される前に、10mM酢酸ナトリウム、pH4.8を用いて5 μ g/ml（およそ0.2 μ M）に希釈される。抗原の注入後、未反応基をブロックするために1 Mエタノールアミンが注入される。キネティクスの測定のために、25°C、およそ25 μ l/分の流速で、0.05%ポリソルベート20（TWEEN-20（商標））界面活性剤含有PBS（PBST）中のFabの2倍段階希釈物（0.78nM～500nM）が注入される。結合速度（ k_{on} ）および解離速度（ k_{off} ）は、単純な1対1ラングミュア結合モデル（BIACORE（登録商標）評価ソフトウェアバージョン3.2）を用いて、結合および解離のセンサーグラムを同時にフィッティングすることによって計算される。平衡解離定数（Kd）は、 k_{off}/k_{on} 比として計算される。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881（1999）を参照のこと。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによってオン速度が $10^6 M^{-1}s^{-1}$ を超える場合、オン速度

は、分光計（例えばストップフロー式分光光度計（Aviv Instruments）または攪拌キュベットを用いる8000シリーズのSLM-AMINCO（商標）分光光度計（ThermoSpectronic））において測定される、漸増濃度の抗原の存在下でのPBS、pH7.2中20nMの抗抗原抗体（Fab形態）の25℃での蛍光発光強度（励起=295nm；発光=340nm、バンドパス16nm）の増加または減少を測定する蛍光消光技術を用いることによって決定され得る。

[0247] 10. Regnase-1変異体

一局面において、本発明は、Regnase-1における配列番号1の513および494位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基が他のアミノ酸残基に置換されたRegnase-1変異体を提供する。

[0248] いくつかの態様において、本発明のRegnase-1変異体は、配列番号1の513および494位；513位；または494位のそれぞれに相当する位置のSer残基が他のアミノ酸に置換されたRegnase-1変異体であってよい。一態様において、このようなRegnase-1変異体は、配列番号1の513および494位；配列番号1の513位；配列番号1の494位；配列番号2の516および497位；配列番号2の516位；または配列番号2の497位のSer残基が他のアミノ酸に置換されたRegnase-1変異体であってよい。アミノ酸置換は当業者に周知の方法を用いて行うことができる。

[0249] いくつかの態様において、本発明のRegnase-1変異体は哺乳動物のRegnase-1であってよく、マウスまたはヒトRegnase-1であってよい。

[0250] 本明細書において「置換された」とは、参照アミノ酸配列におけるある位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残で占められていることを意味し、実際に置換する工程を必須の要件とするものではない。

[0251] いくつかの態様において、本発明におけるSer残基が置換される他のアミノ酸としては、AlaまたはGluが例示されるがこれらに限定されない。Ala等に置換することで、目的の位置のアミノ酸がリン酸化されていないRegnase-1変異体を得ることができ、非リン酸化Regnase-1の対照物質として有用である。また、Gluに置換することで、目的の位置のアミノ酸のリン酸化を模擬し得るた

め、リン酸化Regnase-1の模擬物質として有用である。

[0252] また本発明は、Regnase-1に変異を有する非ヒト動物およびその子孫に関する。そのような非ヒト動物は、当業者に公知の方法を用いて、例えば本明細書に記載のRegnase-1変異体をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニック非ヒト動物を作製することにより得ることができる。非ヒト動物としては、例えば、サル、ブタ、イヌ、ラット、マウス、ウサギ、ハムスター、ウシ、ヒツジ、ネコ、ウマなどを挙げることができる。

実施例

[0253] 以下は、本発明の実施例である。上述の一般的な記載に照らし、種々の他の態様が実施され得ることが、理解されるであろう。

[0254] <材料および方法>

各実施例に特に説明のない限り、本項目に記載の方法を用いて実験を行った。

[0255] (マウスRegnase-1 S435A/S439A (AA) ノックインマウスの作製)

Regnase-1遺伝子を含むゲノムDNAを胚幹 (ES) 細胞 (GSI-1) から単離した。exon 5、exon 6、およびRegnase-1遺伝子末端の下流を包含するおよそ12kbのゲノム断片を、pCR-TOP0ベクター (Thermo Fisher Scientific) にサブクローニングした。部位特異的突然変異誘発によってexon 6のSer435およびSer439残基をAlaで置換するように、標的化ベクターを設計した。2つのloxPに挟まれたネオマイシン耐性遺伝子を、exon 5と6の間のイントロンに挿入した。線状化したベクターをエレクトロポレーションによってGSI-1 ES細胞に導入した。標的化されたES細胞をスクリーニングし、ゲノムPCRおよびサザンブロットティングにより同定した。これらの細胞を、C57BL/6マウス由来の胚盤胞にマイクロインジェクションした。キメラ雄マウスをC57BL/6雌マウスと交配させ、F1ヘテロ接合マウスを作製した。ネオマイシン遺伝子カセットを除去するため、F1マウスをCAG-Creトランスジェニックマウスとさらに交配させた。C57BL/6マウスとの交配によってCAG-Creアレルを除去した後、Regnase-1 AAヘテロ接合 (Regnase-1AA/+) マウスをC57BL/6マウスで少なくとも10世代戻

し交配し、交雑して、Regnase-1AA/AAホモ接合体を得た（本明細書において、このマウスを「Regnase-1AA/AAマウス」または「Regnase-1 AA変異マウス」と称することがある。）。

[0256]（C末端アミノ酸にフレームシフト変異を有するマウスRegnase-1変異アリの作製）

Regnase-1フレームシフト変異マウスをデザインし、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いて、NP0法人発生工学研究会（Biotechnology Research and Development、Dr M. Ikawa and M. Okabe、Osaka University、Osaka、Japan）によって構築した。この試験で使用したgRNA配列は以下である：5' -GTGGGTGGGGTAATGGGTA-3'（配列番号：52）および5' -CCTACCCATCCAGAGTAC-3'（配列番号：53）。各gRNA配列を、CRISPR/Cas9ベクターpSpCas9(BB)-2A-Puro PX459（Addgene；#62988）にインフレームでクローニングした（Nat Protoc 8, 2281-2308（2013））。以前に記載された方法を用いて、PX459ベクターを、C57BL/6 x C57BL/6マウス由来の受精卵に導入した（Dev Growth Differ 56, 122-129（2014））。これらのマウス胚を、偽妊娠ICR雌の卵管に移した。Regnase-1アリにおける遺伝子変異を、DNAシーケンシングによって同定した。C末端切断型Regnase-1タンパク質（Regnase-1 Δ CTD）の発現をもたらすフレームシフト変異を含む変異マウスを交雑させて、Regnase-1 Δ CTDホモ接合体（「Regnase-1 Δ CTD/ Δ CTD」とも称する。）を得た。

[0257]（マウスRegnase-1 S513A/S513A変異アリの作製）

マウスRegnase-1 S513A変異マウスは、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いて、NP0法人発生工学研究会（Biotechnology Research and Development、Dr M. Ikawa and M. Okabe、Osaka University、Osaka、Japan）によって構築した。この試験で使用したgRNA配列は以下である：5' -GTGGGTGGGGTAATGGGTA-3' および5' -CCTACCCATCCAGAGTAC-3'。各gRNA配列を、CRISPR/Cas9ベクターpX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9（Addgene；#42230）にインフレームでクローニングした（Science 339, 819-23（2013））。また、S513A変異のため、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド配列（103bases, 5' -CCACCGACTATGT

GCCCCGCCACCCACCTACCCATCCAGAGAGTA+TGGgCTGAGCCGTA+CC ATTACCCCCACCCACTC CTGTCCTTCAGGAGCCCCAGAG -3' (配列番号: 54)) を合成した。既報 (Dev Growth Differ 56, 122-129 (2014)) に従い、前述のPX459ベクターと一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド配列を、C57BL/6 x C57BL/6マウス由来の受精卵に導入した。これらのマウス胚を、偽妊娠ICR雌の卵管に移植した。Regnase-1アレルにおける遺伝子変異を、DNAシーケンシングによって同定した。

[0258] (プラスミド)

pFLAG-CMV2 (Sigma) およびpcDNA3.1-Mycを含むRegnase-1発現ベクターならびにウイルス発現ベクター、例えばpMRX-FLAG-Regnase-1-ires-puroについては、以前に記載されている (Nature 458, 1185-1190 (2009); Nat Immunol 12, 1167-1175 (2011))。N末端またはC末端を欠く切断型のRegnase-1は、Regnase-1 cDNAのPCR増幅によって構築し、pFLAG-CMV2ベクターに挿入した。Regnase-1発現コンストラクトの点変異は、Quickchange II部位特異的突然変異誘発キット (Agilent Technologies) を用いて調製した。大腸菌 (E. coli) を用いる過剰発現のために、プロリンに富むドメインとC末端ドメイン (441~598) とを含むRegnase-1の一部をRegnase-1 cDNAから増幅して、pGEX 6Pベクター (GE Healthcare) に挿入した。Myc-Act1、HA-TBK1、およびHA-IKKiを各cDNAからPCR増幅して、pcDNA3.1ベクターにインフレームで挿入した。pTRE tight-IL-6 CDS+3' UTRベクターは、以前に記載されている (Nature 458, 1185-1190 (2009))。

[0259] (マウスRegnase-1(45-339))

マウスRegnase-1 (ZC3h12a) (Uniprot ID: Q5D1E7) (配列番号: 1) のアミノ酸番号45-339の断片のN末端にGSTタグが付加されたものを発現コンストラクトとした。マウスRegnase-1(45-339)は上記コンストラクトを用いて大腸菌で発現させ、Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare) で精製し、PreScission Protease (GE Healthcare) でGST部分を切断し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより単離した。

[0260] (抗Regnase-1抗体)

マウスRegnase-1(45-339)タンパク質をウサギに投与して免疫感作を行った。免疫感作されたウサギの細胞からRNAを調整し、RT-PCRを行い、抗体遺伝子を増やしたのちに、抗体遺伝子をプラスミドに組み込んだ。抗体遺伝子を含むプラスミドについては大腸菌に導入して培養し、培養した大腸菌からプラスミドを精製した。抗体遺伝子が導入されたプラスミドはHEK293細胞に導入し、培養上清中に抗体を発現させた。培養上清中の抗体はProtein Aにより精製した。

[0261] (抗リン酸化Regnase-1抗体)

マウスRegnase-1の435番目のリン酸化セリン残基および439番目のリン酸化セリン残基を含む配列の末端にシステイン残基をつなげたペプチドLD(pS)GIG(pS)LESQMSEC(配列番号：6)、並びにマウスRegnase-1の513番目のリン酸化セリン残基を含む配列の末端にシステイン残基をつなげたペプチドCTYPSREYW(pS)EPY(配列番号：7)を合成し、それぞれのシステイン残基にKLHをコンジュゲートしたタンパク質をウサギに投与して免疫感作を行った。免疫感作されたウサギの抗血清からリン酸化ペプチドによるアフィニティ精製と非リン酸化ペプチドによる吸収を行い、抗体を精製した。ここで用いた元のアミノ酸配列LDSGIGSLESQMSE(配列番号：8)、および元の配列の一部REYWSEPY(配列番号：9)はマウスとヒトで保存されていた。

[0262] (抗TFPI-tagペプチド抗体)

N末端にT cellエピトープペプチド(Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu-Gly(配列番号：55)、tetanus toxin TT p30由来)およびPEG5スペーサーを有するTFPI-tagペプチド配列(Thr-Gly-Thr-Gly-Thr-Gly-Thr-MeF-Pro-Ile-Thr-MeF-Pro-Ile(配列番号：56)、MeFはN-メチルフェニルアラニンを示す)を合成により調製し、ウサギに投与して免疫感作を行った。免疫感作されたウサギの細胞からRNAを調製し、RT-PCRを行い、抗体遺伝子を増やしたのちに、抗体遺伝子をプラスミドに組み込んだ。抗体遺伝子を含むプラスミドについては大腸菌に導入して培養し、培養した大腸菌からプラスミドを精製した。抗体遺伝子が導

入されたプラスミドはHEK293細胞に導入し、培養上清中に抗体を発現させた。培養上清中の抗体はProtein Aにより精製した。

[0263] (試薬、細胞)

組換えマウスIL-17Aは、R&D systemsより購入した。組換えマウスIL-1 β 、マウスTNF- α 、マウスIL-6、およびヒトIL-17AはBiolegendより購入した。抗Act1 (H-300)、I κ B- α (C-21)、NF κ B p65 (C-20)、MAPK p38 (C-20)、およびERK1 (K23) は、Santa Cruz Biotechnologyより購入した。抗RPL7A (15340-1-AP) は、Proteintechより得た。抗FLAG M2、Myc (9E10)、およびHA (12CA5) 抗体、FLAG M2アフィニティーゲル、ならびにFLAG x 3ペプチドは、Sigmaより購入した。抗phospho-I κ B α (Ser32/36)、phospho-NF κ B p65 (Ser468)、phospho-MAPK p38 (Thr180/Tyr182)、phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)、JNK、phospho-JNK (Thr183/Tyr185)、phospho-STAT3 (Tyr705)、phospho-TBK1 (Ser172)、およびphospho-IKK ϵ (Ser172) は、Cell Signaling Technologyより得た。抗CD3 ϵ およびIV型コラーゲンは、Abcamより得た。LPS (S. ミネソタ (S. Minnesota) R595) およびBX795は、InvivoGenより購入した。骨髓由来マクロファージは、20 ng/mlマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) (Peprotech) を含むRPMI培地で骨髓細胞を培養することによって作製した。HeLa細胞は、American Type Culture Collectionから購入した。野生型およびRegnase-1AA/AA MEFは、妊娠13.5日目のマウス胚から調製した。Act1 欠損MEFは、Y. Matsushima博士より供与いただいたTraf3ip2ADJMマウスから作製した (J Immunol 185, 2340-2349 (2010))。Regnase-1-/-、TBK1-/-、IKKi-/-、およびTBK1-/-/IKKi-/- MEFは、以前に記載されたとおり調製した (Nature 458, 1185-1190 (2009); J Exp Med 199, 1641-1650 (2004); Nat Immunol 9, 684-691 (2008))。IKK α -/-/IKK β -/- MEFは、I. Verma博士より供与いただいた (Genes & development 14, 1729-1733 (2000))。in vitro条件下における分化によって誘導されたエフェクターCD4+ T細胞は、以前に報告された方法に従って作製した (Annu Rev Immunol 28, 445-489 (2010))。TH1、TH17、またはiTreg細胞の誘導のために、ナイーブCD4+ T

細胞（細胞 1.0×10^6 個）を、抗CD3 ϵ で被覆した（BD Bioscience、 $10 \mu\text{g/ml}$ ）96ウェルプレートに播種し、抗CD3 ϵ （ $1 \mu\text{g/ml}$ ）抗体および抗CD28抗体（ $1 \mu\text{g/ml}$ ）で活性化し、TH1、TH17、またはiTreg分化条件下で3日間培養した：TH1については $10 \mu\text{g/ml}$ 抗IL-4（BD Bioscience）および 10 ng/ml IL-12（Peprrotech）、TH17については $10 \mu\text{g/ml}$ 抗IL-4、 $10 \mu\text{g/ml}$ 抗IFN- γ （BD Bioscience）、 10 ng/ml TGF- β （Peprrotech）、 30 ng/ml IL-6、および 50 ng/ml IL-23（Peprrotech）、または、iTregについては $10 \mu\text{g/ml}$ 抗IL-4、 $10 \mu\text{g/ml}$ 抗IFN- γ 、および 10 ng/ml TGF- β 。LSECは、以前に記載されたように調製した（*Journal of leukocyte biology* 38, 213-230 (1985).）。N末端FLAGエピトープタグを有するRegnase-1を発現する細胞株を、pMRX-FLAG-Regnase-1-ires-puroをトランスフェクトしたPlat-Eレトロウイルスパッケージング細胞からのウイルス含有培養上清を用いたRegnase-1-/-不死化MEFのレトロウイルス感染によって、構築した（*Gene therapy* 7, 1063-1066 (2000)）。 $2 \mu\text{g/ml}$ ピューロマイシンを含むDMEM中で、細胞の培養および維持を行った。

[0264]（EAEモデル）

通常のEAEは、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）（35～55）ペプチド（AnaSpec）を用いた免疫化によって誘発した。MOG（35～55）ペプチド（ 300 ng/マウス ）のエマルジョンと完全フロイントアジュバント（CFA、InvivoGen）を比率1:1で混合して、マウスに皮下注射した。0日目および2日目に百日咳毒素を腹腔内注射した後、マウスを毎日モニタリングし、免疫化後7～28日目の間の臨床スコアリングによって評価した。臨床スコアは、以前に規定されたスケールを用いて測定した（*Immunity* 14, 471-481 (2001)）。骨髄キメラマウスの構築のために、4～5週齢の γ 線照射マウス（ 10 Gy ）に骨髄細胞（細胞 $3.0 \sim 5.0 \times 10^7$ 個/ml）を静脈内注射した。少なくとも4週間後、キメラマウスにEAEの誘発を施した。病原性CD4 $^{+}$ T細胞の受動的な移植によって誘発されるEAE誘発を、以前に記載された方法にしたがって実施した（*Cell* 148, 447-457 (2012)）。簡潔には、MOG（35～55）ペプチド/CFAおよび百日咳毒素の注入の10日後に、野生型マウスを屠殺した。脾細胞（細胞 4×10^6

個) からCD4⁺ T細胞を単離して、MOGペプチドをパルスした照射脾細胞とともに共培養した。CD4 (L3T4) マイクロビーズおよびautoMACSセパレータ (Miltenyi) を用いて共培養細胞から単離したCD4⁺ T細胞を、野生型、Regnase-1AA/AA、およびRegnase-1 Δ CTDマウス (細胞 1.5×10^7 個/マウス) に静脈内注射した。Leica CM 1850 クリオスタット (Leica) を用いて脊髄、リンパ節、および脾臓から凍結切片を調製し、示された抗体で免疫染色した。脊髄切片を調製するために、本発明者らは、以前に記載された方法を使用した (Archives of histology and cytology 66, 123-143 (2003))。

[0265] (フローサイトメトリー)

フローサイトメトリーのために以下の抗体を調製した: PerCP-Cy5.5コンジュゲート抗マウスCD4、PEコンジュゲート抗マウスIL-17A、FITCコンジュゲート抗マウスIFN- γ 、PEコンジュゲート抗マウスCD25 (BD bioscience)、およびAlexa-647コンジュゲート抗マウスFoxp3 (Biolegend)。脊髄細胞を抗CD4抗体およびF4/80抗体 (Biolegend) によって染色した。CD4⁺ T細胞を、100 nM ホルボール12-ミリステート13-アセテート (PMA) (Sigma)、1 μ Mイオノマイシン (Sigma)、およびGolgiPlug (BD bioscience) とともに2時間37°Cで培養した。細胞の透過処理および固定の後に、細胞内染色 (IFN γ 、IL-17A、およびFoxp3) を、Cytotfix/Cytoperm細胞内染色キット (BD bioscience、IFN γ およびIL-17Aの場合) またはFoxp3/転写因子染色バッファーキット (Affymetrix、Foxp3の場合) のいずれかを用いて実施した。

[0266] (免疫沈降)

HEK293細胞を用いるタンパク質の一過性発現のための手法は、以前に記載されている (Nat Immunol 12, 1167-1175 (2011).)。トランスフェクションから24時間後に、超音波処理によって細胞を破砕した。20,000 x gで5分間の遠心分離によって細胞デブリを除去した後、細胞溶解物をDynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) に結合させた抗FLAG M2抗体または抗Myc抗体 (Sigma) のいずれかとともに4°Cで1時間インキュベートした。その後、ビーズをTrisバッファーで2回洗浄した。免疫沈降したタンパク質を、3 x SDS

サンプルバッファーを用いて溶出させ、10% SDS-PAGEゲルに供した。FLAG-Regnase-1を安定的に発現するMEFから、リン酸化マウスRegnase-1を精製した。IL-1 β またはIL-17Aによる刺激の後に、超音波処理によって細胞を破碎した。細胞溶解物を、抗FLAG M2アフィニティーゲルとともに4°Cで1時間インキュベートした。結合したタンパク質を、Trisバッファー中の0.15 mg/ml FLAG x 3ペプチド (Sigma) によって溶出させ、7.5%未変性PAGEゲルに供した。

[0267] (ゲル濾過解析)

マウスRegnase-1のC末端セグメント (441~598) を、大腸菌Rosetta2 (DE3) 細胞 (Merck Millipore) 内でGST融合タンパク質として作製した。細胞を、プロテアーゼ阻害剤を追加したBugbusterタンパク質抽出試薬 (Merck Millipore) 中で溶解させた。融合タンパク質を、Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって細胞溶解物から精製し、PreScission Protease (GE Healthcare) を用いてTrisバッファー [20 mM Tris-HCl (pH7.4) および150 mM NaCl] 中で切断し、マウスRegnase-1セグメントを放出させた。タンパク質溶解性を上昇させるための1% CHAPSの添加の後、Glutathione Sepharose 4Bカラムを用いてGSTタンパク質を除去した。精製済のマウスRegnase-1セグメントをSuperdex 200ゲル濾過カラム (GE Healthcare) にロードした。溶出ピークの見かけの分子量を、ゲル濾過クロマトグラフィー用分子量マーカー (Sigma) の溶出パターンから推定した。

[0268] (in vitroリン酸化アッセイ)

FLAG-Regnase-1を安定的に発現するMEFから、マウスRegnase-1タンパク質を得た。Complete miniプロテアーゼ阻害剤およびPhosStopホスファターゼ阻害剤カクテル (Roche) を追加した20 mM Tris-HCl、pH7.4、および150 mM NaClにおいて細胞を懸濁し、超音波水浴 (Bioruptor Plus, Diagenode) を用いて破碎した。Regnase-1を、FLAG M2アフィニティーゲル (Sigma) で精製した。in vitroリン酸化アッセイのために、以下の組換えタンパク質を調製した: GSTタンパク質 (Sigma)、GSTタグ付TBK1 (Sigma)、GSTタグ付IKKi (Ther

mo Fisher Scientific)、およびLambdaプロテインホスファターゼ (New England BioLabs)。FLAG-Regnase-1 (50 μ g/ml) を、0.2 M HEPES、pH7.0、20 mM MgCl₂、2 mM ATP (または50 μ Ci [γ -³²P] ATP)、および1.0 Mマンニトール中で4時間、30℃でインキュベートした。サンプルを、3 x SDSサンプルバッファー14または4 x 未変性PAGEサンプルバッファー (0.2 M Tris-HCl、pH6.8、40%グリセロール、および0.4%ブロモフェノールブルー) のいずれかと混合し、10%SDS-PAGEゲルまたは7.5%未変性PAGEゲルにロードした。Regnase-1はイムノブロッティングにより検出した。オートラジオグラフィーにより、[γ -³²P] ATPの存在下でリン酸化タンパク質を可視化した。

[0269] (細胞内画分の単離)

以前に記載された方法にしたがって、ER膜画分の分離および単離を行った (Rna 9, 1123-1137 (2003))。MEF細胞 (細胞5 x 10⁷個) を、ホモジナイゼーションバッファー [10 mM HEPES-KOH、pH7.5、10 mM KoAc、1.5 mM Mg(OAc)₂、2 mM DTT、1 mM PMSF、および200 U/ml RNaseOUTリボヌクレアーゼ阻害剤 (Thermo Fisher Scientific)] に懸濁した後、Dounceホモジナイザーで破壊した。ミクロソーム画分およびサイトゾル画分を分離するために、ホモジネートを低速遠心分離 (1,500 x g) に5分間供した。上清をさらに、4℃で20分間の65,000 x gの高速遠心分離 (Beckman TLA 45ローター) に供した。ミクロソームペレットを、Trisバッファーに再懸濁した。ER膜画分を単離するために、ホモジネートを、HKMバッファー [50 mM HEPES-KOH、150 mM KoAc、および5 mM Mg(OAc)₂] 中の2.5 Mスクロースと、比率1:4で混合した。混合物2 mlの上に、HKMバッファー中の0.5mlの0.25 MスクロースおよびHKMバッファー中の0.75 mlの1.3 Mスクロースを積層した。4℃で45分間の500,000 x gの遠心分離 (Beckmann TLA100.3ローター) の後、1.3 M/2.0 Mスクロース界面内のER膜を抽出し、HKMバッファーで希釈した。4℃で20分間の500,000 x gの遠心分離の後、膜をTrisバッファーに再懸濁した。

[0270] (ポリソームプロファイリング)

WTおよびマウスRegnase-1 Δ CTD MEF細胞 (細胞1~2 x 10⁸個) を、細胞回

収前に10分間、5 μ g/mlシクロヘキシミドで前処理した。回収した細胞を、100 μ g/mlシクロヘキシミドを追加した1 mlホモジナイゼーションバッファーに懸濁し、ダウンス型ホモジナイザーの数回のストロークによって低浸透圧溶解させた。細胞画分を含む膜を可溶化するために、10%ジギトニンを、最終濃度2%となるよう添加した。5分間の低速遠心分離（1500 $\times$ g）の後、溶解物上清を、直線勾配の10~60%スクロースポリソームバッファー [50 mM HEPES-KOH、pH7.5、150 mM KCl、10 mM MgSO₄、2 mM DTT、1 mM PMSF、100 μ g/mlシクロヘキシミド、および100 U/ml RNaseOUTリボヌクレアーゼ阻害剤] の上部にロードした。Beckman SW41 Tiローターにおける4℃で2時間にわたる36,000 rpmの超遠心分離の後、ピストン勾配フラクショネーター（Biocomp Instruments）を用いてスクロース勾配の上部から画分を回収し、UV-Star（登録商標）96ウェルプレート（Greiner Bio-one）に移し、260 nmでのUV吸光度によってモニタリングした。

[0271]（定量的PCR解析）

総RNAをHigh Pure（商標）RNA単離キット（Roche）によって精製し、Rever Tra Ace（登録商標）キット（TOYOBO）を用いて逆転写した。定量的PCRのために、Thunderbird（登録商標）Probe qPCRミックス（TOYOBO）によってcDNAのPCR増幅を行った。マウスIL-6、TNF、LCN-2、GM-CSF、CXCL-1、CXCL2、CCL5、およびCCL-20に対するTaqManプローブを、Applied Biosystemsから購入した。Viia7（商標）リアルタイムPCRシステム（Applied Biosystems）によって、蛍光を検出した。18S rRNAの発現を用いてmRNA発現レベルを標準化した。

[0272]（Tet-offシステム）

HEK293 Tet-off細胞（細胞 3.0×10^6 個）に、以前に記載された8pTREtight-IL6-CDS + 3' UTRを、マウスRegnase-1、Act1、およびIKKiをコードする一連の発現ベクターとともに同時トランスフェクトした。3時間後、細胞を3つの60mm培養皿に分け、一晩培養した。IL6-CDS + 3' UTR発現の抑制は、1 μ g/mlドキシサイクリンの存在下で細胞を培養することによって誘導した。

[0273] (統計学的解析)

特に説明のない限り、2群間の差異の統計学的解析は、スチューデントt検定(両側)によって行った。P < 0.05を、統計学的有意と見なした。

[0274] <結果>

実施例1

本実施例では、S435A/S439A (AA) 変異は、Regnase-1のIKK仲介性リン酸化および分解を妨げることが示された。

[0275] Regnase-1はIKK複合体によってリン酸化された後、LPS活性化マクロファージ中でユビキチン-プロテアソーム系を介して分解される。Regnase-1中の2つのセリン残基Ser435およびSer439は推定IKKリン酸化部位として決定されている。Regnase-1のIKK仲介性リン酸化および分解が免疫応答においてどのようにサイトカイン発現を制御するのかを解明するために、本発明者らは、Regnase-1タンパク質中Ser435およびSer439の2つをAlaにアミノ酸置換したノックインマウスを作製した(図1-2A)。変異させたRegnase-1遺伝子を、ゲノムPCRおよび直接シーケンシングによって確認した(図1-2B)。ホモ接合Regnase-1ノックインマウス(Regnase-1AA/AA)は予想メンデル比で生まれ、正常に発育し、Regnase-1欠損マウスについて以前に記載されたような自己免疫疾患のいかなる症状も有さなかった。

[0276] Regnase-1の非リン酸化形態およびリン酸化形態を検出するために、本発明者らは、優れた感度を有するモノクローナル抗体を作製した。予想されたとおり、LPS刺激Regnase-1AA/AAマクロファージはRegnase-1タンパク質分解を全く示さず、それにより、この変異タンパク質がIKK仲介性分解に抵抗性であることが示唆された(図1-3C)。野生型マクロファージと比較して、Regnase-1AA/AAマクロファージにおいては、そのタンパク質産生量が経時的に有意に上昇した。これは、Regnase-1のIKK仲介性リン酸化が、その分解に必須であることを示している。IRAKによるRegnase-1のリン酸化は、電気泳動において遅延バンドとして検出され(図1-3C)、このプロセスはIKK非依存的経路を介して起こることからRegnase-1AA/AAマクロファージ中で典型的に観察された

。LPS、例えば、NF- κ Bシグナル伝達経路におけるI κ BおよびNF- κ B p65、ならびに、MAPK経路におけるマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）p38および細胞外シグナル制御キナーゼ（ERK）1/2によって誘導される他のリン酸化は、野生型とRegnase-1AA/AAマクロファージのどちらにおいても同じであり（図1-3C）、これにより、この変異がRegnase-1AA/AAマクロファージにおけるLPSシグナル伝達経路に影響を与えないことが示された。それにもかかわらず、Regnase-1AA/AAマクロファージは、非常に低い濃度のLPSまたはTLRリガンドの存在下で、野生型と比較してIL-6およびIL-12の低下した産生を示すが、TNF- α については示さず（図1-4D）、これは、*in vitro*条件下での様々なTLRリガンドへの曝露に際して、サイトカイン産生がこの変異によって抑制されたことを示している。

[0277] 実施例2

本実施例では、Regnase-1AA/AAマウスはIL-17に対する弱められた応答を介して実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）に対して耐性であることが示された。

[0278] Regnase-1 AA変異体の免疫抑制効果をさらに調べるために、本発明者らはEAEモデルを使用した。Regnase-1AA/AAマウスは、対照と比べて、EAEの発症遅延および緩徐な進行を示した（図2-1A）。脊髄の組織学的解析により、Regnase-1AA/AAマウスにおける炎症、脱髄、軸索変性、およびニューロン組織へのT細胞浸潤の有意な低下が明らかになった（図2-1B）。浸潤性CD4⁺ T細胞の数は、対照マウスよりもRegnase-1AA/AAマウスにおいて有意に少なかった（図2-1C）。リンパ節の免疫蛍光解析により、Regnase-1AA/AAマウスのリンパ節における胚中心の形成障害および形質細胞の蓄積が明らかになった（データは示さず）。

[0279] 本発明者らは、Regnase-1AA/AAタンパク質を発現するどの細胞型がEAEに対する耐性の原因となっているのかを明確にするために、ナイーブCD4⁺ T細胞が*in vitro*条件下でTH1、TH17、またはTreg細胞に分化する能力を、野生型マウスとRegnase-1AA/AAマウスの間で比較した。これらは類似した分化パターンを示した（図3-1A）。本発明者らは次に、骨髓キメラを用いて、骨髓から

作製された免疫細胞と非造血細胞のどちらがRegnase-1AA/AAマウスにおけるEAEの病理発生の抑制に必要であるのかを調査した。Regnase-1AA/AAマウスへの野生型骨髓細胞の移植は対照よりも有効な疾患抑制をもたらし、一方、Regnase-1AA/AA骨髓細胞を有する野性型マウスは有意な違いを示さなかった（図2-1D）。これらの結果は、Regnase-1AA/AAマウスにおけるEAE疾患の改善が、免疫細胞ではなく非造血細胞によってもたらされたことを示唆している。

[0280] これをさらに確認するために、本発明者らは、MOG特異的自己反応性CD4⁺ T細胞を野生型およびRegnase-1AA/AAマウスに静脈内移植した、移植EAEモデルを使用した（Immunity 29, 628-636 (2008) ; Cell 148, 447-457 (2012)）。このモデルにおいて、活性化TH17細胞は、第5腰髄の背行血管の内皮細胞におけるSTAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) 活性化と炎症とを、IL-6およびIL-17に依存的な様式で誘発することができる。脾臓内皮細胞（IV型コラーゲン陽性）における、炎症の指標であるリン酸化STAT3の免疫組織学的解析によって、Regnase-1AA/AAマウスにおける低レベルのphospho-STAT3が明らかになり、これは、Regnase-1 AA変異が、病原性TH17細胞によって主に誘発される内皮細胞の炎症を抑制することを示唆した（図2-2Eおよび図2-2F）。STAT3リン酸化は、Regnase-1AA/AAマウスの第5腰髄の背行血管の内皮細胞においても低下した（図2-2Gおよび図2-2H）。これらの知見は、この変異させたタンパク質が、IL-6産生を低下させることにより内皮細胞におけるSTAT3活性化を抑制すること、および、IKKによるRegnase-1の分解が、EAEの病理発生の誘発において重要な役割を有することを示している。

[0281] IL-17はNF- κ BとMAPKのシグナル伝達経路の両方を活性化するが、NF- κ Bの弱い活性化因子である（Nature reviews. Immunology 9, 556-567 (2009)）。非造血細胞において、IL-6およびIL-17の協働的刺激により、NF- κ BおよびSTAT3活性化のフィードバック増幅ループにおいてIL-6の過剰発現がもたらされる（Immunity 29, 628-636 (2008) ; J Immunol 189, 1928-1936 (2012)）。本発明者らは、IL-17A、またはIL-17AとTNF- α もしくはIL-6との組み合わせによる刺激の後に、野生型およびRegnase-1AA/AAマウス由来の初代細胞に

おけるサイトカインおよびケモカイン産生を測定した。Regnase-1AA/AAマウス由来のマウス胎仔線維芽細胞（MEF）および肝類洞壁内皮細胞（LSEC）において、TNF- α + IL-17Aによる刺激から24時間後、野生型のものと比べ、IL-6、Regnase-1、CXCL-1、CXCL-2、およびCCL-20 mRNAの発現低下が認められた（図2-2I[MEF]および図3-1B[LSEC]）。野生型とRegnase-1AA/AA細胞との間のMEFにおける標的mRNA発現についての違いは、刺激期間後半においてより明白であった（図2-2I）。同様に、IL-17AとIL-6またはTNF- α のいずれかとの刺激した後のIL-6、CXCL-1、およびCXCL-2 mRNAのレベルもまた、野生型の細胞よりもRegnase-1AA/AAマウスのLSECにおいて低かった（図3-2C）。これらの結果から、非造血細胞におけるIL-17A刺激に際しNF- κ B活性化を介してRegnase-1のIKK仲介性リン酸化および分解が起こること、ならびに、これにより、炎症性因子のmRNAの発現が調節され得ることが示された。

[0282] 実施例3. イミキモド誘発乾癬モデルにおけるRegnase-1 AA変異マウスの病態軽減効果

C57BL/6マウス（野生型マウス;WT）またはRegnase-1 AA変異マウス(AA)の右耳介並びに除毛した頸背部皮膚に62.5 mgのイミキモドクリーム（ベセルナクリーム5%；持田製薬（株））を5日間連日塗布した。耳介の病変の評価は、右耳介の厚さをダイヤルシックネスゲージ（尾崎製作所）を用いて、イミキモド塗布前に継時的に測定することにより行った。また、頸背部皮膚の評価は、紅斑、肥厚、鱗屑の程度を4段階でそれぞれ肉眼的に評価し、それらを合わせたトータルスコア（12点）で示した。

[0283] その結果、野生型マウスでは、イミキモド塗布に伴い、顕著な耳介の肥厚が認められた（図4A）。また、イミキモドを塗布した頸背部皮膚においては、紅斑および肥厚、鱗屑といった乾癬様の皮膚病変が誘導された（図4B）。一方、Regnase-1 AA変異マウスでは、野生型マウスに比べて、耳介の肥厚並びに頸背部の乾癬様皮膚病変（紅斑、肥厚、鱗屑）が軽減した（図4A、4B）。

[0284] （病理学的検査）

イミキモド最終塗布後3日に、野生型マウスあるいはRegnase-1 AA変異マウスを深麻酔下で放血により安楽殺後に剖検した。耳介塗布部皮膚を採材し、10%中性緩衝ホルマリン固定液にて浸漬固定し、常法によりパラフィン包埋し、約3マイクロメートルにて薄切し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色標本を作製した。耳介塗布部皮膚のHE染色標本を光学顕微鏡下で病理組織学的に観察した。また、マイクロメートルを用いて表皮の厚さを以下の区分に分類して計測した：基底層及び有棘層、顆粒層、角質層、並びに表皮全層。

[0285] その結果、野生型マウスでは、真皮における好中球浸潤を伴う表皮の過形成や微小膿瘍といった乾癬様皮膚病変が顕著にみられた（図5A、表2）。一方、Regnase-1 AA変異マウスでは、野生型マウスよりもそれら乾癬様病変の軽減がみられた。また、表皮の厚さの形態計測の結果、いずれの区分においても、Regnase-1 AA変異マウスは野生型マウスよりも低値を示した（図5B）。

[0286] [表2]

イミキモド誘発乾癬モデルにおける野生型マウス及びRegnase-1 AA変異マウスの耳介塗布部皮膚の病理組織学的所見

所見	WT					AA				
	#6	#7	#8	#9	#10	#1	#2	#3	#4	#5
表皮過形成	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±
表皮における微小膿瘍	+	-	-	+	++	-	±	-	-	-
真皮における炎症性細胞浸潤										
好中球	++	++	++	++	++	±	±	±	±	±
単核球系細胞	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±

#動物番号

病変の程度：±、軽微；+、軽度；++、中等度；+++、重度；-、著変なし

[0287] (各種遺伝子発現の定量)

イミキモドをDay0, 2, 4に隔日塗布し、塗布翌日に段階的にマウスを安楽死処置して塗布部位の耳介を採取した。QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, No. 79306)及び RNeasy 96 kit (QIAGEN, No. 74182)を用い、常法に従ってRNAを抽出した。逆転写にて相補的DNAを得た後、Taqman PCR法により以下の目的遺伝子の発現を測定した。Taqman PCRはQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN, No. 204445)を用い、LightCycler 480 II (Roche社製)にて解析を実施した。使用したTaqmanプローブを下記に示した。

B2m (Applied biosystems社製、Mm00437762_m1) : 内在性コントロール

Il6 (Applied biosystems社製、Mm00446190_m1) : 炎症性サイトカイン

Il1a (Applied biosystems社製、Mm00439620_m1) : 炎症性サイトカイン

Cxcl2 (Applied biosystems社製、Mm00436450_m1) : 白血球遊走因子

Hbegf (Applied biosystems社製、Mm00439306_m1) : 細胞増殖因子

Spr2i (Applied biosystems社製、Mm00726832_s1) : ケラチノサイトマーカー

Keratin 6A (Applied biosystems社製、Mm00833464_g1) : ケラチノサイトマーカー

[0288] その結果、野生型マウスでは、Regnase-1の標的である遺伝子 (Il6, Il1a, Cxcl2, Hbegf) (図19-1～図19-5参照) が病態惹起に伴い増加した (図6)。一方、Regnase-1 AA変異マウスでは、病態惹起に伴い誘導されるこれら遺伝子の増加が抑制されていた。Regnase-1 AA変異マウスにおいては、病態に伴う炎症性サイトカインの産生並びに細胞増殖活性に対し抑制作用があることが示唆された。また、野生型マウスでは、ケラチノサイトに発現する因子であるSpr2i, Keratin 6Aが病態惹起に伴い増加した (図6)。一方、Regnase-1 AA変異マウスでは、乾癬様病変軽減効果を反映してこれら遺伝子の増加が抑制されていた。Regnase-1 AA変異マウスにおいては、ケラチノサイトの増殖が抑制されたことが示唆された。

[0289] 実施例 4. 抗糸球体基底膜抗体誘発腎炎モデルにおけるRegnase-1 AA変異マウスの病態軽減効果

抗糸球体基底膜抗体にて誘発する腎炎を、野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスに誘導した。マウスにヒツジ由来IgG抗体をアジュバントと混ぜて免疫し、次いで、ラット糸球体をヒツジに免疫して得たヒツジ抗血清 (腎毒性血清) を1日1回、4日間連続投与した。腎毒性血清投与後2週の時点において採血を実施し、腎障害の指標である血清クレアチニン、尿素窒素、シスタチンCを測定した。また、同様に2週の時点において蓄尿による採尿を実施し、尿中総蛋白値、尿中クレアチニン値を測定した。血清パラメータ、尿

中パラメータの測定はTBA-120-FR（東芝メディカルシステムズ(株)社製）を使用して実施した。各図における略号は以下を用いた：病態非誘導野生型マウス(WTNC)；病態非誘導Regnase-1 AA変異マウス(AANC)；病態誘導野生型マウス(WTDC)；病態誘導Regnase-1 AA変異マウス(AADC)。

[0290] 結果として、糸球体障害の指標である血清クレアチニン値および尿総蛋白対尿クレアチニン比は、病態誘導野生型マウス（WTDC）に比べて病態誘導Regnase-1 AA変異マウス（AADC）において低値を示した（図7A）。Regnase-1 AA変異マウスは、腎障害に対する保護作用を持つことが示唆された。

[0291] （ハイドロキシプロリンの定量）

腎毒性血清投与後2週後にマウスを安楽死処置し、腎臓を採取した。採取した腎臓を凍結乾燥後、重量を測定した。6規定塩酸を加えて95℃にて一晩加水分解処理し、質量分析法により、腎臓重量当たりのハイドロキシプロリン(Hyp)量を測定した。

[0292] 結果として、組織線維化の指標であるハイドロキシプロリン量は、病態誘導野生型マウス（WTDC）に比べて病態誘導Regnase-1 AA変異マウス（AADC）において低値を示した（図7B）。Regnase-1 AA変異マウスは、腎線維化に対する保護作用を有することが示唆された。

[0293] （各種遺伝子発現の定量）

腎毒性血清投与後2週後にマウスを安楽死処置し、腎臓を採取した。採取した腎臓をQIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, No.79306)及び RNeasy 96 kit (QIAGEN, No.74182)を用い、常法に従ってRNAを抽出した。逆転写にて相補的DNAを得たのち、Taqman PCR法により以下の目的遺伝子の発現を測定した。Taqman PCRはQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN, No.204445)を用い、Light Cycler 480 II (Roche社製)にて解析を実施した。使用したTaqmanプローブを下記に示した。

Gapdh (Applied biosystems社製、 Mm99999915_g1)：内在性コントロール

Col1a1 (Applied biosystems社製、 Mm00801666_g1)：臓器線維化指標

Acta2 (Applied biosystems社製、 Mm00725412_s1)：臓器線維化指標

Ctgf (Applied biosystems社製、Mm01192933_g1) : 臓器線維化指標

Ddr1 (Applied biosystems社製、Mm01273496_m1) : 臓器線維化指標

Pdgfb (Applied biosystems社製、Mm00440677_m1) : 臓器線維化指標

[0294] 結果として、組織線維化の指標であるCol1a1 遺伝子量およびActa2遺伝子量は、病態誘導野生型マウス (WTDC) に比べて病態誘導Regnase-1 AA変異マウス (AADC) において低値を示した (図8A)。Regnase-1 AA変異マウスは、腎線維化に対する保護作用を持つことが示唆された。

[0295] また、野生型マウスでは、Regnase-1の標的である遺伝子 (Ctgf, Ddr1, Pdgfb) (図19-1~図19-5参照) が病態惹起に伴い増加した。一方、Regnase-1 AA変異マウスでは、これら遺伝子の増加が抑制されていた (図8B)。Regnase-1 AA変異マウスにおいては、線維化関連因子の発現抑制を介して、線維化の抑制作用があることが示唆された。

[0296] (血中の各種血球数の変化)

腎毒性血清投与後2週後のマウスから得た血液を用いて、XT-2000iV (シスメックス株式会社製) により血球数を測定した。野生型マウスでは、病態誘導に伴い、単位血液容積あたりの白血球数、好中球数、単球数が増加したが、Regnase-1 AA変異マウス (AADC) では、病態に伴う血中の好中球数並びに単球数の増加を抑制した (図8C)。Regnase-1 AA変異マウスは腎炎発症に伴う炎症性細胞の増加を抑制する可能性が示唆された。

[0297] (病理学的検査)

抗糸球体基底膜抗体投与開始後2週に、野生型マウスあるいはRegnase-1 AA変異マウスを深麻酔下で放血により安楽殺後に剖検した。腎臓及び肺を採材し、4%パラフォルムアルデヒド液にて浸漬固定し、常法によりパラフィン包埋し、約3マイクロメートルにて薄切し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色標本作製した。腎臓及び肺のHE染色標本を光学顕微鏡下で病理組織学的に観察した。また、腎臓については標本上の全糸球体の病変について、半月体、硬化、半月体及び硬化の和、並びに全糸球体病変についてそれぞれ計数し、その割合を算出した。

[0298] その結果、腎臓においては、野生型マウス（WT）では半月体形成及び糸球体硬化といった半月体形成性糸球体腎炎の各種病変が顕著にみられた（図9A、9B）。一方、Regnase-1 AA変異マウス（AA）では、野生型マウスよりもそれら糸球体腎炎の病変の軽減がみられた。肺においては、野生型マウスでは肺胞あるいは脈管周囲間質における炎症性細胞浸潤あるいは肉芽腫が顕著にみられた（図9C、表3）。一方、Regnase-1 AA変異型マウスでは、野生型マウスよりもそれら肺病変の軽減がみられた。

[0299]

[表3]

所見	WT										AA																									
	#1	#2	#3	#4	#9	#10	#11	#12	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#22	#23	#24	#25	#26	#27	#28	#29	#30	#31	#32	#33	#34	#35	#36						
脈管周囲間質における炎症細胞浸潤	-	+	+	±	±	++	±	+	+	+	±	±	+	+	±	±	±	-	±	±	±	-	±	+	±	±	±	±	±	±	±					
単核球系細胞		+	±	±	±	++	±	+	±	+	±	±	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±	±	±	±	±					
好中球		±	-	-	++	-	-	±	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-					
脈管周囲間質における出血／水腫	-	+	±	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
肺胞における炎症性細胞浸潤／肉芽腫	-	+	±	-	++	+	++	+	+	+	-	+	+	±	+	±	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	±	-	-	±	±					
単核球系細胞		+	±		++	+	++	+	+	+	+	+	+	±	+	±							±	±		±				±	±					
好中球		-	-	-	+		+	±	±	±	±	±	±	±	±	±						±	-							-	-					
肺胞上皮の腫大	-	+	±	±	++	-	+	+	±	±	-	±	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-	+	±	±	±	±	-	±	±	±					
肺胞毛細血管における好中球増加	±	+	±	±	+	-	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
血管内皮の腫大	-	-	-	-	+	-	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
#動物番号																																				
病変の程度：±、軽微；+、軽度；++、中等度；+++、重度；-、著変なし																																				

#動物番号

病変の程度: ±、軽微; +、軽度; ++、中等度; +++、重度; -:、著変なし

[0300] 実施例 5. ブレオマイシン誘発強皮症モデルにおけるRegnase-1 AA変異マウスの病態軽減効果

ブレオマイシン誘発強皮症モデルを野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異

マウスに誘導した。ブレオマイシンを皮下埋め込みポンプにて投与し、4週後に安楽死処置して投与部皮膚及び肺を採材した。各図における略号は以下を用いた：病態非誘導野生型マウス(WTNC)；病態非誘導Regnase-1 AA変異マウス(AANC)；病態誘導野生型マウス(WTDC)；病態誘導Regnase-1 AA変異マウス(AADC)。

[0301] (皮膚のヒドロキシプロリンの定量)

採取した皮膚を凍結乾燥後、重量を測定した。6規定塩酸を加えて加水分解処理し、質量分析法により、皮膚重量当たりのヒドロキシプロリン量を測定した。

[0302] 結果として、病態誘導に伴い、組織線維化の指標であるヒドロキシプロリン量は、病態誘導野生型マウス(WTDC)に比べて病態誘導Regnase-1 AA変異マウス(AADC)において低値を示した。(図10A)。Regnase-1 AA変異マウスは、皮膚線維化に対する保護作用を持つことが示唆された。

[0303] (肺の各種遺伝子発現の定量)

ブレオマイシン投与開始4週後にマウスを安楽死処置し、肺を採取した。採取した肺をQIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, No.79306)及びRNeasy 96 kit (QIAGEN, No.74182)を用い、常法に従ってRNAを抽出した。逆転写にて相補的DNAを得たのち、Taqman PCR法により以下の目的遺伝子の発現を測定した。Taqman PCRはQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN, No.204445)を用い、LightCycler 480 II (Roche社製)にて解析を実施した。使用したTaqmanプローブを下記に示した。

Gapdh (Applied biosystems社製、Mm99999915_g1)：内在性コントロール

Col1a1 (Applied biosystems社製、Mm00801666_g1)：臓器線維化指標

[0304] 結果、野生型マウスでは、線維化指標であるCol1a1遺伝子が病態惹起に伴い増加した。一方、Regnase-1 AA変異マウスでは、遺伝子の増加が抑制されていた(図10C)。Regnase-1 AA変異マウスにおいては、線維化の抑制作用があることが示唆された。

[0305] (肺の病理学的検査)

ブレオマイシン投与開始後4週に、野生型マウスあるいはRegnase-1 AA変異マウスを深麻酔下で放血により安楽殺後に剖検した。肺を採材し、4%パラホルムアルデヒド液にて浸漬固定し、常法によりパラフィン包埋し、約3マイクロメーターにて薄切し、ヘマトキシリン-エオジン（HE）染色標本を作製した。肺のHE染色標本を光学顕微鏡下で病理組織学的に観察した。

[0306] その結果、野生型マウスでは、肺胞上皮の変性・壊死、肺胞／間質における炎症性細胞浸潤（好中球、単核球系細胞／泡沫細胞）、肺胞における好酸性物質／浸出物、気管支肺胞上皮過形成、肺胞／間質の線維化、脈管・気管支周囲間質における水腫／リンパ管拡張が顕著にみられた（図10B、表4）。一方、Regnase-1 AA変異マウスでは、野生型マウスよりもそれら肺傷害病変のうち、特に炎症性細胞浸潤、気管支肺胞上皮過形成、肺胞／間質の線維化、脈管・気管支周囲間質の水腫／リンパ管拡張の軽減がみられた。

[0307]

[表4]

所見	AA													
	WT							AA						
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14
肺胞上皮の変性・壊死	++	++	++	++	++	+++	++	++	+	++	++	++	++	++
肺胞／間質における炎症性胞浸潤	±	±	+	±	+	++	+++	±	±	+	±	±	-	±
好中球	+	+	++	+	++	++	++	+	+	+	+	++	+	+
単核球系細胞／泡沫細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
肺胞における好酸性物質／浸出物	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
気管支肺胞上皮過形成	+	+	+	+	±	++	++	+	±	-	+	±	-	-
肺胞／間質の線維化	++	+	++	+	++	++	++	+	+	+	+	++	+	+
脈管・気管支周囲間質における水腫／リンパ管拡張	+	±	+	+	+	++	+++	+	+	±	+	+	±	++
#動物番号														

病変の程度: ±、軽微; +、軽度; ++、中等度; +++、重度; -, 著変なし

[0308] 実施例 6. 実験的自己免疫性ぶどう膜炎モデルにおけるRegnase-1 AA変異マウスの病態軽減効果

完全フロイントアジュバントとIRBP（光受容体間レチノイド結合タンパク

質) ペプチドを混合し、C57BL/6マウス(野生型マウス)またはRegnase-1 AA変異マウスに皮内免疫した。非病態対照群に割り付けられたマウスには、ペプチドを加えずに溶媒と完全フロイントアジュバント混合物を投与した。ペプチドは一個体あたり140 nmolまたは280 nmolを投与した。用いたペプチドの配列を以下に示す。

IRBPペプチド: LAQGAYRTAVDLESLASQLT (配列番号: 19)

[0309] 免疫後、週3回程度眼底検査を行い、炎症および網膜構造障害の程度をスコア化した。スコアリングは文献を参考に実施し、スコアは0~4の5段階で評価した(Exp Eye Res 87(4), 319-326 (2008))。結果を図11-1のA、Bおよび図11-2のC、Dに示す。

[0310] 結果として、野生型マウスでは病態誘導によって炎症スコアおよび構造障害スコアの増加が認められたが、Regnase-1 AA変異マウスにおいては炎症スコアおよび構造障害スコアの増加がほとんど見られなかった。Regnase-1 AA変異マウスは眼炎症および網膜構造障害に対する保護作用を持つことが示唆された。

[0311] 実施例7. 実験的自己免疫性ぶどう膜炎T細胞移入モデルにおけるRegnase-1 AA変異マウスの病態軽減効果

実施例6と同様に完全フロイントアジュバントとIRBP(光受容体間レチノイド結合タンパク質)ペプチドを混合し、C57BL/6マウス(野生型マウス)に皮内免疫した。

免疫後12日目にマウスを安楽死処置し、脾臓を採取した。脾臓細胞を溶血処理した後、IRBPペプチド5 μ M、ODN1826(Invitrogen, tlrl-1826) 0.3 μ g/mlを含有するRPMI-1640培地中で2日間培養した。Pan T Cell Isolation Kit II, mouse (Miltenyi, 130-095-130)を用いて細胞を単離し、1匹当たり 1×10^6 個の細胞を腹腔内投与にて、野生型マウスおよびRegnase-1 AA変異マウスに移入した。

移入後、11日目から18日目まで両眼の眼底検査を行い、炎症の程度をスコア化した。スコアは0~4の5段階で評価した。

移入後18日目に動物を深麻酔下で放血により安楽殺後に剖検した。眼球を採材し、グルタルアルデヒド溶液あるいは4%パラフォルムアルデヒド溶液にて浸漬固定し、常法あるいはAMeX法によりパラフィン包埋し、約3マイクロメートルにて薄切し、ヘマトキシリンエオジン（HE）染色標本を作製した。眼球のHE染色標本を光学顕微鏡下で病理組織学的に観察した。網膜の構造変化について、各部位を以下の基準でスコア化し、その和を算出した。杆体外節：スコア1、細胞浸潤；スコア2、部分的な消失；スコア3、中等度な消失；スコア4、ほぼ全体の消失。神経細胞層：スコア1、細胞浸潤；スコア2、部分的な消失；スコア3、中等度な消失；スコア4、ほぼ全体の消失；スコア5、全体の消失。網膜構造：スコア1、10%未満の網膜ひだ；スコア2、10%～50%の網膜ひだ；スコア3、50%より広範の網膜ひだ。

眼底検査の結果として、Regnase-1 AA 変異マウス（AA）では眼における炎症の軽減効果を示した（図36A）。病理組織学的解析の結果として、Regnase-1 AA 変異マウス（AA）では網膜構造障害スコアの軽減がみられた（図36B）。したがってRegnase-1は免疫感作のみならず、感作成立後の病態の進展にも関与する可能性が示唆された。

[0312] 実施例 8

本実施例では、Regnase-1はIL-17受容体シグナル伝達経路においてTBK1およびIKKiによってリン酸化されることが示された。

[0313] 本発明者らは次に、Regnase-1がIL-17Aシグナル伝達成分によってどのように翻訳後修飾されるのかを調査した。野生型およびRegnase-1AA/AA MEFにおけるRegnase-1のイムノブロット解析により、IL-17A処理がRegnase-1リン酸化を誘導することが明らかになり、これはRegnase-1の電気泳動移動度シフトの形態として表された（図12-1A）。野生型MEFにおいて、IL-17A刺激の際にRegnase-1の劇的な消失は起こらなかったが（図12-1A）、Regnase-1リン酸化パターンは、LPSまたはIL-1刺激に際してIRAK1およびIRAK2仲介性リン酸化に伴って見られるものと類似していた（Nat Immunol 12, 1167-1175 (2011)）。IL-17A刺激はNF- κ Bの弱い活性化をもたらした（図12-3I）、これにより、IL

-17Aシグナル伝達経路における弱いIKK活性化がIL-17A刺激の際のRegnase-1の弱い分解をもたらしたことが示された。実際に、Regnase-1 AA変異型タンパク質のリン酸化型は、Regnase-1AA/AA MEFにおいてIL-17A刺激の間に徐々に蓄積していた。

[0314] IL-17Aシグナル伝達経路におけるRegnase-1のリン酸化の原因となるキナーゼを同定するために、本発明者らは、TBK1、IKKi、TBK1/IKKi、Act1、IKK α /IKK β 、またはIRAK1/IRAK2を欠く一連のMEFを調査した。本発明者らは、TBK1とIKKiの両方、または、IL-17シグナル伝達経路に不可欠なアダプタータンパク質であるAct1を欠くMEFにおいてRegnase-1リン酸化が起こらないことを見出した（図12-1B）。TBK1またはIKKiのどちらかを欠くMEFでは、IL-17Aに応答したRegnase-1のリン酸化が見られ、これは、TBK1およびIKKiが互いに独立したRegnase-1キナーゼ活性を有することを示した（図12-1B）。TBK1およびIKKi両方の阻害剤であるBX795を用いたMEFの処理は、IL-17A刺激に際してRegnase-1リン酸化を阻害した（図12-1C）。TBK1およびIKKiがRegnase-1を直接リン酸化するかどうかを調査するため、本発明者らは、FLAGタグ付Regnase-1を安定に発現するMEF細胞株から精製した組換えRegnase-1を調製した。in vitro条件下での組換えTBK1および/またはIKKiによる組換えRegnase-1のリン酸化は、イムノブロッティングおよび³²Pオートラジオグラフィーによる電気泳動移動度シフトパターンとして検出された（図12-2D）。これらの結果により、TBK1およびIKKiのどちらも、IL-17Aに応答したRegnase-1リン酸化の原因となることが確認された。IRAKによるRegnase-1のリン酸化パターンはTBK1およびIKKiによるものと類似しているように見えたが、IRAK1/IRAK2二重欠損MEFにおいてRegnase-1リン酸化が起こった（図12-2E）。対照的に、IL-1 β に応答したRegnase-1リン酸化はTBK1/IKKi二重欠損MEFで起こった（図12-3J）。これらの結果から、TBK1およびIKKiはIRAK非依存的な様式でRegnase-1をリン酸化し、IRAKはTBK1およびIKKi非依存的にRegnase-1をリン酸化することが示唆される。

[0315] 実施例 9

本実施例では、Act1はRegnase-1と相互作用することによってTBK1/IKKiによるTBK1/IKKi仲介性のRegnase-1リン酸化に寄与することが示された。

[0316] 本発明者らは、Regnase-1がAct1、TBK1、およびIKKiと相互作用するかどうかを調べた。全長またはN末端もしくはC末端切断型のRegnase-1とAct1の共免疫沈降によって、Regnase-1はそのC末端ドメインを介してAct1と結合することが明らかになった（図12-2F）。本発明者らは次に、HEK293細胞内でAct1、TBK1、またはIKKiとRegnase-1を共発現させた。Regnase-1のリン酸化バンドシフトは、Act1と共発現させた場合に見られたがTBK1またはIKKiとの共発現では見られず、Act-1およびTBK1とまたはAct-1およびIKKiと共発現させた場合に、リン酸化Regnase-1のより強いバンドが検出された（図12-2G）。対照的に、リン酸化Regnase-1の量は、SEFIRドメインを含むC末端部を欠いたAct-1変異型（Act1 Δ SEFIR）およびTBK1とまたはAct1 Δ SEFIRおよびIKKiと共発現させた場合（図12-2H）には低下し、これは、TBK1またはIKKiによるRegnase-1リン酸化がRegnase-1のC末端ドメインとAct1の間の相互作用を必要とすることを示唆した。共免疫沈降解析によって、Regnase-1がTBK1、IKKi、およびAct-1 SEFIRドメインと相互作用することと、Act1がTBK1、IKKi、およびRegnase-1と相互作用することが示された（図12-2Gおよび図12-2H）。これらの結果から、Act1のC末端ドメインを介したRegnase-1への結合によって、TBK1およびIKKiに対するRegnase-1の到達性の向上とTBK1またはIKKiによるRegnase-1およびAct1の同時リン酸化とがもたらされたことが示される。

[0317] 実施例 10

本実施例では、プロリンに富む領域内の残基のリン酸化は、オリゴマー化したRegnase-1を解離させることが示された。

[0318] 本発明者らは、TBK1およびIKKiによりリン酸化されたRegnase-1アミノ酸残基の同定を試みた。Act1とTBK1またはIKKiとの共発現によってリン酸化Regnase-1（マウス由来）を調製した。精製済みのリン酸化Regnase-1をプロテアーゼで消化し、高分解能液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS）を用いて解析した。重要なリン酸化部位として5つのRegnase-1残基（Ser439、Ser494

、Thr505、Ser508、およびSer513)を同定した(図13-1A、表5)。5残基のうち1つ(Ser439)は、IKKのリン酸化標的に対応していた。残りの4残基(Ser494、Thr505、Ser508、およびSer513)はRegnase-1のプロリンに富む領域内に局在し、リン酸化に関するいかなるコンセンサス配列も含んでいなかった。本発明者らは、IL-17受容体(IL-17R)シグナル伝達経路におけるRegnase-1のリン酸化に対して、これらの残基が寄与しているのかを調べた。Ser494およびSer513のアラニンによる置換は、HeLa細胞においてIL-1 β またはIL-17Aによって刺激した場合のリン酸化Regnase-1の消失をもたらした(図13-1B)、これは、これらの残基がリン酸化Regnase-1における電気泳動移動度の変化を引き起こした中心的な残基であることと、これらがIRAKおよびTBK1/IKKiに共通するリン酸化部位であることを示した。

[0319] [表5]

HEK293 細胞における 共発現ベクター	Regnase-1 のみ (対照)	Regnase-1 + ACT-1 + TBK1	Regnase-1 + ACT-1 + IKKi
対照においてのみ 同定された リン酸化部位	Ser18, Ser68, Thr195, Ser299, Ser408, Thr522, Thr555		
共通して 同定された リン酸化部位	Ser103, Ser114, Ser344, Thr348, Ser354, Ser359, Ser368, Ser374, Ser394, Ser454, Ser482,	Ser103, Ser114, Ser344, Thr348, Ser359, Ser368, Ser374, Ser394, Ser454, Ser482	Ser103, Ser114, Ser344, Thr348, Ser368, Ser394, Ser454
TBK1 と IKKi の両方に おいて同定された リン酸化部位		Ser28, Ser124, Thr115, Ser288, Ser494, Ser508, Ser513,	
TBK1 においてのみ 同定された リン酸化部位		Thr109, Ser404, Ser454, Ser470, Ser482, Thr498, Thr505, Ser592,	
IKKi においてのみ 同定された リン酸化部位			Ser21, Ser268, Ser386, Ser439, Ser474

[0320] 本発明者らは次に、このプロリンに富む領域内におけるRegnase-1リン酸化の役割を調査した。プロリンに富む領域はRegnase-1のオリゴマー化に関与すると報告されており、この領域を欠くRegnase-1切断変異型はそのRNase活性を失っている (Mol Cell 44, 424-436 (2011) ; Nucleic Acids Res 41, 3314-3326 (2013))。これらの知見から、プロリンに富むセグメントのリン酸化がRegnase-1の自己集合を調節している可能性が浮上した。本発明者らは、プロリンに富む領域およびC末端ドメインを含むGSTタグ付Regnase-1断片の作製および精製を行った。また本発明者らは、リン酸化を模倣するために、プロリンに富む領域におけるSerおよびThr残基をグルタミン酸で置換した変異断片も構築した。Regnase-1断片 (野生型、S494E/S513E、およびS494E/T505E/S508E/S513E) のオリゴマー化は、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて解析した。野生型の断片は高分子量のオリゴマーをいくつか形成したが、変異型ではオリゴマー化が阻害された (図13-2C) 。これにより、プロリンに富む領域へのホスホセリンおよびホスホトレオニン残基の導入はオリゴマー化Regnase-1の解離を促進することが示される。リン酸化Regnase-1の分子集合を調査するため、本発明者らは、N末端FLAGタグ付Regnase-1を安定的に発現するMEFから精製されたRegnase-1の未変性PAGE解析を使用した。この実験により、IL-1 β またはIL-17A刺激はRegnase-1モノマーの出現を誘発することが実証された (図13-3D) 。また、組換えTBK1およびIKKiによるRegnase-1のin vitroリン酸化も、モノマー形態への転換を誘導した (図13-3E) 。これらの結果は、Regnase-1のプロリンに富む領域におけるリン酸化が、Regnase-1の自己集合に必要な相互作用に影響を与え、かつオリゴマー化形態からモノマー形態への転換を促進するという見解を支持するものである。

[0321] 実施例 1.1

本実施例では、Regnase-1リン酸化は、それ自体の細胞内局在をERからサイトゾルへと変化させることが示された。

[0322] Regnase-1タンパク質は、粗面ER膜画分に見られる (Cell 161, 1058-1073 (2015)) 。本発明者らは、IL-1 β またはIL-17Aで刺激されたMEFの細胞ホモジ

ネットから、ER膜、ミクロソーム、および可溶性細胞質画分などの細胞内区画を単離し、ウエスタンブロッティングを用いてそれらのタンパク質分布を解析した。全てのリン酸化Regnase-1タンパク質は細胞質内に存在していたが（図14-1A）、一方で非リン酸化Regnase-1は依然リボソーム含有オルガネラに局在した（図14-1A）。Regnase-1タンパク質のこのサイトゾル分布は、Regnase-1がリン酸化されていないTNF- α 刺激MEFまたはIL-17A刺激Act-1欠損MEFでは観察されず（図14-1B）、これにより、Regnase-1リン酸化およびその後のRegnase-1オリゴマーの解離は、ERから細胞質へのRegnase-1の移行を引き起こしたことが示された。興味深いことに、IL-17A刺激後、ER画分内の非リン酸化Regnase-1の量は、野生型細胞においてよりもRegnase-1AA/AA MEFにおいて経時的に多くなった（図14-1C）。この知見から、IL-17A刺激の際にERに付着した非リン酸化Regnase-1タンパク質が、Regnase-1を標的とするmRNAレベルの調節を媒介することが示唆される。

[0323] リン酸化Regnase-1の細胞内分布の変化は、Regnase-1がERでAct1およびTBK1/IKKiに結合する可能性も高める。本発明者らは、Regnase-1、Act1、およびTBK1/IKKiの間の相互作用がERで起こるかどうかを、IL-17A刺激細胞または非刺激細胞から単離した細胞内画分の共免疫沈降によって調査した。リン酸化TBK1およびリン酸化IKKiと相互作用したRegnase-1は、ミクロソームでは見られたが、可溶性細胞質画分では見られなかった（図14-2D）。野生型およびAct1欠損MEFから単離した細胞内画分のウエスタンブロット解析によって、Act1は、IL-17Aに応答したERにおけるTBK1およびIKKi両方のリン酸化の原因でありかつRegnase-1のキナーゼ仲介性リン酸化を促進することが明らかになった（図14-2E）。これらの結果から、Act1は、IL-17A刺激後にER膜上でTBK1、IKKi、およびRegnase-1のリン酸化を促進するためのシグナル伝達因子として働いていることが示唆される。

[0324] 実施例 1.2

本実施例では、IL-17仲介性Regnase-1リン酸化がそのRNase活性の喪失をもたらすことが示された。

[0325] 本発明者らは次に、ERからのリン酸化Regnase-1の解離が細胞刺激に際してIL-6 mRNAレベルに影響を与えるのかを調査した。IL-1 β およびTNF- α による刺激の場合とは異なるものの、IL-17AはRegnase-1リン酸化を誘導するにもかかわらず、このサイトカインは、その弱いNF- κ B活性化が理由でIL-6 mRNAを十分に誘導しない。TNF- α は、強いNF- κ B活性化を伴ってIL-6 mRNA発現を誘導するが、Regnase-1リン酸化を誘導することはできない。本発明者らは、TNFで前処理された後にIL-17Aのみで刺激されたMEFにおけるIL-6 mRNAのレベルを測定した。野生型MEFでは、IL-17A刺激の際にIL-6 mRNA誘導が強く増強され、これによってRegnase-1リン酸化が引き起こされた（図15-1A）。Regnase-1 AA変異細胞およびTBK1/IKKi二重欠損細胞ではIL-17A刺激の際にIL-6 mRNA誘導が抑制され、特に、二重欠損MEFでは有意に阻害された（図15-1B）。TBK1/IKKi二重欠損細胞はRegnase-1リン酸化を示さず、IL-17Aに応答しリボソーム含有オルガネラにおける細胞内局在化を維持していた（データは示さず）。

[0326] 本発明者らは、Tet-off誘導システムを用いて、Regnase-1リン酸化がmRNA分解能に与える影響を評価した。Act1およびIKKiと共発現させると、Regnase-1は容易にリン酸化された。Regnase-1またはリン酸化Regnase-1どちらかの存在下のTet-off HEK293細胞においてIL-6 mRNAおよび3' UTRを過剰発現させ、その後、ノーザンブロッティングによりIL-6 mRNAレベルを評価した。Regnase-1によるIL-6 mRNA分解は、Act1およびIKKiとの共発現によって阻止された（図15-2C）。これは、リン酸化Regnase-1がその標的mRNAを分解する能力を欠いていることを強く示す。

[0327] 本発明者らは次に、Regnase-1AA/AA細胞における標的mRNA抑制の機構を調査した。上記のとおり、標的mRNAの抑制は、IL-17A刺激のより遅い段階において、より増強される。本発明者らは、IL-17A刺激が終わった後の回復期にリン酸化および非リン酸化Regnase-1のイムノブロット解析を用いた。非リン酸化Regnase-1タンパク質は野生型MEFにおいては回復期に徐々に現れ、これは、タンパク質合成阻害剤の存在下で観察された（図15-2D）。非リ

ン酸化Regnase-1タンパク質量の上昇は、野生型細胞においてよりもRegnase-1AA/AA MEFにおいて、はるかに強く増強された。対照的に、プロテインホスファターゼ-1および2Aの阻害剤であるオカダ酸の存在下では非リン酸化Regnase-1は現れず（図15-2D）、これは、非リン酸化Regnase-1の出現がホスファターゼに仲介されることを示した。また、Regnase-1AA/AA MEFのTNF- α およびIL-17A処理後の回復期の間に、オカダ酸の存在下でIL-6のmRNA安定性も増強された（図15-2E）。これらの結果は、IL-17A刺激の際にRegnase-1AA/AA細胞で観察されるRegnase-1の標的mRNAの抑制には、リン酸化Regnase-1から非リン酸化型への転換が必要であることを示唆している。

[0328] 実施例 1.3

本実施例では、Regnase-1のC末端切断型変異（Regnase-1 Δ CTD）およびS513A変異（Regnase-1 S513A）は、IL-17仲介性リン酸化を阻害し、*in vitro*および*in vivo*におけるIL-17仲介性炎症応答を消失させることが示された。

[0329] リン酸化Regnase-1は、構成的に活性なオリゴマーから不活性なモノマーへの転換によって、ERから遊離する。この知見は、リン酸化を受けない場合にRegnase-1変異型がRNase機能を維持し続け得る可能性を示唆している。これを調べるため、本発明者らは、MEF中で安定である様々なRegnase-1変異型を発現させ、IL-17仲介性リン酸化に抵抗性のあるRegnase-1変異型を探索した。本発明者らは、Act-1との相互作用に必須であるC末端ドメインを欠くRegnase-1変異型が、IL-17A刺激によってリン酸化されないことを見出した（図16-1A）。本発明者らは次に、Regnase-1のプロリンに富むドメインにフレームシフトおよび未成熟終止コドンを導入することにより、C末端切断型Regnase-1を発現する遺伝学的に変異したマウスを作製することを試みた（図17-1A）。本発明者らは、コドン517における1bpの欠失を有する変異マウスを得ることに成功し、それによってフレームシフト変異を導いた（Regnase-1 Δ CTDと称する、図17-1B）。この変異がタンパク質発現レベルおよび任意の翻訳後修飾に与える影響を調べるため、Regnase-1 Δ CTD/ Δ CTD変異マウス由来のMEFをTNF- α 、IL-17A、およびIL-1 β で刺激した。これらの刺激はRegnase-1 Δ CTDタン

パク質のNF- κ B依存的な増加を誘導し、リン酸化を表す移動度シフトしたバンドはみられなかった（図16-1B）。IL-17A刺激の際のRegnase-1 Δ CTDタンパク質リン酸化の可能性を調査するため、HEK293細胞においてMyc-Act-1、HA-TBK-1、およびHA-IKKiとFLAGタグ付Regnase-1 Δ CTDを共発現させ、共免疫沈降させた。Regnase-1 Δ CTDタンパク質は、野生型と比較して有意に低下したリン酸化を示し（図16-1C）、Act-1とは共免疫沈降しなかった（図16-1D）。これらの結果は、Regnase-1 Δ CTDがRegnase-1リン酸化に不可欠なAct-1への結合を欠いていること、およびIL-17A刺激の際に非リン酸化型のままであることを実証している。

[0330] 本発明者らは、Ser513をアラニンに置換した変異マウスを作製した（図17-1C、図17-1D）。この変異がタンパク質発現レベルおよび任意の翻訳後修飾に与える影響を調べるため、Regnase-1 S513A変異マウス由来のMEFをTNF- α 、IL-17A、およびIL-1 β で刺激した。これらの刺激はRegnase-1 S513Aタンパク質のNF- κ B依存的な増加を誘導し、リン酸化を表す移動度シフトしたバンドはみられなかった（図16-4L）。次に、Regnase-1変異タンパクのタンパク安定性について調べた。Regnase-1 AA変異マウス由来のMEFとRegnase-1 S513A変異マウス由来のMEFを転写抑制剤であるシクロヘキシミドの存在下、TNF- α 、IL-1 β 、LPSおよびIL-17Aで刺激した。その結果、WTのMEFではIL-1 β 、LPSおよびIL-17A刺激後Regnase-1タンパクレベルは顕著に減少するのに対し、Regnase-1 AA変異マウス由来のMEFとRegnase-1 S513A変異マウス由来のMEFではRegnase-1タンパクレベルの減少が認められなかった（図16-4M、図16-5N）。従って、Regnase-1 S513A変異は、IL-17A刺激後に誘導されるリン酸化と分解に耐性を示し、その結果、Regnase-1タンパクの安定性を増強した。

[0331] 本発明者らは次に、リボソーム含有オルガネラにおけるRegnase-1 Δ CTDタンパク質の結合パターンを調査した。本発明者らは、IL-17Aで刺激されたRegnase-1 Δ CTD/ Δ CTD MEFの細胞ホモジネートから細胞質およびミクロソーム画分を単離し、ウエスタンブロット解析によって、Regnase-1、リボソームタンパク質L7a、GAPDH、およびphospho-TBK1のタンパク質分布を解析した。野生

型Regnase-1はIL-17Aによってリン酸化され、細胞質へのその移行に伴いもはやミクロソームには局在していなかったが、Regnase-1 Δ CTD変異型はIL-17A刺激後にミクロソームに結合しつづける。これには、ミクロソームにおけるRegnase-1 Δ CTDタンパク質の増加が付随していた（図16-2E）。Regnase-1は、ポリソーム上で集合した翻訳活性のあるリボソームにも結合し、翻訳用リボソームにおけるmRNAの分解を促進する（Cell 161, 1058-1073 (2015)）。本発明者らは、TNF- α およびIL-17Aで刺激された野生型およびRegnase-1 Δ CTD/ Δ CTD MEFにおける、翻訳活性のあるポリソームへのRegnase-1の結合を確認した（図16-2F）。野生型MEFでは、Regnase-1のポリソームへの局在性はサイトカイン刺激によって低下したが、翻訳活性のあるポリソームにおけるRegnase-1の局在性は、これらのサイトカインで刺激された変異MEFにおいて、刺激されていないものよりも増大していた（図16-2G）。野生型と変異型Regnase-1の間でタンパク質局在化のパターンが反対であることは、炎症刺激の間でさえ標的mRNA発現を低下させることにおけるRegnase-1 Δ CTD変異の役割を意味するものである。これを検証するため、本発明者らは、炎症誘発性サイトカインで刺激された野生型およびRegnase-1 Δ CTD/ Δ CTD MEF、Regnase-1 S513A MEFにおけるRegnase-1ターゲティング遺伝子のmRNA誘導を調べた。野生型MEFにおいて、TNF- α + IL-17Aによる刺激はIL-6、LCN-2、およびGM-CSFなどのRegnase-1標的mRNAの時間依存的な増加を誘導したが、これらは変異MEFでは見られなかった（図16-3H、図17-4E）。変異MEFにおいて、TNF- α およびIL-17Aによる逐次的な刺激は、IL-6、CXCL-1、CXCL-2、CCL-20、LCN-2、およびGM-CSFなどのIL-17関連遺伝子の低下したmRNA産生を誘導した（図17-2C、図17-4F）。さらに、IL-17AとIL-6またはTNF- α のいずれかとで24時間刺激した後のIL-6、CXCL-1、およびCXCL-2のタンパク質産生量は、Regnase-1 Δ CTD/ Δ CTDのMEFにおいて、野生型由来の細胞よりも有意に低かった（図17-3D）。これらは、Regnase-1 Δ CTDタンパク質がIL-17A刺激の後にリボソーム含有オルガネラにおけるその細胞内局在性を維持していること、および、IL-17Aによって仲介されるmRNA安定性の増強とそれに続く炎症性サイトカインの産生と

を阻害する負の調節因子として働くことを示している。

[0332] 本発明者らは、ERからのRegnase-1のIL-17仲介性遊離が損なわれていることがTH17細胞仲介性自己免疫障害の抑制にとって重要であるかどうかを検証するために、Regnase-1 Δ CTD/ Δ CTDマウスにおいてEAEを誘導した。これらのマウスにおいて、EAE重篤度は野生型マウスと比べて強力に弱められた（図16-3I）。免疫化から28日後のマウスのフローサイトメトリー解析は、Regnase-1 Δ CTD/ Δ CTDマウスのニューロン組織へのCD4⁺ T細胞およびマクロファージの浸潤の有意な減少を示した（図16-3JおよびK）。一方、野生型と比べて変異マウスで数が増大した脾臓由来TH1細胞を除いて、脾臓およびリンパ節の細胞におけるTH1およびTH17細胞数は、野生型と変異マウスの間で同等であった（図18）。これらの結果は、Regnase-1 Δ CTD変異もまた、内皮細胞におけるSTAT3活性化の持続的阻害を介してEAE病理発生の抑制を引き起こし、TH17細胞が神経器官に浸潤するために必要であるTH17細胞仲介性炎症を妨害することを示唆している。

[0333] 実施例 1 4. ルシフェラーゼアッセイによるRegnase-1標的遺伝子の探索

（ルシフェラーゼアッセイ）

ホタルルシフェラーゼ（firefly-luciferase）を発現するpGL3-標的遺伝子3' UTRプラスミドまたはコントロールのpGL3-emptyプラスミドと、野生型Regnase-1発現プラスミド、変異型Regnase-1（D141N）発現プラスミドまたはコントロールのemptyプラスミドをHEK293に形質移入した。同時に、ウミシイタケルシフェラーゼ（renilla-luciferase）発現プラスミドを内部コントロールとして形質移入した。培養24時間後、Dual-luciferase reporter assay system（Promega株式会社）を用いて細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。

[0334] （発現プラスミド）

野生型のmouse Regnase-1および141番目のアミノ酸をDからNに置換した変異型mouse Regnase-1（D141N）をpCXND3プラスミド（中外製薬株式会社）に挿入し、野生型Regnase-1発現プラスミドおよび変異型Regnase-1（D141N）発

現プラスミドを調製した。FLAGタグをpCXND3プラスミドに挿入したものをコントロール用のemptyプラスミドとして調製した。

pGL3-標的遺伝子3' UTRプラスミドは、標的遺伝子mRNAの3' UTR配列をpGL3プラスミド (promega株式会社) のXbaI切断部位に挿入して作成した。標的遺伝子はRAW264.7および不死化したmouse keratinocyteを用いたRNA immunoprecipitation assayにより選定した。

[0335] 結果、Fabp5、Ackr3、Ctgf、Adamts1、Atf2、Cd80、Cyr61、Ddr1、Duox1、Dusp6、Csf3、Hbegf、Id3、Il19、Map3k8、Il1a、mcoln3、Mitf、Orc1、Pdgfb、Ptgs1、Sesn1、Ptger4、Shq1、Sulf1、Tnfrsf9、zc3h12c、RarbおよびTmem9 3' UTRを挿入したpGL3プラスミドを形質移入した細胞では、emptyプラスミドを形質移入した場合と比べてRegnase-1の形質移入によりルシフェラーゼ活性が顕著に低下し、用量依存性がみられた (図19-1~図19-5)。一方で、変異型Regnase-1 (D141N) 発現プラスミドを形質移入した場合はルシフェラーゼ活性に大きな変化は見られなかった。これらのことから、上記遺伝子がRegnase-1によって制御される新規標的である可能性が示された。

[0336] 実施例 15. IKK β またはTBK1によるRegnase-1のリン酸化の検出

(ヒトRegnase-1の調製)

標的タンパク質として、ヒトRegnase-1 (UniProt ID: Q5D1E8) (配列番号: 2) の全長配列を利用し、N末端側にGSTタグ、C末端側にビオチンリガーゼBirAの認識配列を持つコンストラクトとした。上記Regnase-1は哺乳細胞Expi293で発現、グルタチオンセファロースで精製し、Turbo3C protease (Accelagen) によりGSTタグを切断後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより単離した。必要に応じて、Regnase-1 1 μ gに対してlambda phosphatase (SIGMA, P9614) を7unit添加し、4°Cで2時間インキュベートすることで脱リン酸化を実施後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより単離した。

[0337] (リン酸化反応)

2mM DTT、100 μ Mバナジウム酸ナトリウム、2 mM塩化マンガンを追加したKinase assay buffer III (SignalChem社製) を用いて、20 μ MのATP存在下で

キナーゼ（IKK β （SignalChem社製）またはTBK1（SignalChem社製））と前記で調製したビオチン化ヒトRegnase-1を室温で1時間反応させることによりリン酸化反応を行った。

[0338] （リン酸化ヒトRegnase-1の検出）

リン酸化ヒトRegnase-1の検出は、上記抗体を用いたウエスタンブロッティングにより行った。ウエスタンブロッティングは、SDS-PAGEゲル中のタンパク質をPVDFメンブレン（Bio-Rad社製）に転写することにより行った。一次抗体として前記抗Regnase-1抗体、または抗リン酸化Regnase-1抗体を、二次抗体としてAnti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked antibody（Cell Signaling Technology社製）を用いた。ペルオキシダーゼ反応は、Super signal Westpura Extended Duration Substrate（Thermo社製）により行い、化学発光をImageQuant LAS 4000 mini（GE Healthcare社製）により検出した。その結果、抗リン酸化Regnase-1抗体はキナーゼによるリン酸化反応によって生成されたリン酸化ヒトRegnase-1を、抗Regnase-1抗体はヒトRegnase-1を、それぞれ特異的に検出した（図20）。

[0339] 実施例15の結果から、ヒトRegnase-1がIKK β およびTBK1によってリン酸化を受けることが確認された。また、ヒトRegnase-1における前記リン酸化部位は、マウスRegnase-1におけるリン酸化部位に相当する部位であると考えられた。これら実施例の手法を用いることにより、Regnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定することが可能である。

[0340] 特定の理論に拘束されることを意図しないが、本発明者らは本研究の結果から、以下（1）～（5）のように考察する。

[0341] （1）Regnase-1は、MyD88依存的経路を活性化するIL-1またはLPSに応答して二段階リン酸化を受ける。最初のリン酸化はタンパク質キナーゼのIRAKファミリーが仲介し、次にIKK仲介性リン酸化が起こり、これによって、プロテアーゼ依存的分解がもたらされる。IKK依存的分解によって低下したRegnase-1タンパク質レベルは、mRNA発現の「ブレーキ」としてのその機能を減衰させるようであり、これが、Regnase-1の標的mRNAの発現を誘導する。しかしなが

ら、本発明者らの本結果において、Regnase-1のIKK非依存的リン酸化がRNase活性の停止に寄与していることが実証された。Regnase-1はリボソーム含有オルガネラにおいてオリゴマー形態で存在しているが、細胞刺激によって引き起こされるリン酸化は、Regnase-1の自己集合を妨害して、ERおよび翻訳活性のあるポリソームから遊離させる。本発明者らの実験において、Regnase-1のリン酸化は分解よりも長い期間にわたって維持され、サイトカインまたはTLRリガンドによる刺激に応答した、Regnase-1の標的mRNAの安定化に寄与した。

[0342] (2) 本発明者らは、IKKによってリン酸化される2つのセリン残基をアラニン残基に変異させたRegnase-1 AA変異型を導入した。IL-17A刺激は、野生型MEFとRegnase-1 AA変異型MEFの両方において、Regnase-1の迅速なリン酸化を誘導した。Regnase-1 AA変異細胞の場合に、IL-17A刺激の後期における非リン酸化Regnase-1の出現を認めた。これは、Regnase-1タンパク質によって調節される一連のmRNAの抑制と、Regnase-1 AA変異マウスで観察されたEAE重篤度の低下の原因である可能性がある。Regnase-1 AA変異細胞における非リン酸化Regnase-1タンパク質のこの蓄積は、タンパク質合成阻害剤の存在下であっても起こったため、リン酸化Regnase-1が非リン酸化型に転換されていることが示唆された。本発明者らは、非リン酸化Regnase-1タンパク質の出現はホスファターゼによる脱リン酸化に起因する可能性があると推測した。Regnase-1 AA変異型細胞をホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸で処理することによってこの推論を確認し、それにより、IL-6 mRNAの半減期の劇的な延長がもたらされた。Regnase-1の脱リン酸化は、ERへの付着を介してmRNA分解活性の回復をもたらす。したがって、Regnase-1は、可逆的な脱リン酸化およびERへの迅速な再配置を介した弱い刺激に応答してその標的mRNAの発現を阻害する可能性がある。

[0343] (3) 本発明者らはまた、Act1との相互作用に必要なC末端ドメインを欠くRegnase-1タンパク質を発現したRegnase-1 Δ CTD変異マウスも作製した。TH17細胞仲介性炎症が非造血細胞において弱められているために、これらのマウスも、Regnase-1 AA変異マウスと同様、野生型と比較して低下したEAE重篤度

を示した。その一方、Regnase-1欠損ヘテロ接合体は、非造血細胞の炎症増加が理由でEAEに対する感受性がより高いことが、以前の報告により示されており (Immunity, 2015 Sep 15; 43(3): 475-487)、これは、EAEの病理発生の際の非造血細胞での炎症の抑制におけるRegnase-1の重要な役割を立証するものである。しかしながら、Regnase-1 Δ CTD/ Δ CTDマウスにおけるEAE病理発生の阻害の機構は、Regnase-1AA/AAマウスにおけるそれとは異なっている可能性がある。IKK仲介性リン酸化によって誘発されるその分解の欠如のために、Regnase-1 AA変異タンパク質は野生型よりも豊富であり、これはEAEにおける有益な効果を有する。Regnase-1 Δ CTD変異型は、定常状態ではより低いレベルのタンパク質発現を示し、いくつかの炎症性サイトカインで刺激されると発現の増大を示して、ERへの非リン酸化Regnase-1の蓄積を促進し、標的mRNA分解を加速させた。Regnase-1 mRNAは3' UTRにそれ自体の結合部位を含んでいるので、定常状態にある低いレベルのRegnase-1 Δ CTDは、それ自体のmRNAの自己調節から生じている可能性がある。これは、タンパク質分解を導くシグナルを伝達する際だけでなく、非リン酸化/活性タンパク質の細胞内蓄積を回避するために標的mRNAの分解活性を弱める際における、Regnase-1のリン酸化の調節的役割に関する重要な洞察を提供するものである。

[0344] (4) IL-17は、IL-17シグナル伝達経路において必須のアダプタータンパク質であるAct1とIL-17受容体 (IL-17R) との相互作用を介して、細胞質内にシグナルをもたらす。本発明者らは、ERにおけるRegnase-1と、Act1、TBK1、およびIKKiとの間の会合を同定した。Regnase-1はC末端ドメインを介してAct1と会合する。Regnase-1に対するAct1の結合は、TBK1およびIKKiによるRegnase-1リン酸化を強く促進し、これは、ERから細胞質へのRegnase-1の移行を強化して、そのmRNA分解能を遮断する。これらの知見は、Regnase-1リン酸化が、IL-17R会合後に起こるAct1活性化と直接的に相関していること、および、Regnase-1が、IL-17誘導性mRNA発現の調節に関与することを示唆している。実際に、IL-17に応答してアップレギュレートされる遺伝子の一群、例えばIL-6、IL-8、CXCL1、およびCXCL2は、Regnase-1の標的mRNAに対応している。

[0345] (5) Regnase-1は、定常状態において特定のmRNAを不安定化させかつIL-17で刺激されると急速に不活性化されるRNA結合RNaseであり、IL-17応答に際して特定のmRNAを安定化させる。本発明者らが本明細書において示した研究において、IL-17誘導性のRegnase-1のリン酸化は、Regnase-1 Δ CTD変異体において激しく損なわれていた。TNF- α およびIL-17の同時刺激は、Regnase-1 Δ CTD変異細胞におけるIL-6、CXCL1、CXCL2、CCL-20、Lipocalin-2、およびGM-CSF産生を、TBK1/IKKi ダブルノックアウト細胞と同程度まで劇的に低下させた。これらの結果は、Regnase-1、Act1、およびTBK1/IKKiの間の相互作用が、IL-17刺激によって誘導されるこれらの炎症性遺伝子の発現を左右していること、ならびに、Regnase-1が、IL-17に応答した炎症性応答を調節するのに中心的役割を果たしていることを、強く示唆する。Regnase-1リン酸化の遮断は、TH17細胞関連疾患の治療のための新たな戦略を提供し得る。

[0346] 実施例 1 6. Regnase-1の513位のリン酸化によるIL-6産生への影響

IL-6 mRNAレベルが、刺激に際してRegnase-1リン酸化およびERからのその解離によって制御されていることを確認するため、TBK1/IKKiによるリン酸化に抵抗性のあるマウスRegnase-1変異型を作製した。Regnase-1変異型を発現する2つのMEF細胞株を樹立した：一方はAlaによるSer513の置換を含み（Regnase-1 S513A）、他方はC末端ドメインを欠いていた（Regnase-1 Δ CTD）。どちらの変異型もRegnase-1リン酸化を示さず、IL-1 β またはIL-17Aに応答しERにおける細胞内局在化を維持していた（図21A）。TNF- α とIL-17Aを用いた同時刺激の際のIL-6 mRNA産生は、野生型細胞と比べて、これらの変異MEFで有意に低下していた（図21B）。このことから、Regnase-1の513位のリン酸化を阻害することで、IL-6の産生が強く抑制されることが示された。

[0347] 実施例 1 7. イミキモド誘発乾癬モデルにおけるRegnase-1 S513A変異マウスの病態軽減効果

C57BL/6マウス（野生型マウス;WT）またはRegnase-1 S513A変異マウス(S513A)の右耳介並びに除毛した頸背部皮膚に62.5 mgのイミキモドクリーム（ベセルナクリーム5%；持田製薬（株））をDay0, 2, 4に隔日塗布した。耳介の

病変の評価は、右耳介の厚さをデジタルシックネスゲージ（尾崎製作所）を用いて、イミキモド塗布前から継続的に測定することにより行った。また、頸背部皮膚の評価は、紅斑、肥厚、鱗屑の程度を4段階でそれぞれ肉眼的に評価し、それらを合わせたトータルスコア（12点）で示した。

その結果、野生型マウスでは、イミキモド塗布に伴い、顕著な耳介の肥厚が認められた（図22A）。また、イミキモドを塗布した頸背部皮膚においては、紅斑および肥厚、鱗屑といった乾癬様の皮膚病変が誘導された（図22B）。一方、Regnase-1 S513A変異マウスでは、野生型マウスに比べて、耳介の肥厚並びに頸背部の乾癬様皮膚病変（紅斑、肥厚、鱗屑）が軽減した（図22A、22B）。

[0348] S513Aマウス評価（各種遺伝子発現の定量）

マウスを安楽死処置して塗布部位の耳介を採取した。QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, No.79306)及び RNeasy 96 kit (QIAGEN, No.74182)を用い、常法に従ってRNAを抽出した。逆転写にて相補的DNAを得た後、Taqman PCR法により以下の目的遺伝子の発現を測定した。Taqman PCRはQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN, No.204445)を用い、LightCycler 480 II (Roche社製)にて解析を実施した。使用したTaqmanプローブを下記に示した。

B2m (Applied biosystems社製、Mm00437762_m1)：内在性コントロール

Il6 (Applied biosystems社製、Mm00446190_m1)：炎症性サイトカイン

Il1a (Applied biosystems社製、Mm00439620_m1)：炎症性サイトカイン

Cxcl2 (Applied biosystems社製、Mm00436450_m1)：白血球遊走因子

Hbegf (Applied biosystems社製、Mm00439306_m1)：細胞増殖因子

Spr2i (Applied biosystems社製、Mm00726832_s1)：ケラチノサイトマーカ

ー

Keratin 6A (Applied biosystems社製、Mm00833464_g1)：ケラチノサイトマーカ

結果、S513Aマウスでは、ケラチノサイトマーカであるSpr2i遺伝子、Keratin6A遺伝子の、病態惹起に伴う誘導が抑制されていたことから、乾癬モデ

ル病態に特徴的なケラチノサイト増加が抑制されていることが明らかとなった。

また、野生型マウスでは、Regnase-1の標的である遺伝子 (Il6, Il1a, Cxcl2, Hbegf) が病態惹起に伴い増加した (図37)。一方、S513A変異マウスでは、病態惹起に伴い誘導されるこれら遺伝子の増加が抑制されていた。Regnase-1 AA変異マウスにおいては、病態に伴う炎症性サイトカインの産生並びに表皮細胞増殖活性に対し抑制作用があることが示唆された。

[0349] 実施例 18. 実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルにおけるRegnase-1 S513A変異マウスの病態軽減効果

(EAEモデル)

通常のEAEは、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) (35~55) ペプチド (AnaSpec) を用いた免疫化によって誘発した。MOG (35~55) ペプチド (300 ng/マウス) のエマルジョンと完全フロイントアジュバント (CFA, InvivoGen) を比率1:1で混合して、マウスに皮下注射した。0日目および2日目に百日咳毒素(100 ng/マウス)を腹腔内注射した後、マウスを2日毎にモニタリングし、免疫化後7~28日目の間の臨床スコアリングによって評価した。臨床スコアは、以前に規定されたスケールを用いて測定した (Immunity 14, 471-481 (2001))。

(統計学的解析)

特に説明のない限り、2群間の差異の統計学的解析は、スチューデントt検定 (両側) によって行った。P < 0.05を、統計学的有意と見なした。

Regnase-1 S513A変異マウスでは、野生型マウスに比べて、病態に伴う臨床スコアの増加を低減し、病態を軽減した (図38)。

[0350] 実施例 19. 標的結合ポリペプチドの試験管内選択 (パニング)

19-1 ポリペプチドライブラリをコードするランダム化された二本鎖DNAライブラリ

特許文献 (W02013/100132) に記載の手法に準じ、DNAライブラリを構築した。同ライブラリは、ランダム領域のトリプレットが9または10回繰り返

しで出現するように調製した。

[0351] 1 9 - 2 環状ポリペプチドライブラリ

前述の二本鎖DNAライブラリから調製したmRNA-ピューロマイシンリンカーライゲーション産物と無細胞翻訳液を使用し、W02013/100132に記載の方法に準じて、環状ポリペプチドライブラリを翻訳合成した。同ライブラリを構成する環状ポリペプチドのランダム領域には、メチオニンおよびシステインを除いた18種類の天然アミノ酸をランダムに割り当てた。

[0352] 1 9 - 3 パニングの実施

前述の環状ポリペプチドライブラリを使用し、W02013/100132に記載の方法に準じて、パニングを実施した。パニングの際の標的分子としては、ビオチン化したヒトRegnase-1を用いた。パニングを複数ラウンド繰り返し濃縮された配列を、標的分子であるRegnase-1に結合する環状ポリペプチドの配列として同定した。その中のPP1～PP6について、後述する本実施例に示す方法により合成した。さらにPP7～PP25についても、同様に合成を行った。

[0353] 実施例 2 0 . 環状ポリペプチドの合成

実施例中では以下の略号を使用した。

A A	酢酸アンモニウム
D B U	1, 8 - ジアザビシクロ [5. 4. 0] - 7 - ウンデセン
D C M	ジクロロメタン
D C E	1, 2 - ジクロロエタン
D M F	N, N - ジメチルホルムアミド
D M S O	ジメチルスルホキシド
D I C	N, N' - ジイソプロピルカルボジイミド
D I P E A	N, N - ジイソプロピルエチルアミン
F A	ギ酸
M T B E	メチル - tert - ブチルエーテル
N M P	N - メチル - 2 - ピロリドン
T F A	トリフルオロ酢酸

T F E 2, 2, 2-トリフルオロエタノール
 T I P S トリイソプロピルシラン
 H O A t 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール
 H A T U O- (7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル) -
 N, N, N', N' -テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩

[0354] ペプチド合成及び、固相合成に用いる反応溶媒はペプチド合成用（渡辺化学、和光純薬から購入）を用いた。例えばDCM、DMF、NMP、2% DBU in DMF、TFAなどである。また、水を溶媒として加えない反応では、脱水溶媒、超脱水溶媒、無水溶媒（関東化学、和光純薬などから購入）を用いた。

[0355] LC/MSの分析条件は、表6に記載のとおりである。

[表6]

分析条件	装置	カラム (I.D.x長さ)(mm)	移動相	勾配(A/B)	流速 (mL/分)	カラム 温度(℃)	波長
SQDAA05	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)10mM AcONH ₄ .H ₂ O B)MeOH	95/5=> 0/100(1.0分間) 0/100(0.4分間)	1	35	210-400nm PDA total
SQDAA50	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)10mM AcONH ₄ .H ₂ O B)MeOH	50/50=> 0/100(0.7分 間) 0/100(0.7分間)	1	35	210-400nm PDA total
SQDFA05	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)0.1% FA.H ₂ O B)0.1% FA.MeCN	95/5=> 0/100(1.0分間) 0/100(0.4分間)	1	35	210-400nm PDA total
SQDFA50	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)0.1% FA.H ₂ O B)0.1% FA.MeCN	50/50=> 0/100(0.7分 間) 0/100(0.7分間)	1	35	210-400nm PDA total

[0356] ペプチド化合物の化学合成

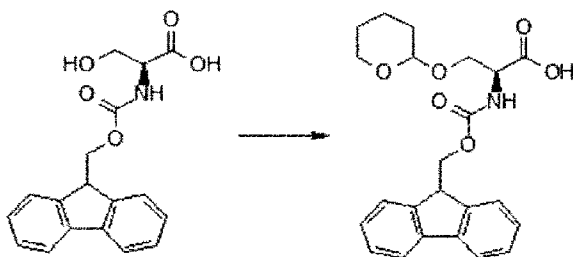
WO2013/100132に記載のFmoc法によるペプチド合成法に従い、下記の基本ルートでペプチドの伸長を行った。すなわち、1) Asp側鎖のカルボン酸を2-クロロトリチルレジンに担持させたものの、AspのN末からのFmoc法によるペプチド伸長反応、2) 2-クロロトリチルレジンからのペプチドの切り出し過程、3) 切り出し過程によって2-クロロトリチルレジンから外れて生じたAsp側鎖のカルボン酸と、ペプチド鎖N末端（三角ユニット）のアミノ基との縮合によるアミド環化、4) ペプチド鎖に含まれる側鎖官能基の保護基の脱保護、5) preparative HPLCによる化合物の精製、の5段階の工程である。本実施例において、特に記述がない限り、この基本ルートをもとにペプチド化合物の合成をおこなった（図23）。

[0357] ペプチド合成機によるペプチド合成に用いるFmoc-アミノ酸

本明細書内に記載するペプチド合成において、ペプチド合成機による合成には、以下のFmoc-アミノ酸を用いた。Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OPis)-OH、Fmoc-D-MeAla-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-MeAla-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Trp-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-β-MeAla-OH (Fmoc-bMeAla-OHと表記する場合もある)、Fmoc-Asp(OMpe)-OH、Fmoc-MePhe-OHなどは東京化成工業、渡辺化学工業、Chempep社、Chem-Implex社、もしくはAmatek社から購入した。

また、Fmoc-Ser(THP)-OH、Fmoc-Thr(THP)-OHは、以下の方法にて合成した。

[0358] (2S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロパン酸 (化合物1、Fmoc-Ser(THP)-OH) の合成



化合物 1

(S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-ヒドロキシプロパン酸 (Fmoc-Ser-OH、渡辺化学より購入、1.0g, 3.06mmol) とp-ト

ルエンスルホン酸ピリジニウム (PPTS、0.038 g, 0.153 mmol) の混合物にトルエン (10 mL) を加えて、減圧下トルエンを留去することで共沸により含まれている水分を除去した。得られた残渣に超脱水テトラヒドロフラン (THF、6.1 mL) と3,4-ジヒドロ-2H-ピラン (1.9 mL, 21.3 mmol) を加え、窒素雰囲気下、50℃にて4時間攪拌した。LCMS (SQDFA05) にて原料の消失を確認後、混合物を25℃まで冷却し、酢酸エチル (6 mL) を加えた。続いて飽和塩化ナトリウム水溶液 (6 mL) を加えて有機層を洗浄し、水層を酢酸エチル (6 mL) で抽出した。得られた全ての有機層を混合し、これをさらに飽和塩化ナトリウム水溶液 (6 mL) にて2度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥し、溶媒を減圧下留去した。

得られた残渣をテトラヒドロフラン (THF、12.2 mL) に溶解させ、次いでpH 8.0に調製した1.0 M リン酸緩衝液 (12.2 mL) を加えた。この混合物を50℃で3時間攪拌した。25℃まで冷却した後、酢酸エチル (12.2 mL) を加え、有機層と水層を分離した。水層に酢酸エチル (12.2 mL) を加えて抽出を行った後、得られた全ての有機層を混合し、飽和塩化ナトリウム水溶液 (12.2 mL) で2度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去し、さらにポンプにて減圧下、25℃で30分乾燥させた。

得られた残渣をジクロロメタン (7 mL) に溶解させ、次いでヘプタン (16.6 mL) を加えた。制御した減圧下 (~100 hPa)、ジクロロメタンのみを留去し、得られた混合物をろ過して固体を得た。このヘプタンでの洗浄操作を2度繰り返した。得られた固体をポンプにて減圧下、25℃で2時間乾燥させ、1.40 gの残渣を得た。

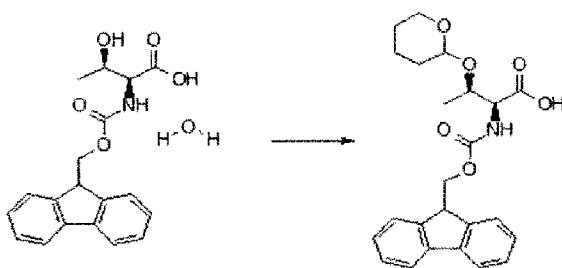
得られた残渣にt-ブチルメチルエーテル (TBME、25 mL) とpH 2.1の0.05 M リン酸水溶液 (70 mL) を加えて、25℃にて5分間攪拌した後、有機層と水層を分離した。水層にt-ブチルメチルエーテル (TBME、25 mL) を加えて抽出した後、得られた全ての有機層を混合し、飽和塩化ナトリウム水溶液 (25 mL) にて2度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥させ、減圧下溶媒を留去した。残渣をポンプにて減圧下、25℃で2時間乾燥させることで、(

(2S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロパン酸 (化合物 1、Fmoc-Ser(THP)-OH、1.22 g, 30 mol%のt-ブチルメチルエーテル (TBME) が残留) を得た。得られたFmoc-Ser(THP)-OHは-25℃の冷凍庫にて保存した。

LCMS (ESI) $m/z = 410.2$ (M-H)

保持時間: 0.81分 (分析条件SQDFA05)

[0359] (2S, 3R)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ブタン酸 (化合物 2、Fmoc-Thr(THP)-OH) の合成



化合物 2

(2S, 3R)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-ヒドロキシブタン酸 一水和物 (Fmoc-Thr-OHの一水和物、東京化成より購入、5.0 g, 13.9 mmol) とp-トルエンスルホン酸ピリジニウム (PPTS、0.175 g, 0.70 mmol) の混合物にトルエン (50 mL) を加えて、減圧下トルエンを留去することで共沸により含まれている水分を除去した。得られた残渣に超脱水テトラヒドロフラン (THF、28 mL) と3,4-ジヒドロ-2H-ピラン (8.8 mL, 97 mmol) を加え、窒素雰囲気下、50℃にて4時間攪拌した。LCMS (SQDFA05) にて原料の消失を確認後、混合物を25℃まで冷却し、酢酸エチル (30 mL) を加えた。続いて飽和塩化ナトリウム水溶液 (30 mL) を加えて有機層を洗浄し、水層を酢酸エチル (30 mL) で抽出した。得られた全ての有機層を混合し、これをさらに飽和塩化ナトリウム水溶液 (30 mL) にて2度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥し、溶媒を減圧下留去し、粗生成物を9.3 g得た。

得られた粗生成物のうち、4.65 gをテトラヒドロフラン (THF、30 mL) に

溶解させ、次いでpH 8.0に調製した1.0 M リン酸緩衝液 (30 mL) を加えた。この混合物を50℃で4時間攪拌した。25℃まで冷却した後、酢酸エチル (30 mL) を加え、有機層と水層を分離した。水層に酢酸エチル (30 mL) を加えて抽出を行った後、得られた全ての有機層を混合し、飽和塩化ナトリウム水溶液 (30 mL) で2度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去し、さらにポンプにて減圧下、25℃で30分乾燥させた。

得られた残渣をジエチルエーテル (50 mL) に溶解させ、次いでヘプタン (50 mL) を加えた。制御した減圧下 (~100 hPa)、ジエチルエーテルのみを留去し、得られた混合物をろ過して固体を得た。このヘプタンでの洗浄操作を2度繰り返した。得られた固体をポンプにて減圧下、25℃で2時間乾燥させ、Fmoc-Thr(THP)-OHのナトリウム塩 (2.80 g, 6.26 mmol) を得た。

得られた全量のFmoc-Thr(THP)-OHのナトリウム塩に酢酸エチル (50 mL) と pH 2.1の0.05 M リン酸水溶液 (140 mL) を加えて、25℃にて5分間攪拌した後、有機層と水層を分離した。水層に酢酸エチル (50 mL) を加えて抽出した後、得られた全ての有機層を混合し、飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL) にて2度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥させ、減圧下溶媒を留去した。残渣をポンプにて減圧下、25℃で2時間乾燥させた後、得られた固体をt-ブチルメチルエーテル (TBME、50 mL) に溶解させ、溶媒を減圧下留去した。さらにポンプにて減圧下、25℃で1時間乾燥させることで、(2S, 3R)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ブタン酸 (化合物2、Fmoc-Thr(THP)-OH、2.70 g, 30mol%のt-ブチルメチルエーテル (TBME) が残留) をTHP保護上の不斉炭素に由来するジアステレオマーとして得た。得られたFmoc-Thr(THP)-OHは-25℃の冷凍庫にて保存した。

LCMS (ESI) m/z = 424.2 (M-H)

保持時間: 0.84分、0.85分 (分析条件SQDFA05)

[0360] 自動合成機によるペプチド固相合成

ペプチド合成機 (Multi pep RS; Intavis社製) を用い

て、Fmoc法によりペプチド合成を行った。なお、操作の詳細な手順については合成機に付属のマニュアルに従った。

合成機にN末端がFmocで保護されたアスパラギン酸の側鎖カルボン酸部位が結合した2-クロロトリチルレジンは(1カラムあたり100mg)と、各種Fmoc-アミノ酸(0.6mol/L)と1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール(HOAt)のNMP溶液と、ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)のN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)溶液(10%v/v)をセットした。Fmoc-Thr(THP)-OH、Fmoc-Ser(THP)-OHはNMP溶液においてoxymaと共存させ、さらにモレキュラシーブス4A1/8(和光純薬工業)もしくはモレキュラシーブス4A1/16(和光純薬工業)を添加してセットした。

Fmoc脱保護溶液としてジアザビスクロウンデセン(DBU)のDMF溶液(2%v/v)を用いて合成を行った。レジンはDMFにて洗浄した後、Fmoc脱保護に次いでFmocアミノ酸の縮合反応を1サイクルとし、このサイクルを繰り返すことでレジン表面上にペプチドを伸長させた。ペプチド伸長完了後、レジンのN末端のFmoc基の除去をペプチド合成機上にて行った後、レジンをDMFにて洗浄した。

[0361] 伸長したペプチドのレジンからの切り出し

上記の方法によって得られた固相上に担持された鎖状ペプチドに対し、DCMを加えレジンを再膨潤させた後、レジンに2,2,2-トリフルオロエタノール(TFE)/DCM(1/1,v/v,2mL)を加えて室温にて2時間振とうした。続いてチューブ内の溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、残ったレジンをさらに2,2,2-トリフルオロエタノール(TFE)/DCM(1/1,v/v,1mL)にて2回洗浄した。得られた全ての切り出し溶液を混合し、減圧下濃縮した。

[0362] 切り出したペプチドの環化

切り出し後に減圧下濃縮した残渣をDMF/DCM(1/1,v/v,8mL)に溶解した。0.5MのO-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール

－1－イル）－N，N，N，N－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HATU）／DMF溶液（用いたレジン上のモル数に対して1．5等量）と、DIPEA（用いたレジン上のモル数に対して1．8等量）を加え、室温にて2時間攪拌した。その後、減圧下溶媒を留去した。

[0363] 環状ポリペプチドが有する側鎖官能基の保護基の脱保護と精製

TFA－TIPS－H₂O混合溶液（95／2．5／2．5、 $v/v/v$ 、1．5 mL）を加え、残渣を溶解させた後、室温にて1時間攪拌した。減圧下、溶媒を留去した後、DMSOを加え、不溶物をフィルターろ過にて取り除いた後、preparative－HPLCで精製した。

合成ペプチドの構造情報と分析データをまとめたものを表7に示す。

[0364] 環状ポリペプチドが有する側鎖官能基の保護基の脱保護と精製（その2）

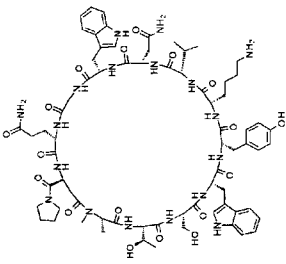
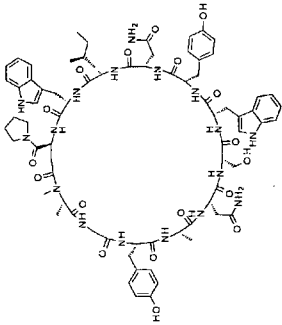
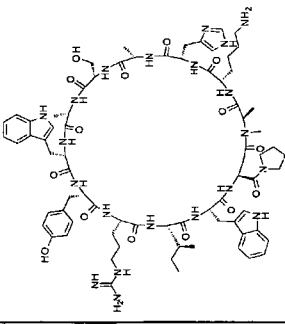
TFA－TIPS－H₂O混合溶液（95／2．5／2．5、 $v/v/v$ 、1．5 mL）を0℃にて加え、残渣を溶解させた後、室温にて30分間攪拌した。0℃にてMTBE（10 mL）を加え、生じた沈殿物を遠心分離にて回収した。回収した粗固体をMTBE（15 mL）で3回洗浄した。得られた固体にDMSOを加え溶解し、不溶物をフィルターろ過にて取り除いた後、preparative－HPLCで精製した。

合成ペプチドの構造情報と分析データをまとめたものを表8Aおよび表8Bに示す。

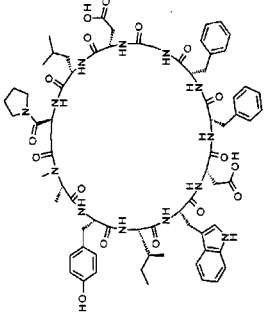
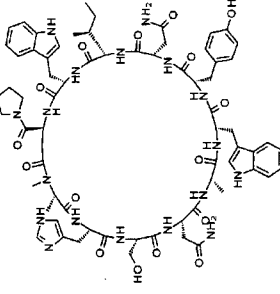
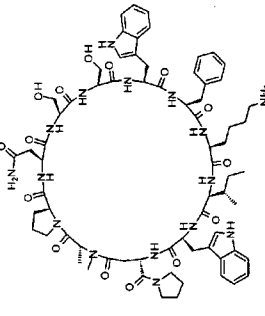
表7、8A、および8Bについて説明する。表に記載のPP1～25はそれぞれ、「Core 01」のアミノ酸（MeAla（N－メチル-L－アラニン）またはD-MeAla（N－メチル-D－アラニン））のアミノ基と、C末端のアミノ酸（Asp）の側鎖カルボキシ基をアミド結合により環化させたペプチドであることを表す。「cterm」カラムは前記C末端のアミノ酸（Asp）の主鎖カルボキシ基と縮合する官能基を意味しており、pyrroはピロリジンを意味する。

[0365]

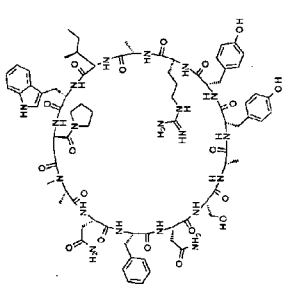
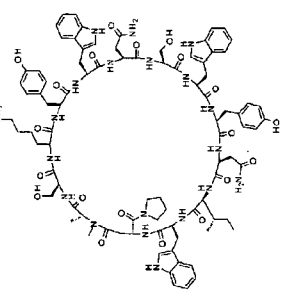
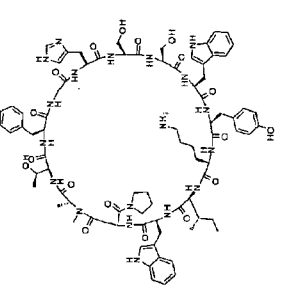
[表7]

id	Structure	core 01	core 02	core 03	core 04	core 05	core 06	core 07	core 08	core 09	core 10	core 11	core 12	cterm	Exact mass	Observed (m/z) 分析条件 SQDAA50
pp1		MeAla	Thr	Ser	Trp	Tyr	Lys	Val	Asn	Trp	Gly	Gln	Asp	pyrro	1502.7	1504.0 (M+H) 1501.8 (M-H)
pp2		MeAla	Gly	Tyr	Ala	Asn	Ser	Trp	Tyr	Asn	Ile	Trp	Asp	pyrro	1507.7	1509.1 (M+H) 1506.8 (M-H)
pp3		D-MeAla	Lys	His	Ala	Ser	Ala	Trp	Tyr	Arg	Ile	Trp	Asp	pyrro	1551.8	1553.1 (M+H) 1551.0 (M-H)

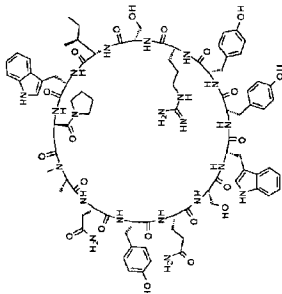
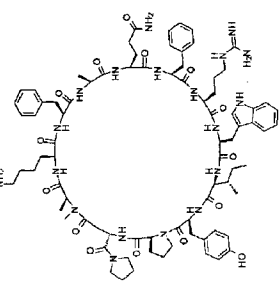
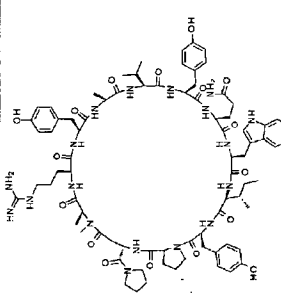
[表7]の続き

1410.9 (M+H) 1408.9 (M+H)	1425.9 (M+H) 1423.8 (M+H)	1399.9 (M+H) 1398.1 (M+H)
1409.7	1424.7	1398.7
pyrro	pyrro	pyrro
Asp	Asp	Asp
Leu	Trp	Trp
Asp	Ile	Ile
Gly	Asn	Lys
Phe	Tyr	Phe
Phe	Trp	Trp
Asp	Ala	Ser
Trp	Asn	Ser
Ile	Ser	Asn
Tyr	His	Pro
MeAla	MeAla	D-MeAla
		
PP4	PP5	PP6

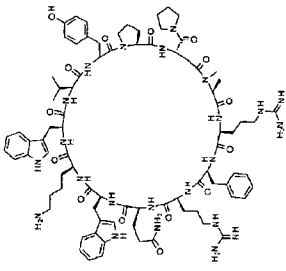
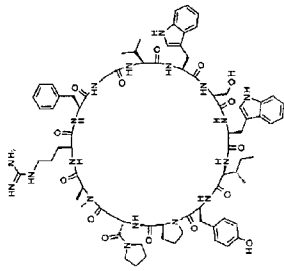
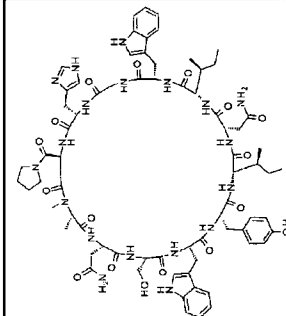
[0366] [表8A]

id	Structure	core 01	core 02	core 03	core 04	core 05	core 06	core 07	core 08	core 09	core 10	core 11	core 12	core 13	term	Exact mass	Observed (m/z) 分析条件: SQDAA50
pp7		MeAla	Asn	Phe	Asn	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Ala	Ile	Trp	Asp	pyrro	1638.8	1640.3 (M+H) 1638.1 (M-H)
pp8		D-MeAla	Ser	Lys	Tyr	Trp	Asn	Ser	Trp	Tyr	Asn	Ile	Trp	Asp	pyrro	1780.8	1782.3 (M+H) 1780.6 (M-H)
pp9		D-MeAla	Thr	Tyr	Gly	His	Ser	Ser	Trp	Tyr	Lys	Ile	Trp	Asp	pyrro	1661.8	1663.2 (M+H) 1661.4 (M-H)

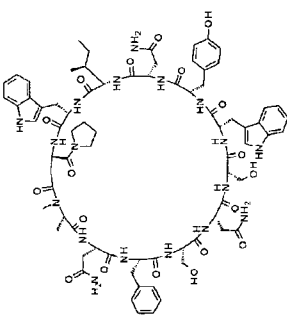
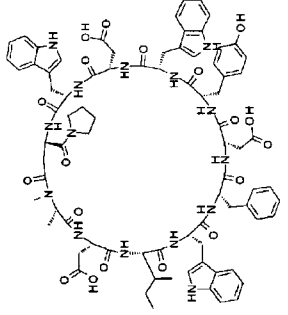
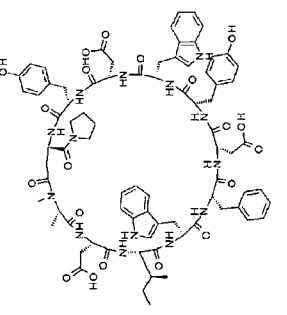
[表8A]の続き

1802.4 (M+H) 1799.6 (M-H)	1591.4 (M+H) 1589.7 (M-H)	1594.2 (M+H) 1592.1 (M-H)
1799.8	1589.9	1592.8
pyrro	pyrro	pyrro
Asp		
Trp	Asp	Asp
Ile	Pro	Pro
Ser	Tyr	Tyr
Arg	Ile	Ile
Tyr	Trp	Trp
Tyr	Arg	Gln
Trp	Phe	Tyr
Ser	Gln	Val
Gln	Ala	Ala
Tyr	Phe	Tyr
Asn	Lys	Arg
MeAla	MeAla	MeAla
		
PP10	PP11	PP12

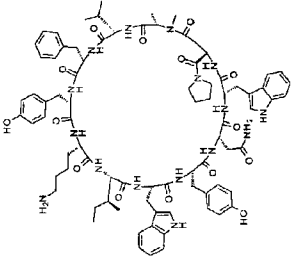
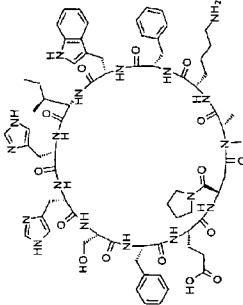
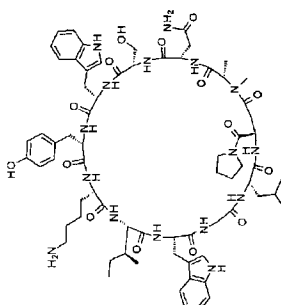
[表8A]の続き

	1701.4 (M+H) 1699.5 (M-H)		1546.3 (M+H) 1544.1 (M-H)		1525.2 (M+H) 1523.3 (M-H)
	1699.9		1544.8		1523.7
	pyrro		pyrro		pyrro
	Asp		Asp		Asp
	Pro		Pro		His
	Tyr		Tyr		Gly
	Val		Ile		Trp
	Trp		Trp		Ile
	Lys		Ser		Asn
	Trp		Trp		Ile
	Gln		Val		Tyr
	Arg		Gly		Trp
	Phe		Phe		Ser
	Arg		Arg		Asn
	MeAla		MeAla		MeAla
					
PP13		PP14		PP15	

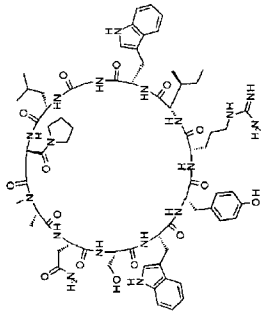
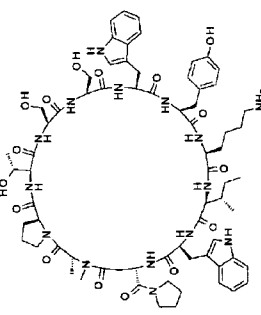
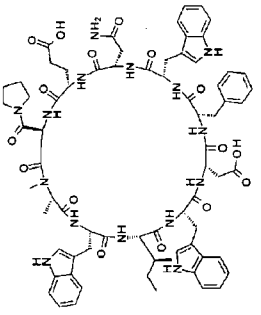
[0367] [表8B]

1566.2 (M+H) 1564.1 (M-H)	1581.1 (M+H) 1579.3 (M-H)	1558.1 (M+H) 1556.1 (M-H)
1564.7	1579.7	1556.7
pyrro	pyrro	pyrro
Asp		
Trp	Asp	Asp
Ile	Trp	Tyr
Asn	Asp	Asp
Tyr	Trp	Trp
Trp	Tyr	Tyr
Ser	Asp	Asp
Asn	Phe	Phe
Ser	Trp	Trp
Phe	Ile	Ile
Asn	Asp	Asp
MeAla	MeAla	MeAla
		
PP16	PP17	PP18

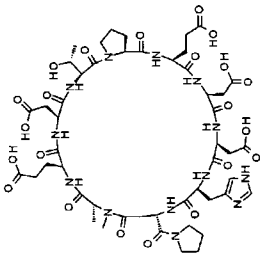
[表8B]の続き

1554.3 (M+H) 1552.3 (M-H)	1466.2 (M+H) 1464.1 (M-H)	1402.2 (M+H) 1400.2 (M-H)
1552.8	1464.7	1400.7
pyrro	pyrro	pyrro
Asp	Asp	Asp
Trp	Glu	Leu
Asn	Phe	Gly
Tyr	Ser	Trp
Trp	His	Ile
Ile	His	Lys
Lys	Ile	Tyr
Tyr	Trp	Trp
Phe	Phe	Ser
Val	Lys	Asn
MeAla	MeAla	MeAla
		
PP19	PP20	PP21

[表8B]の続き

1430.2 (M+H) 1428.1 (M-H)	1403.2 (M+H) 1401.2 (M-H)	1431.1 (M+H) 1429.1 (M-H)
1428.7	1401.7	1429.6
pyrro	pyrro	pyrro
Asp	Asp	
Leu	Trp	Asp
Gly	Ile	Glu
Trp	Lys	Asn
Ile	Tyr	Trp
Arg	Trp	Phe
Tyr	Ser	Asp
Trp	Ser	Trp
Ser	Thr	Ile
Asn	Pro	Trp
MeAla	D-MeAla	MeAla
		
PP22	PP23	PP24

[表8B]の続き

1192.9 (M+H) 1190.8 (M+H)
1191.5
pyrro
Asp
His
Asp
Asp
Glu
Pro
Thr
Asp
Glu
D-MeAla

PP25

[0368] 環状ポリペプチドのC末端 (c term) にGG-TFPI-tagのN末

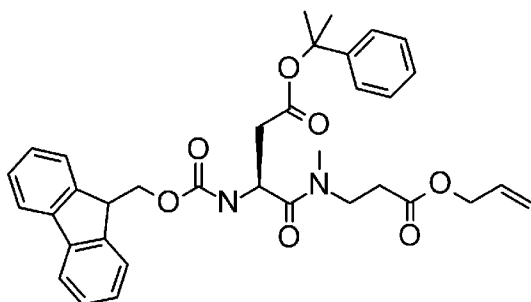
端を結合させた化合物（環化体+GG-TFP I-t a g）の化学合成

既に実施例に記載の方法である自動合成機によるペプチド固相合成により Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl))-resin)-bMeAla-OAllyl（化合物RS3）のレジンをを用いて、C末端（c t e r m）がアリル（Allyl）基で保護された鎖状ペプチドを合成した。続いて、既に実施例に記載の方法で固相上からの切り出し、環化を行った。得られた環化体（環化体A）のC末端（c t e r m）のアリル基の脱保護を行い環化体Bへ変化した後、環化体Bと別途Fmoc-Ile-O-Trt(2-Cl)-resin（化合物RS4）を用いて、既に実施例に記載の方法である自動合成機によるペプチド固相合成により合成した固相上に担持されたGG-TFP I-t a gのN末端とを縮合反応により結合させた。その後、実施例記載の方法により固相上からの切り出しを行い、得られた化合物の全ての保護基（PG: protecting group）をTFA-TIPS-H₂O（95/2.5/2.5、v/v/v）混合溶液にて脱保護した後、preparative-HPLCで精製することで、目的物である環状ポリペプチドのC末端（c t e r m）にGG-TFP I-t a gを結合させた化合物（環化体+GG-TFP I-t a g）を得た（図39）。

[0369] 環状ポリペプチドのC末端（c t e r m）にGG-TFP I-t a gのN末端を結合させた化合物（環化体+GG-TFP I-t a g）の化学合成に用いたレジンの調製法

Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl))-resin)-bMeAla-OAllyl（化合物RS3）の合成は図40に記載のスキームに従って行った。

[0370] (S)-3-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-((3-(アリルオキシ)-3-オキソプロピル)(メチル)アミノ)-4-オキソブタン酸 2-フェニルプロパン-2-イル（化合物RS1、Fmoc-Asp(OPis)-bMeAla-OAllyl）の合成



市販のFmoc- β -MeAla-OH (Fmoc-bMeAla-OHとも表記する場合がある。CAS# 172965-84-3) (19.52 g、60.0 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOAt) (12.25 g、90.0 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDCI·HCl) (17.25 g、90.0 mmol) のジクロロメタン (DCM) 溶液 (120 mL) にアリルアルコール (12.24 mL、180 mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (15.72 mL、90 mmol) を0℃にて加え、室温にて1時間撹拌した。反応液に水を加えた後、ジクロロメタン (DCM) で抽出し、飽和塩化アンモニウム水溶液、50%飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過を行った後、減圧下濃縮することで、3-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)プロパン酸アリル (Fmoc-bMeAla-OAllyl) (20.9 g) を粗生成物として得た。

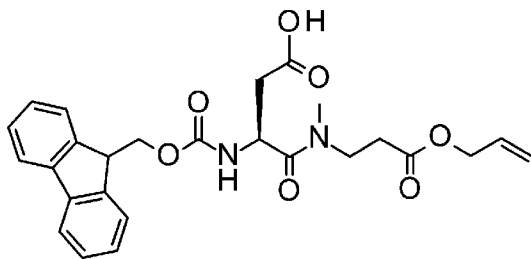
粗生成物である3-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)プロパン酸アリル (Fmoc-bMeAla-OAllyl) (10.96 g) のジメチルホルムアミド溶液 (60 mL) に1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン (DBU) (4.52 mL、30 mmol) を室温にて加え、室温にて30分間撹拌した。反応液にピリジン塩酸塩 (4.16 g、36.0 mmol) を室温にて加え、30分間撹拌した後、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOAt) (6.13 g、45.0 mmol)、市販のFmoc-

Asp(OPis)-OH (CAS# 200336-86-3) (16.34 g、34.5 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDCI·HCl) (8.63 g、45.0 mmol)を室温にて加え、1時間攪拌した。反応液にt-ブチルメチルエーテルを加えた後、飽和塩化アンモニウム水溶液で2回、5%炭酸ナトリウム水溶液で2回、水、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過を行った後、減圧下濃縮することで得られた粗生成物を順相カラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)にて2回精製することで、(S)-3-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-((3-(アリルオキシ)-3-オキソプロピル)(メチル)アミノ)-4-オキソブタン酸 2-フェニルプロパン-2-イル(化合物RS1、Fmoc-Asp(OPis)-bMeAla-OAllyl) (14.499 g、2工程77%)を得た。

LCMS (ESI) m/z = 621 (M+Na)⁺

保持時間: 1.03分(分析条件SQDFA05)

[0371] (S)-3-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-((3-(アリルオキシ)-3-オキソプロピル)(メチル)アミノ)-4-オキソブタン酸(化合物RS2、Fmoc-Asp-bMeAla-OAllyl)の合成



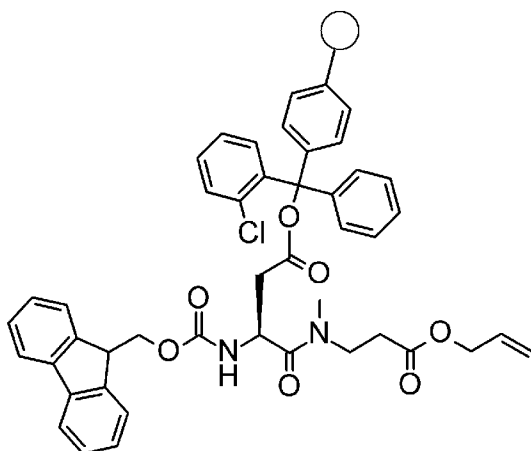
(S)-3-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-((3-(アリルオキシ)-3-オキソプロピル)(メチル)アミノ)-4-オキソブタン酸 2-フェニルプロパン-2-イル(化合物RS1、Fmoc-Asp(OPis)-bMeAla-OAllyl) (14.499 g、24.22 mmol)のジクロロメタン溶液(

24.22 mL) に0℃にてトリフルオロ酢酸 (TFA) (11.19 mL、145 mmol) を滴下しながら加え、30分間攪拌した。反応液に8M水酸化ナトリウム水溶液 (18.16 mL) を滴下しながら加えた後、飽和リン酸二水素ナトリウム水溶液、水を加え、酢酸エチルで2回抽出した。得られた有機層を飽和リン酸二水素ナトリウム水溶液／水＝1／2で調製した溶液で2回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過を行うことで (S) - 3 - (((9H-フルオレン-9-イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 4 - ((3 - (アリルオキシ) - 3-オキソプロピル) (メチル) アミノ) - 4-オキソブタン酸 (化合物RS2、Fmoc-Asp-bMeAla-OAllyl) (14.2 g) を粗生成物として得た。

LCMS (ESI) $m/z = 481$ (M+H)⁺

保持時間：0.76分 (分析条件SQDFA05)

[0372] Fmoc-Asp (O-Trt (2-Cl) -resin) -bMeAla-OAllyl (化合物RS3) の合成

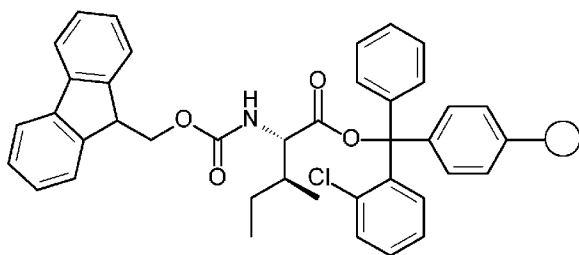


フィルター付きの反応容器に2-クロロトリチルクロライドレジン (1.60 mmol/g、100-200 mesh、1%DVB、渡辺化学から購入、30 g、48.0 mmol) とジクロロメタンを入れ、室温にて30分間振とうした。窒素圧をかけてジクロロメタンを除いた後、上述の (S) - 3 - (((9H-フルオレン-9-イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 4 - ((3 - (アリルオキシ) - 3-オキソプロピル) (メチル) アミノ) - 4-オキソブタン酸 (化合物RS2、Fmoc-Asp-bM

eAla-OAllyl) (11.6 g) と N, N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (20.24 mL、116 mmol) のジクロロメタン (241 mL) 溶液を反応容器に添加し、40 分間振とうした。窒素圧をかけて反応液を除いた後、ジクロロメタン (241 mL) にメタノール (27.4 mL) と N, N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (20.4 mL、116 mmol) を加えた混合液を反応容器に添加し、2 時間振とうした。窒素圧をかけて反応液を除いた後、ジクロロメタンを入れ、5 分間振とうし、窒素圧をかけてジクロロメタンを除く操作を 5 回繰り返し、レジンを洗浄した。得られたレジンを減圧下で一晩乾燥させ、Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl))-resin-bMeAla-OAllyl (化合物 RS3) (38.0578 g) を得た。

得られたレジンのローディング量は文献記載 (Letters in Peptide Science, 2002, 9, 203) の方法を用い算出した。Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl))-resin-bMeAla-OAllyl (化合物 RS3) (5.8 mg) を反応容器に入れ、DMF (2 mL) を加え 1 時間振とうした。反応液に DBU (0.04 mL) を加え、30 分振とうした後、アセトニトリル (10 mL) を加え、1 mL を取りだし、さらに溶液量が 12.5 mL になるまでアセトニトリルで希釈した。得られた溶液の吸光度 (304 nm) を測定し (Shimadzu、UV-1600PC (セル長 1.0 cm) を用いて測定)、Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl))-resin-bMeAla-OAllyl (化合物 RS3) のローディング量を 0.517 mmol/g と算出した。

[0373] Fmoc-Ile-Otrt(2-Cl)-resin (化合物 RS4) の合成



フィルター付きの反応容器に2-クロロトリチルクロライドレジン（1.60 mmol/g、100–200 mesh、1%DVB、渡辺化学から購入、10.0 g、16.0 mmol）と脱水ジクロロメタンを入れ、室温にて1時間振とうした。窒素圧をかけてジクロロメタンを除いた後、市販のN-（（（9H-フルオレン-9-イル）メトキシ）カルボニル）-N-イソロイシン（Fmoc-Lle-OH）（2.83 g、8.00 mmol）とN、N-ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）（6.71 mL、38.4 mmol）の脱水ジクロロメタン（80 mL）溶液を反応容器に添加し、30分間振とうした。窒素圧をかけて反応液を除いた後、脱水ジクロロメタン（80 mL）に脱水メタノール（20 mL）とN、N-ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）（7.0 mL）を加えた混合液を反応容器に添加し、2時間振とうした。窒素圧をかけて反応液を除いた後、ジクロロメタンを入れ、5分間振とうし、窒素圧をかけてジクロロメタンを除く操作を3回繰り返す、レジンを洗浄した。得られたレジンを減圧下で一晩乾燥させ、Fmoc-Lle-Otirt(2-Cl)-resin（化合物RS4）（12.5113 g）を得た。

得られたレジンのローディング量は文献記載（Letters in Peptide Science, 2002, 9, 203）の方法を用い算出した。Fmoc-Lle-Otirt(2-Cl)-resin（化合物RS4）（10.0 mg）を反応容器に入れ、DMF（2 mL）を加え1時間振とうした。反応液にDBU（0.04 mL）を加え、30分振とうした後、アセトニトリル（10 mL）を加え、1.0 mLを取りだし、さらに溶液量が12.5 mLになるまでアセトニトリルで希釈した。得られた溶液の吸光度（304 nm）を測定し（Shimadzu、UV

—1600PC（セル長1.0 cm）を用いて測定）、Fmoc-Ile-Otrt（2-Cl）-resin（化合物RS4）のローディング量を0.549 mmol/gと算出した。

[0374] 環化体AのC末端（c t e r m）アリル基の脱保護反応

Fmoc-Asp（O-Trt（2-Cl）-resin）-bMeAla-OAllyl（化合物RS3）（600 mg）を用いることで得られた環化体Aをジクロロメタン（6.0 mL）に溶解させた後、フェニルシラン（PhSiH₃）（0.096 mL、0.776 mmol）、テトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（0）（Pd（PPh₃）₄）（36 mg、0.031 mmol）を加え、室温にて攪拌した。原料の消失をLC-MSで確認した後、反応液にメタノールを加え、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をジメチルスルホキシドに溶解し逆相カラムクロマトグラフィー（10 mM 酢酸アンモニウム水溶液／メタノール）にて精製することで環化体Bを得た（図41）。

[0375] 環化体+GG-TFP I - t a g化合物の合成法

フィルター付きの反応容器に、Fmoc-Ile-Otrt（2-Cl）-resin（化合物RS4）を用いて、既に実施例に記載の方法である自動合成機によるペプチド固相合成により合成したN末端がFmoc基で保護されたGG-TFP I - t a gレジン（50 mg）を加えた後、ジクロロメタンを加え30分間レジン振とうし、ジクロロメタンをろ過により除いた。2% 1, 8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン（DBU）／ジメチルホルムアミド（DMF）溶液（0.5 mL）を反応容器に加え、30分間室温にて振とうした後、ろ過により反応液を除いた。その後、ジメチルホルムアミド（DMF）（0.5 mL）を反応容器に加え、5分間振とうし、ろ過によりジメチルホルムアミド（DMF）を除いた。このジメチルホルムアミド（DMF）によるレジンの洗浄操作を6回繰り返した。続いて、0.1 M 環化体B／N-メチル-2-ピロリドン（NMP）溶液（250 μL）と0.75 M 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

(H O A t) / N-メチル-2-ピロリドン (NMP) 溶液 (83 μ L) の混合物に 0.75 M N、N-ジイソプロピルカルボジイミド (D I C) / ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液 (40 μ L) を加え数回ピペッティングにより攪拌した溶液を反応容器に加えた。反応容器を終夜で 40°C で振とうさせた後、ろ過により反応液を除いた。その後、ジメチルホルムアミド (DMF) (0.5 mL) を反応容器に加え、5 分間振とうし、ろ過によりジメチルホルムアミド (DMF) を除いた。このジメチルホルムアミド (DMF) によるレジンの洗浄操作を 6 回繰り返した。反応容器にジクロロメタン (DCM) (0.5 mL) を加え数回振とうさせた後、ろ過によりジクロロメタン (DCM) を除いた。反応容器にトリフルオロエタノール (T F E) / ジクロロメタン (DCM) = 1 / 1 溶液 (0.5 mL) を加え、室温で 2 時間振とうし、固相上からの切り出しを行った。ろ過により切り出し液を回収した後、反応容器にトリフルオロエタノール (T F E) / ジクロロメタン (DCM) = 1 / 1 溶液 (0.5 mL) を加え、レジンの洗浄を 2 回行った。得られた溶液をまとめて減圧下濃縮することで、保護基 (P G : p r o t e c t i n g g r o u p) を有する環化体+GG-T F P I - t a g 化合物を得た。得られた保護基 (P G : p r o t e c t i n g g r o u p) を有する環化体+GG-T F P I - t a g 化合物に対し、0°C にて T F A - T I P S - H₂O 混合溶液 (95 : 2.5 : 2.5、v / v / v) (1.0 mL) を加えた後、0°C にて攪拌した。尚、原料の消失は L C - M S により確認した。反応液に 0°C にて t-ブチルメチルエーテルを加え、ろ過を行い、得られた固体をジメチルスルホキシドに溶解し、p r e p a r a t i v e H P L C で精製することで、目的物である環化体+GG-T F P I - t a g 化合物を合成した (図42)。

[0376] 環化体+GG-T F P I - t a g 化合物の構造情報

環化体+GG-T F P I - t a g 化合物の構造情報を図43に示した。また、環化体+GG-T F P I - t a g 化合物の配列情報および分析情報をそれぞれ表9および表10に示した。表9の C o r e 01~13 は環状部を構

成するアミノ酸であり、H 01～17は直鎖部を表すアミノ酸と定義した。Asp2は環化部位を表しており、アスパラギン酸（Asp）側鎖のカルボン酸部位がCore 01のN末端とアミド結合により環化していることを表している。またAsp2のC末端と直鎖部H 01のN末端がアミド結合で連結され、Asp2に近い方からH 01、H 02・・・であると定義した。また、c termはH17の主鎖カルボン酸の官能基を表しており、「none」とはH17のC末端がカルボン酸であることを表している。

[0377]

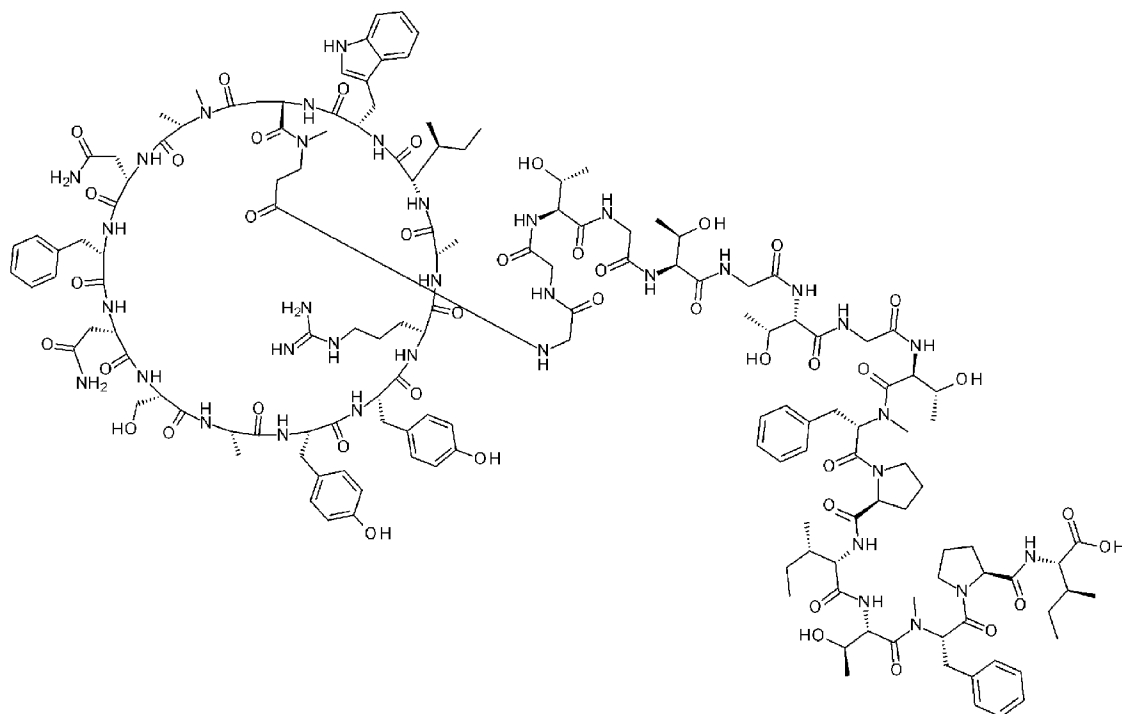
[表9]

化合物 番号	Core 01	Core 02	Core 03	Core 04	Core 05	Core 06	Core 07	Core 08	Core 09	Core 10	Core 11	Core 12	Core 13	H 01	H 02	H 03	H 04	H 05	H 06	H 07	H 08	H 09	H 10	H 11	H 12	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	clerm	
PP7+tag	MeAla	Asn	Phe	Asn	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Ala	Ile	Trp	Asp2	bMeAla	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	MePhe	MePhe	Pro	Ile	Thr	MePhe	Pro	Ile	none
PP10+tag	MeAla	Asn	Tyr	Gln	Ser	Trp	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Ile	Trp	Asp2	bMeAla	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	MePhe	MePhe	Pro	Ile	Thr	MePhe	Pro	Ile	none
PP23+tag	D-MeAla	Pro	Thr	Ser	Ser	Trp	Tyr	Lys	Ile	Trp	Asp2			bMeAla	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Thr	MePhe	MePhe	Pro	Ile	Thr	MePhe	Pro	Ile	none

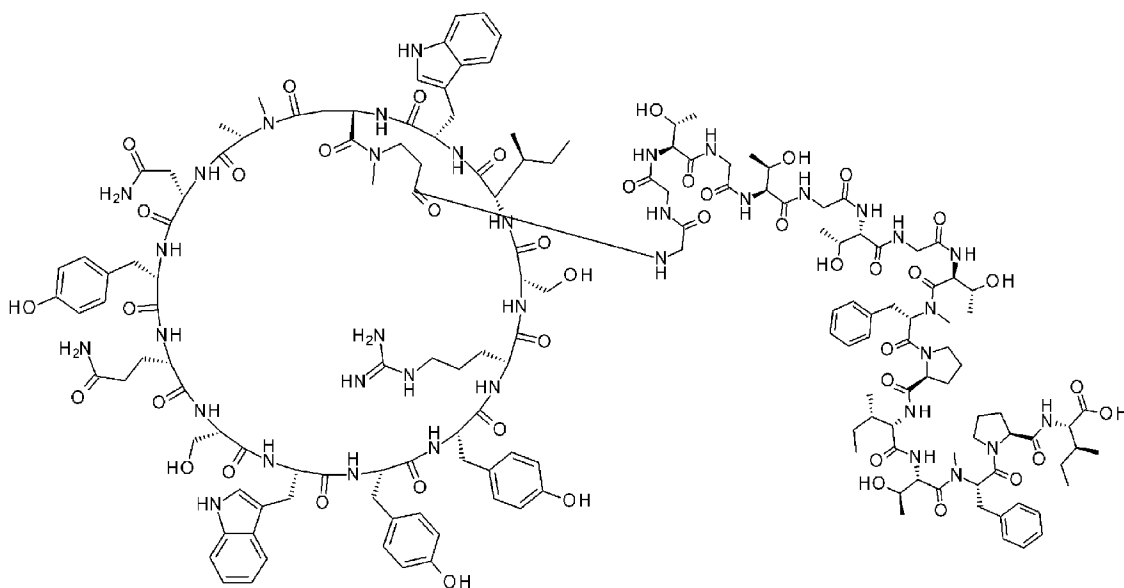
[表10]

化合物 番号	Exact MS	LCMS(ESI) m/z		保持時間	分析条件
PP7+tag	3203.6	1600.7	$(M-2H)^{2-}$	0.48	SQDAA50
PP10+tag	3364.6	1683.3	$(M+2H)^{2+}$	0.44	SQDAA50
PP23+tag	2966.5	1484.3	$(M+2H)^{2+}$	0.49	SQDAA50

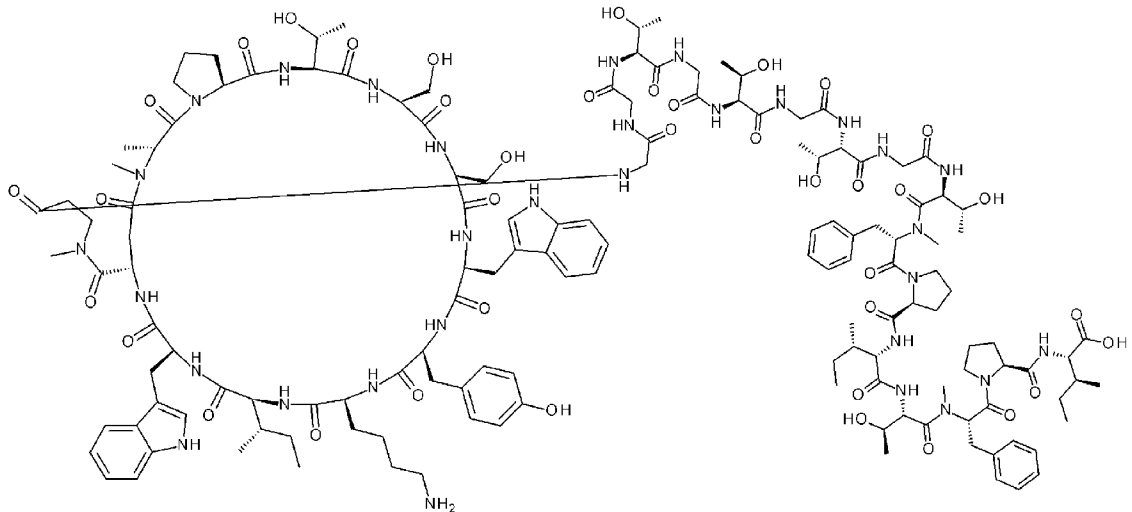
[0379] P P 7 + t a g (配列番号 : 5 7)



P P 1 0 + t a g (配列番号 : 5 8)



PP23+tag (配列番号: 59)



[0380] 実施例 2 1. IKK β またはTBK1 によるRegnase-1 のリン酸化の検出 (AlphaScreen)

(ヒトRegnase-1の調製)

標的タンパク質として、human Regnase-1(UniProt ID: Q5D1E8)の全長配列を利用し、N末端側にFLAGタグ、C末端側にビオチンリガーゼBirAの認識配列を持つコンストラクトとした(FL_Reg1)。上記Regnase-1は哺乳細胞Expi293で発現、FLAG M2 アガロースで精製し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより単離した。ビオチン化が必要な場合は、非特許文献(BMC biotechnology, 2008, 8, 41およびProtein Science, 1999, 8, 921-929)の方法を用いた。

ヒトRegnase-1全長配列のうち1番目から546番目のアミノ酸配列を調製し、N末端側にFLAGタグ、C末端側にビオチンリガーゼBirAの認識配列を持つコンストラクトとした(本明細書において、Regnase-1のC末端ドメイン(配列番号: 2の場合、547番目から599番目のアミノ酸)が欠損したRegnase-1を「 Δ CTD_Reg1」と称する。なお「 Δ CTD_Reg1」は、実施例13において調製されたような、コドン517における1bpの欠失に起因するフレームシフト変異に起因するC末端ドメイン欠損体である「Regnase-1 Δ CTD」とは異なる)。また、ヒトRegnase-1全長配列のうち301番目から599番目のアミノ酸配列をC末Regnase-1とし、N末端側にFLAGタグ、C末端側にビオチンリガーゼBirAの認識配列を持つコンストラクトを作製した(Reg1_301-599)。上記Regnase-1は哺乳細胞Expi29

3で発現、FLAG M2 アガロースで精製し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより単離した。ビオチン化が必要な場合は、非特許文献(BMC biotechnology, 2008, 8, 41およびProtein Science, 1999, 8, 921-929)の方法を用いた。

[0381] (リン酸化反応)

2mM DTT、100 μ M バナジウム酸ナトリウム、2 mM 塩化マンガンを追加したKinase assay buffer III (SignalChem社製)を用いて、10 μ MのATP存在下でキナーゼ (IKK β (SignalChem社製) またはTBK1 (SignalChem社製)) とRegnase-1を室温で2時間反応させることによりリン酸化反応を行った。

[0382] (リン酸化Regnase-1の検出)

リン酸化Regnase-1の検出は、AlphaScreenシステムにより行った。上記リン酸化Regnase-1抗体をそれぞれ添加して室温で1時間反応後に、Anti FLAG AlphaLISA Acceptor Beads (PerkinElmer社製) とProtein A AlphaScreen Donor Beads (PerkinElmer社製) を加え、EnVision (PerkinElmer社製) を用いて励起された発光を測定した。その結果、キナーゼによるリン酸化反応によって生成されたリン酸化Regnase-1を特異的に検出し、Regnase-1並びにキナーゼ濃度依存的にシグナルが増強することを確認した (図24)。

[0383] (化合物のリン酸化阻害活性)

2 nMの上記Regnase-1と化合物を混合した後、リン酸化反応を行って生成されたリン酸化Regnase-1をAlphaScreenシステムにより検出した。結果は、Regnase-1のみで得られるシグナルを阻害率100%、化合物の代わりに溶媒 (DMSO) を同量添加した時に得られるシグナルを阻害率0%として、各濃度の化合物添加時に得られるシグナルから阻害率を算出した。得られた用量反応曲線から50%阻害濃度 (μ M) を算出した (表11)。

その結果、これらの化合物 (PP1, PP2, PP3, PP4, PP5並びにPP6) はいずれもIKK β ならびにTBK1の両方のキナーゼによる全長Regnase-1 (FL_Reg1) のリン酸化を濃度依存的に阻害した (図25-1、図25-2)。一方、化合物PP2, PP3, PP4, PP5, PP6は、両キナーゼによるRegnase-1のCTD欠損体 (Δ CTD_Reg1) のリン酸化もFL-Reg1と同様に阻害したが、PP1は Δ CTD_Reg1のリン酸化を阻害

しなかった（図26-1、図26-2）。これらの結果から、化合物PP2, PP3, PP4, PP5, PP6は、ヒトRegnase-1（配列番号：2）のC末端ドメイン以外の部分（配列番号：2における1-546番目のドメイン）に含まれるアミノ酸に作用してリン酸化阻害活性を発揮しているのに対し、化合物PP1は、ヒトRegnase-1（配列番号：2）のC末端ドメイン（配列番号：2における547-599番目のドメイン）に含まれるアミノ酸に作用してリン酸化阻害活性を発揮している可能性が示唆された。

[0384] [表11]

TBK1 または IKK β による Regnase-1 のリン酸化阻害活性
（各化合物による 50%阻害濃度を記載）

ID	FL_Reg1		Δ CTD_Reg1	
	TBK1	IKK β	TBK1	IKK β
PP1	54.5	28.1	>62.1	>62.1
PP2	21.7	16.6	17.6	14.0
PP3	3.9	4.6	5.7	8.3
PP4	61.9	19.5	44.9	8.3
PP5	24.2	23.6	19.1	20.4
PP6	13.1	17.0	14.5	20.3

[0385] 実施例 2 2. IKK β またはTBK1とRegnase-1の結合（AlphaScreen）

（ヒトRegnase-1の調製）

標的タンパク質として、human Regnase-1(UniProt ID: Q5D1E8)の全長配列のN末端側にFLAGタグ、C末端側にビオチンリガーゼBirAの認識配列を持つコンストラクトを作製した（FL_Reg1）。上記Regnase-1は哺乳細胞Expi293で発現、FLAG M2 アガロースで精製し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより単離した。ビオチン化が必要な場合は、非特許文献(BMC biotechnology, 2008, 8, 41およびProtein Science, 1999, 8, 921-929)の方法を用いた。

[0386] （化合物によるキナーゼとRegnase-1の結合阻害）

2.5 nMの上記Regnase-1と化合物を混合した後、2.5 nMのIKK β またはTBK1を添加して室温で2時間反応させた。その後、Anti FLAG AlphaLISA Acceptor

Beads (PerkinElmer社製) と Glutathione-coated AlphaScreen Donor Beads (PerkinElmer社製) を加え、EnVision (PerkinElmer社製) を用いて励起された発光を測定した。結果は、Regnase-1のみで得られるシグナルを阻害率100%、化合物の代わりに溶媒 (DMSO) を同量添加した時に得られるシグナルを阻害率0%として、各濃度の化合物添加時に得られるシグナルから阻害率を算出した。得られた用量反応曲線から50%阻害濃度 (μM) を算出した (表 1 2)。

その結果、PP2, PP3, PP4, PP5, PP6は両キナーゼとRegnase-1の結合を阻害したが、PP1は阻害しなかった (図27-1、図27-2)。

[0387] [表12]

TBK1 または IKK β と Regnase-1 との結合阻害活性
(各化合物による 50%阻害濃度を記載)

ID	FL_Reg1	
	TBK1	IKK β
PP1	>62.1	>62.1
PP2	15.5	35.8
PP3	3.1	8.3
PP4	24.4	47.7
PP5	11.5	24.0
PP6	19.2	42.1

[0388] ペプチドライブラリから同定された化合物PP1～PP25に関して、TBK1によるRegnase-1のリン酸化を阻害する活性、およびTBK1とRegnase-1との結合を阻害する活性が測定された。結果をまとめたものを表 1 3 に示す (各化合物による50%阻害濃度 (μM) を記載)。

その結果、TBK1によるリン酸化に関して、全長Regnase-1 (FL_Reg1) を基質として用いた場合、PP1～PP25はいずれも阻害活性を示した。Regnase-1のCTD欠損体($\Delta\text{CTD_Reg1}$; ヒトRegnase-1 (配列番号: 2) のアミノ酸1-546番目に相当) を基質として用いた場合、PP1とPP20以外の化合物で阻害活性が認められた。これらの化合物は、当該領域 (ヒトRegnase-1のアミノ酸1-546番目

の領域) に作用してリン酸化阻害活性を発揮している可能性が示唆された。

また、C末Regnase-1 (Reg1_301-599 ; ヒトRegnase-1 (配列番号 : 2) のアミノ酸301-599番目に相当) を基質として用いた場合、PP1、PP11、PP16およびPP20以外の化合物で阻害活性が認められた。これらの化合物は、当該領域 (ヒトRegnase-1の301-599番目の領域) に作用してリン酸化阻害活性を発揮している可能性が示唆された。TBK1と全長Regnase-1 (FL_Reg1) との結合に関しては、PP1とPP12以外の化合物で阻害活性が認められた。

[0389] [表13]

ID	リン酸化阻害			結合阻害
	FL_Reg1	Δ CTD_Reg1	Reg1_301-599	FL_Reg1
PP1	54.5	>62.1	>62.1	>62.1
PP2	21.7	17.6	22.4	15.5
PP3	3.9	5.7	7.1	3.1
PP4	61.9	44.9	35.9	24.4
PP5	24.2	19.1	40.4	11.5
PP6	13.1	14.5	16.8	19.2
PP7	2.2	4.7	4.6	17.9
PP8	2.9	5.5	6.0	6.5
PP9	4.2	6.6	7.9	8.3
PP10	0.2	0.2	0.4	9.8
PP11	29.1	55.6	>62.1	60.9
PP12	12.7	22.5	19.6	>62.1
PP13	8.4	17.7	18.0	13.8
PP14	3.1	5.2	6.8	7.1
PP15	8.5	9.5	17.4	13.7
PP16	52.4	38.1	>62.1	20.2
PP17	<0.06	0.3	<0.06	<0.06
PP18	0.6	1.8	0.9	<0.06
PP19	3.7	4.6	5.8	2.4
PP20	38.5	>62.1	>62.1	47.6
PP21	13.5	11.7	17.0	5.6
PP22	24.3	22.8	25.8	11.4
PP23	18.8	29.7	30.7	9.2
PP24	35.7	27.3	34.8	7.7
PP25	18.9	16.1	16.3	13.1

[0390] また、ペプチドライブラリから同定された化合物PP1～PP25に関して、IKK β によるRegnase-1のリン酸化を阻害する活性、およびIKK β とRegnase-1との結合を阻害する活性が測定された。結果をまとめたものを表14に示す（各化合物による50%阻害濃度（ μ M）を記載）。

その結果、IKK β によるリン酸化に関して、全長Regnase-1（FL_Reg1）を基質として用いた場合、PP1～PP25はいずれも阻害活性を示した。Regnase-1のCTD欠損体（ Δ CTD_Reg1；ヒトRegnase-1（配列番号：2）のアミノ酸1-546番目に相当）を基質として用いた場合、PP1、PP11、PP20、PP23以外の化合物で阻害活性が認められた。これらの化合物は、当該領域（ヒトRegnase-1のアミノ酸1-546番目の領域）に作用してリン酸化阻害活性を発揮している可能性が示唆された。また、C末Regnase-1（Reg1_301-599；ヒトRegnase-1（配列番号：2）のアミノ酸301-599番目に相当）を基質として用いた場合、PP1、PP11、PP20、PP23以外の化合物で阻害活性が認められた。これらの化合物は、当該領域（ヒトRegnase-1の301-599番目の領域）に作用してリン酸化阻害活性を発揮している可能性が示唆された。IKK β と全長Regnase-1（FL_Reg1）との結合に関しては、PP1、PP11、PP12、PP16、PP20、PP25以外の化合物で阻害活性が認められた。

[0391]

[表14]

ID	リン酸化阻害			結合阻害
	FL_Reg1	Δ CTD_Reg1	Reg1_301-599	FL_Reg1
PP1	28.1	>62.1	>62.1	>62.1
PP2	16.6	14.0	18.5	35.8
PP3	4.6	8.3	6.8	8.3
PP4	19.5	8.3	12.8	47.7
PP5	23.6	20.4	31.3	24.0
PP6	17.0	20.3	17.5	42.1
PP7	0.8	4.5	3.0	15.1
PP8	1.4	7.8	5.7	7.4
PP9	2.7	6.4	6.2	10.6
PP10	0.5	2.6	1.8	11.4
PP11	22.3	>62.1	>62.1	>62.1
PP12	6.8	27.0	20.7	>62.1
PP13	3.6	43.2	23.2	16.9
PP14	1.6	9.0	6.5	20.1
PP15	5.6	31.0	22.0	33.7
PP16	20.6	30.8	42.2	>62.1
PP17	0.5	0.3	0.7	<0.06
PP18	0.4	0.2	0.5	<0.06
PP19	5.4	12.6	10.1	5.8
PP20	24.7	>62.1	>62.1	>62.1
PP21	19.6	39.3	37.2	20.7
PP22	15.0	34.0	31.0	26.8
PP23	25.6	>62.1	>62.1	41.3
PP24	5.3	4.0	7.2	8.8
PP25	27.0	47.7	27.6	>62.1

[0392] 実施例 23. Regnase-1によるRNA分解活性の検出 (PP1-6)

組み換え型Regnase-1タンパク質によるRNA分解活性 (RNase活性) を測定する評価系により、化合物の同活性に及ぼす影響について評価を実施した。

(ヒトIL-8 RNAの調製)

ヒトIL-8遺伝子 (NCBI, Refseq NM_000584.3) の転写開始部位の上流にT7プロモータをもつDNAを化学合成により得たのち、大腸菌増幅のためpUC57ベクターにクローニングした。PCR法にてT7プロモータを含むIL-8遺伝子の一部を

増幅し、アガロースゲル電気泳動法により目的のDNA産物を含む画分を回収した。Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega社製)を用いて、PCR産物を精製した。ScriptMAX Thermo T7 transcription Kit (TOYOBO社製)のプロトコルに従い、試験管内RNAポリメラーゼ反応により、PCR産物からRNAを生成した。つづいて、RNeasy Mini Kit (QIAGEN社製)を用い、RNAを精製しアッセイに使用した。T7プロモータ融合IL-8遺伝子の増幅に使用したプライマーの配列を示す。

Fw(5' -3'): taatacgactcactataggg (配列番号 : 17)

Rv(5' -3'): gaaaatttaactgggtaccc (配列番号 : 18)

[0393] (Regnase-1 D141N変異体の調製)

Human Regnase-1全長配列のうち141番目のアミノ酸をアスパラギン酸 (D) からアスパラギン (N) となるように変異を導入し、N末端側にFLAGタグ、C末端側にビオチンリガーゼBirAの認識配列を持つコンストラクトを作成した。上記Regnase-1は哺乳細胞Expi293で発現、FLAG M2 アガロースおよびcOmplete His-Tag Purification Resin(Roche社)で精製し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより単離した。ビオチン化が必要な場合は、非特許文献(BMC biotechnology, 2008, 8, 41、および非特許文献Protein Science, 1999, 8, 921-929)の方法を用いた。

[0394] (Cleavage反応)

1mM DTT, 5mM MgCl₂, 0.0125mM ZnCl₂, 150mM NaCl含有Tris-HCl(pH7.5) バッファー中で、IL8 RNAおよびRegnase-1タンパク質 (FLAG_Regnase-1あるいはFLAG_Regnase-1(D141N)) を終濃度100nMになるよう混合し、37°Cで1時間反応させることによりRegnase-1によるRNA cleavage反応を行った。化合物評価の際にはDMSOに溶解した化合物を終濃度12.5 μM、2.5 μMになるよう混合液に加え、同様に反応させた。

[0395] (RNAの検出)

反応終了後、Taqman PCR法により反応溶液中のIL8 RNA濃度を定量した。反応に使用した濃度既知のIL8 RNAを段階希釈して標準曲線を作成し、反応溶液

中のIL8 RNA濃度を算出した。Taqman PCRはQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN社製)に従い実施し、LightCycler 480 II (Roche社製)にて解析を実施した。使用したTaqmanプローブを下記に示した。

IL8 (Applied biosystems社製、Hs01553824_g1)

[0396] (結果)

RNA濃度は二重測定した結果の平均値を示した。RNA分解活性の無いD141N変異体に比べて、Regnase-1を加えた際にRNA濃度の減少が見られたことから、この評価系においてRegnase-1に依存したRNA分解が確認された。また、Regnase-1と化合物を共存させたところ、いずれの化合物もRegnase-1によるRNA分解活性を阻害しなかった(図28)。図29にD141Nに化合物を加えた際の影響を示す。いずれの化合物もRNAの検出自体に大きく影響を与えないことが示された。

[0397] 実施例24. Regnase-1によるRNA分解活性の検出 (PP7-25)

実施例23に記載した方法と同様にして、化合物によるRNase活性に及ぼす影響について評価を実施した。

[0398] (Cleavage反応)

0.75mM DTT, 3.8mM MgCl₂, 9.4μM ZnCl₂, 150mM NaCl含有Tris-HCl(pH7.5)バッファー中で、IL8 RNAおよびRegnase-1タンパク質(FLAG_Regnase-1あるいはFLAG_Regnase-1(D226N, D244N))を終濃度100nMになるよう混合し、37°Cで1時間反応させることによりRegnase-1によるRNA cleavage反応を行った。化合物評価の際にはDMSOに溶解した化合物を終濃度12.5μM、2.5μMになるよう混合液に加え、同様に反応させた。

[0399] (RNAの検出)

反応終了後、Taqman PCR法により反応溶液中のIL8 RNA濃度を定量した。反応に使用した濃度既知のIL8 RNAを段階希釈して標準曲線を作成し、反応溶液中のIL8 RNA濃度を算出した。Taqman PCRはQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN社製)に従い実施し、LightCycler 480 II (Roche社製)にて解析を実施した。使用したTaqmanプローブを下記に示した。

IL8 (Applied biosystems社製、Hs01553824_g1)

[0400] (Regnase-1_wtおよびRegnase-1_D226N, D244Nの調製)

ヒトRegnase-1全長配列または全長配列のうち226番目のアミノ酸をアスパラギン酸 (D) からアスパラギン (N) となるような変異と、244番目のアミノ酸をアスパラギン酸 (D) からアスパラギン (N) となるような変異を導入し、N末端側にFLAGタグ、C末端側にSortase認識配列(Leu-Pro-Met-Thr-Gly) (配列番号: 49) およびヒスチジンタグを持つコンストラクトを作成した (Regnase-1_wtおよびRegnase-1_D226N, D244N)。上記Regnase-1は哺乳細胞Expi293で発現、FLAG M2 アガロースと必要に応じてさらにcOmplete His-Tag Purification Resin(Roche社)で精製し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより単離した。

[0401] (結果)

RNA濃度は二重測定した結果の平均値を示した。RNA分解活性の無いD226N, D244N変異体に比べて、Regnase-1を加えた際にRNA濃度の減少が見られたことから、この評価系においてRegnase-1に依存したRNA分解が確認された。また、Regnase-1と化合物を共存させたところ、いずれの化合物もRegnase-1によるRNA分解活性を阻害しなかった (図30)。図31にD226N, D244Nに化合物を加えた際の影響を示す。いずれの化合物もRNAの検出自体に大きく影響を与えないことが示された。

[0402] 実施例 25. Regnase-1とペプチド化合物 (PP1~PP25) の結合 (Affinity mass分析)

lipidure(Lipidure-CM5206)(NOF CORPORATION, 71S42000001)でコーティングされた96 PP plate (Greiner bio-one, 651201) へ2 μ LのTris-Buffer(25 mM Tris-NaOH pH 8.3, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 % DMSO)を分注し、その後、DMSOにて1 mM に調整したDMSOサンプルをLABCYTE ECHO (登録商標) アコースティック 分注システムで20nLずつ加えた。さらに予めTris-Bufferを用い 1 μ M FL_Reg1に調製したタンパク18 μ Lを加え(最終化合物濃度1 μ M) 暗所にて1時間、23 $^{\circ}$ Cでインキュベーションした。その後、96-well, 400

μL , Hydrophilic PVDF $0.45\mu\text{m}$, Long drip(Harvard, 74-5556)に、あらかじめ膨潤させておいたP-2, Fine (Bio-Rad, 1504114)を $100\mu\text{L}$ ずつ添加し、数回bufferを用い2000XG, 2分間遠心にてコンディショニングを実施した。その次に、インキュベーション後のサンプル $20\mu\text{L}$ をコンディショニング完了後の96-well, $400\mu\text{L}$, Hydrophilic PVDF $0.45\mu\text{m}$, Long dripに添加し2000XG, 2分間遠心にてSEC処理をした。SECからの通液に0.1%蟻酸 (LC/MS grade, 067-04531, 富士フイルム和光純薬工業(株))が加えられたアセトニトリル (LC/MS grade, 富士フイルム和光純薬工業(株))を $32\mu\text{L}$ 加え1800XG, 5分間遠心し上澄みを分析サンプルとしLC/MSにて測定した。結果を表15に示す。PP1~P25のいずれのペプチド化合物についてもRegnase-1への結合が検出された。

[0403] [表15]

ID	AS-MS ratio(%)	ID	AS-MS ratio(%)	ID	AS-MS ratio(%)
PP1	21.8	PP11	5.1	PP21	15.1
PP2	14.2	PP12	21.0	PP22	14.5
PP3	1.2	PP13	0.1	PP23	28.6
PP4	37.5	PP14	4.2	PP24	51.1
PP5	20.8	PP15	66.7	PP25	6.9
PP6	6.4	PP16	17.9		
PP7	15.8	PP17	67.8		
PP8	6.2	PP18	71.6		
PP9	14.8	PP19	2.1		
PP10	3.7	PP20	85.0		

[0404] 実施例26. 表面プラズモン共鳴法による競合性評価

Regnase-1結合分子間の競合性評価は、Biacore T200 (GE healthcare) を用いた方法で測定され、解析された。Sensor chip Protein A (GE healthcare) 上に抗TFPI-tagペプチド抗体を介してキャプチャーされたリガンドPP7+tag、PP10+tag、またはPP23+tagに対して、アナライトとして $3\mu\text{M}$ Regnase-1溶液または $3\mu\text{M}$ Regnase-1と $10\mu\text{M}$ ペプチド化合物の混合液が添加されることでRegnase-1の結合が検出され、その比較から競合性が評価された。センサーチップ表面の再生には10mM Glycine (pH 1.5)溶液が用いられた。ランニング

バッファーには、10mM Hepes-NaOH, 150mM NaCl (Nacalai tesque), 5mM DTT (Wako), 10mM MgCl₂ (Wako), 0.05% Tween20 (Junsei-Kagaku), 1% DMSO (Sigma-aldrich)が用いられた。測定は全て20℃で実施され、アナライトの調製にはランニングバッファーが使用された。

得られた結合レスポンスはBiacore T200 Evaluation Software (GE health care) にてsolvent correctionおよびdouble-referencingの処理が行われた。処理されたレスポンスはリガンドの固定化量で割られることで、ノーマライズされた。「ノーマライズされたRegnase-1溶液添加時のレスポンス」にて「ノーマライズされたRegnase-1とペプチド化合物の混合液添加時のレスポンス」を割った値を算出し、各ペプチド化合物の競合性の指標とした。解析の結果得られた競合性指標は表 1 6 に記された。競合性指標が0.8以下となったペプチド化合物は、PP7+tag、PP10+tag、またはPP23+tag と競合すると判断された。結果より、PP7+tagと競合するペプチド化合物、PP10+tagと競合するペプチド化合物、PP23+tagと競合するペプチド化合物、PP7+tagおよびPP23+tagと競合するがPP10+tagと競合しないペプチド化合物が見出された。

[0405]

[表16]

		リガンド		
		PP7+tag	PP10+tag	PP23+tag
アナライズ	PP1	0.74	0.79	0.78
	PP2	-0.10	0.32	-0.01
	PP3	-0.13	0.19	-0.02
	PP4	0.63	1.05	0.67
	PP5	-0.09	0.31	0.00
	PP6	-0.15	0.33	-0.03
	PP7	-0.09	0.15	0.00
	PP8	-0.11	0.14	-0.02
	PP9	-0.11	0.16	-0.02
	PP10	-0.10	0.12	-0.01
	PP11	0.91	0.94	0.92
	PP12	0.90	0.92	0.92
	PP13	0.91	0.95	0.93
	PP14	0.68	0.88	0.76
	PP15	-0.12	0.59	-0.01
	PP17	0.98	0.96	0.99
	PP18	0.98	0.99	0.99
	PP19	0.87	0.95	0.91
	PP20	-0.41	0.69	0.35
	PP21	-0.10	0.17	-0.01
	PP22	-0.11	0.15	-0.02
	PP23	-0.11	0.15	-0.01
	PP24	0.94	0.91	0.96
	PP25	0.97	0.97	0.99
	Regnase-1 のみ	0.93	0.96	0.94
		1.13	1.02	1.09
		0.99	1.02	0.98
		0.96	1.00	0.98

[0406] 実施例 27. 抗Regnase-1抗体の作製

(ペプチド抗原の調製)

ヒトRegnase-1全長配列のうち438番目のセリンおよび442番目のセリンを含む配列の末端にシステイン残基をつなげたペプチドCLDSGIGSLESQMSELWGVRGG

(配列番号：50)、および516番目のセリンを含む配列の末端にシステイン残基をつなげたペプチドAFPPREYWSEPYLPPPTC-NH₂ (配列番号：51) を合成

した。ペプチドは溶解度を上げるためにDMSOを必要に応じて添加し、Imject Maleimide Activated mcKLH (Thermo Fisher scientific)を用いて、システイン残基にKLHをコンジュゲートし、D-PBSで透析を行った。

[0407] (抗非リン酸化Regnase-1ペプチド抗体)

ヒトRegnase-1全長配列のうち438番目のセリンおよび442番目のセリンを含む配列の末端にシステイン残基をつなげたペプチドCLDSGIGSLESQMSELWGVGG、および516番目のセリンを含む配列の末端にシステイン残基をつなげたペプチドAFPPREYWSEPYPLPPPTC-NH₂のシステイン残基にKLHをコンジュゲートしたタンパク質の混合物、もしくは、ビオチンをコンジュゲートしたペプチドCLDSGIGSLESQMSELWGVGG、およびビオチンをコンジュゲートしたペプチドAFPPREYWSEPYPLPPPTC-NH₂とストレプトアビジンタンパク質の混合物をウサギに投与して免疫感作を行った。免疫感作されたウサギの細胞を溶解し、RTおよびPCRを行って抗体遺伝子を増やしたのちに、抗体遺伝子をプラスミドに組み込んだ。抗体遺伝子を含むプラスミドについては大腸菌に導入して培養し、培養した大腸菌からプラスミドを精製した。抗体遺伝子が導入されたプラスミドはHEK293細胞に導入し、培養上清中に抗体を発現させた。培養上清中の抗体はProtein Aにより精製した。プラスミドをシーケンス解析して、Sequencher Ver5とGenetyx Ver 14にて抗体配列を決定した。取得された抗Regnase-1抗体の名称と、重鎖および軽鎖アミノ酸配列をそれぞれ表17に示す。

[0408] [表17]

抗体の名称	重鎖アミノ酸配列	軽鎖アミノ酸配列
REA0023	配列番号：20	配列番号：21
REA0027	配列番号：22	配列番号：23
REB0007	配列番号：24	配列番号：25
REB0014	配列番号：26	配列番号：27
REB0022	配列番号：28	配列番号：29

[0409] (抗非リン酸化Regnase-1ペプチド抗体のペプチドおよびヒトRegnase-1全長への結合確認)

ビオチンをコンジュゲートしたFL_Reg1、ビオチンをコンジュゲートしたペプチドCLDSGIGSLESQMSELWGVGG、ビオチンをコンジュゲートしたペプチドAFP

PREYWSEPYPLPPPTC-NH₂、および、ビオチン化されたBSA(Sigma, A8549)をそれぞれストレプトアビジン固相化ビーズに結合させた。

それらのビーズに抗Regnase-1抗体を混ぜて反応させた。その後、Anti-Rabbit IgG1 Alexa488 (molecular probes, A21244)を混ぜて反応させ、iQue screener PLUS (intellicyt社)にて解析を実施した。データはFlowJo ver10にて解析した。

[0410] (結果)

ビオチン化されたBSA、ペプチド1 (CLDSGIGSLESQMSELWGVRGG) , ペプチド2 (AFPPREYWSEPYPLPPPTC-NH₂) , もしくはFL_Reg1への抗非リン酸化Regnase-1ペプチド抗体の結合をヒストグラムに示す (図32) 。ビオチン化されたBSAへの結合 (破線) 、ペプチド1, ペプチド2, もしくはFL_Reg1への結合 (実線) をオーバーレイした。REA0023とREA0027はビオチン化されたBSAへの結合に比べ、ペプチド1およびFL_Reg1に強く結合した。REB0007, REB0014, REB0022はビオチン化されたBSAへの結合に比べ、ペプチド2およびFL_Reg1に強く結合した。

[0411] 実施例 28. 抗Regnase-1抗体のRegnase-1リン酸化阻害活性評価

(方法)

2 mM DTT、100 μ M バナジウム酸ナトリウム、 2 mM塩化マンガン、15 μ M ATPを添加したKinase Assay Buffer III (SignalChem 社製) を含む溶液 (ATP buffer) に脱リン酸化Regnase-1が150 nMとなるよう混合した。この溶液4 μ lと50 μ g/mlあるいは15 μ g/mlの抗Regnase-1抗体を含むHEPES Buffered Saline 4 μ lを混合し、1時間反応させた。反応液に150 nMの各キナーゼ (IKK β あるいはTBK1) を含むATP buffer を4 μ l混合し、さらに1時間反応させた。反応後、4 $\times$ Laemmli Sample buffer (Bio-Rad 社製) を4 μ l加え95°Cで5分間インキュベートすることで、タンパクの変性処理を行った。このサンプルを3分間氷冷した後、イージーセパレーター (Wako 社製) に設置したスーパーセッパ phos-tag 7.5% 17ウェル (Wako 社製) に10 μ l添加した。マーカーとしてワイドビュー プレスティンタンパク質マーカーIII (Wako 社製) を10 μ l添加

し、イーザーセパレーター内はTris-Glycine SDS buffer (Takara 社製) で満たした。175 Vで70分泳動した後、5 mM EDTA, 20% MeOHを含む10% Tris-Glycine SDS bufferで10分洗浄した。洗浄をさらに2回行った後、20% MeOHを含む10% Tris-Glycine SDS bufferで10分洗浄した。洗浄後ゲルをTransBlotTurbo Transfer Pack (Bio-Rad 社製) で挟み、BioRad Transfer Turbo (Bio-Rad 社製) を用い転写した。転写後のPVDFメンブレンをTris Buffered Saline with Tween (登録商標) 20 (TBS-T) (Takara 社製) で洗浄し、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (登録商標) (TOYOBO 社製) に浸して30分間ブロッキングした。その後4000倍希釈したリン酸化Regnase-1に対する抗体を含むCan Get Signal_Solution.1 (TOYOBO 社製) に浸し、4°Cで一晩反応させた。翌日、TBS-Tでメンブレンを15分3回洗浄し、2000倍希釈したAnti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology 社製) を含むCan Get Signal_Solution.2 (TOYOBO 社製) に浸し、室温で1時間反応させた。TBS-Tで15分3回洗浄し、Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo 社製) を添加してペルオキシダーゼ反応を行った。化学発光はImage Quant LAS4000 mini (GE Healthcare 社製) を使用して検出した。

[0412] (結果)

各キナーゼの処置により、リン酸化Regnase-1のバンドが検出された (図33A)。バンドの濃さをImage Quant-TL (GE Healthcare 社製) で測定した。化合物を加えていないControl群でキナーゼを加えたサンプルのバンドの濃さを1とした時の、化合物を加えたサンプルのバンドの濃さの相対値を算出した。終濃度16.7 μ g/ml、5.0 μ g/mlのREA0023、REA0027を加えると、IKK β 処置時のリン酸化Regnase-1のバンドの濃さが減少した (図33B)。同様に、終濃度16.7 μ g/ml、5.0 μ g/mlのREB0007、REB0014、REB0022を加えると、TBK1処置時のリン酸化Regnase-1のバンドの濃さが減少した (図33C)。これらの結果は、抗Regnase-1抗体が、キナーゼ (IKK β あるいはTBK1) によるRegnase-1のリン酸化を抑制することを示している。

[0413] 実施例 29. Regnase-1によるRNA分解活性の検出

実施例 23 に記載した方法と同様にして、抗Regnase-1抗体によるRNase活性に及ぼす影響について評価を実施した。

[0414] (Cleavage反応)

0.75mM DTT, 3.8mM MgCl₂, 9.4μM ZnCl₂, 150mM NaCl含有Tris-HCl(pH7.5)バッファーを用いて、IL8 RNAおよびRegnase-1タンパク質 (FLAG_Regnase-1あるいはFLAG_Regnase-1(D226N, D244N)) を終濃度100nMになるよう混合し、37℃で1時間反応させることによりRegnase-1によるRNA cleavage反応を行った。抗体評価の際にはHBS (HEPES-buffered saline) に溶解した抗体を終濃度30μg/ml, 9.0μg/mlになるよう混合液に加え、同様に反応させた。

[0415] (RNAの検出)

反応終了後、Taqman PCR法により反応溶液中のIL8 RNA濃度を定量した。Taqman PCRはQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN社製)に従い実施し、Light Cycler 480 II (Roche社製)にて解析を実施した。使用したTaqmanプローブを下記に示した。

IL8 (Applied biosystems社製、Hs01553824_g1)

[0416] (結果)

RNA濃度は二重測定した結果の平均値を示した。図34に示されるように、RNA分解活性の無いD226N, D244N変異体に比べて、Regnase-1を加えた際にRNA濃度の減少が見られたことから、この評価系においてRegnase-1に依存したRNA分解が確認された。また、Regnase-1と抗Regnase-1抗体を共存させたところ、いずれの抗体もRegnase-1によるRNA分解活性を阻害しなかった。図35にD226N, D244Nに化合物を加えた際の影響を示す。いずれの抗体もRNAの検出自体に大きく影響を与えないことが示された。

[0417] 前述の発明は、明確な理解を助ける目的のもと、実例および例示を用いて詳細に記載したが、本明細書における記載および例示は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書で引用したすべての特許文献および科学文献の開示は、その全体にわたって、参照により明示的に本明細書に組み入れられる。

産業上の利用可能性

[0418] 本発明により、例えば、Regnase-1におけるSer残基のリン酸化を阻害することが疾患の治療および／または予防等に有効であることが見いだされた。また、例えば、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの因子とRegnase-1との結合を阻害することが疾患の治療および／または予防等に有効であることが見出された。本発明は、Regnase-1が関与する疾患の治療および／または予防の分野において有用である。

請求の範囲

- [請求項1] Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子を含有する、Regnase-1が関与する疾患を治療および／または予防するための組成物。
- [請求項2] TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害するRegnase-1結合分子を含有する、Regnase-1が関与する疾患を治療および／または予防するための組成物。
- [請求項3] 前記Regnase-1が関与する疾患が、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、線維化疾患およびRNAウイルス感染症からなる群より選択される少なくとも一つの疾患である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項4] 前記Regnase-1が関与する疾患がIL-17、IL-1、IL-36およびTLRリガンドからなる群より選択される少なくとも一つの因子が、疾患の形成、増悪および／または継続に関与する疾患である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項5] 前記Regnase-1が関与する疾患が、IL6、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つの因子が、疾患の形成、増悪および／または継続に関与する疾患である、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項6] Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子を含有する、細胞、組織または臓器の線維化；または上皮の過形成を抑制するための組成物。
- [請求項7] Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つのSer残

基のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子を含有する、IL6、IL1a、CXCL1、CXCL2、HBEGF、CTGF、DDR1およびPDGFBからなる群より選択される少なくとも一つのmRNAの発現を抑制するための組成物。

[請求項8] 前記配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置が、(i) 配列番号1の513、494、439、および435位；または、(ii) 配列番号2の516、497、442、および438位である、請求項1および請求項3～7のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項9] Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つのSer残基のリン酸化を指標とする、Regnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定するための方法。

[請求項10] 以下(a)および(b)の工程を含む、請求項9に記載の方法：

(a) Regnase-1をリン酸化し得るキナーゼとRegnase-1とを被験物質の存在下で混合し、前記キナーゼによるRegnase-1のリン酸化を検出する工程；

(b) 被験物質の非存在下と比較して、前記キナーゼによるRegnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定する工程。

[請求項11] 前記キナーゼが、TBK1、IKKi、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つのキナーゼである、請求項10に記載の方法。

[請求項12] Regnase-1のリン酸化を阻害する物質を特定するための組成物であって、予め定められた量のキナーゼおよびRegnase-1を含む前記組成物。

[請求項13] 以下(c)および(d)の工程を含む、TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1との結合を阻害する物質を特定するための方法：

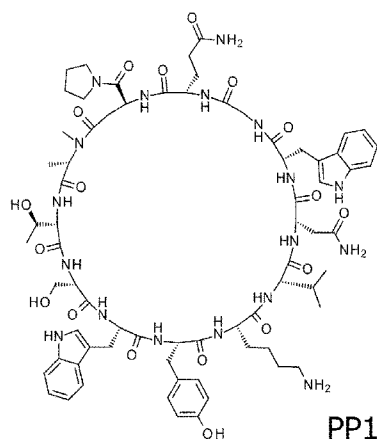
(c) TBK1、IKKi、Act-1、IKKおよびIRAKからなる群より選択される少なくとも一つの結合分子とRegnase-1とを被験物質の存在下で混合し、前記結合分子とRegnase-1との結合活性を測定する工程；

(d) 被験物質の非存在下と比較して、前記結合分子とRegnase-1との結合活性を低減させ得る物質を特定する工程。

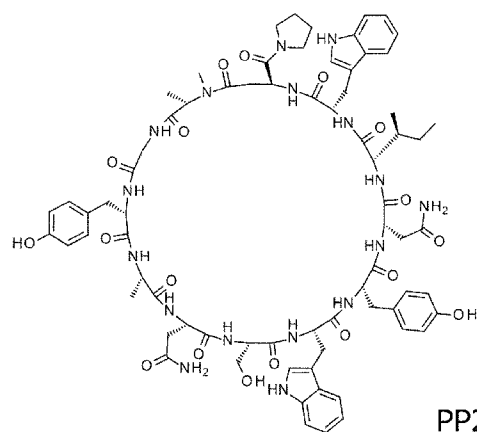
[請求項14] 配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のアミノ酸残基がリン酸化されたRegnase-1を特異的に認識する抗体。

[請求項15] Regnase-1における配列番号1の513、494、439、および435位のそれぞれに相当する位置からなる群より選択される少なくとも一つの位置のSer残基のリン酸化を阻害するRegnase-1結合分子。

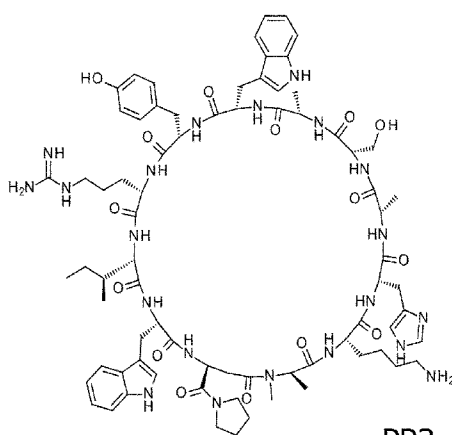
[請求項16] Regnase-1への結合について、以下PP1～PP25より選択される少なくとも一つの化合物と競合する、請求項15に記載のRegnase-1結合分子。



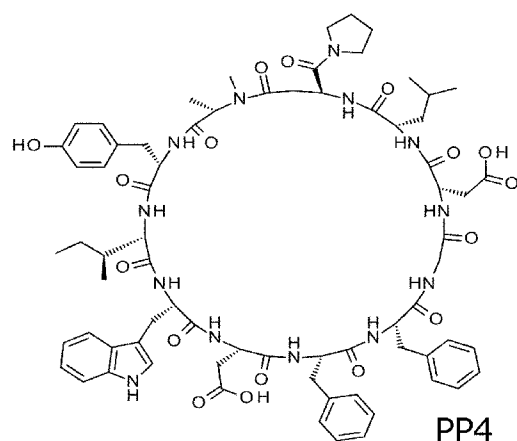
PP1



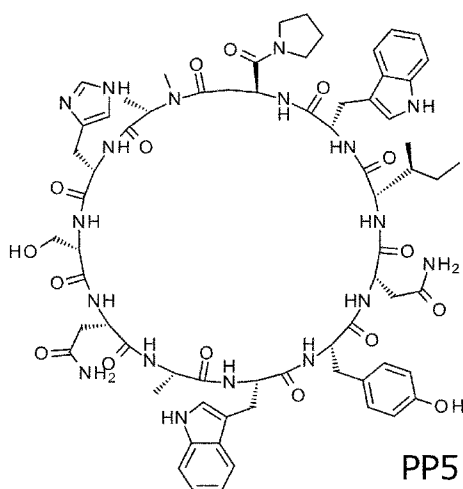
PP2



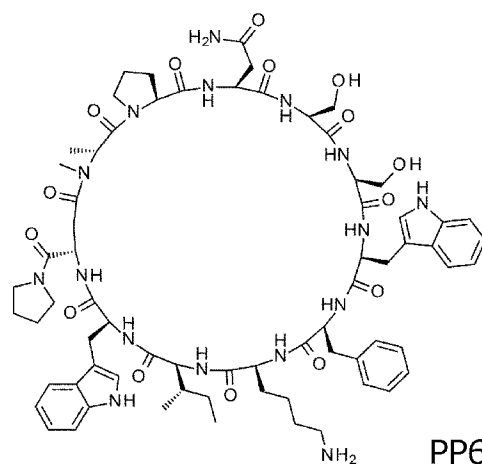
PP3



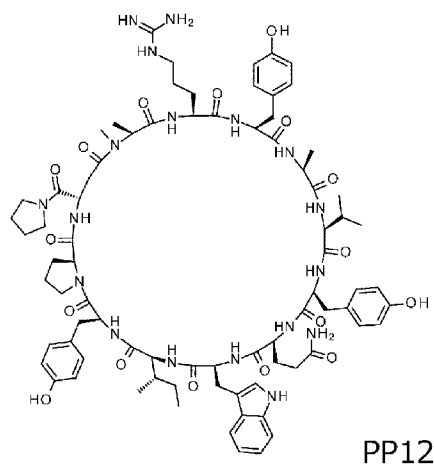
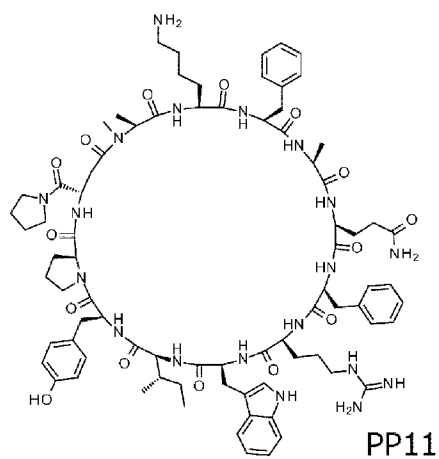
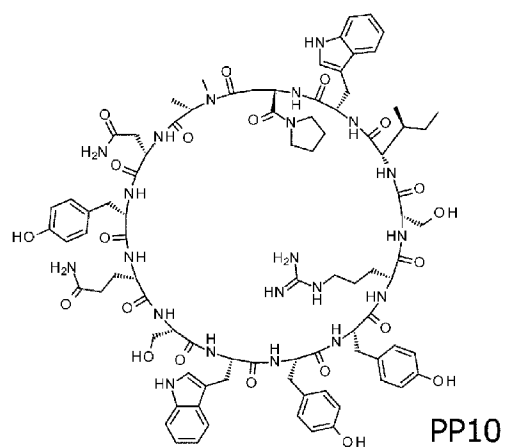
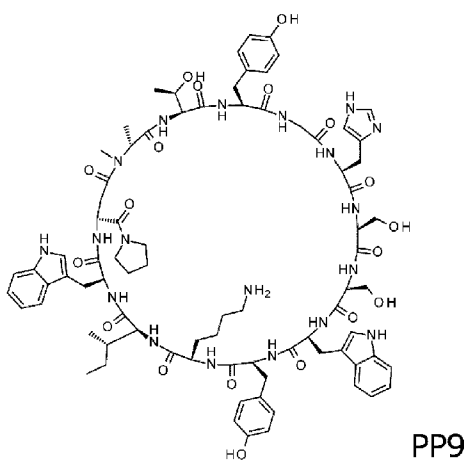
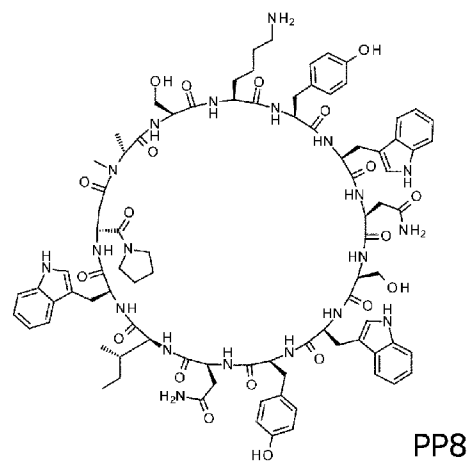
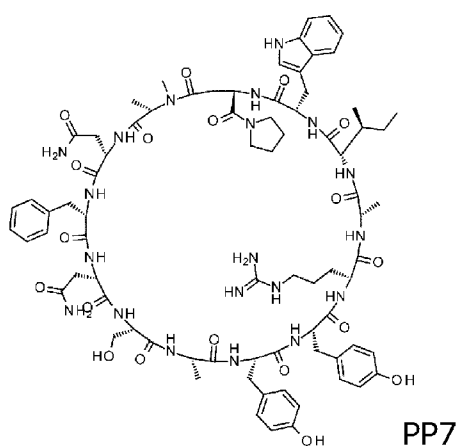
PP4

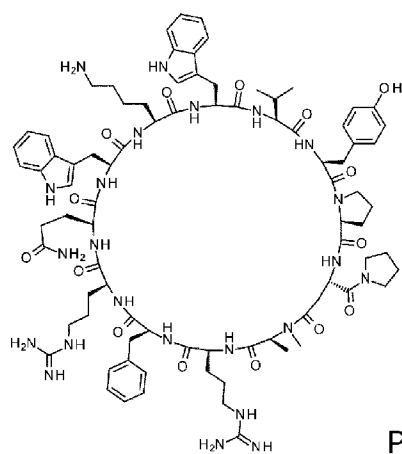


PP5

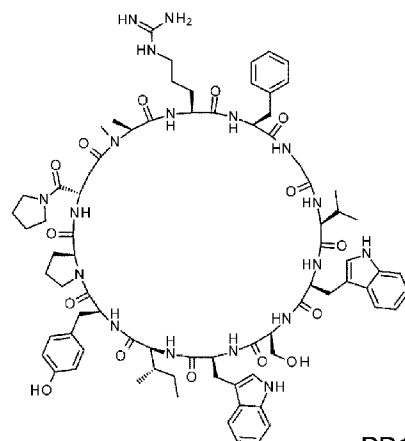


PP6

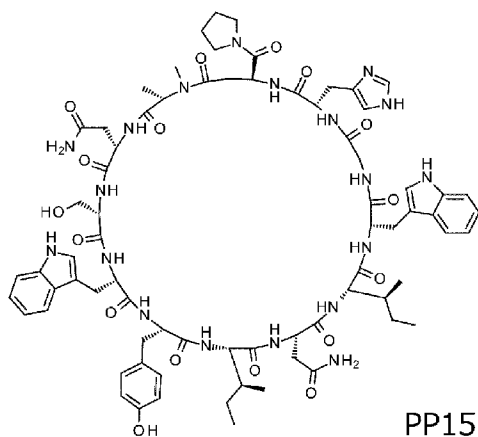




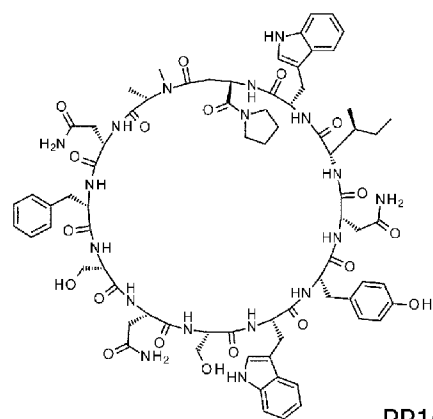
PP13



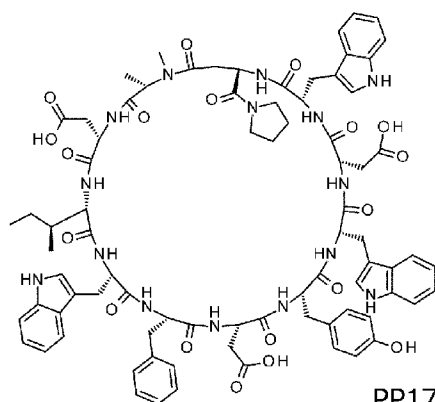
PP14



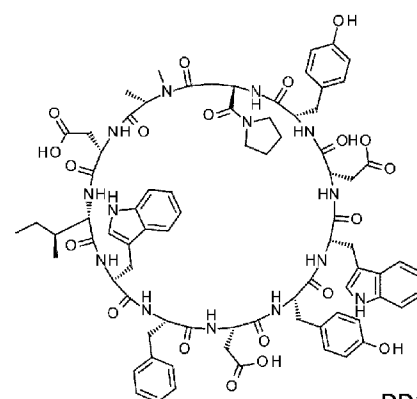
PP15



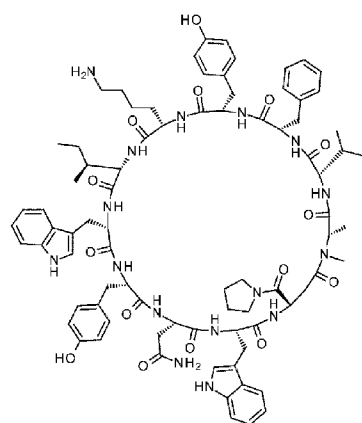
PP16



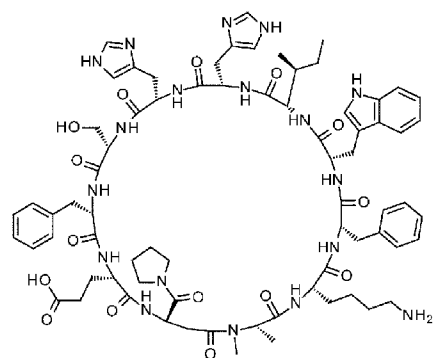
PP17



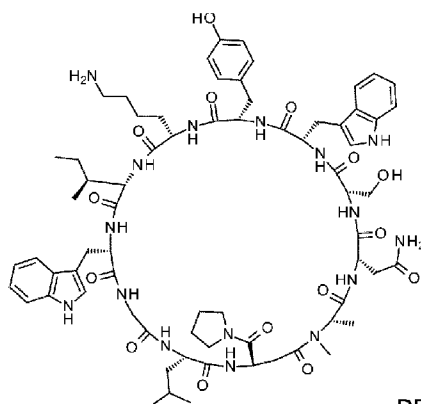
PP18



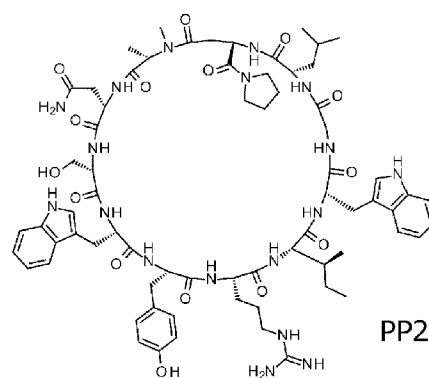
PP19



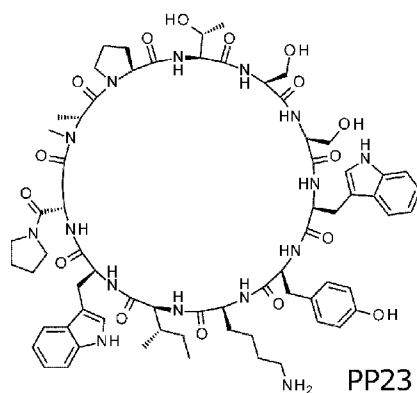
PP20



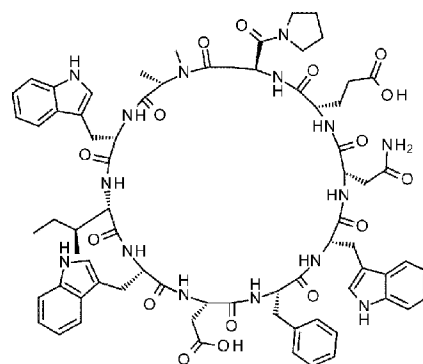
PP21



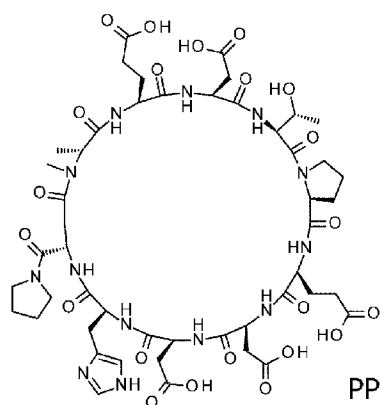
PP22



PP23



PP24



PP25

[請求項17] 以下（i）および（i i）のSer残基のリン酸化を阻害する、請求項15または16に記載のRegnase-1結合分子：

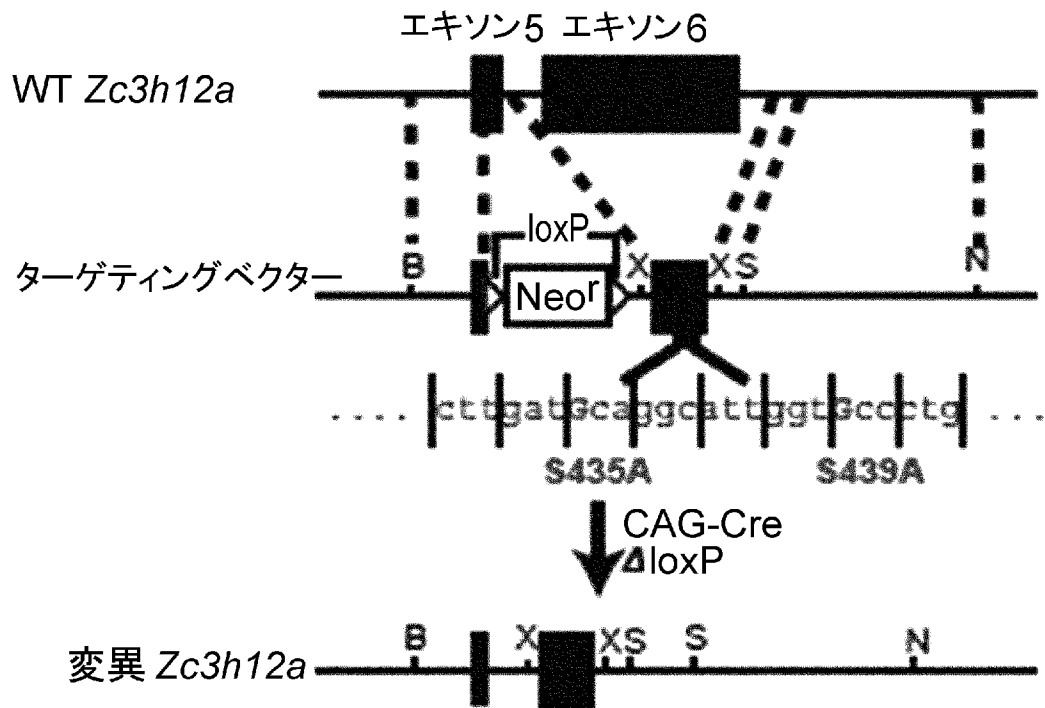
（i）Regnase-1における配列番号1の513および494位のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のSer残基；および

（i i）Regnase-1における配列番号1の439および435位のそれぞれに相当する位置のいずれか又は両方のSer残基。

[ 1-1]

<u>Q5D1E7</u>	ZC12A	マウス	1	MSDPCGTKPVQESNPTMSLWSLEDRHSSQGRPQPDQDPVAKAFTSELOMKVDFFRKLGY	60
<u>Q5D1E8</u>	ZC12A	ヒト	1	MSGPCGKPKVLEASPTMSLWFEFEDSHSRQGTFRPGQELAAEEASALELOMKVDFFRKLGY	60
<u>Q5D1E7</u>	ZC12A	マウス	61	SSSEIHSVLOKLGVOADTNTVLGELVKHGSATERECOALTAPSPQPLVPRGGSTPKPST	120
<u>Q5D1E8</u>	ZC12A	ヒト	61	SSTEIHSVLOKLGVOADTNTVLGELVKHGTATERERQTSPPDPCPQLPLVPRGGGTPKAPN	120
<u>Q5D1E7</u>	ZC12A	マウス	121	LEPSLPEEDREGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFCRGILLAVNWFLERGHDTITVFVP	180
<u>Q5D1E8</u>	ZC12A	ヒト	121	LEPFLPEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFCRGILLAVNWFLERGHDTITVFVP	180
<u>Q5D1E7</u>	ZC12A	マウス	181	SWRKEQPRPDVPITDQHILRELEKKKILVETPSRRRVGGKRVVCYDDRFIVKLAFESDGVV	240
<u>Q5D1E8</u>	ZC12A	ヒト	181	SWRKEQPRPDVPITDQHILRELEKKKILVETPSRRRVGGKRVVCYDDRFIVKLAYESDGIV	240
<u>Q5D1E7</u>	ZC12A	マウス	241	VSNDTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFVNDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLPSE	300
<u>Q5D1E8</u>	ZC12A	ヒト	241	VSNDTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFVNDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE	300
<u>Q5D1E7</u>	ZC12A	マウス	301	HRKQPCPYGKCKTYGIKCRFFHFERPSPQRSVADELARANALLSPPTFVKDKSSQRPSP	360
<u>Q5D1E8</u>	ZC12A	ヒト	301	HRKQPCPYGRKCTYGIKCRFFHFERPSPQRSVADELARANALLSPPRAPSKDKNGRRPSP	360
<u>Q5D1E7</u>	ZC12A	マウス	361	ASQSSSVSLEAEPGSLDGKKLGARSSPGPHREGSPQTCAPAGRSLLPVSGG---SEFGPTEW	417
<u>Q5D1E8</u>	ZC12A	ヒト	361	SSQSSSLTSESEQCSLDGKKLGAOASPGSRQEGLTQTYAPSGRSLAPSGSGSSFGPTDW	420
<u>Q5D1E7</u>	ZC12A	マウス	418	LAHTQDSLPTYTSQECIDSGIGSLESOMSELWVRGGSPGESGPTRGPYAGYHSYGSKVPA	477
<u>Q5D1E8</u>	ZC12A	ヒト	421	LPQTLDLPLVVSQDCLDSGIGSLESOMSELWVRGGGEPGPPRAPYTGYSPTYGSELPA	480
<u>Q5D1E7</u>	ZC12A	マウス	478	APSFSPERPAMGAGHFSVPTDYVPPPPPTYPSREYWSEPYFLPPPTFVLQEPQRPSPGAGG	537
<u>Q5D1E8</u>	ZC12A	ヒト	481	TAAFSAFGRAMGAGHFSVPADYPPAPPAPFPFREYWSEPYFLPPPTSVLQEPFVQSPGAGR	540
<u>Q5D1E7</u>	ZC12A	マウス	538	GPWGRVGDIAKERAGVYTKLCGVFFPFPPLVEAVMRRFPQLLDPPQQLAAEILSYKSOHLSE	596
<u>Q5D1E8</u>	ZC12A	ヒト	541	SPWGRAGSLAKEQASVYTKLCGVFFPFPPLVEAVMGRFPQLLDPPQQLAAEILSYKSOHPSE	599

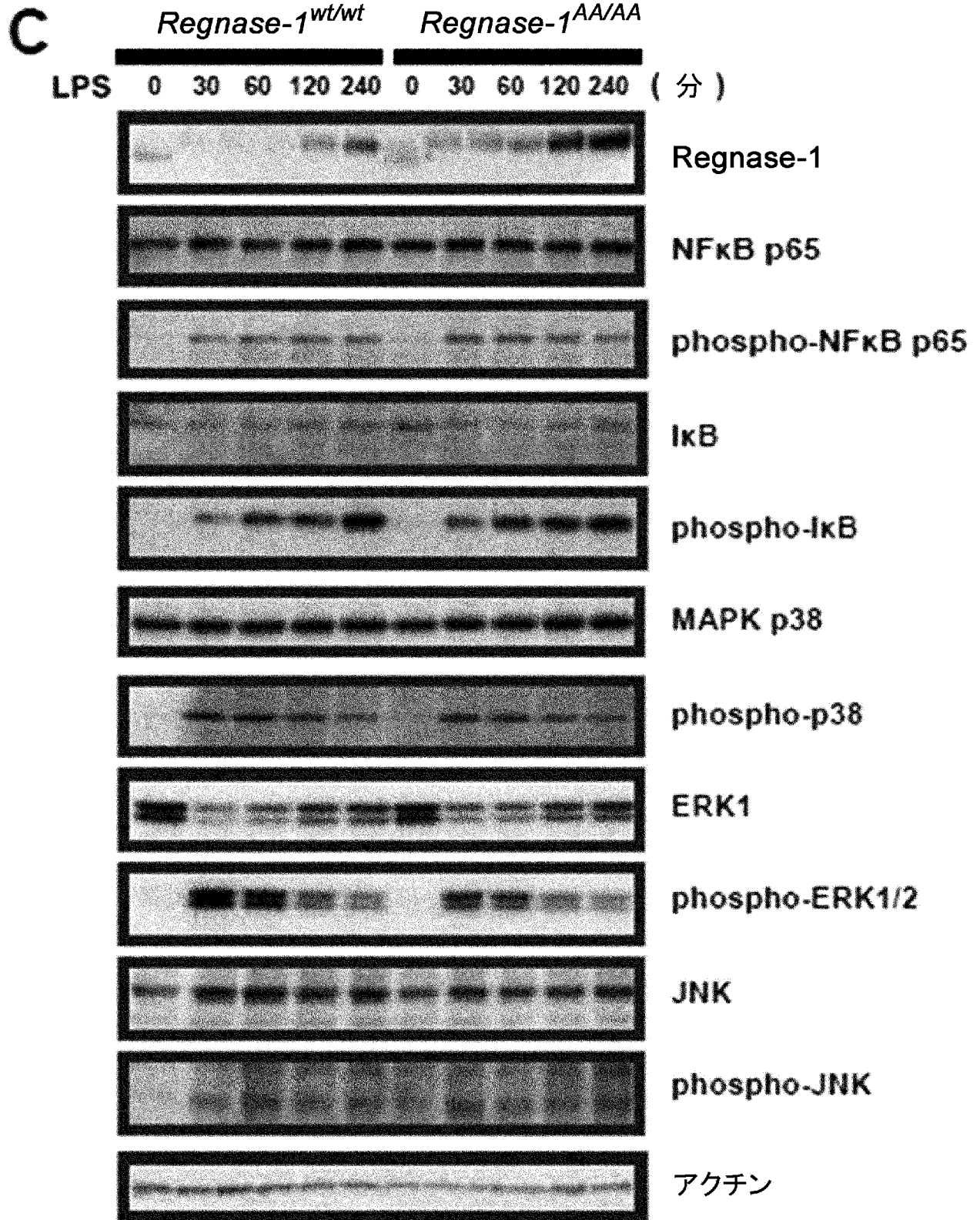
[図1-2]

A**B**

Leu Asp Ala Gly Ile Gly Ala Leu



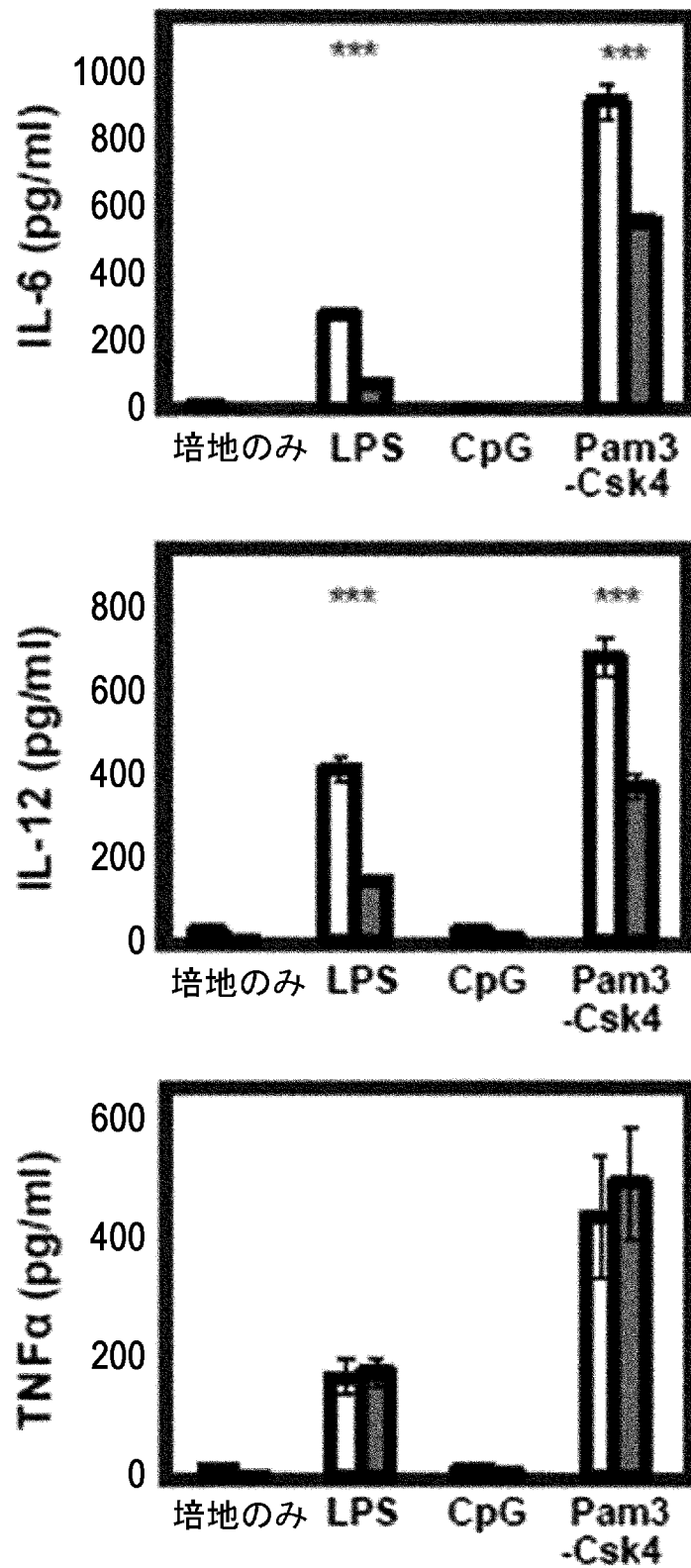
[図1-3]



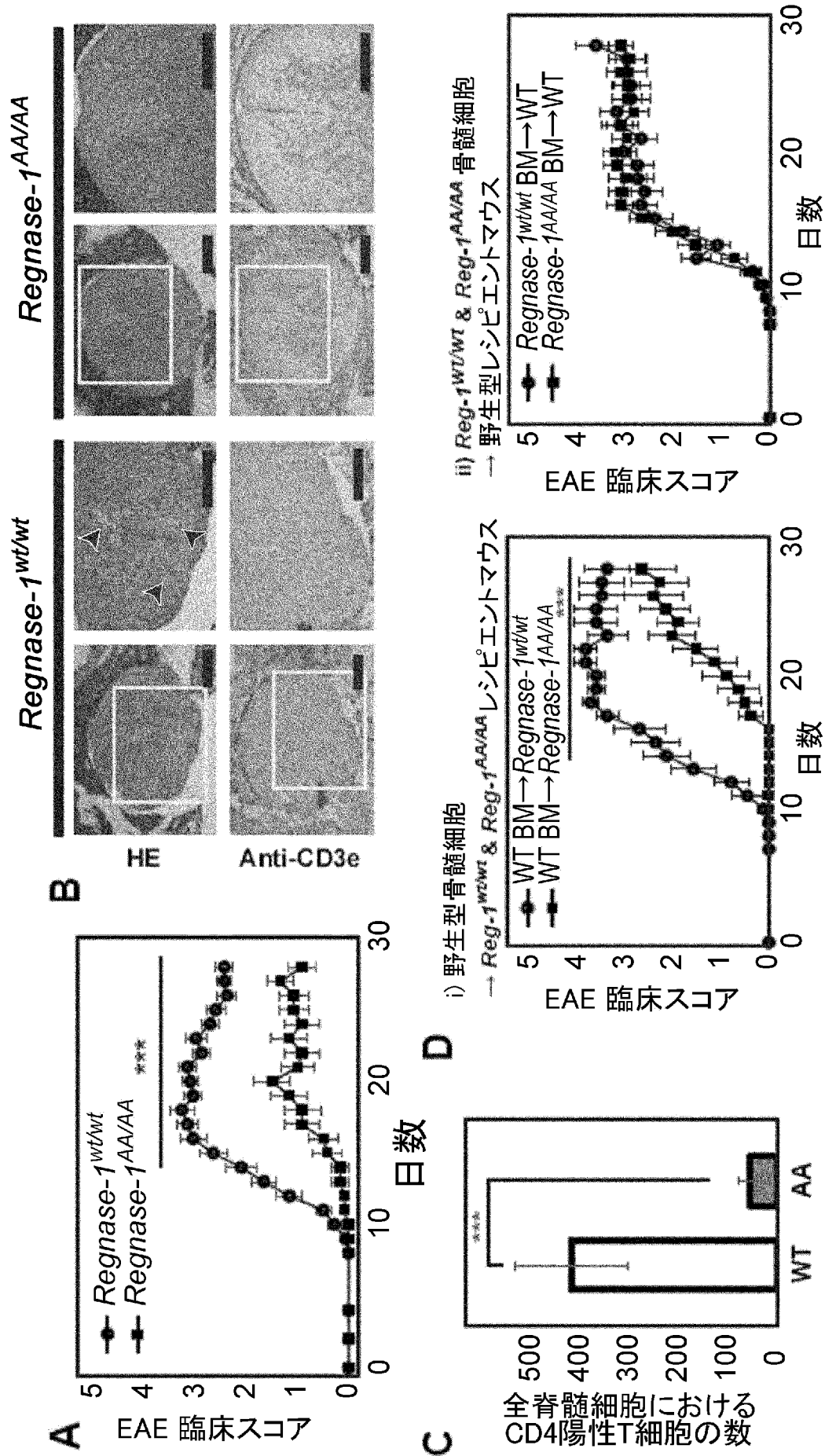
[図1-4]

■ *Regnase-1*^{wt/wt}
■ *Regnase-1*^{AA/AA}

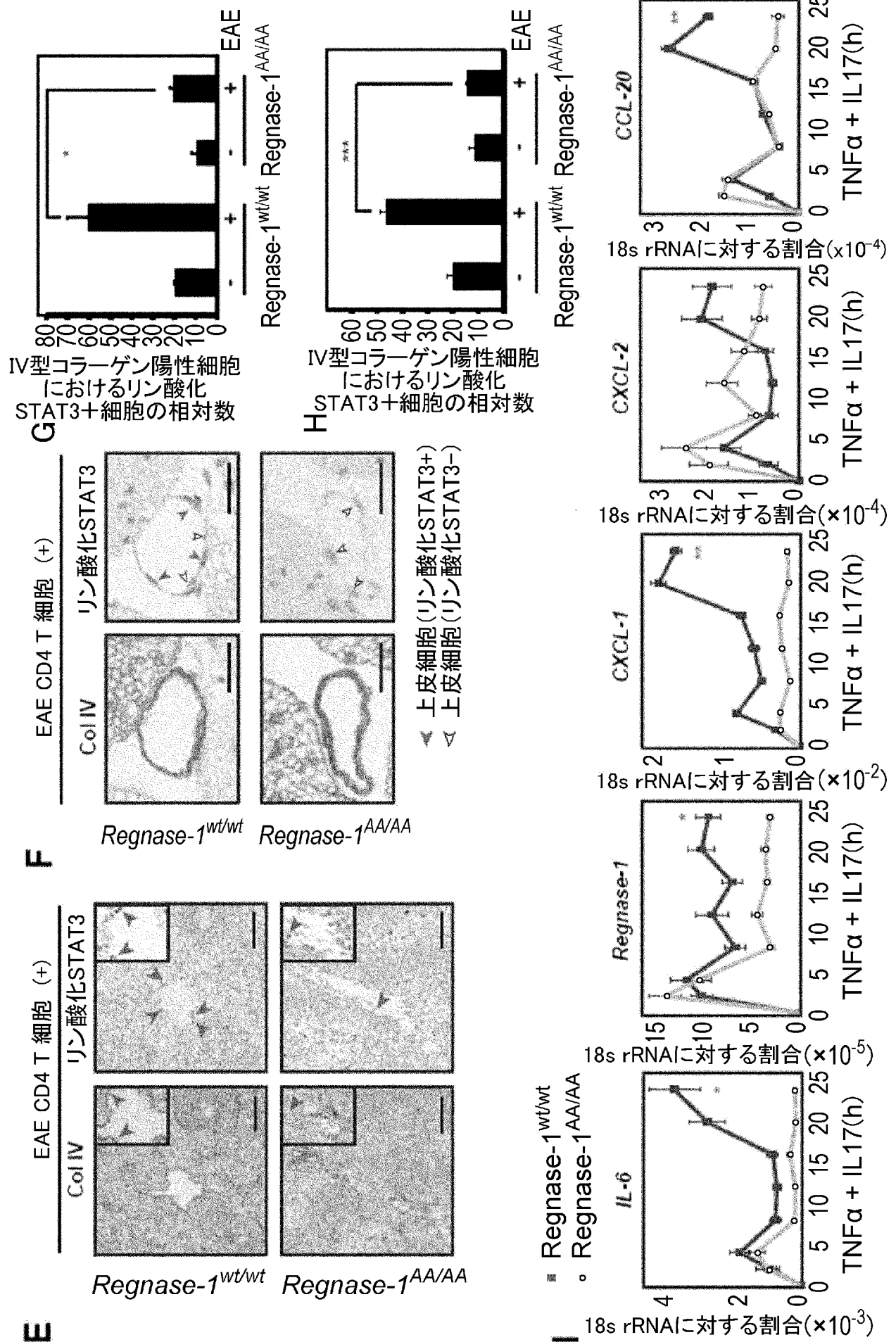
D



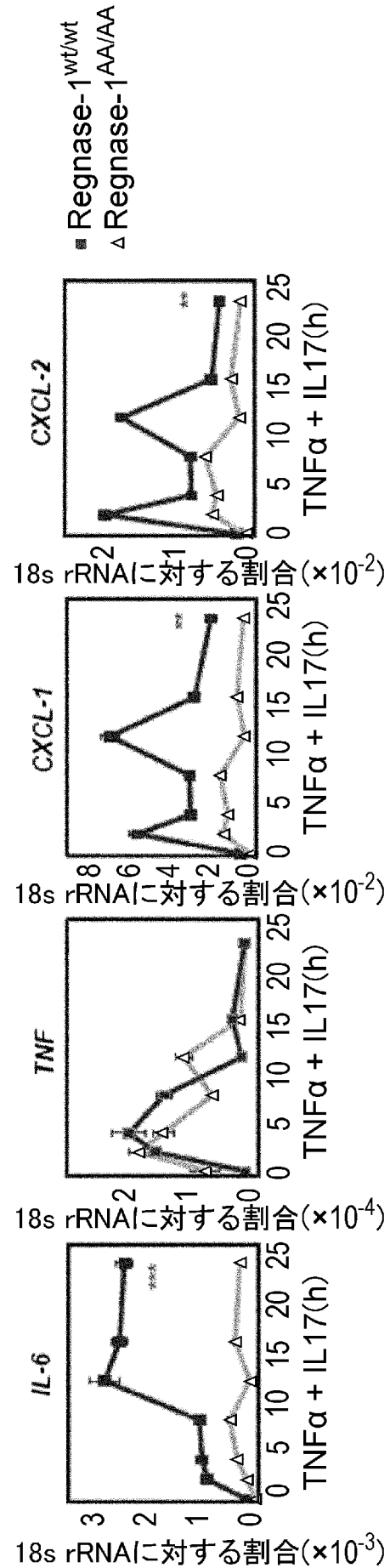
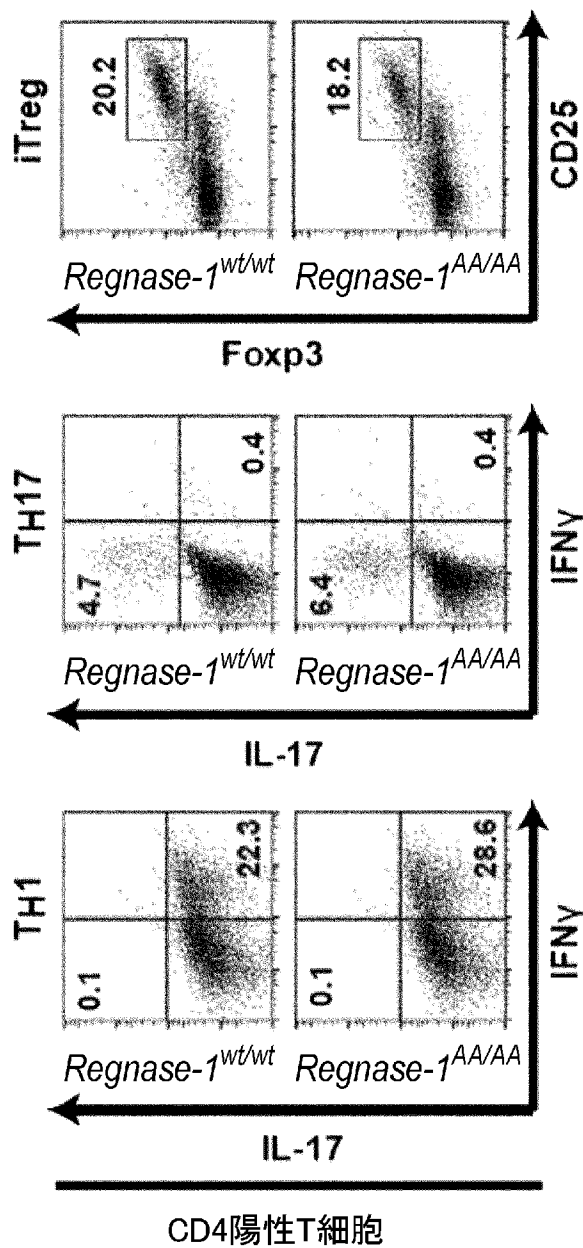
[図2-1]



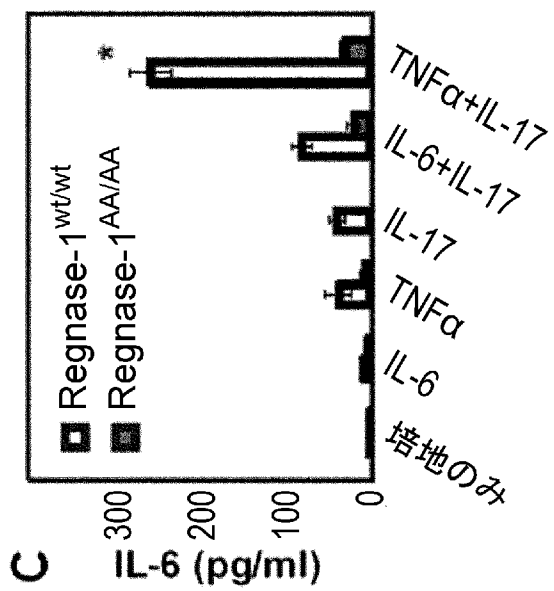
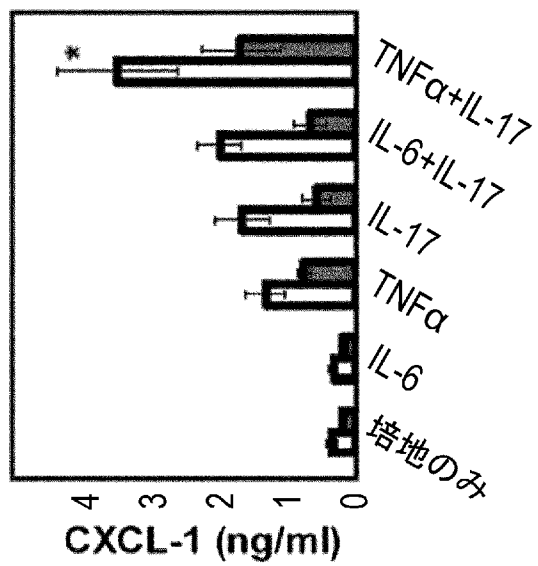
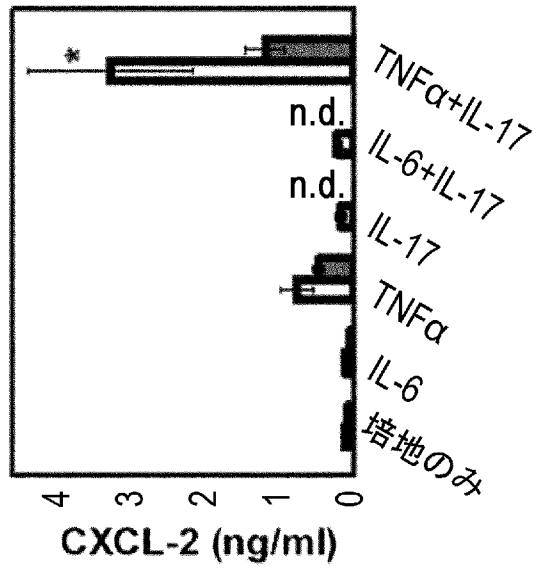
[図2-2]



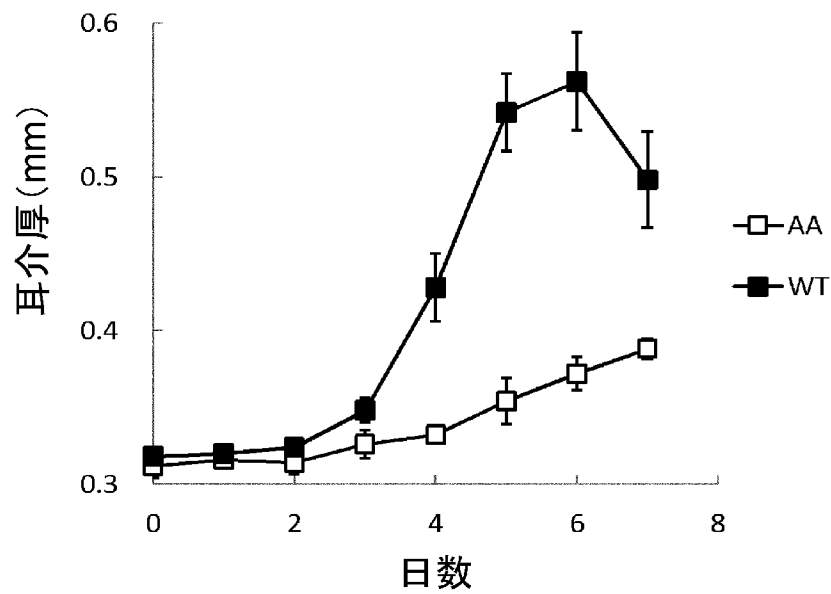
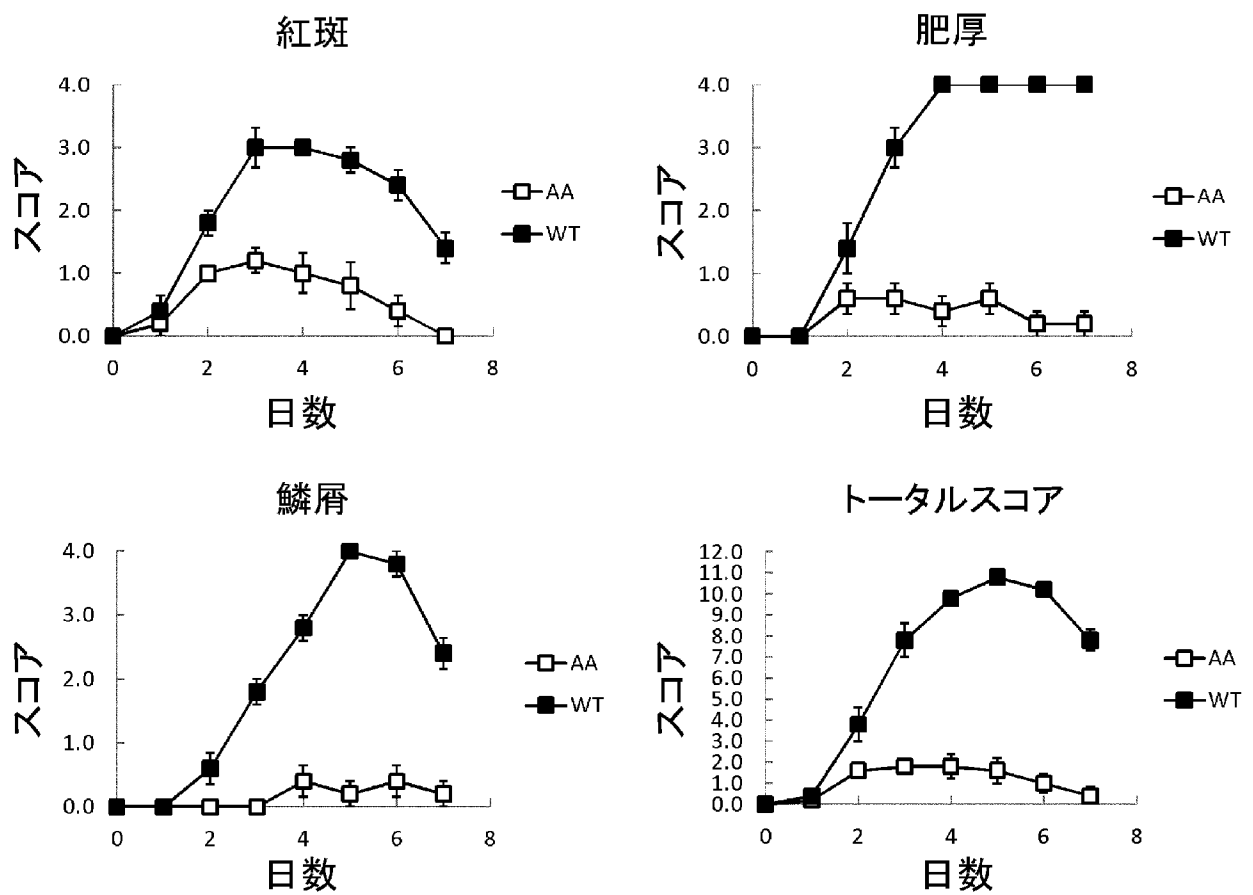
[図3-1]



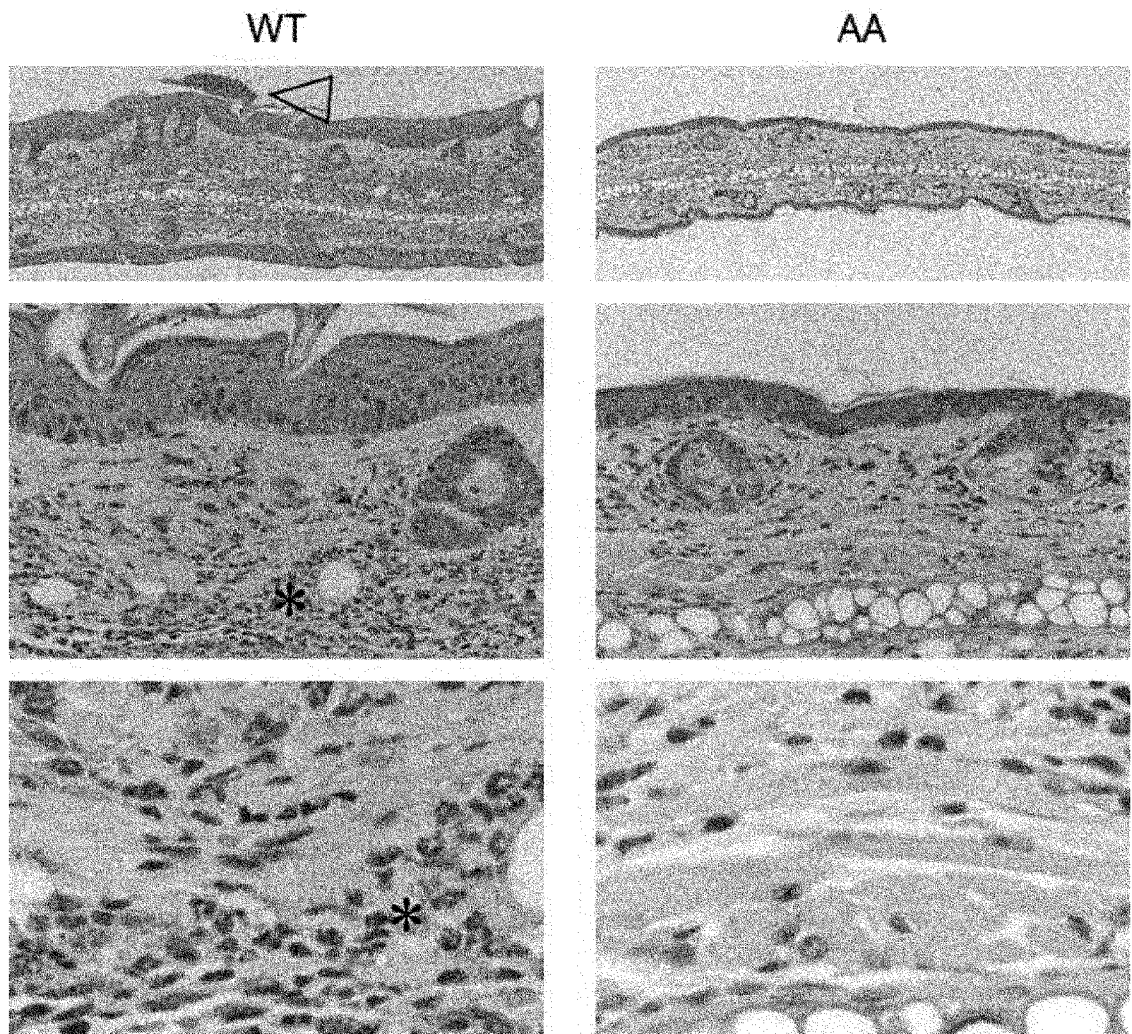
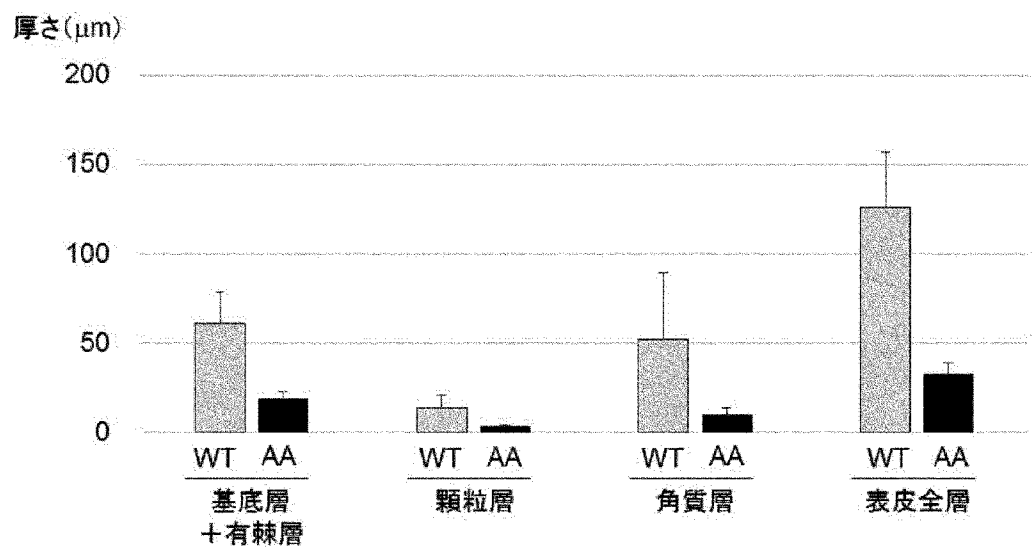
[図3-2]



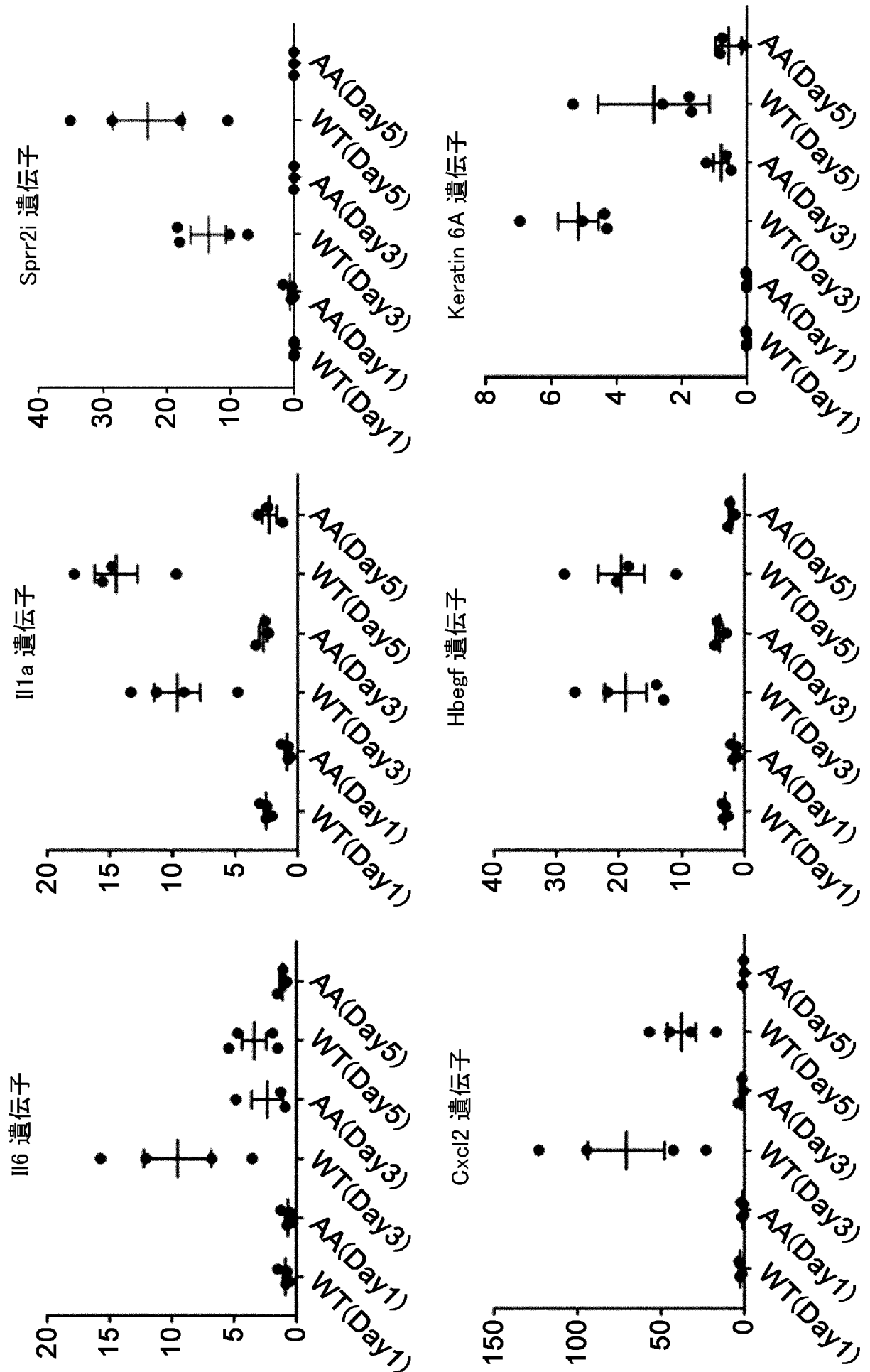
[図4]

A**B**

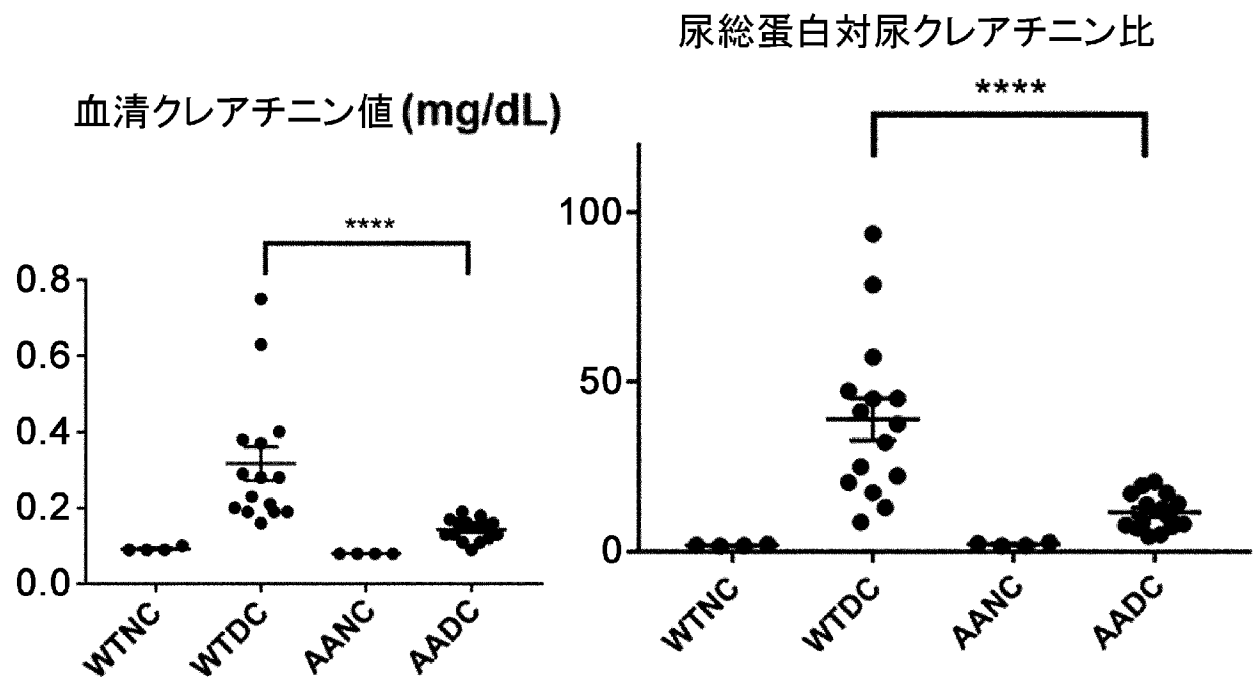
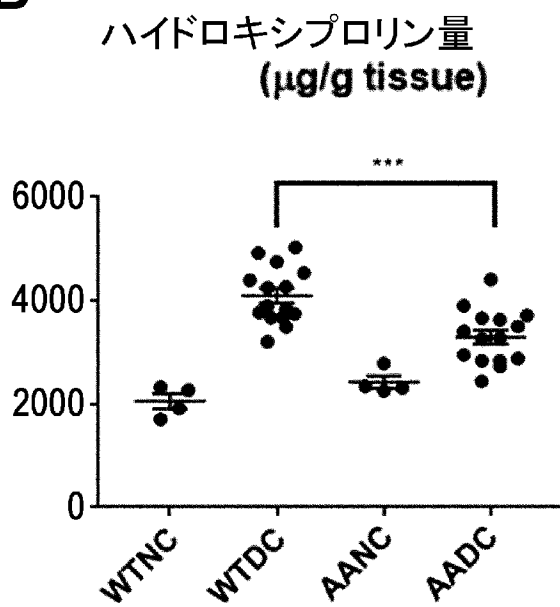
[図5]

A**B**

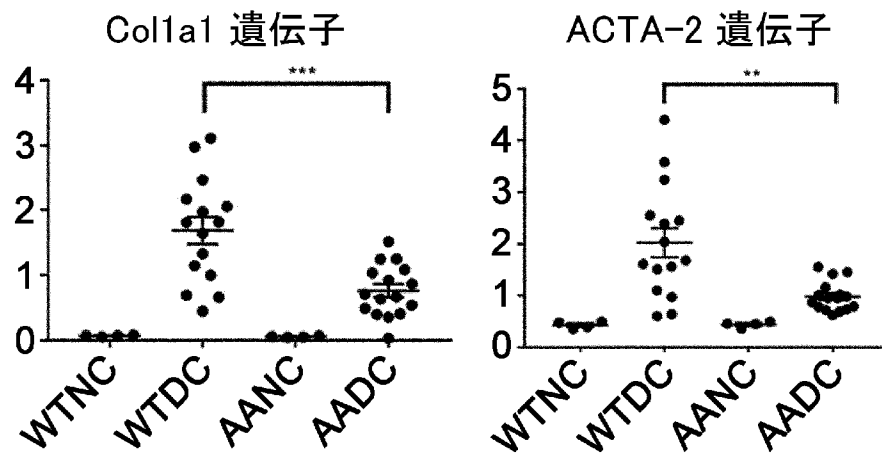
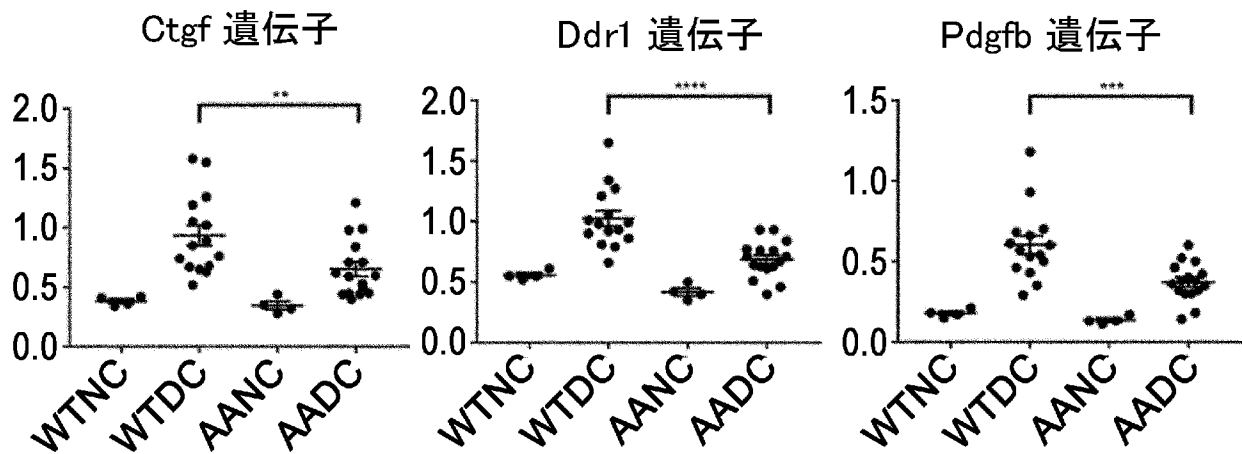
[図6]



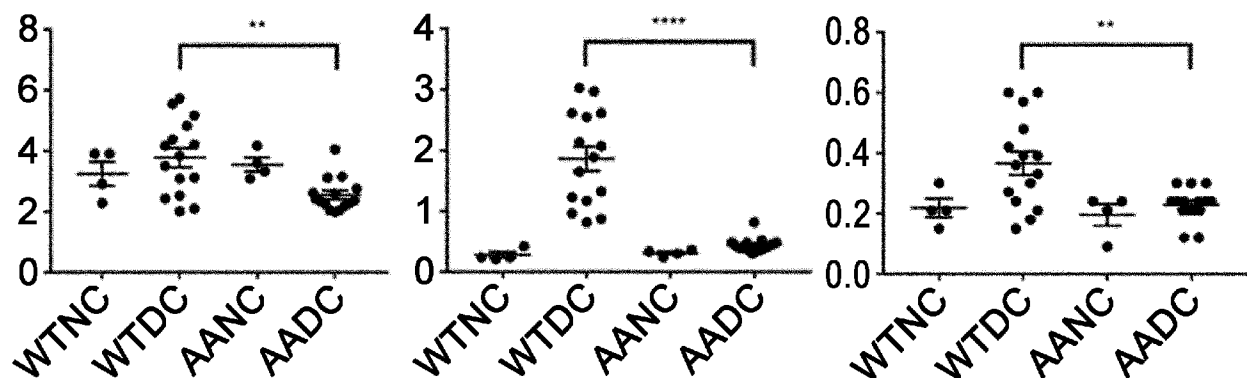
[図7]

A**B**

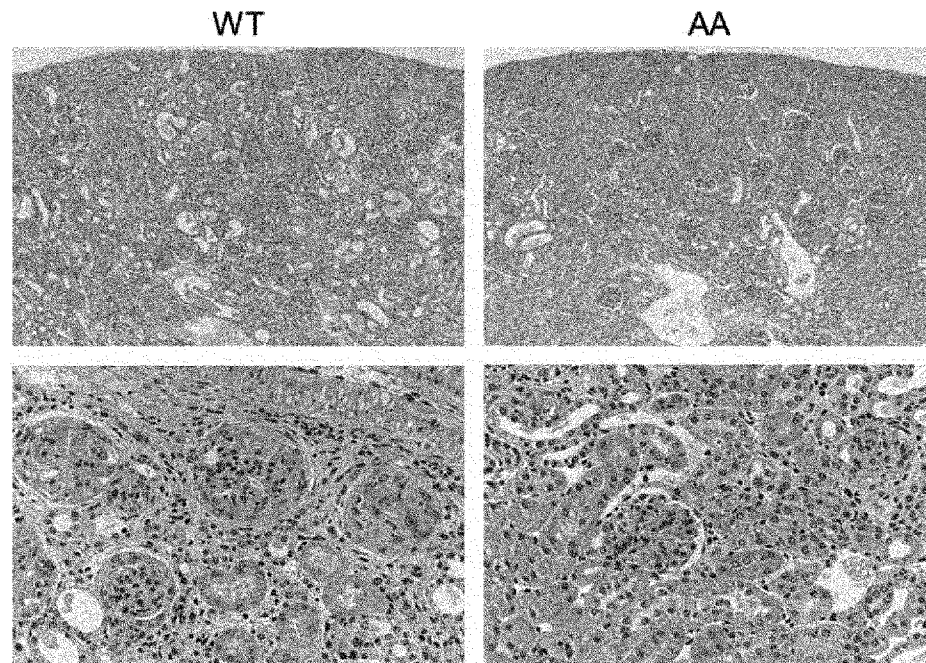
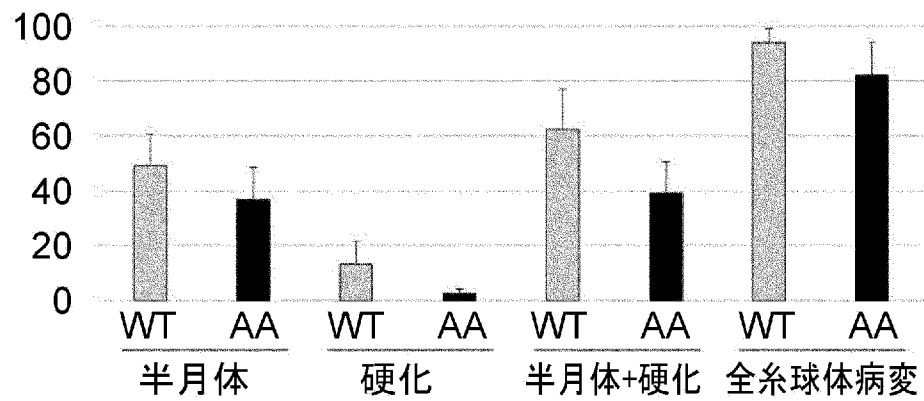
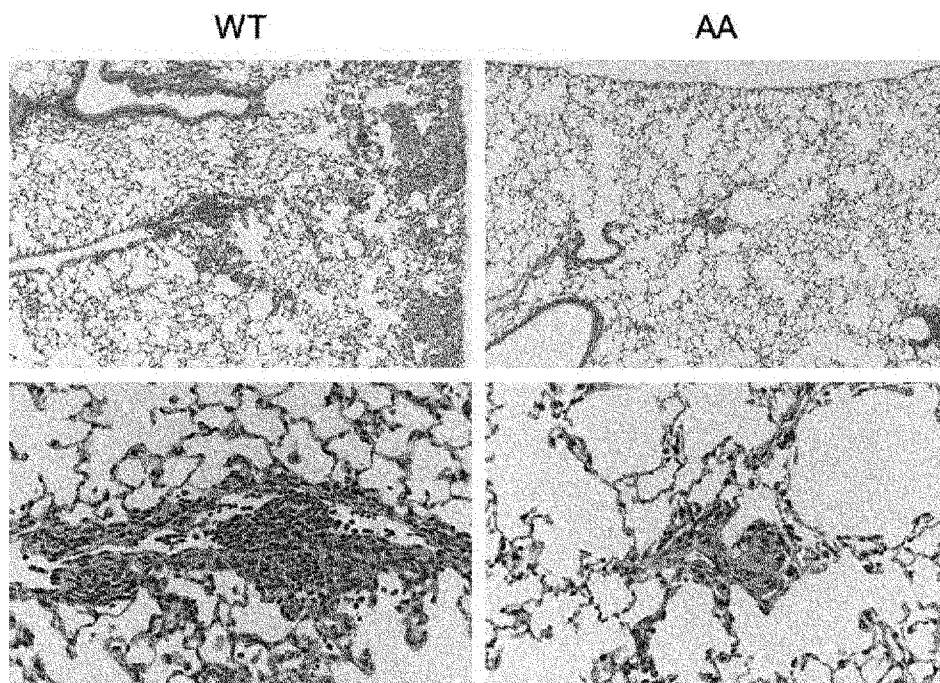
[図8]

A**B****C**

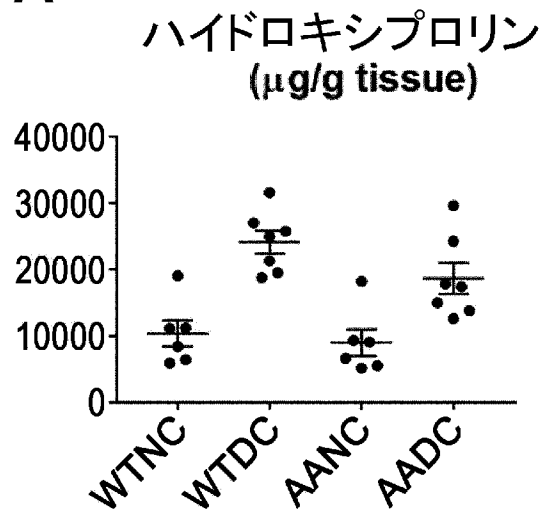
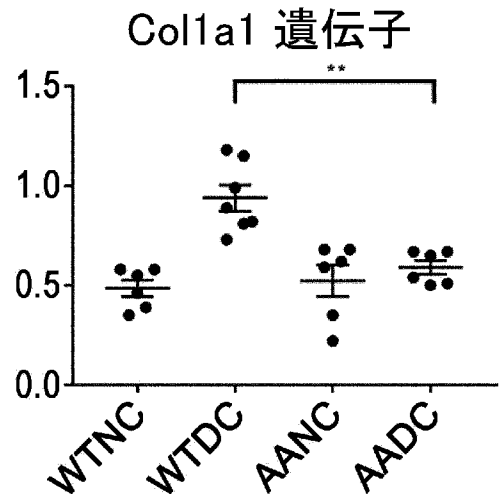
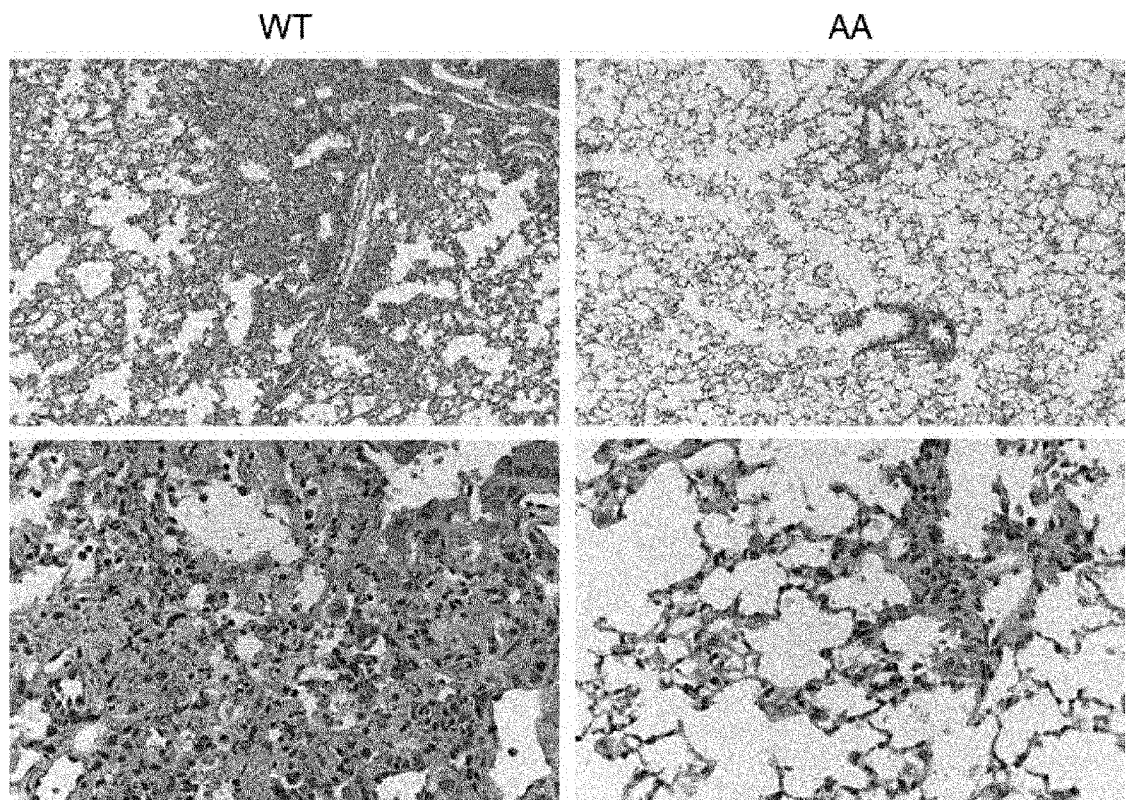
白血球数 ($\times 10^3$ 細胞/ μ l) 好中球数 ($\times 10^3$ 細胞/ μ l) 単球数 ($\times 10^3$ 細胞/ μ l)



[図9]

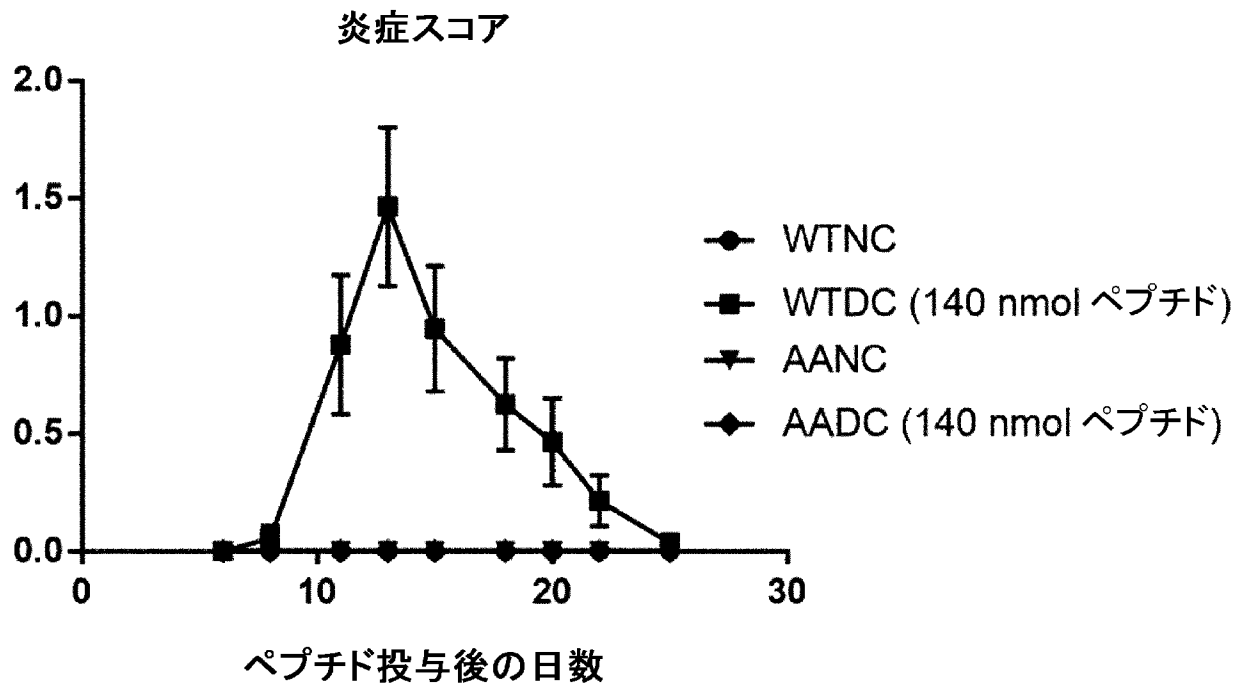
A**B** 糸球体病変の割合(%)**C**

[図10]

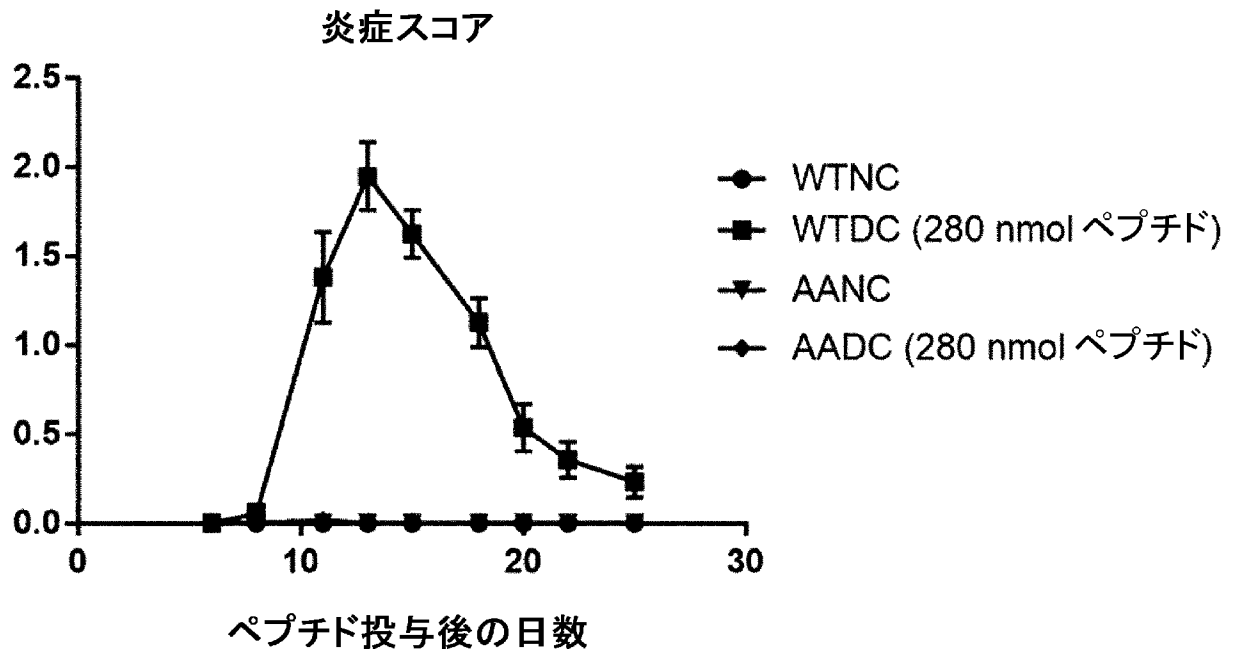
A**C****B**

[図11-1]

(A)



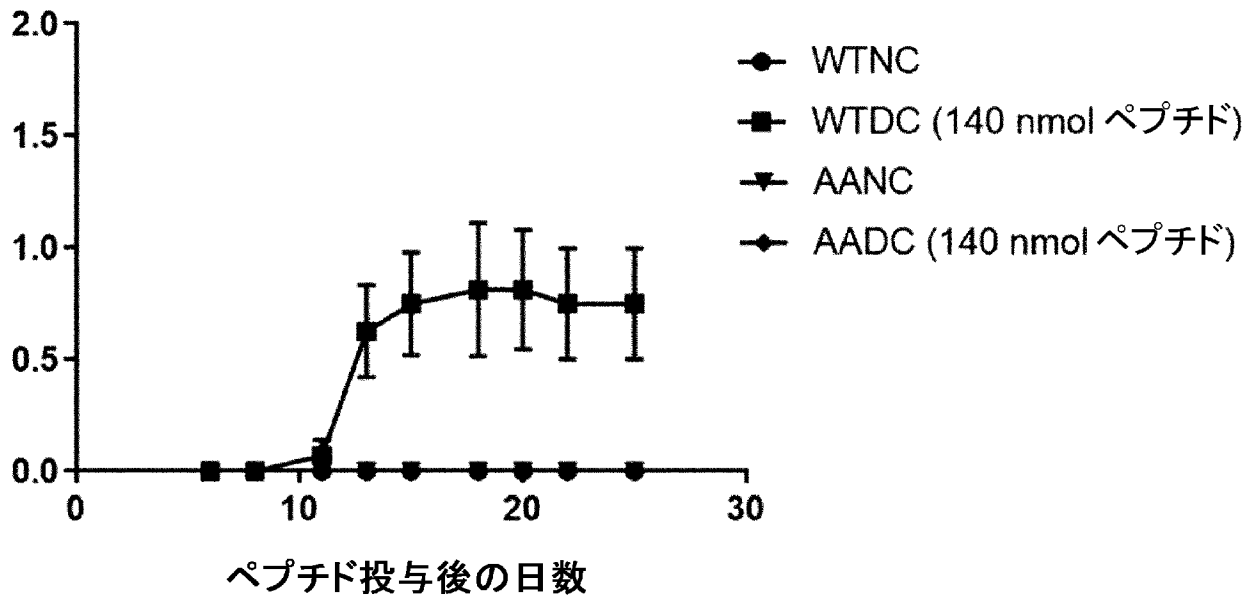
(B)



[図11-2]

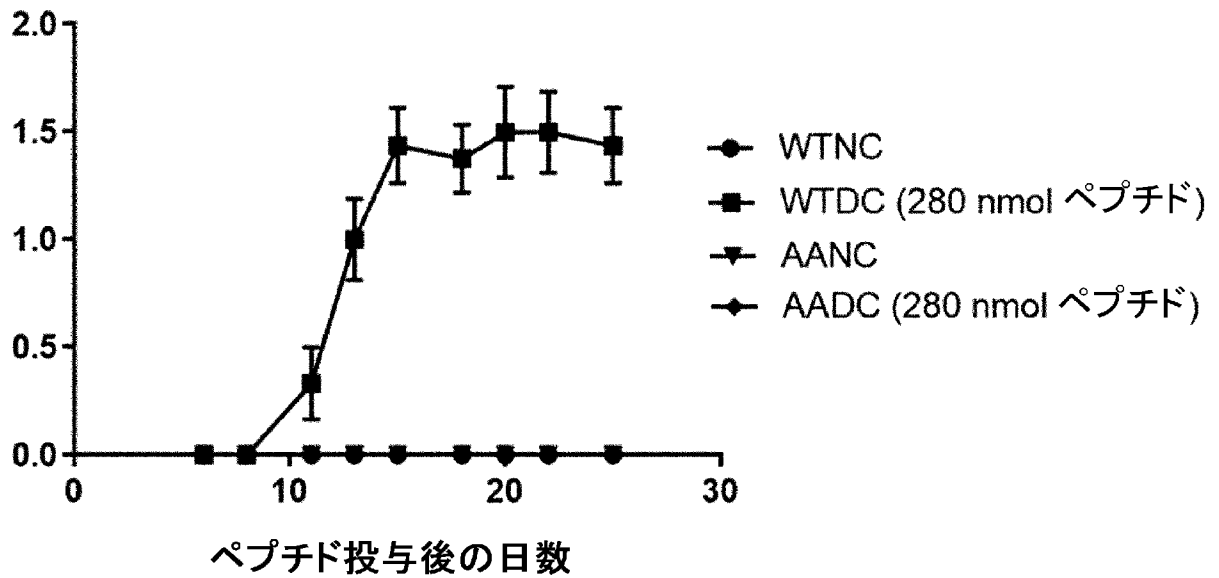
(C)

構造障害スコア

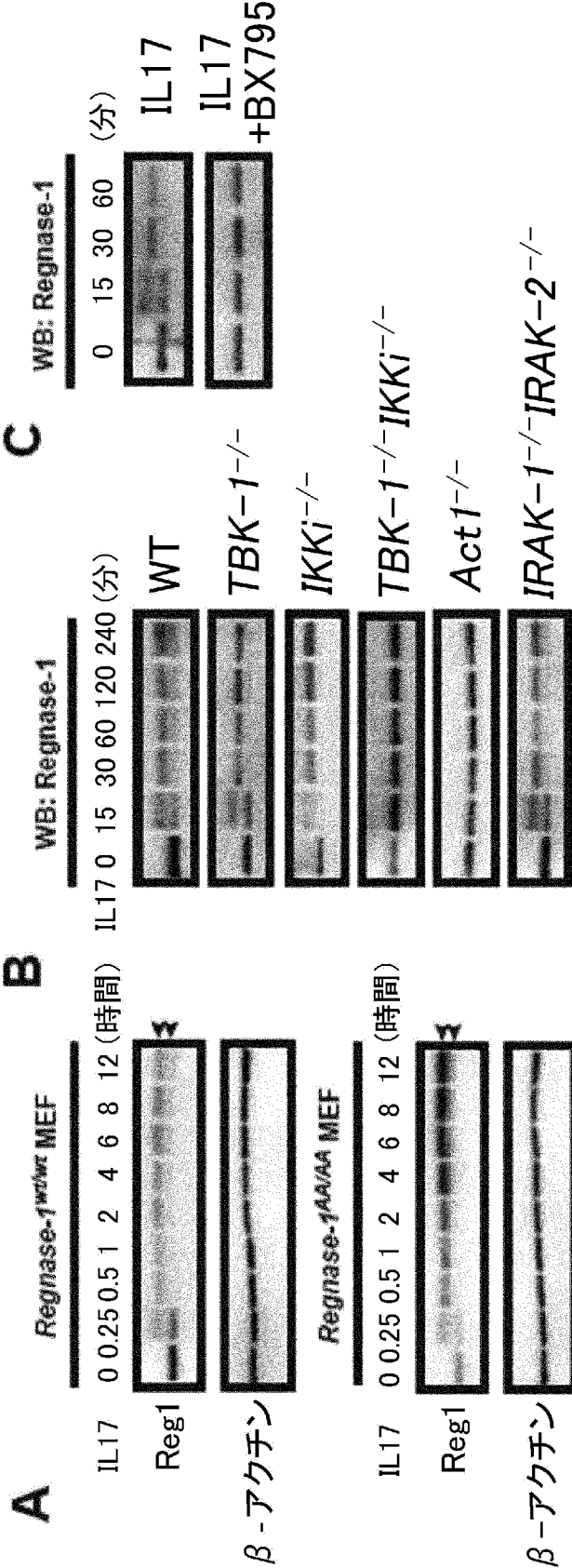


(D)

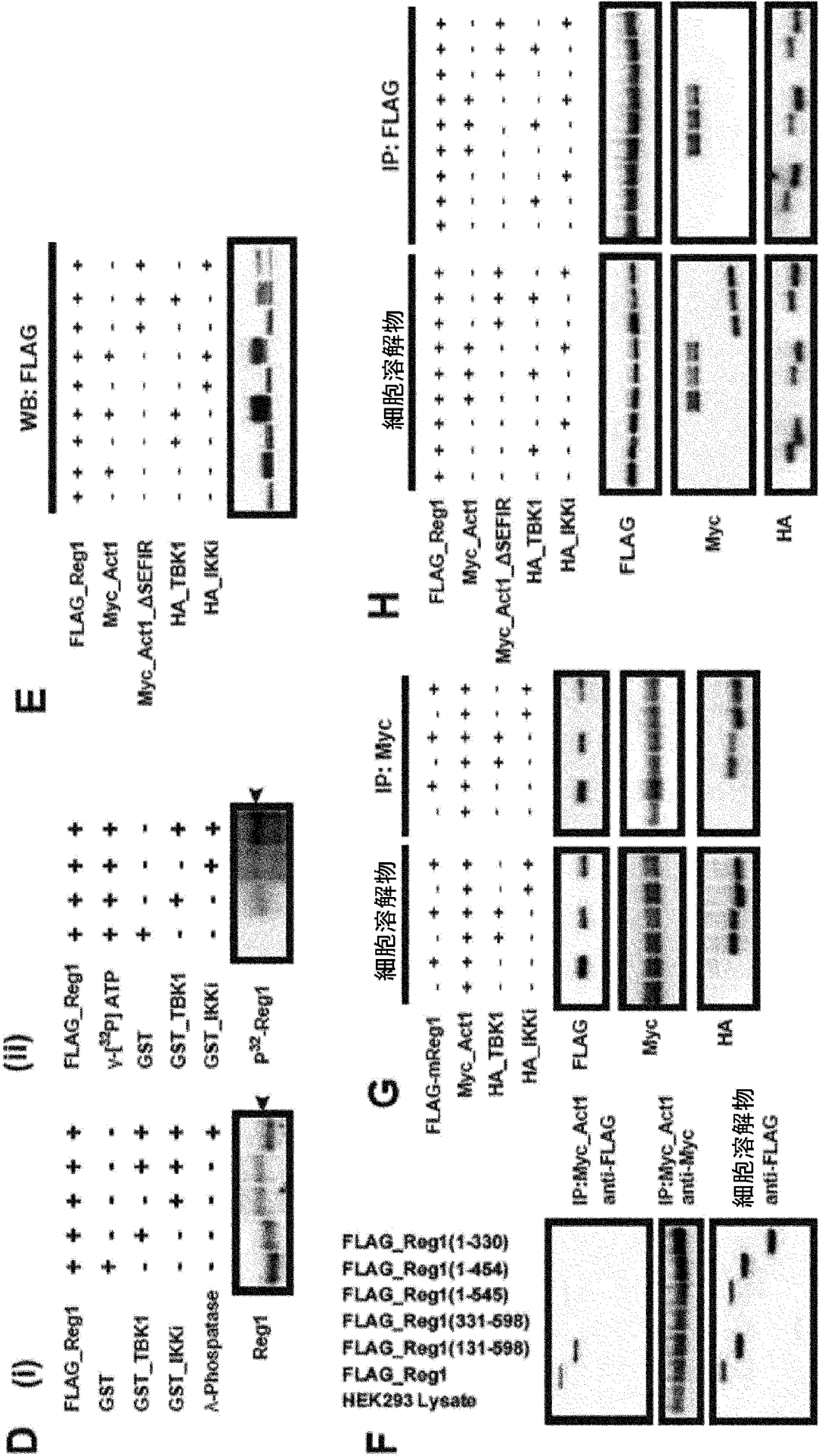
構造障害スコア



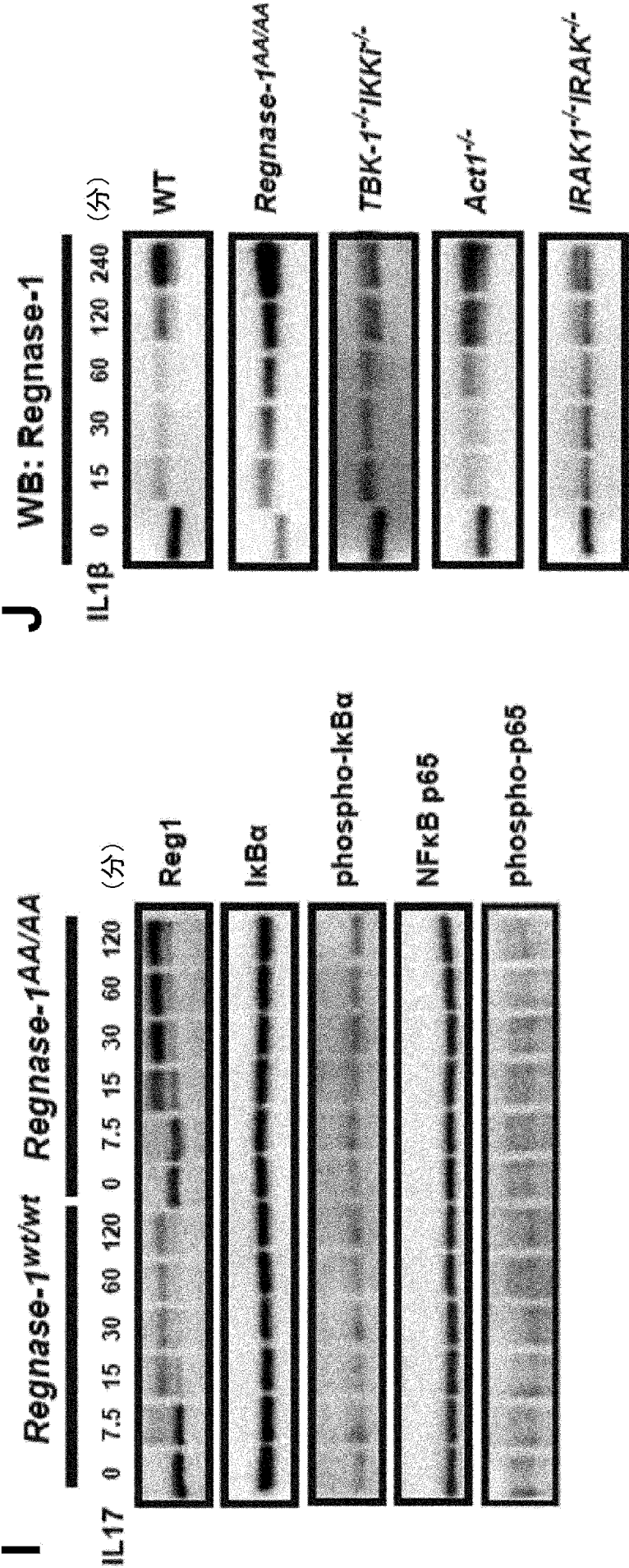
[図12-1]



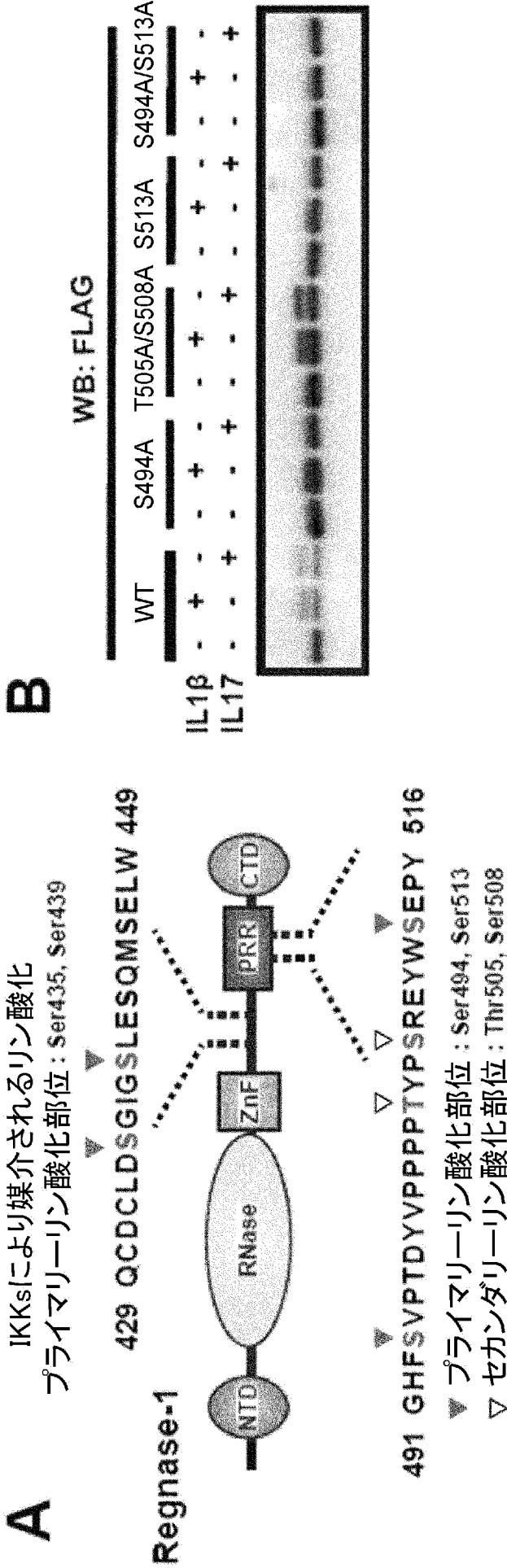
[図12-2]



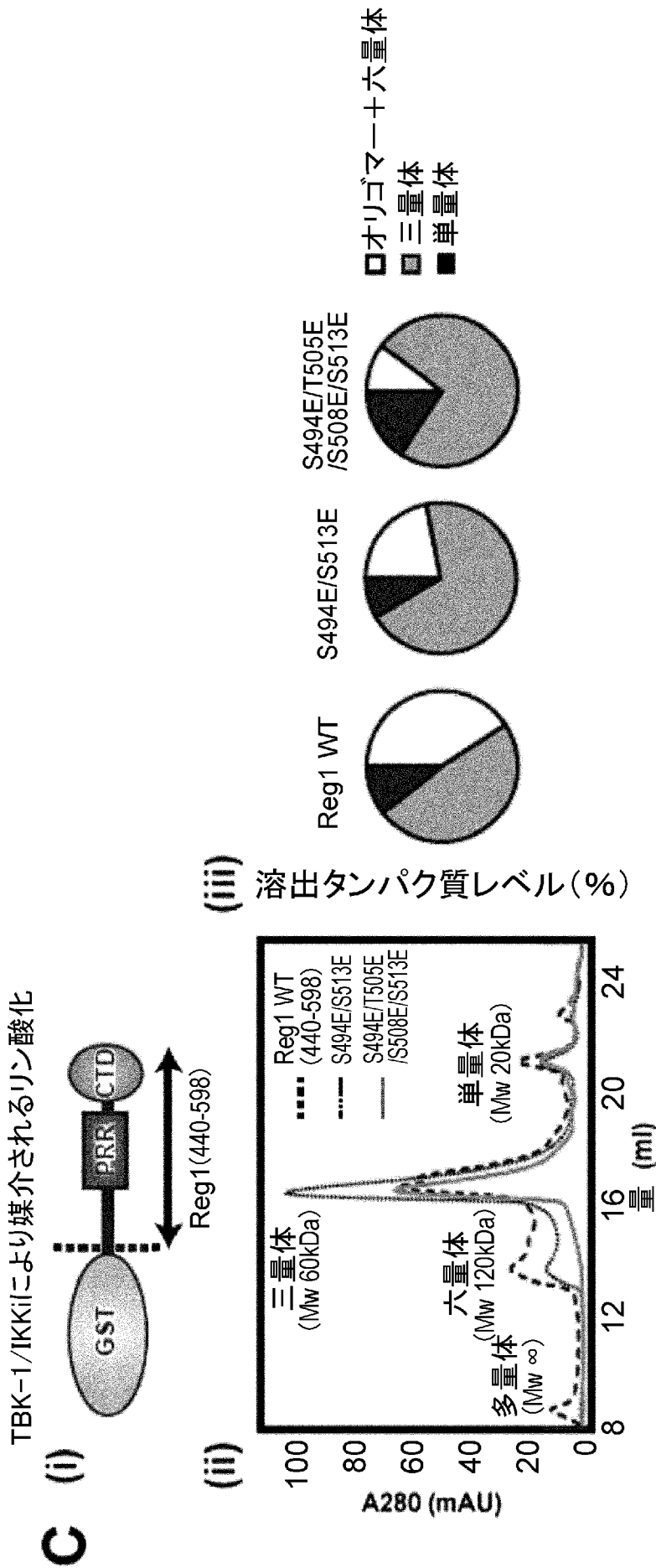
[図12-3]



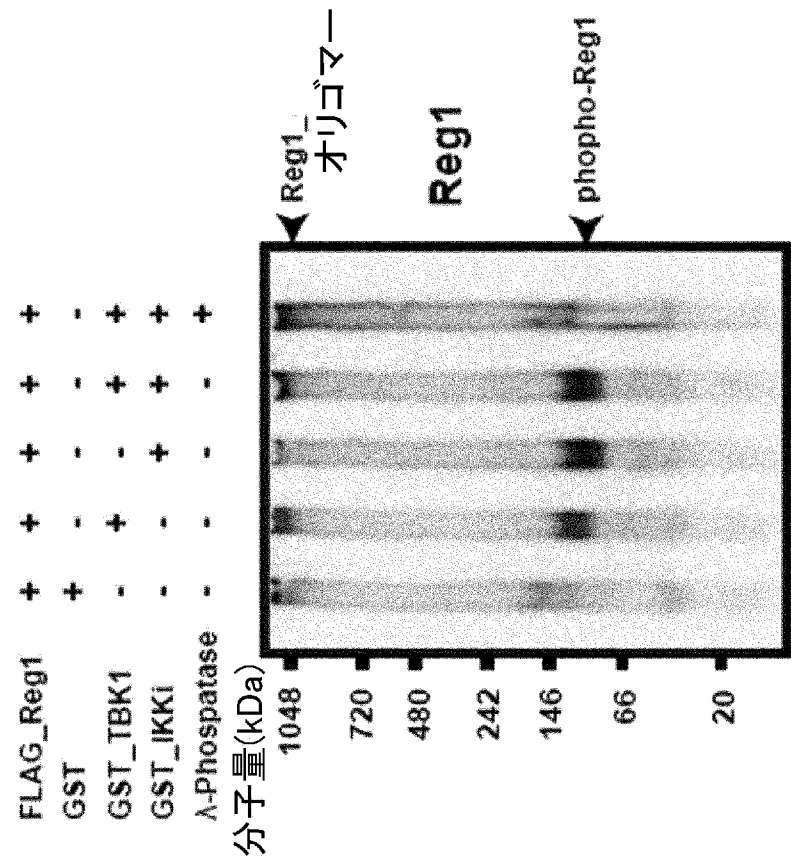
[図13-1]



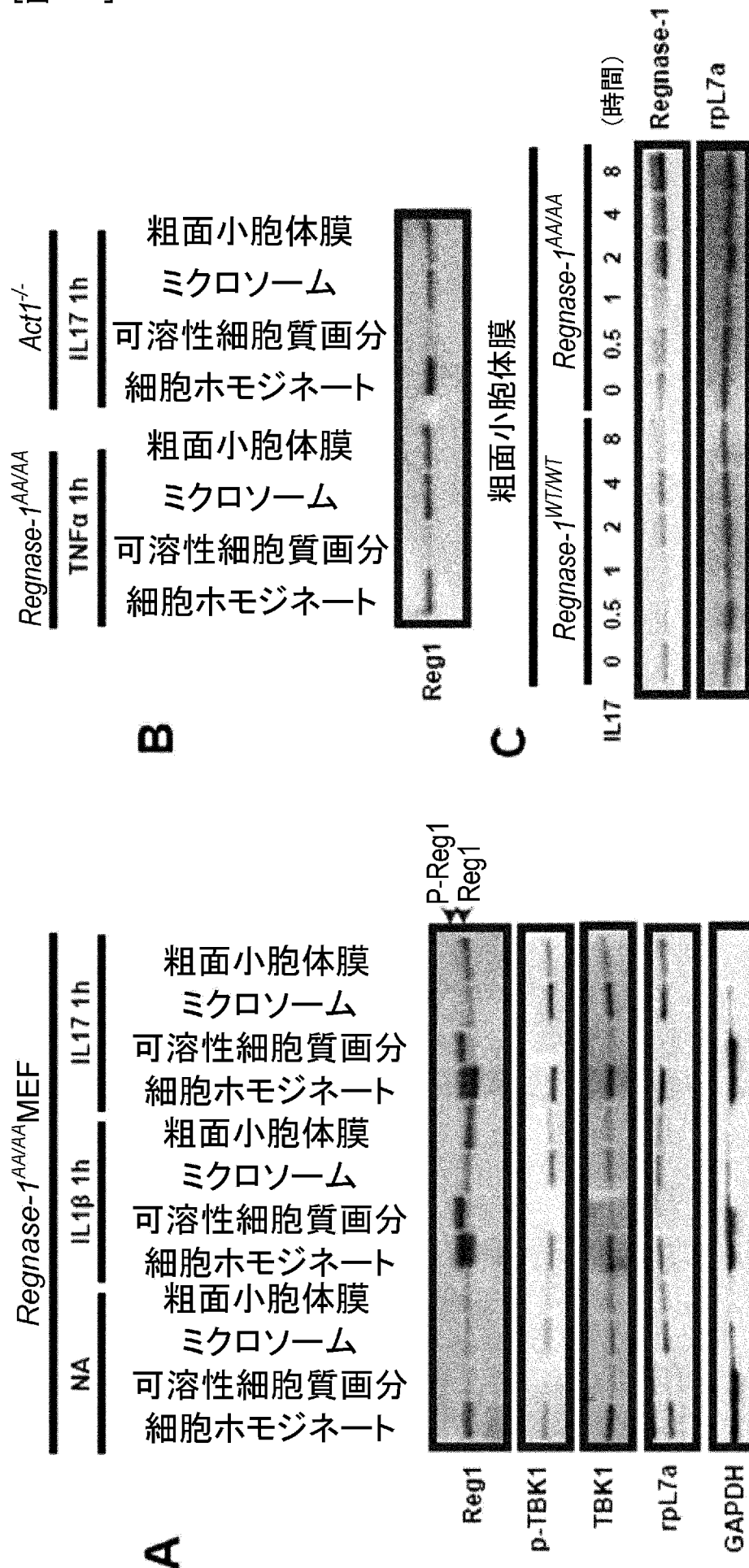
[図13-2]



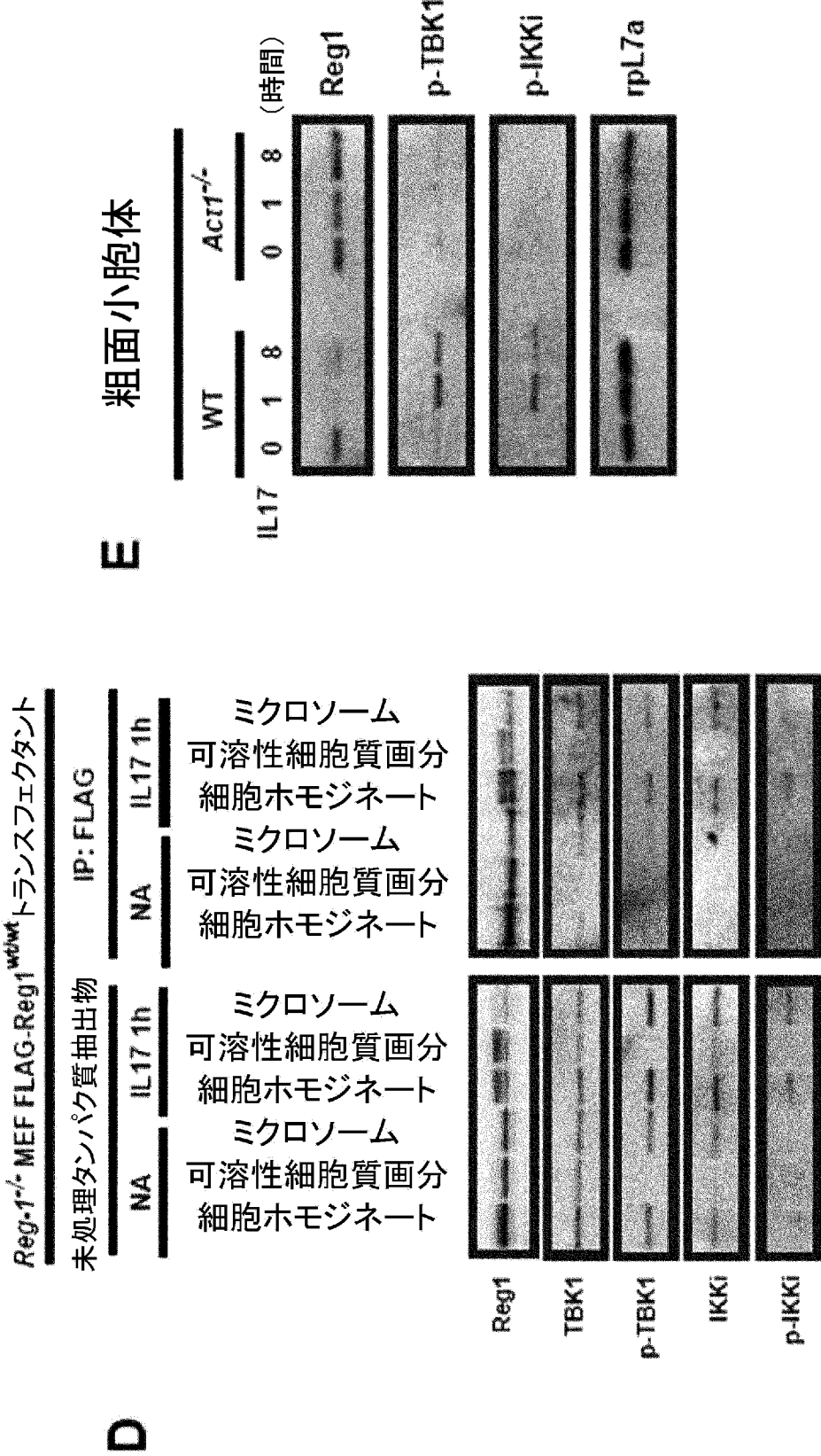
[図13-3]



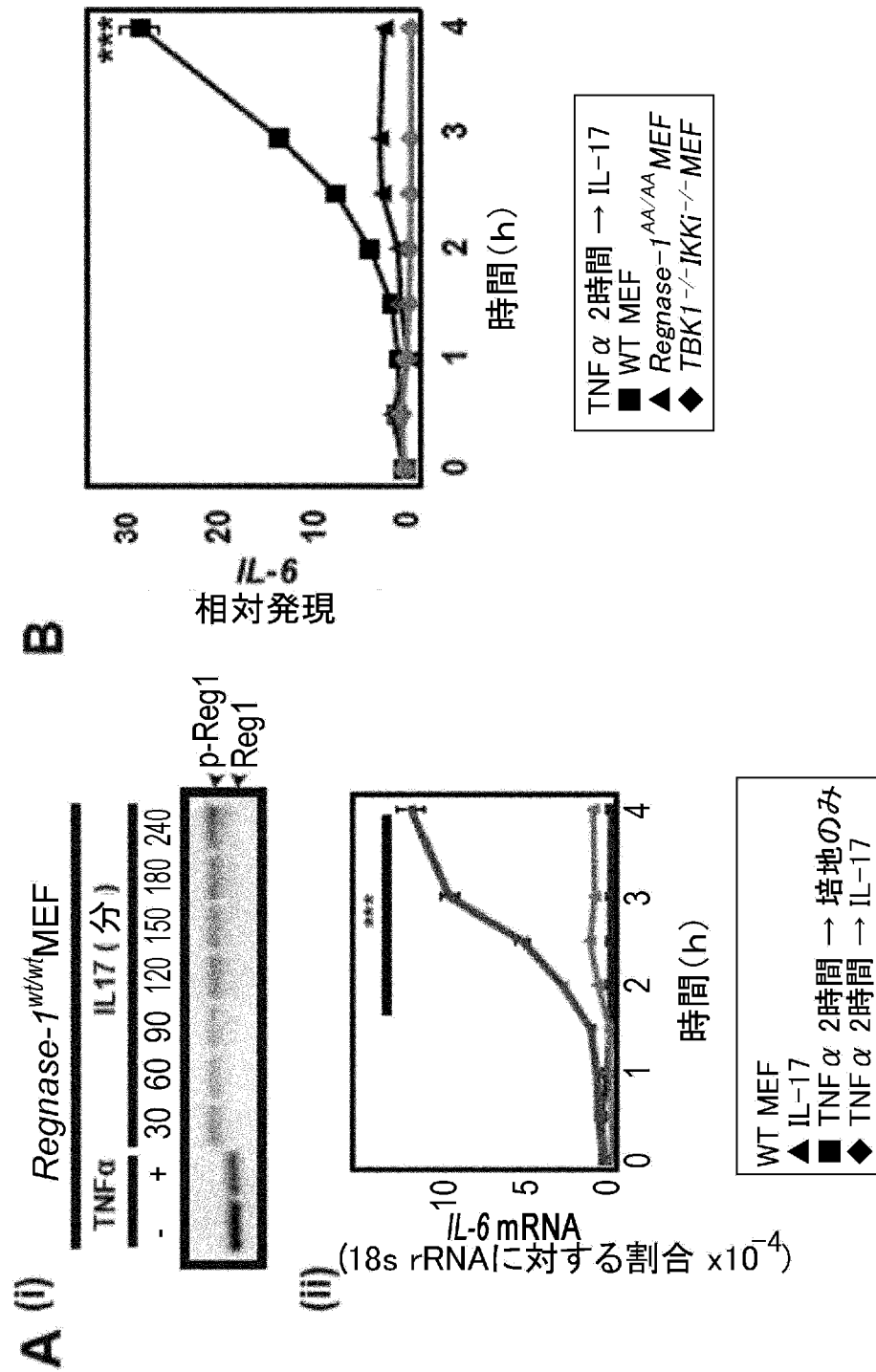
[図14-1]



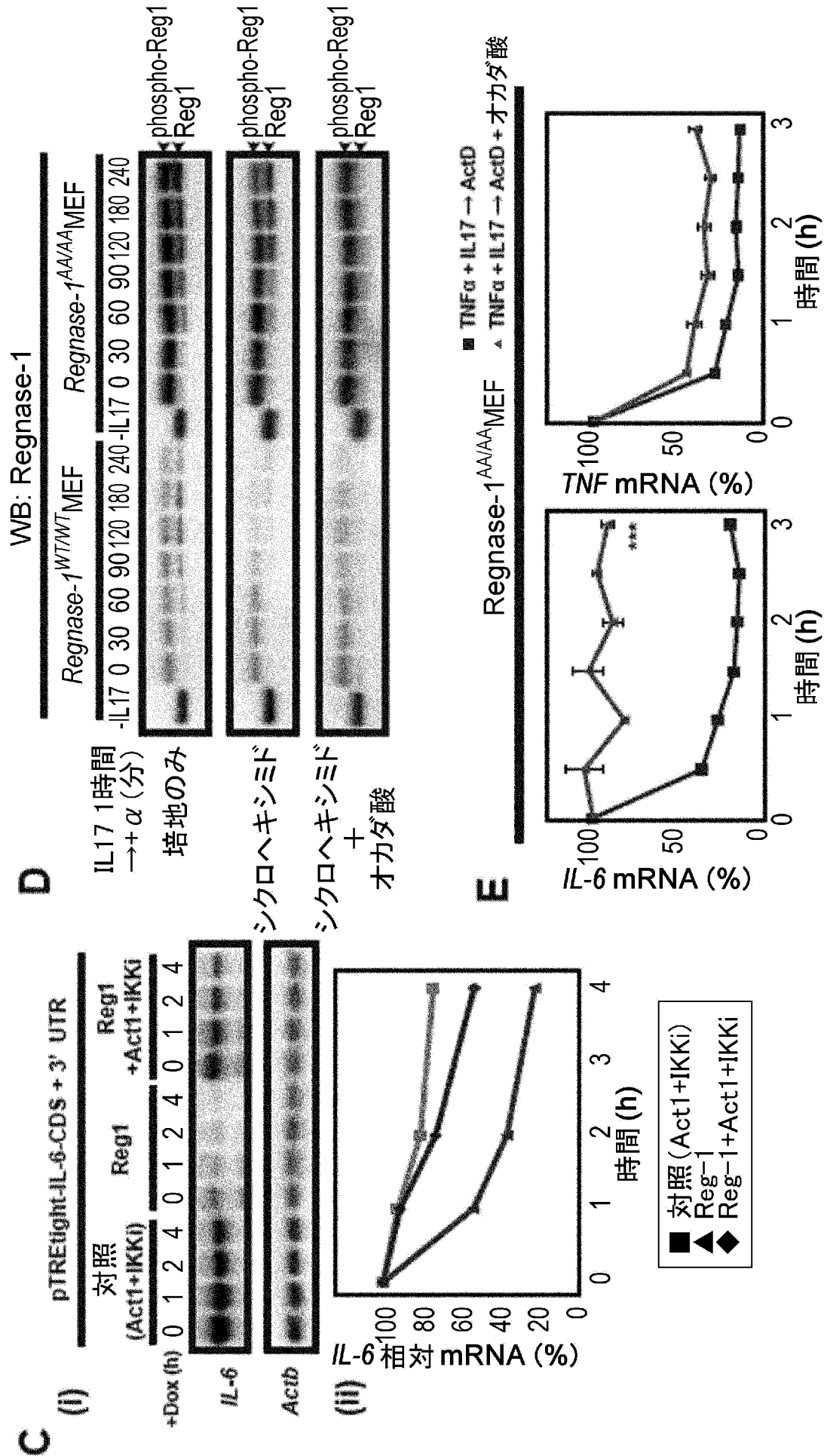
[図14-2]



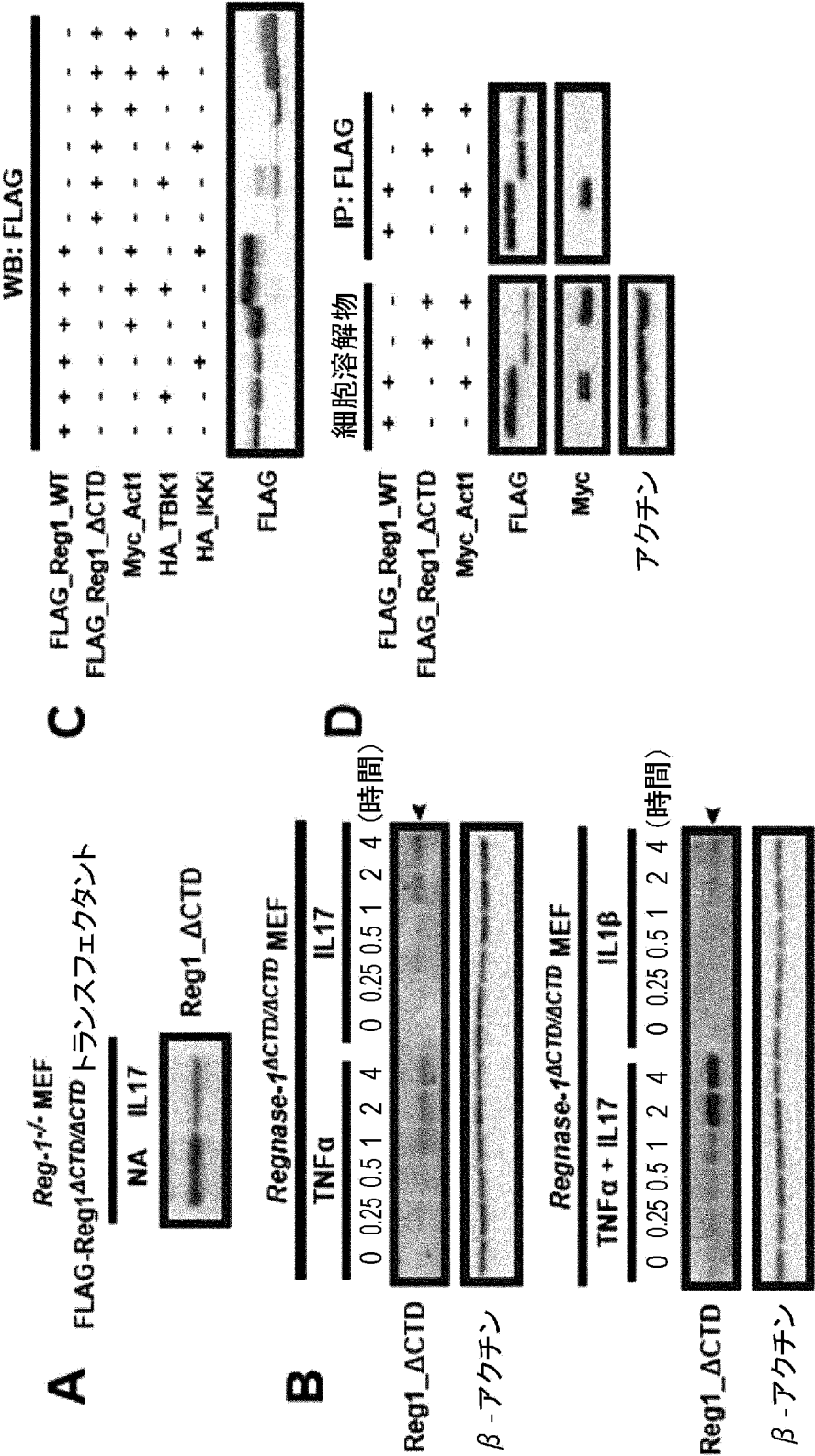
[図15-1]



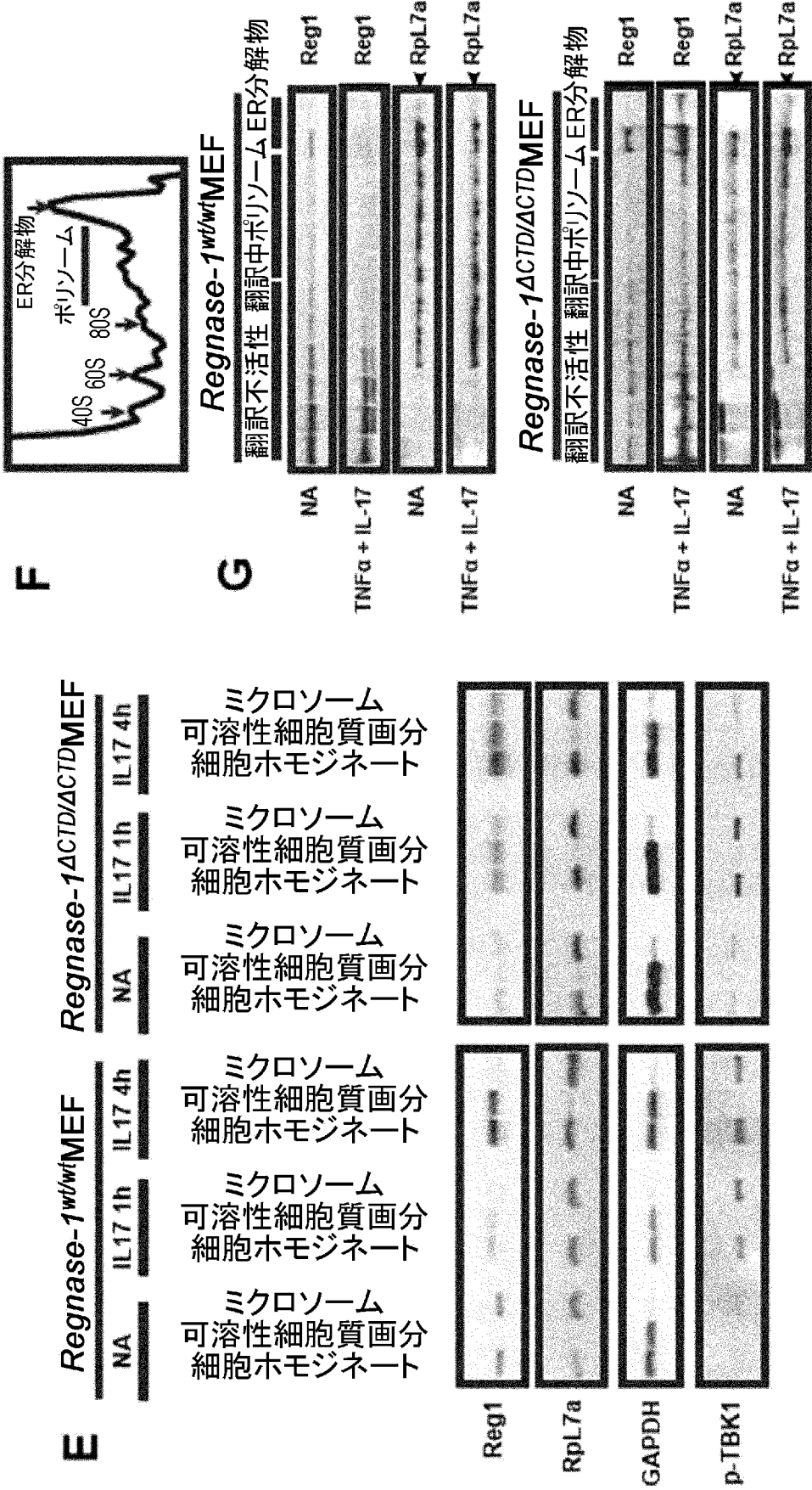
[図15-2]



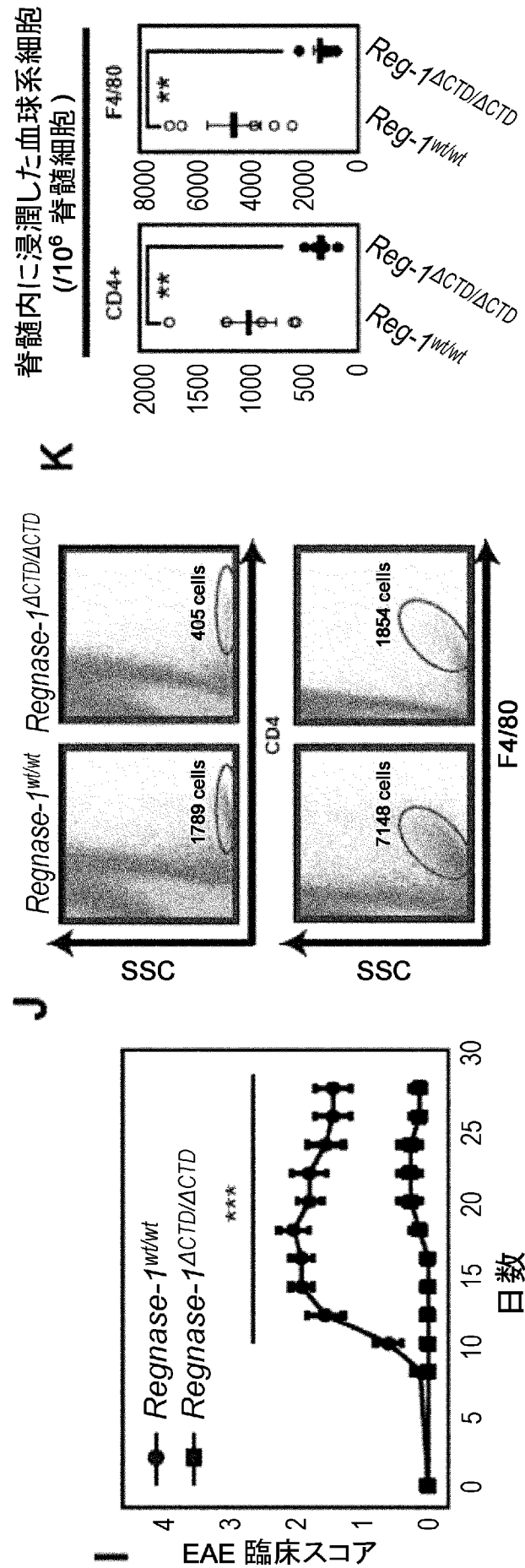
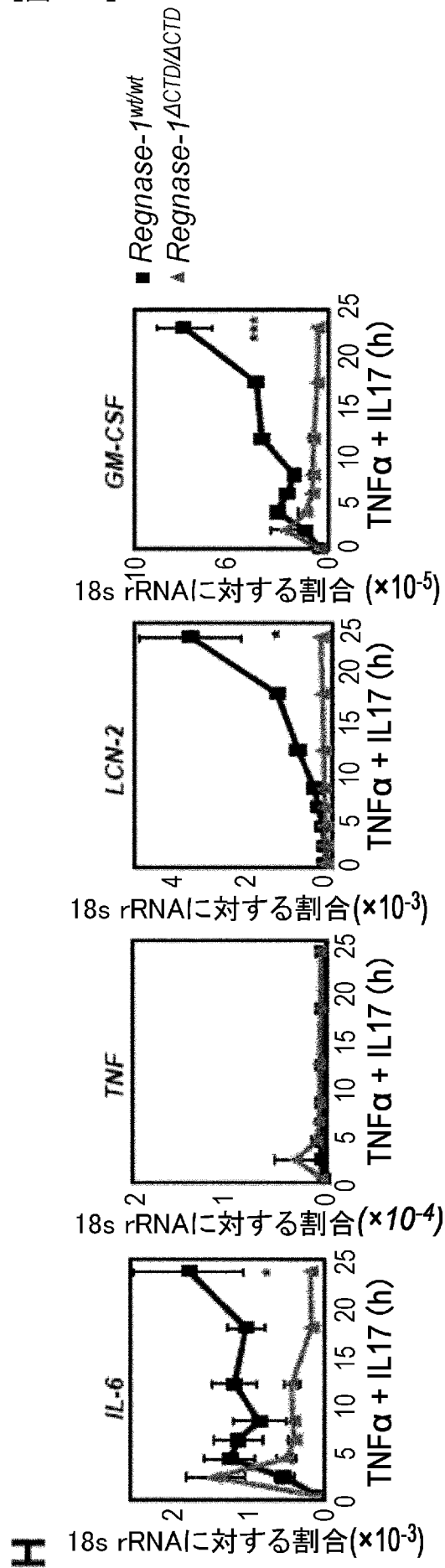
[図16-1]



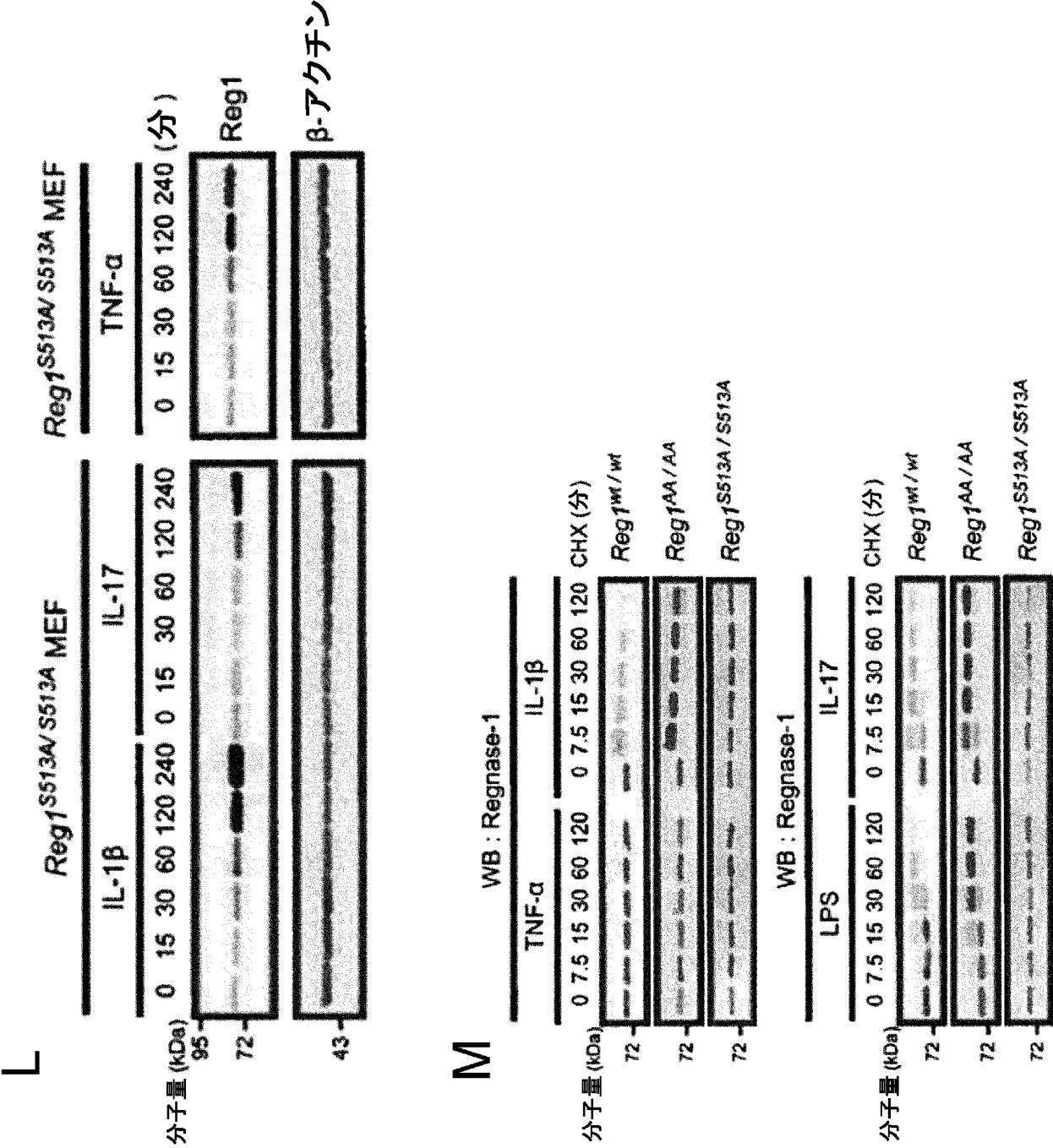
[図16-2]



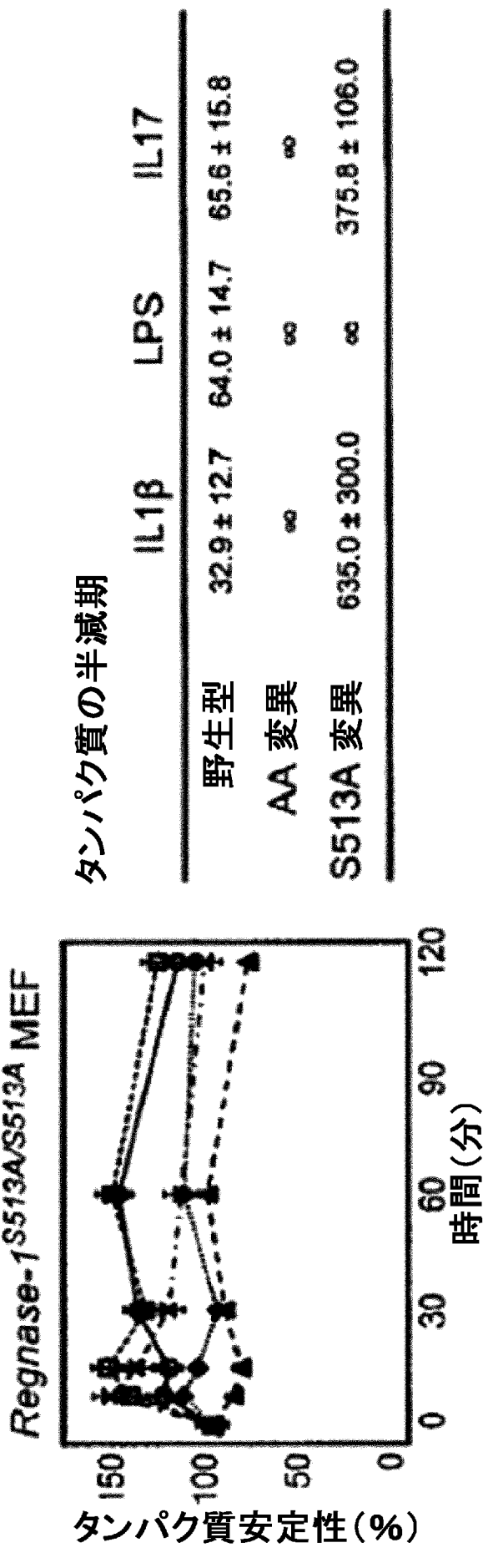
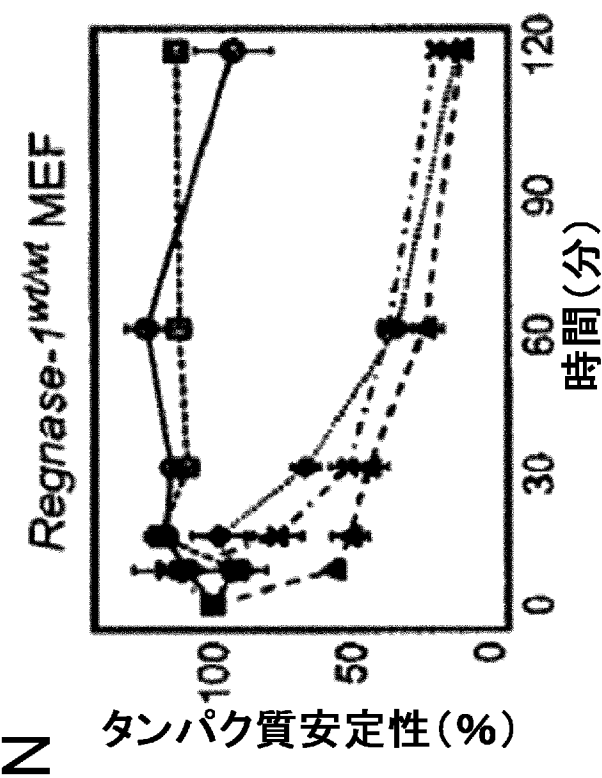
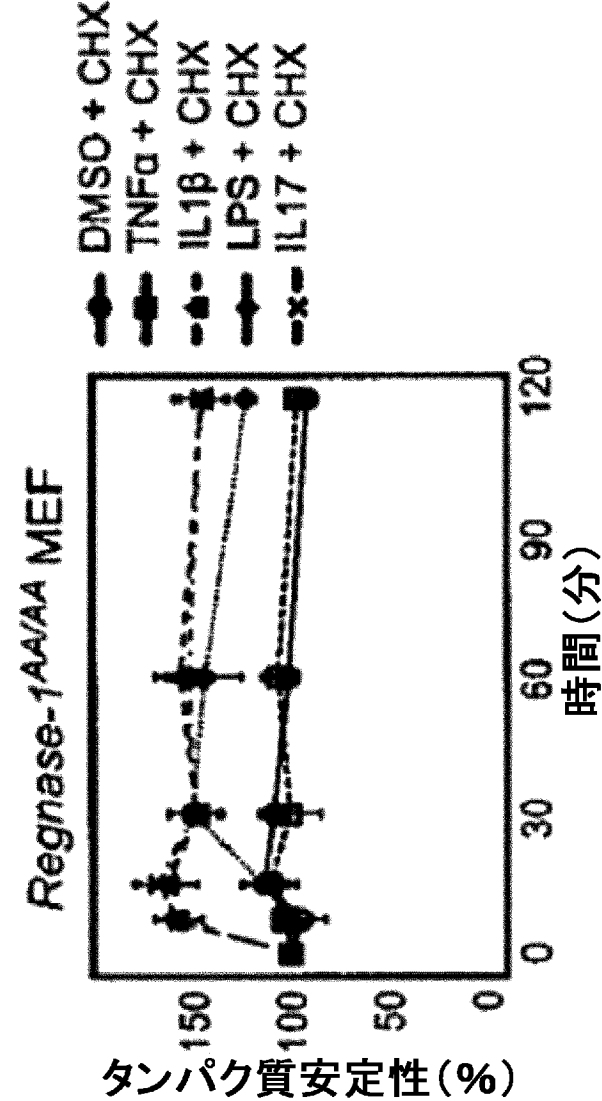
[図16-3]



[図16-4]



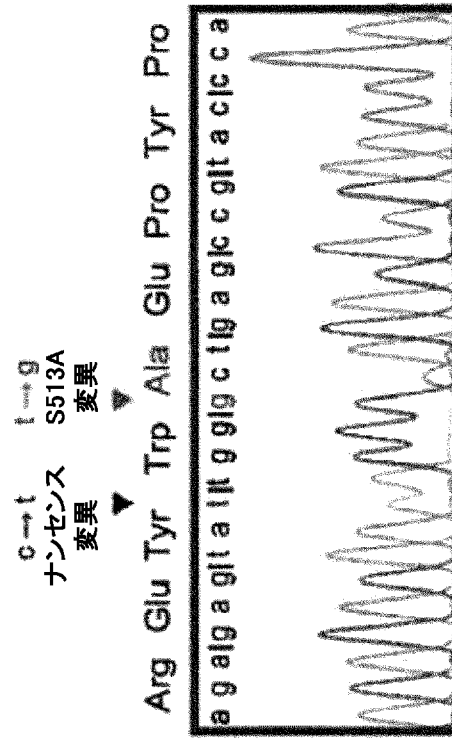
[図16-5]



タンパク質の半減期

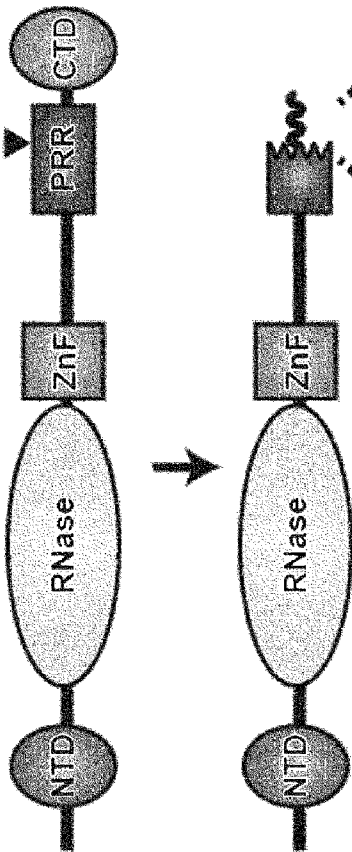
	IL1β	LPS	IL17
野生型	32.9 ± 12.7	64.0 ± 14.7	65.6 ± 15.8
AA 変異	∞	∞	∞
S513A 変異	635.0 ± 300.0	∞	375.8 ± 106.0

[図17-1]



B

CRISPR-Cas9システムによる
標的ゲノム変異

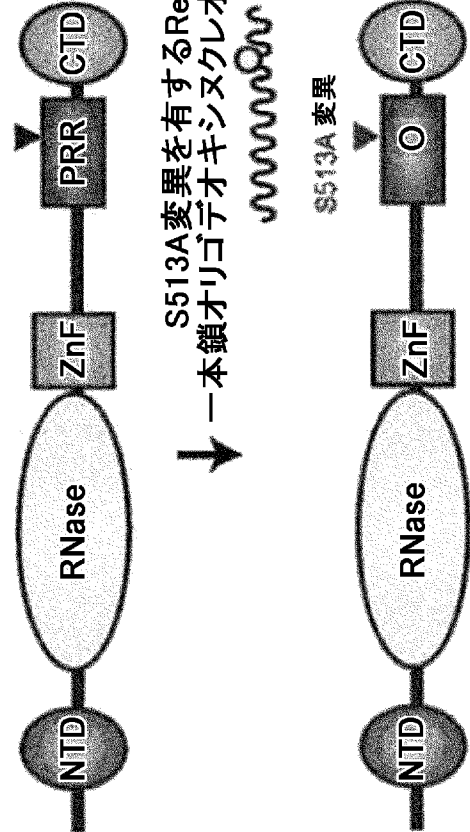


フレームシフトおよび未成熟終止

512 WSEPYHYPHLLSFRSPRDPAAGLVGAPGAGWTTWPKGLVYIPSCVVSPPHTW*

D

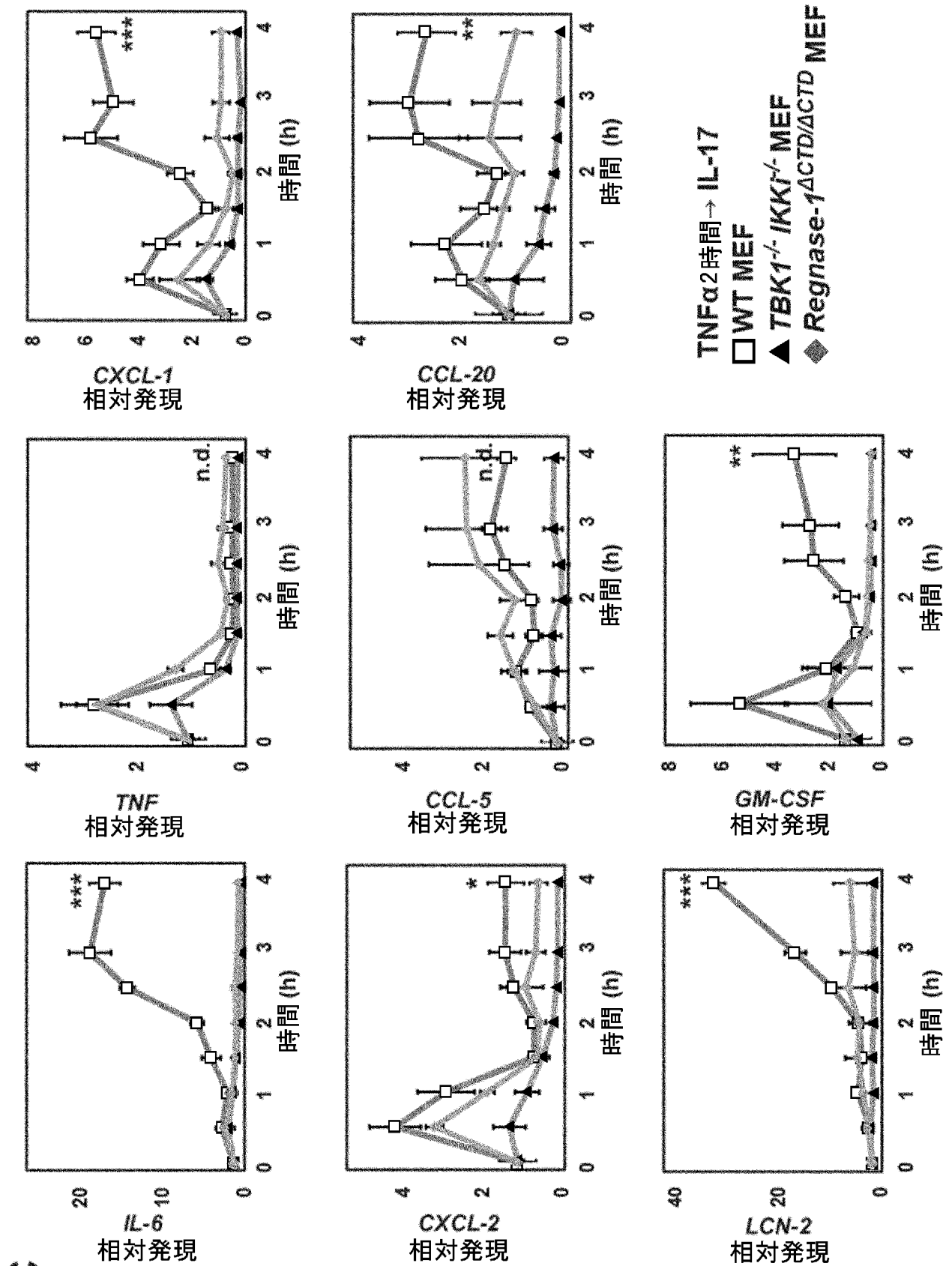
CRISPR-Cas9システムによる
標的ゲノム変異



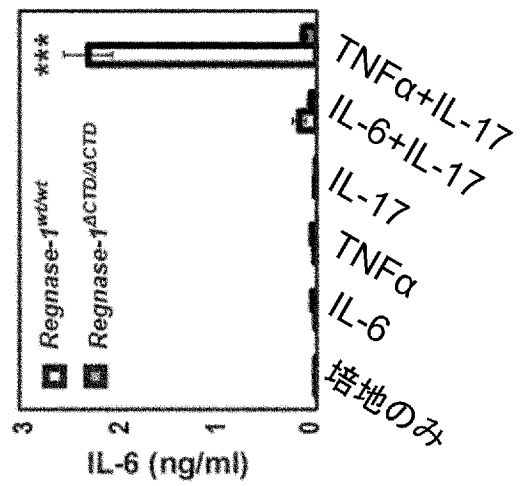
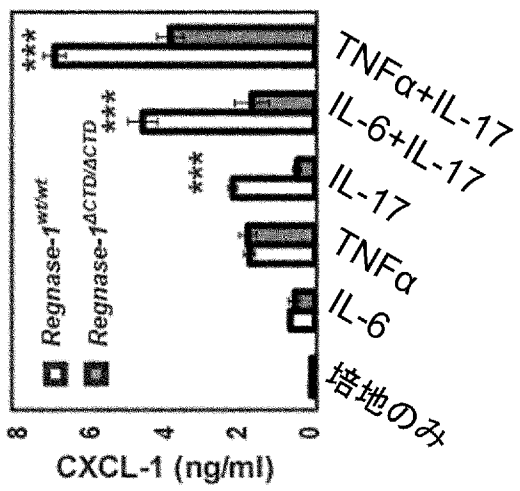
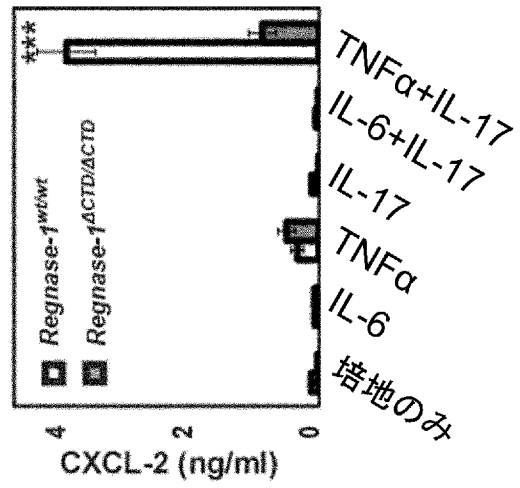
S513A変異を有するRegnase-1
一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN)

S513A 変異

[図17-2]

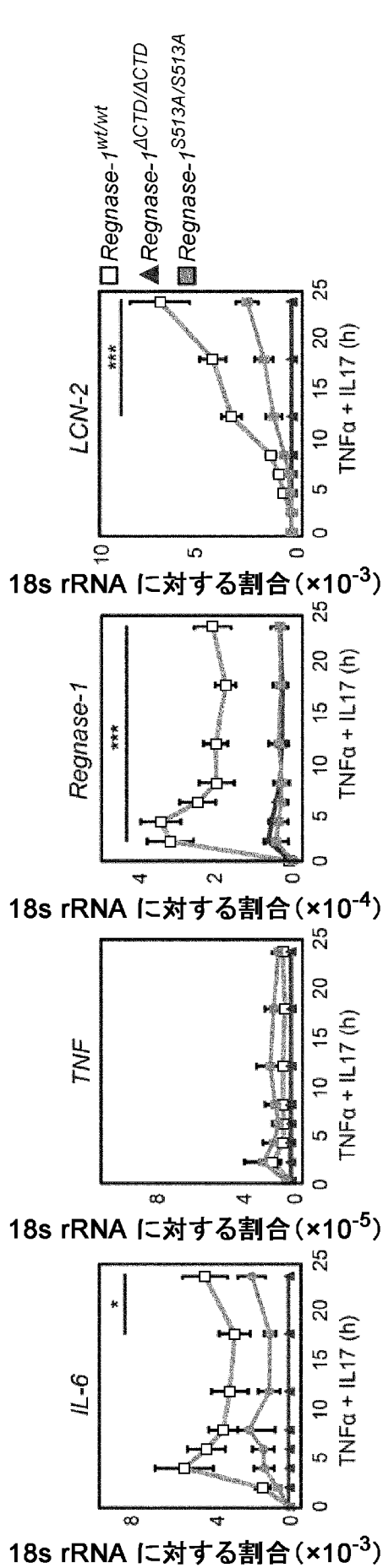
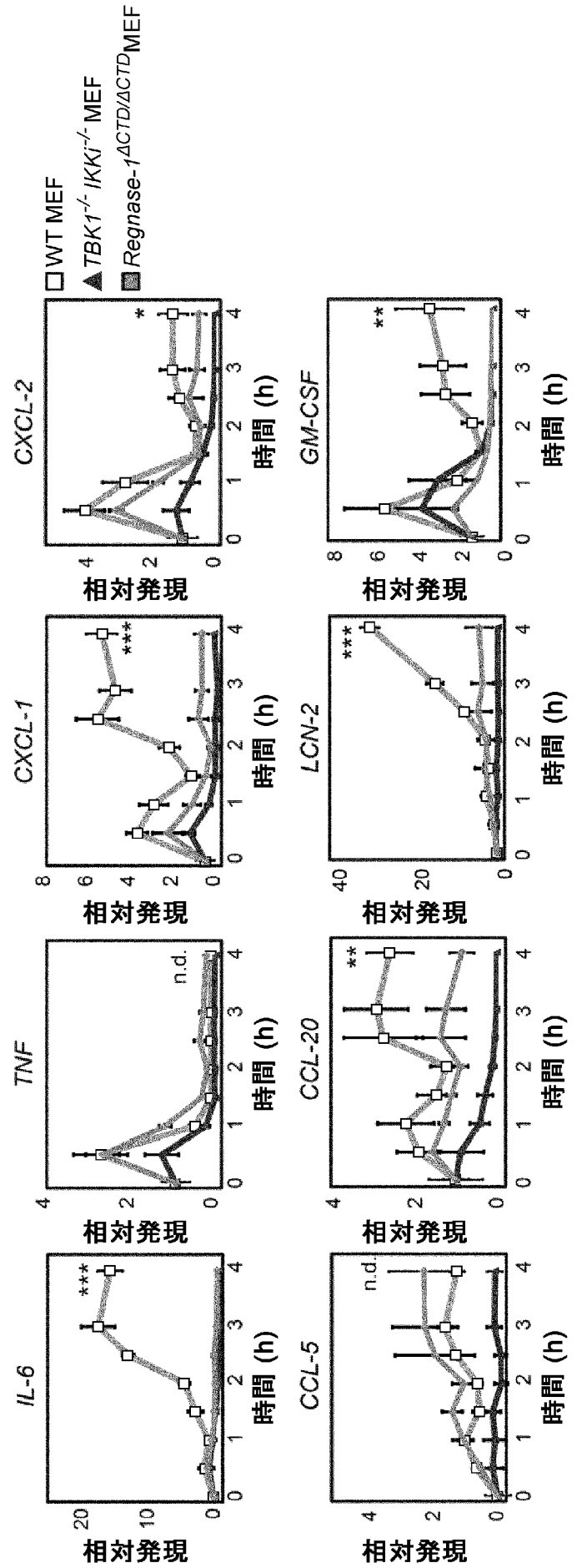


[図17-3]

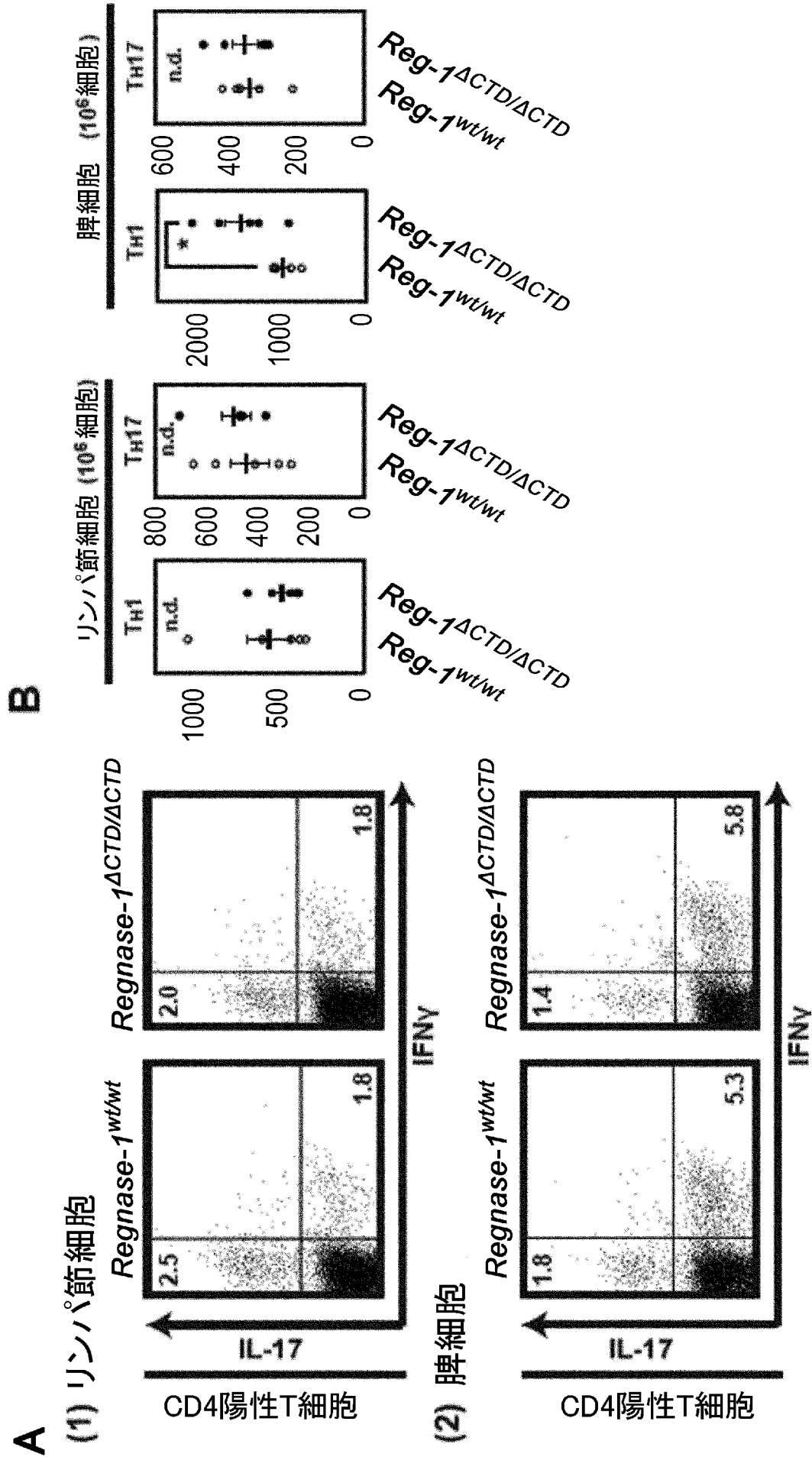


D

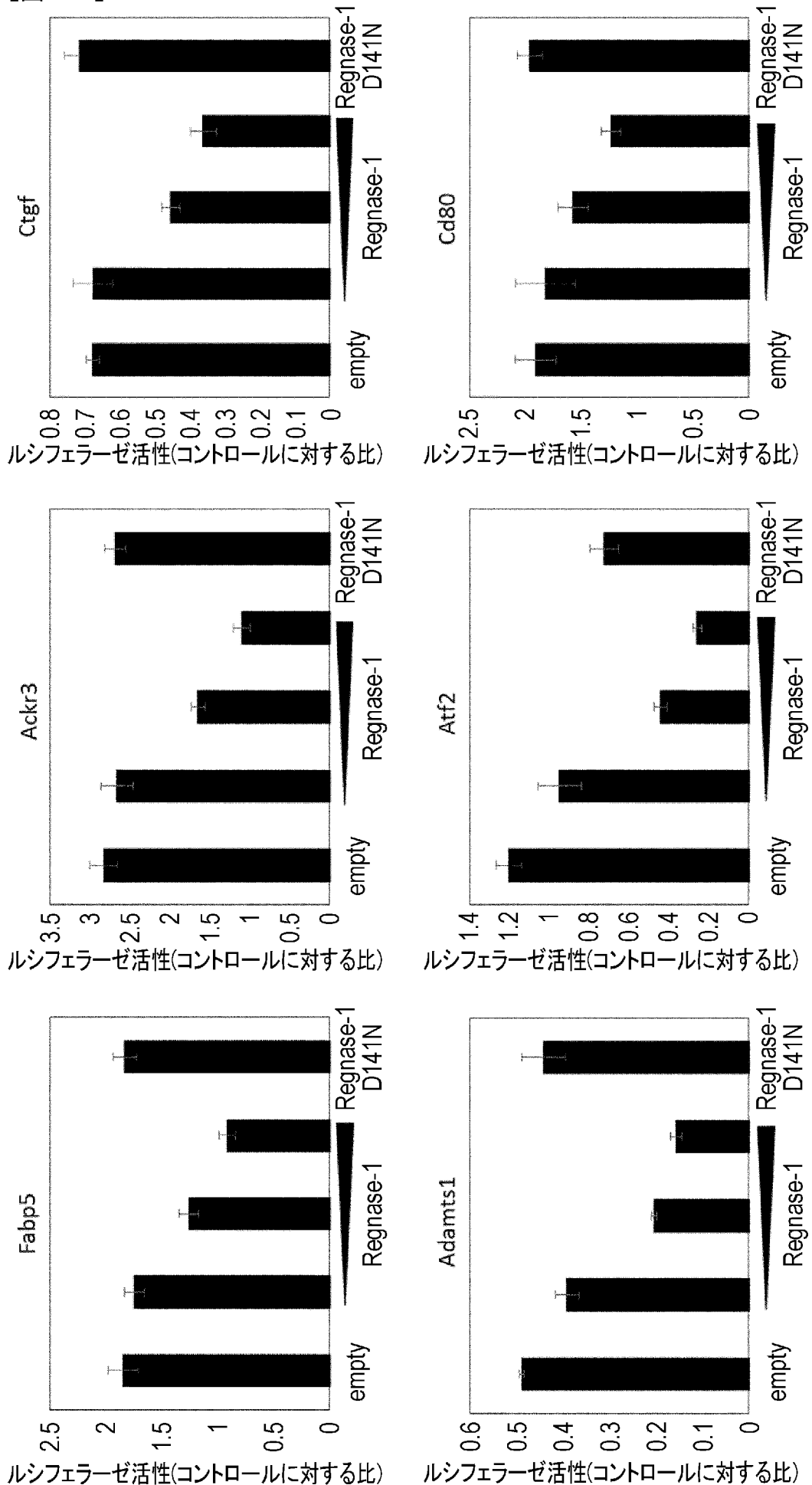
[図17-4]

E TNF α およびIL-17による刺激F TNF α 2時間 → IL-17による刺激

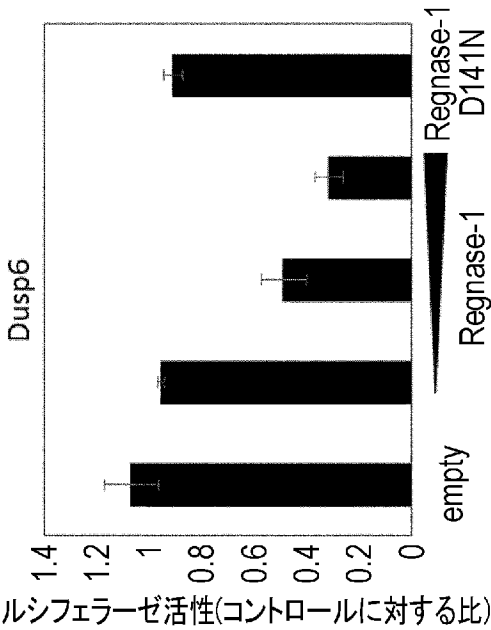
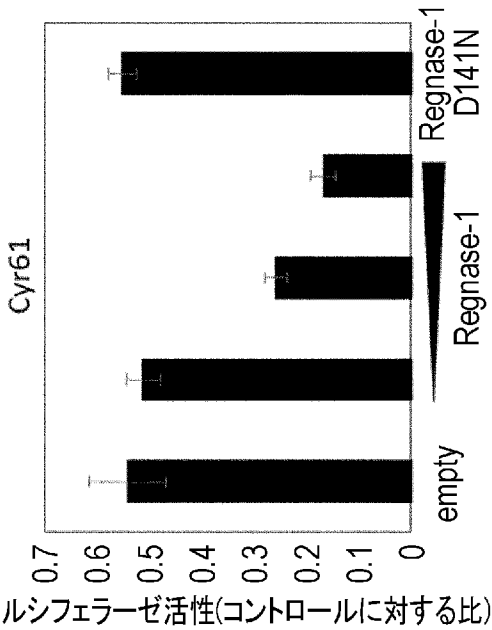
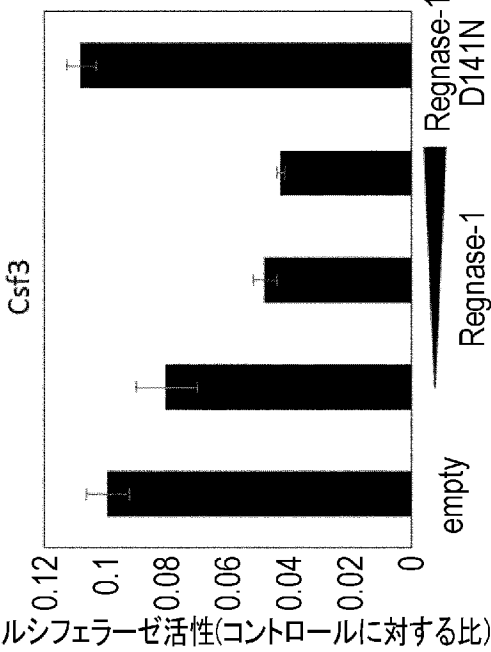
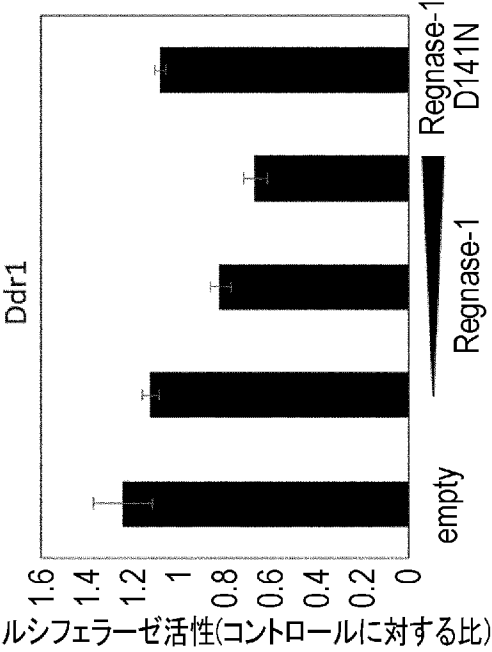
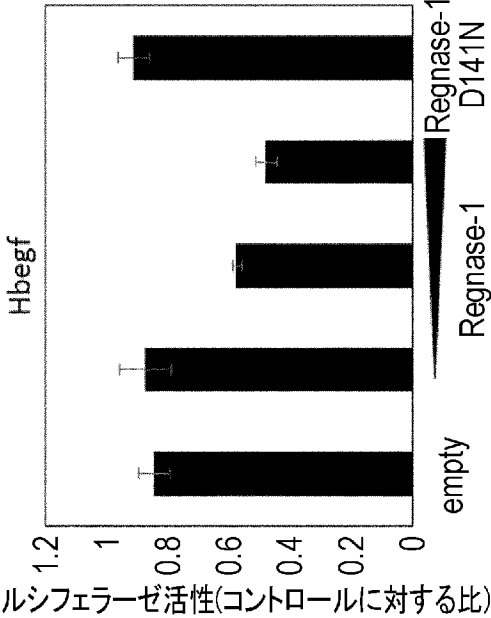
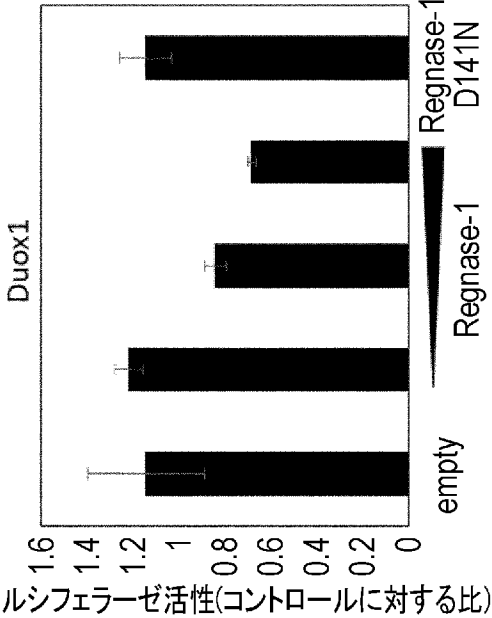
[図18]



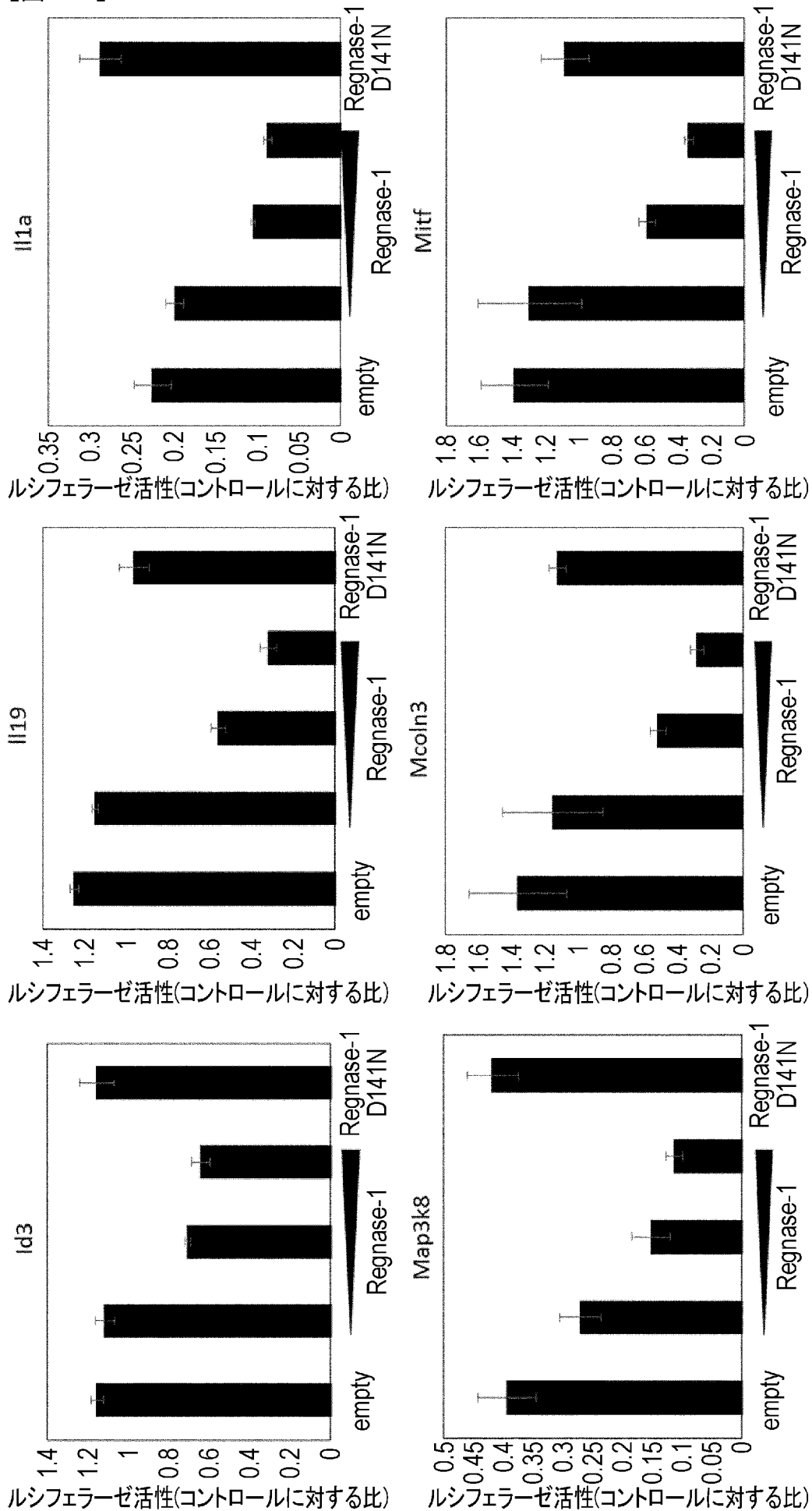
[図19-1]



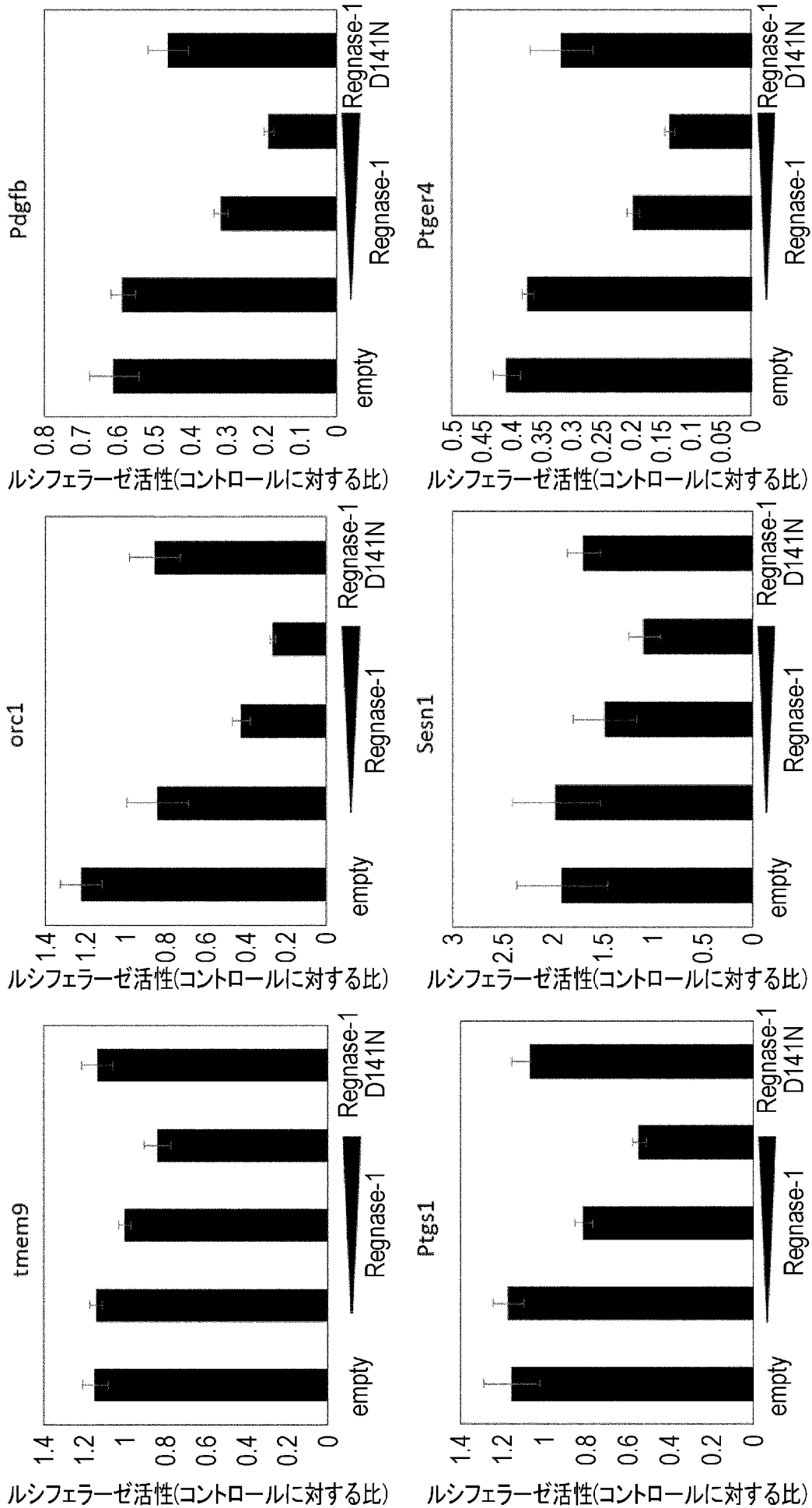
[図19-2]



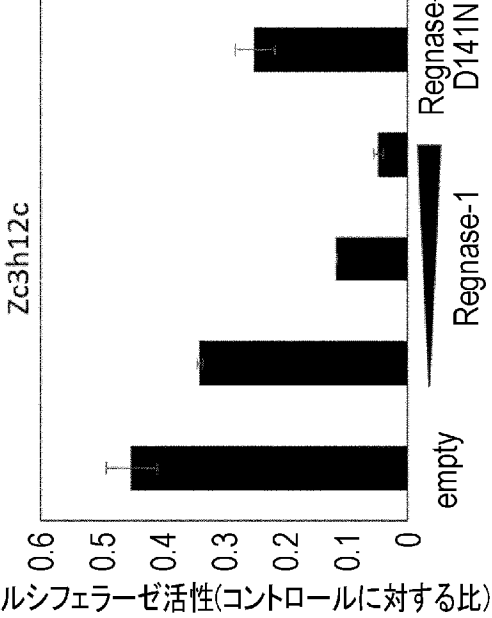
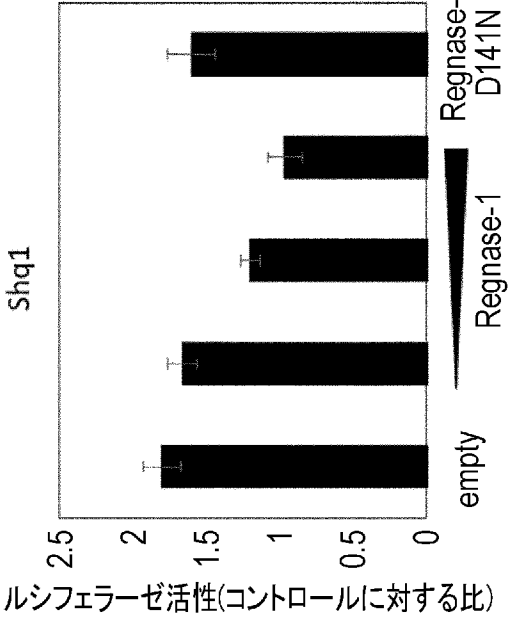
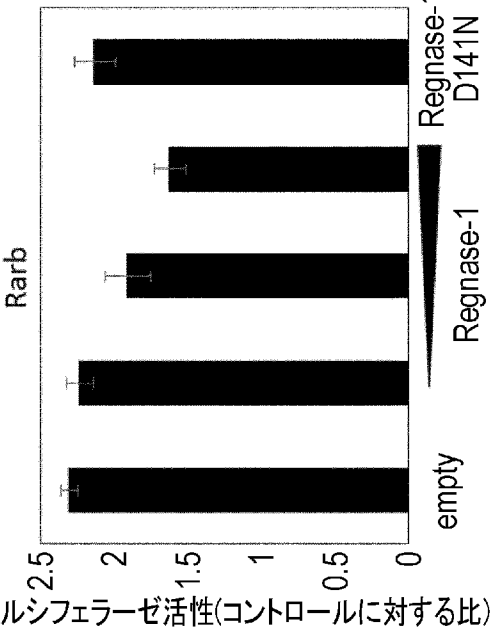
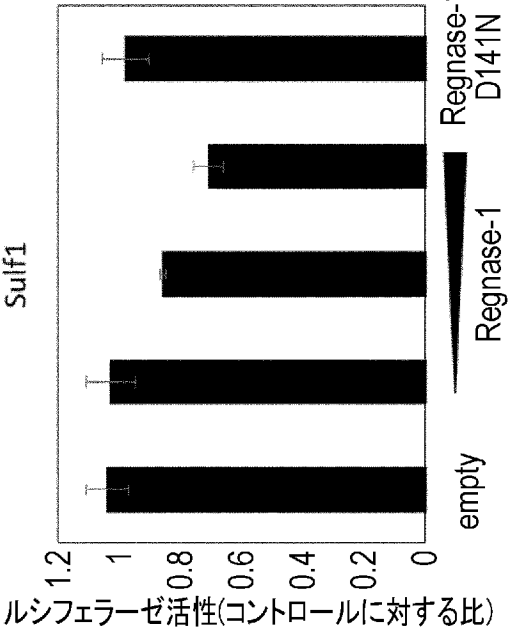
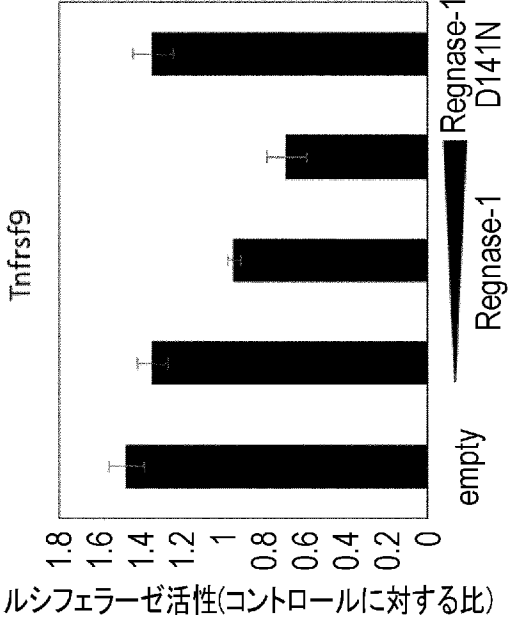
[図19-3]



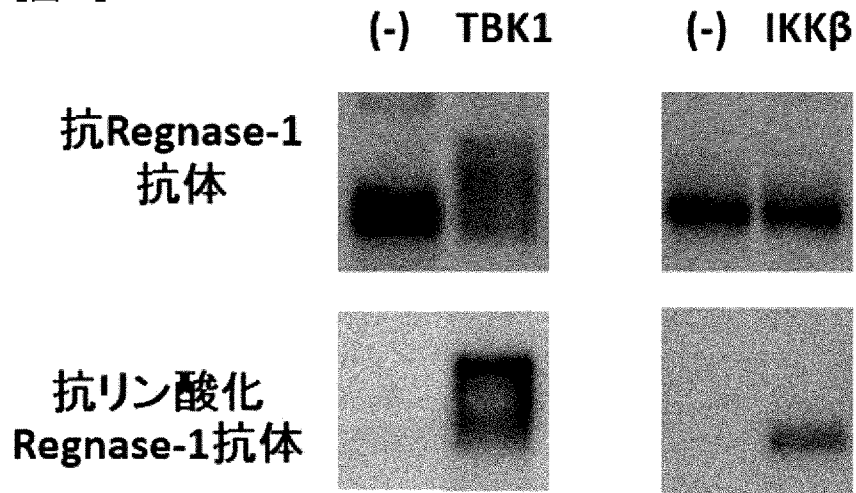
[図19-4]



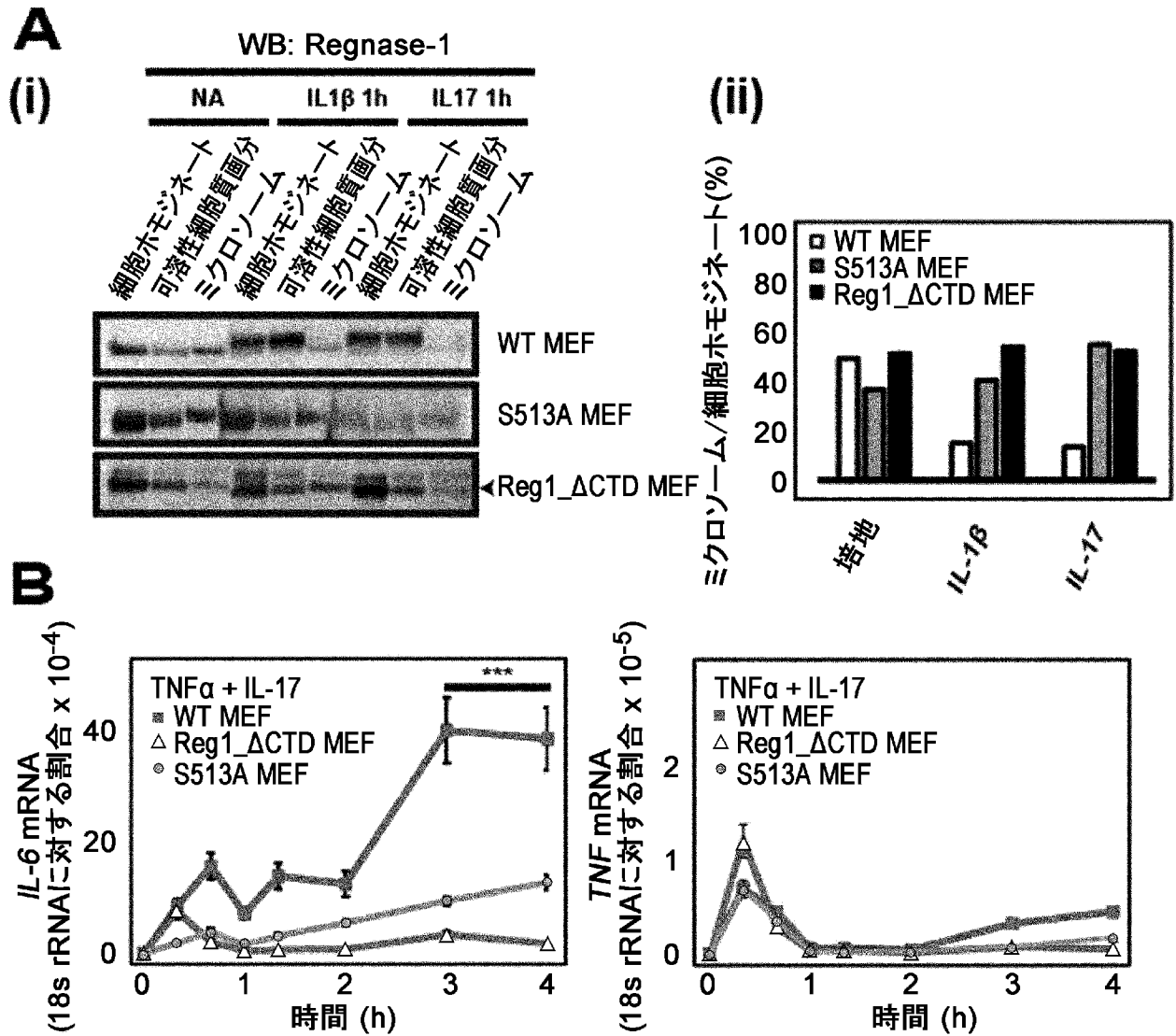
[図19-5]



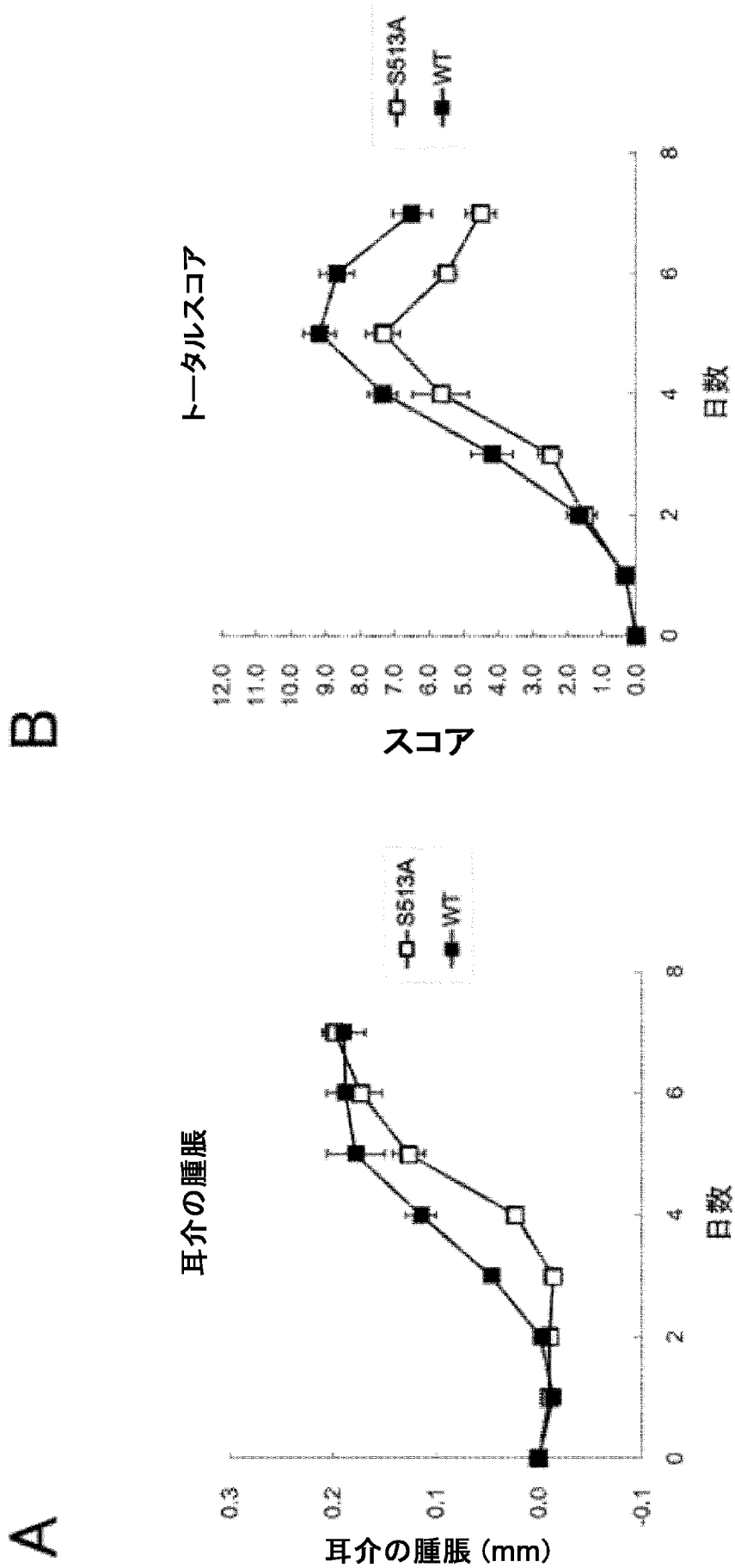
[図20]



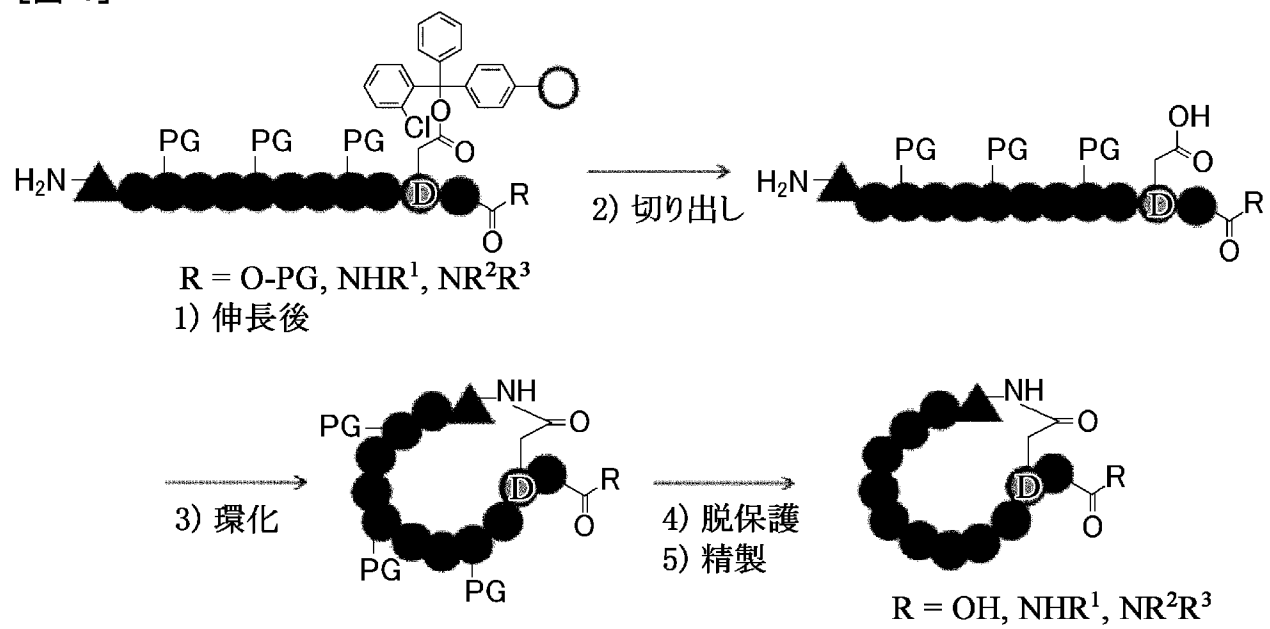
[図21]



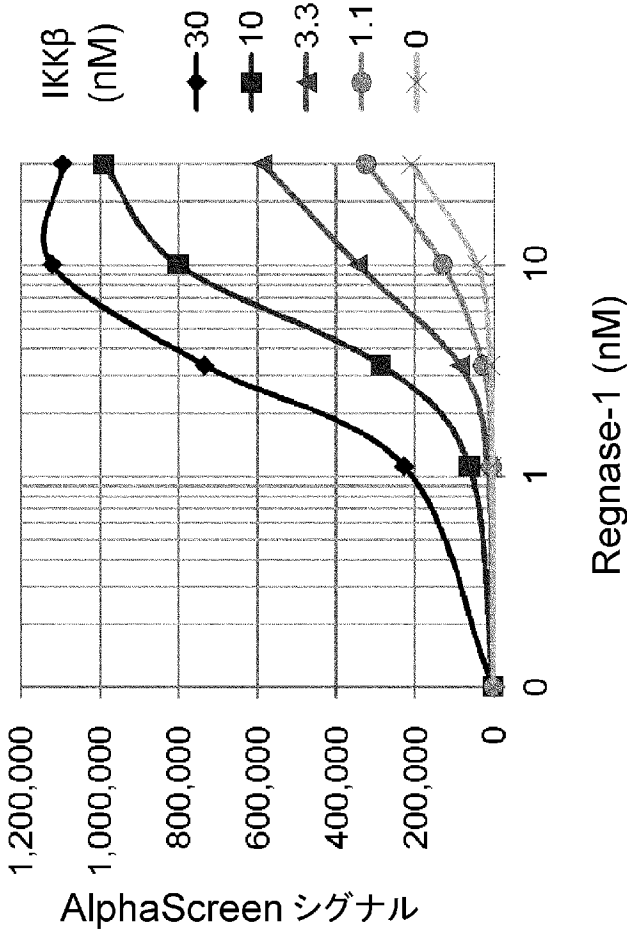
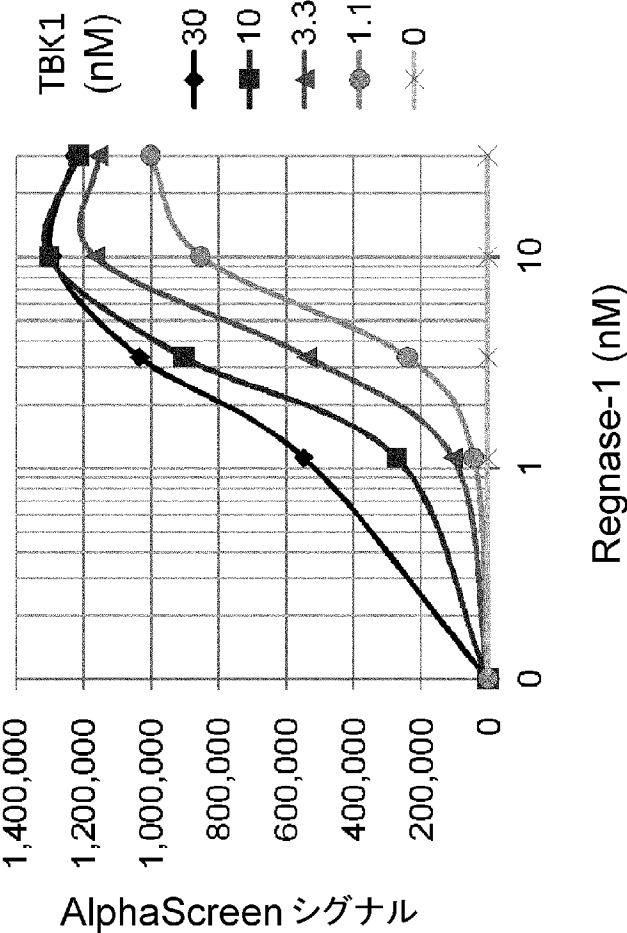
[図22]



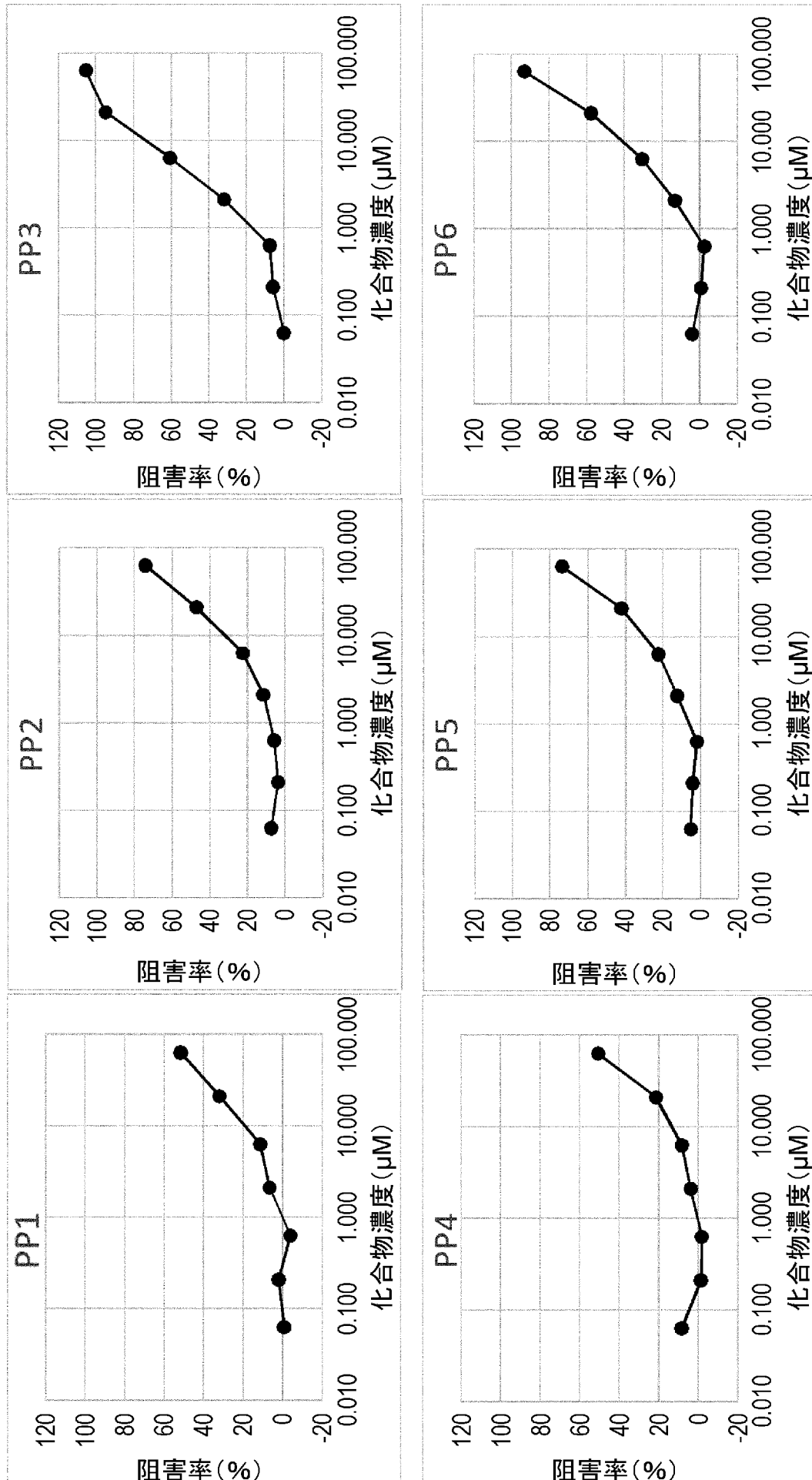
[図23]



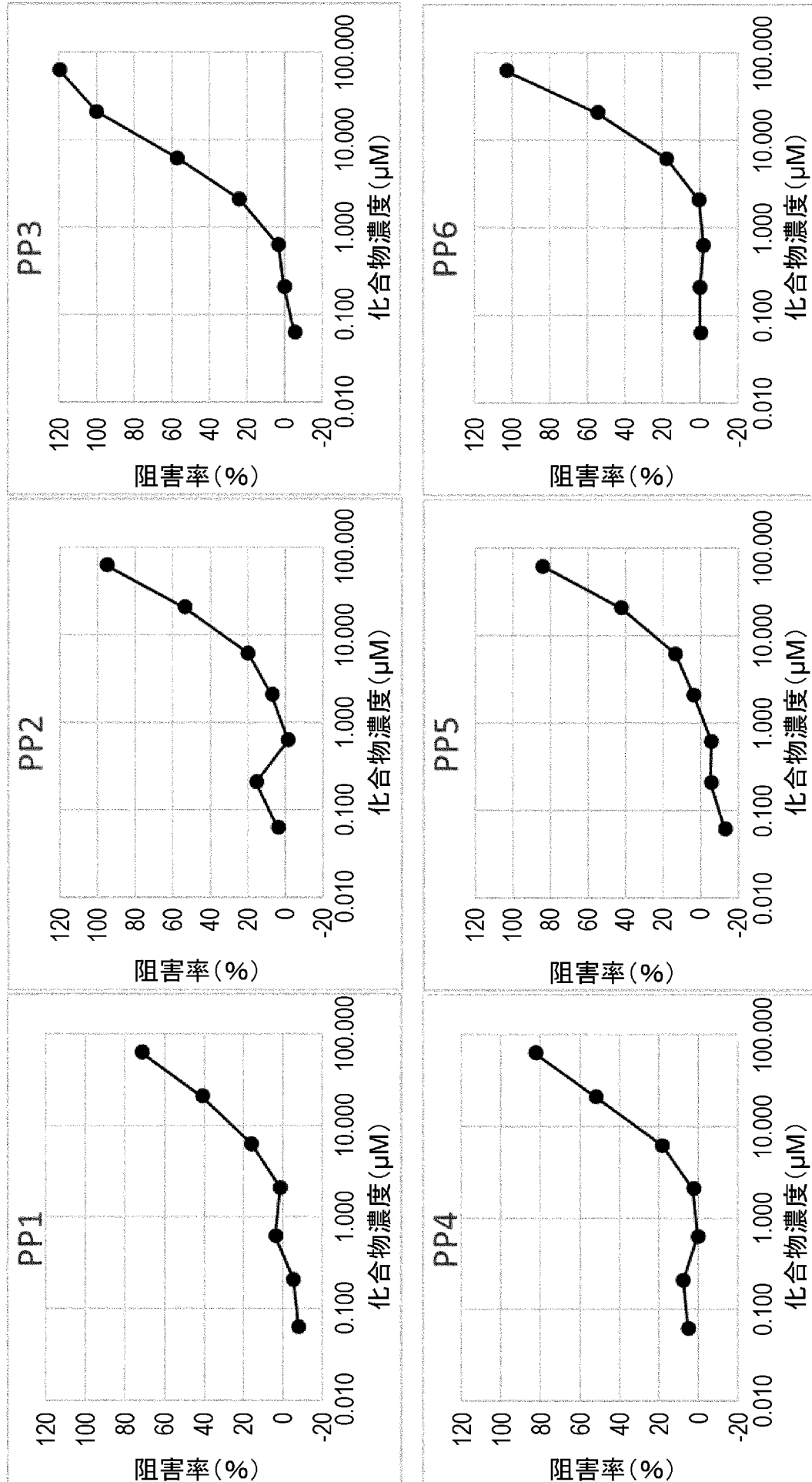
[図24]



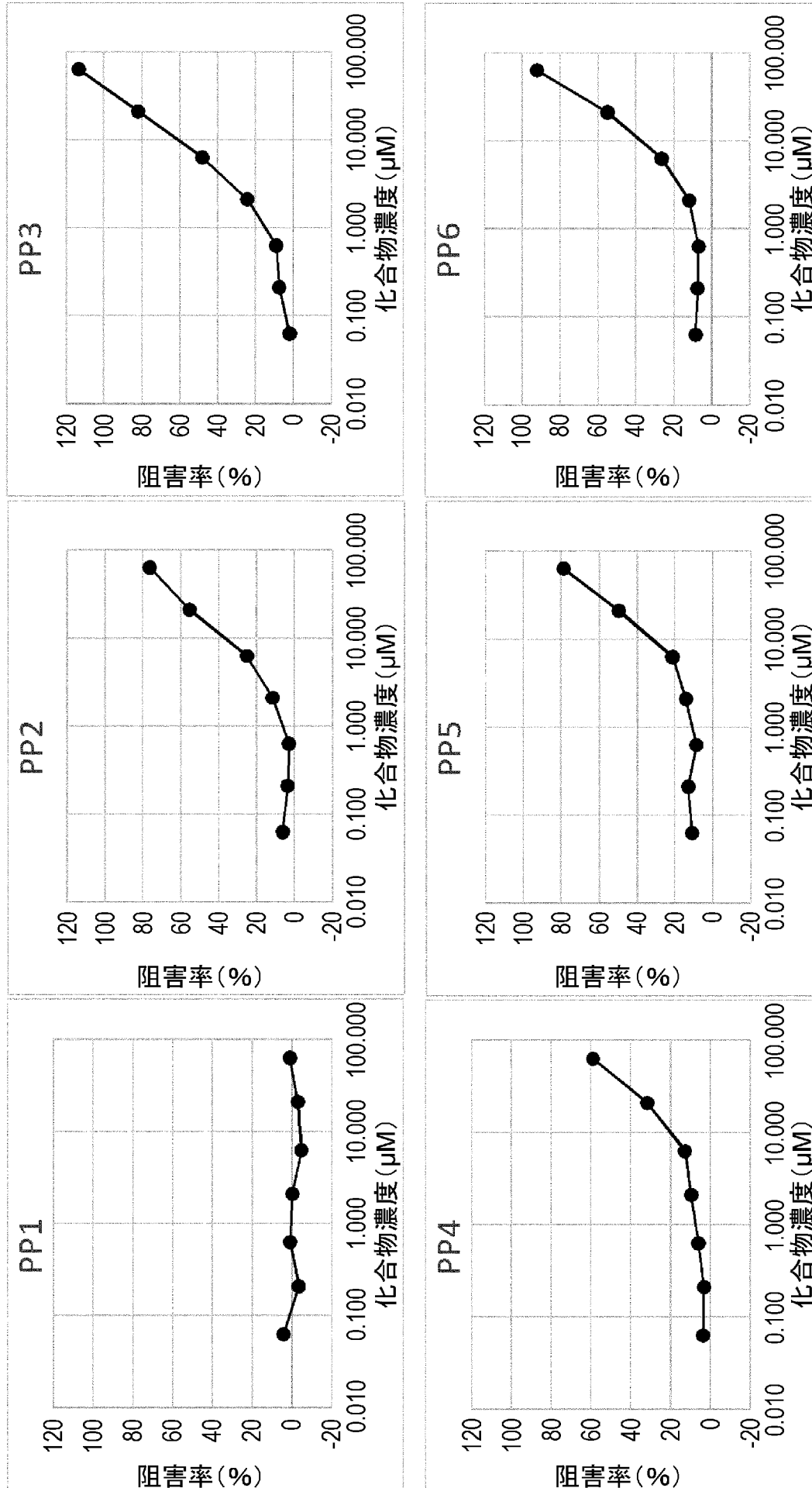
[図25-1]



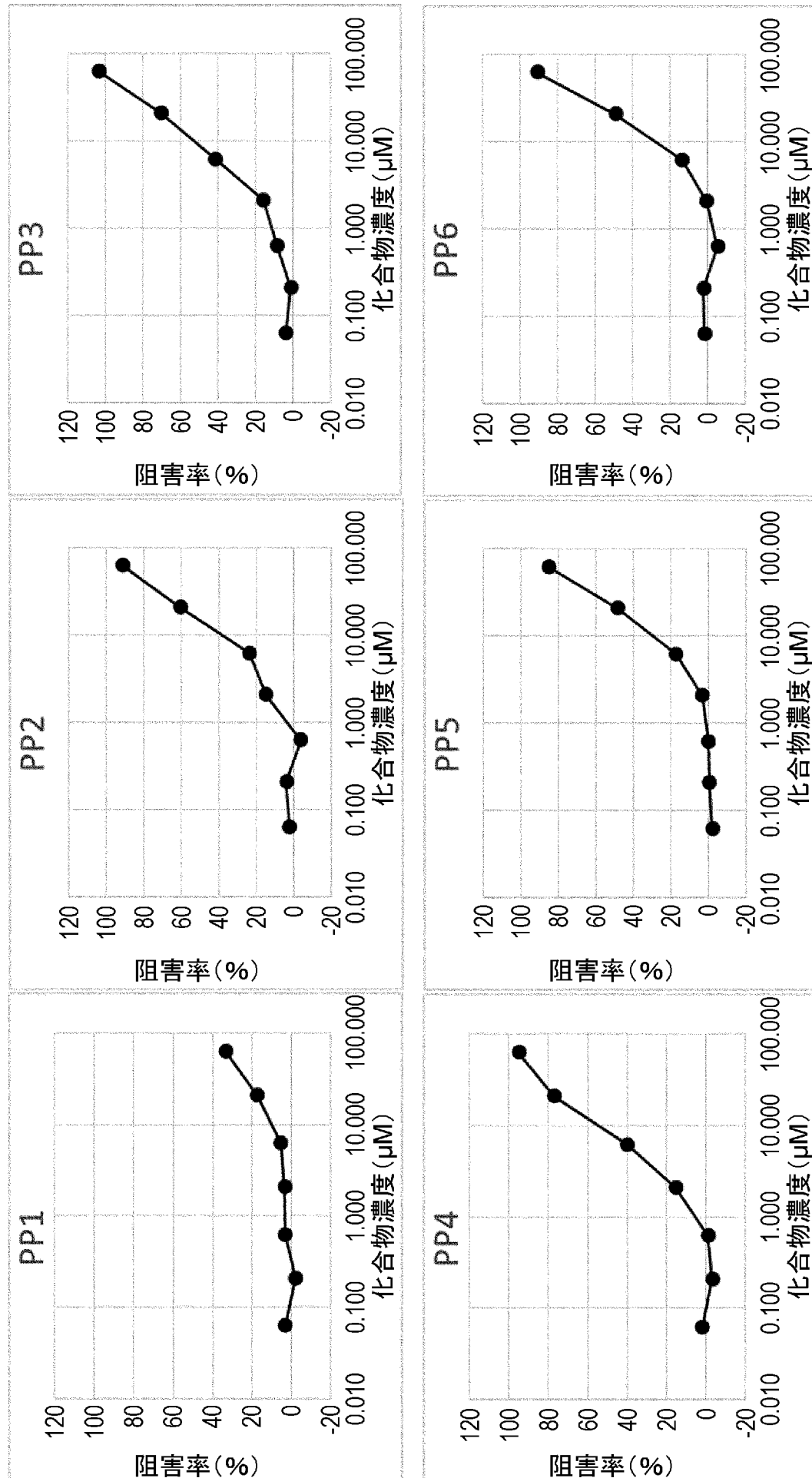
[図25-2]



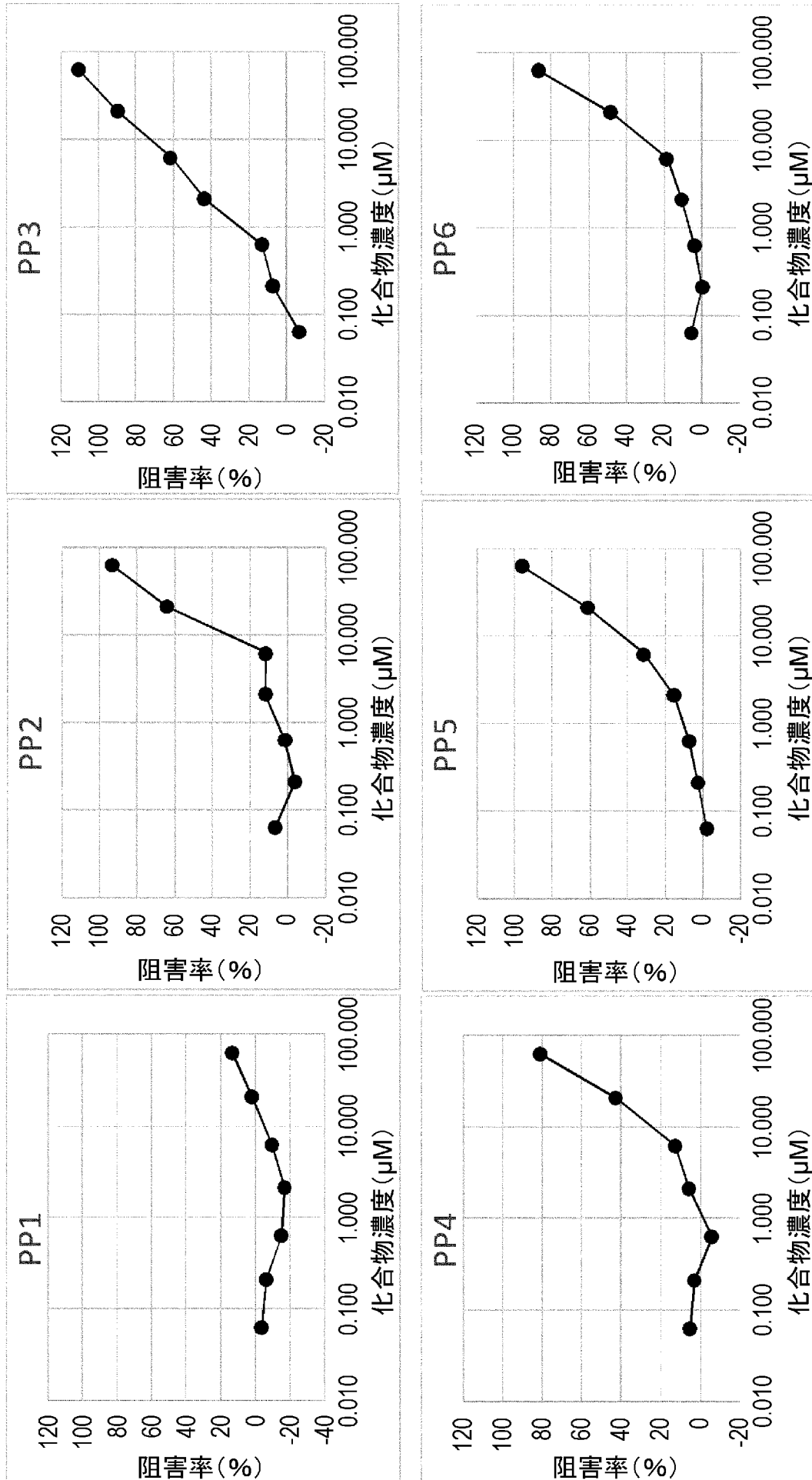
[図26-1]



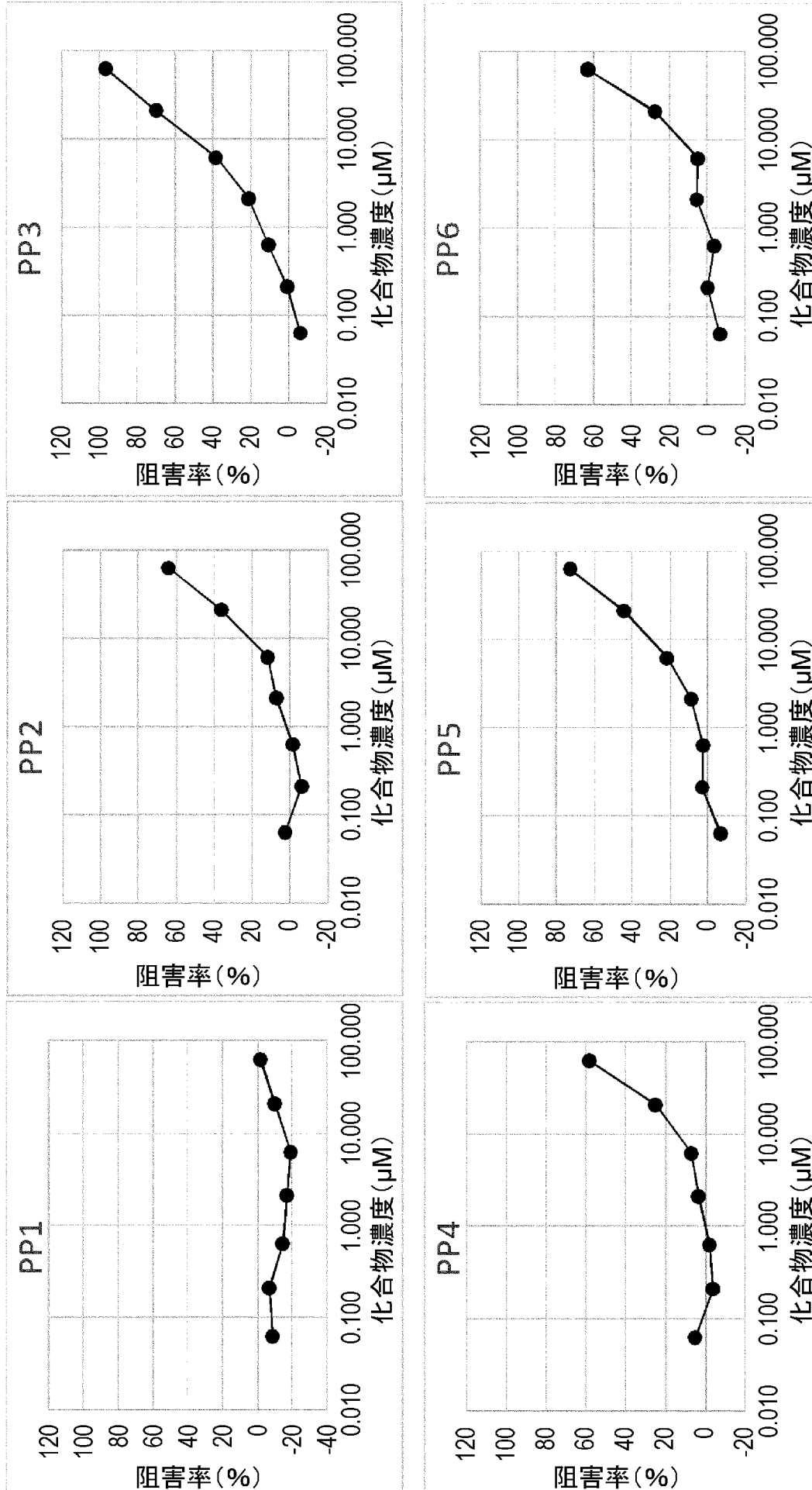
[図26-2]



[図27-1]

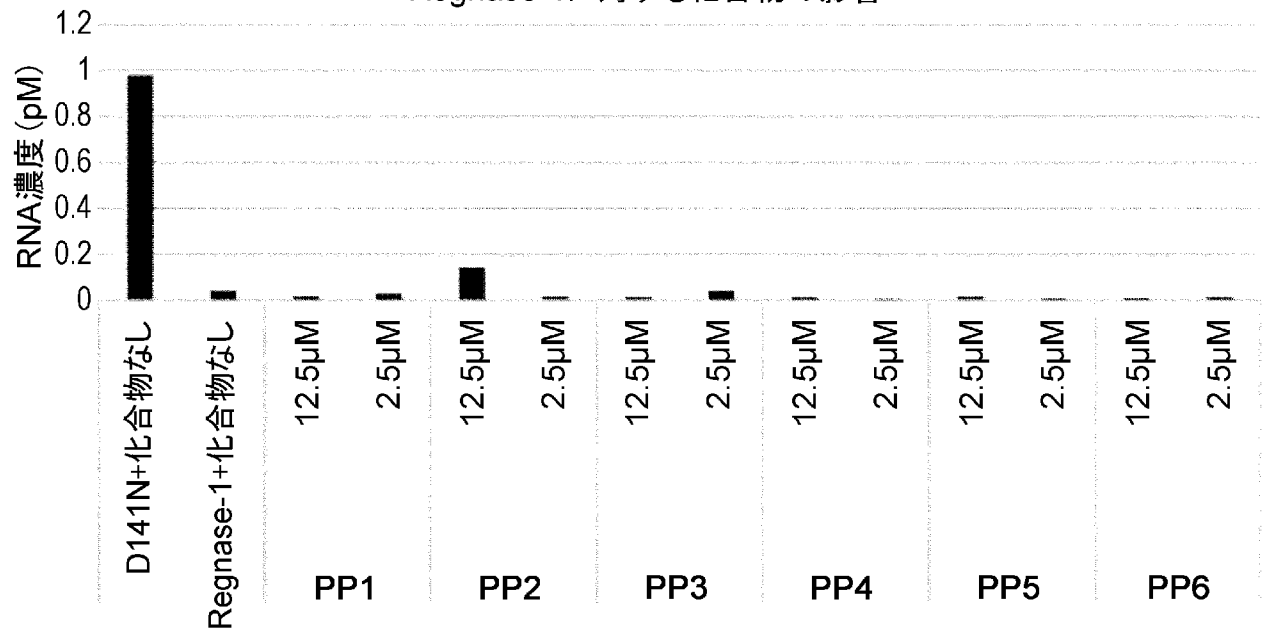


[図27-2]



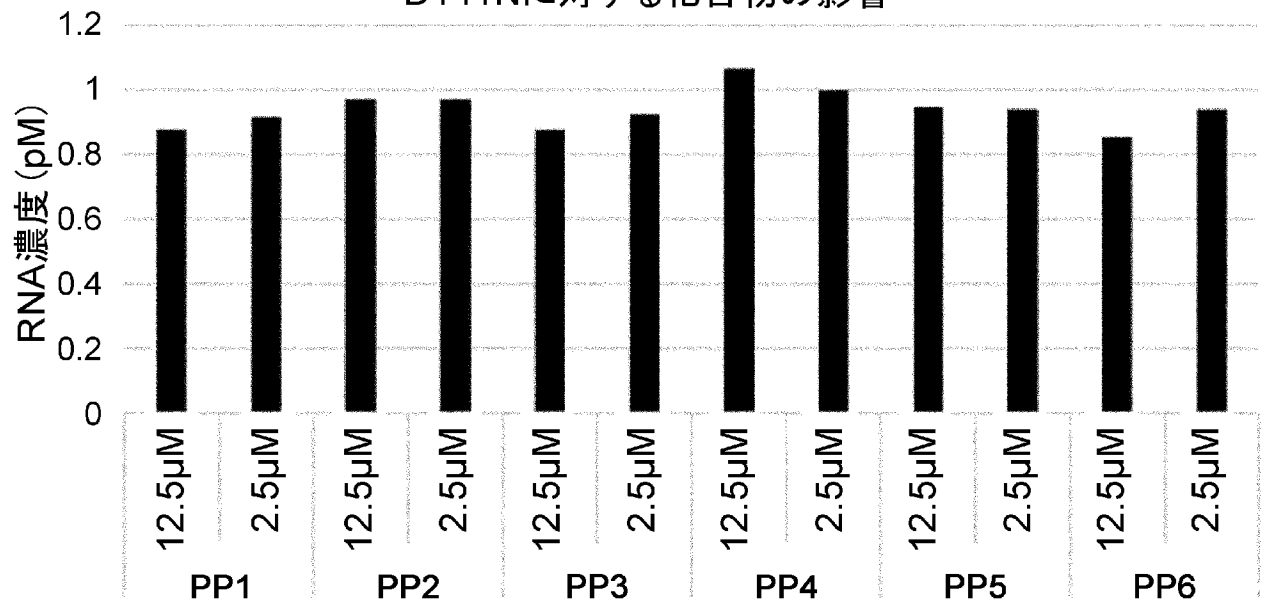
[図28]

Regnase-1に対する化合物の影響

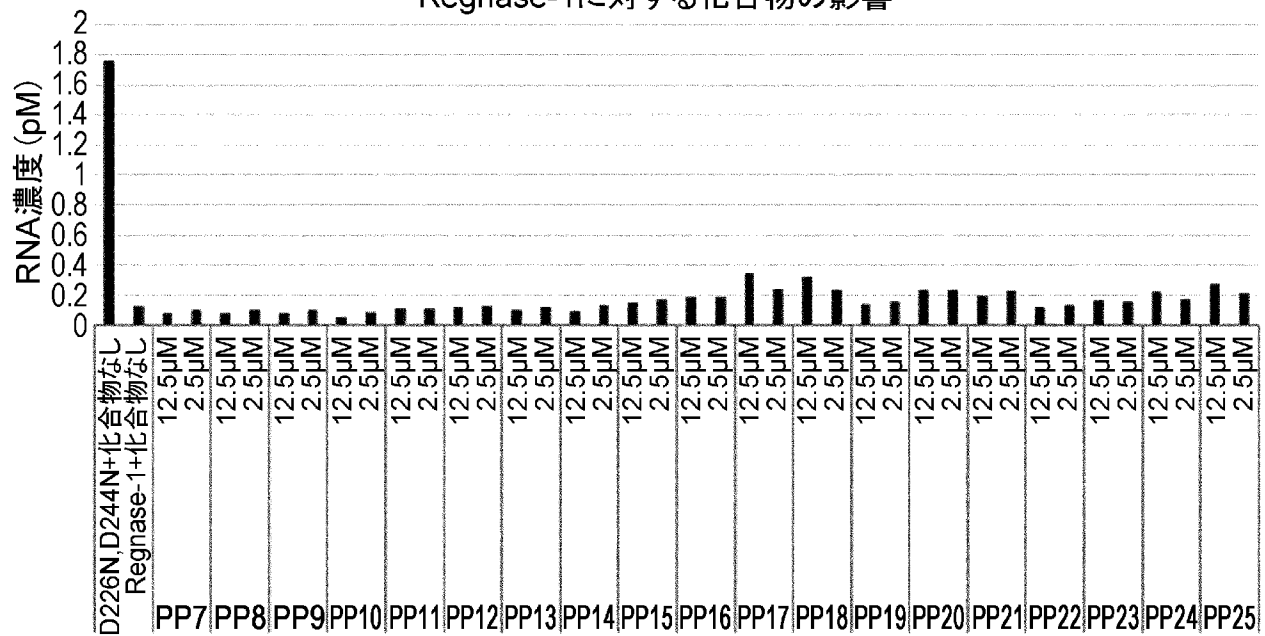


[図29]

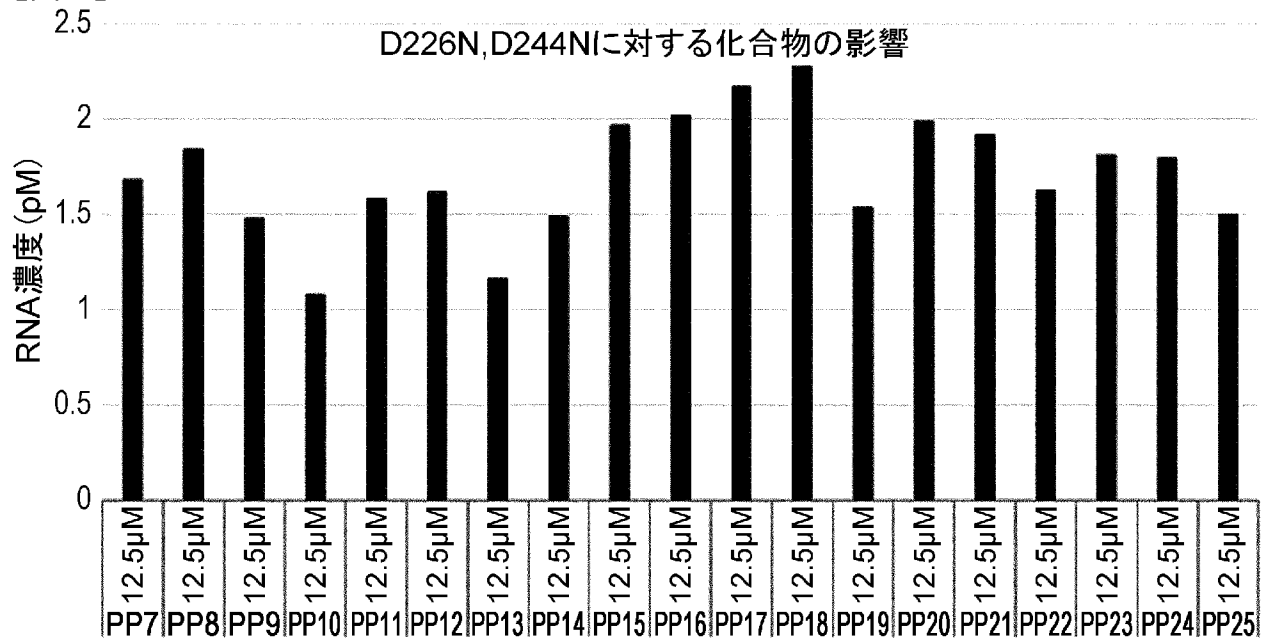
D141Nに対する化合物の影響



Regnase-1に対する化合物の影響

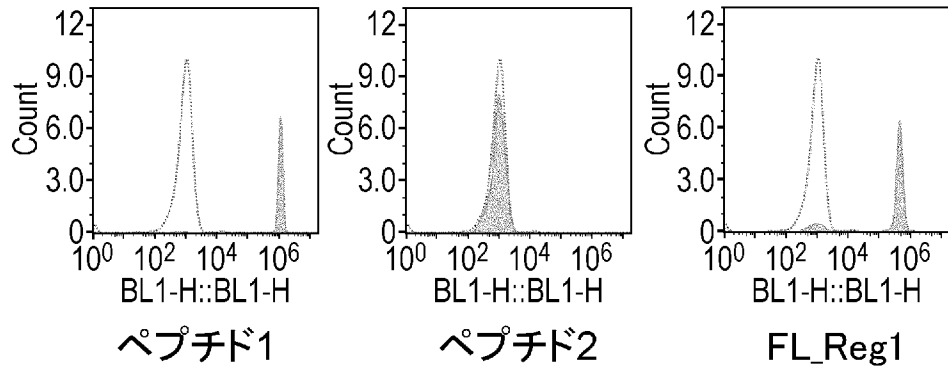


D226N,D244Nに対する化合物の影響

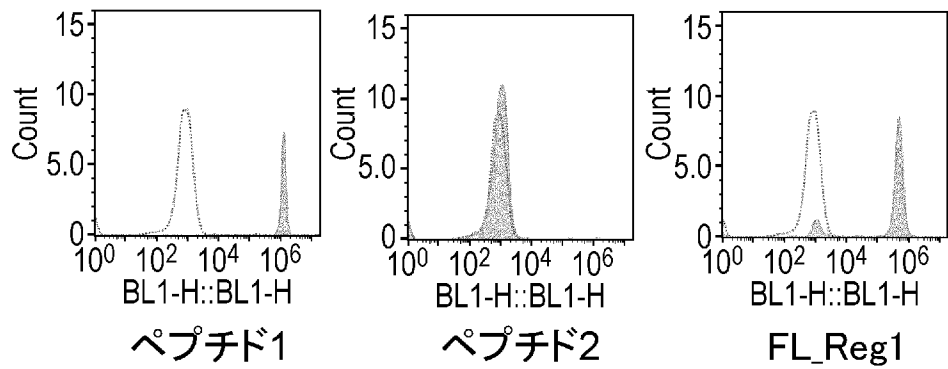


[図32]

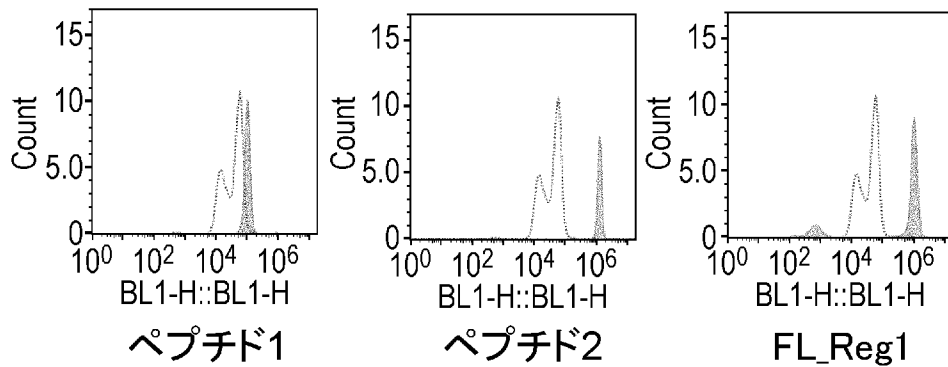
REA0023



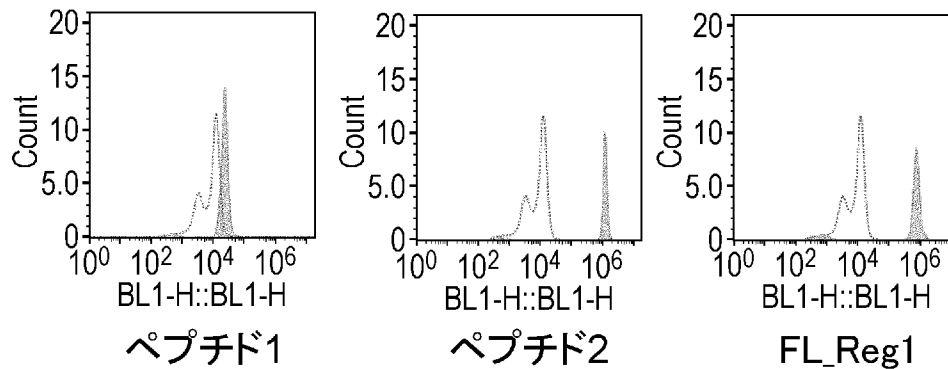
REA0027



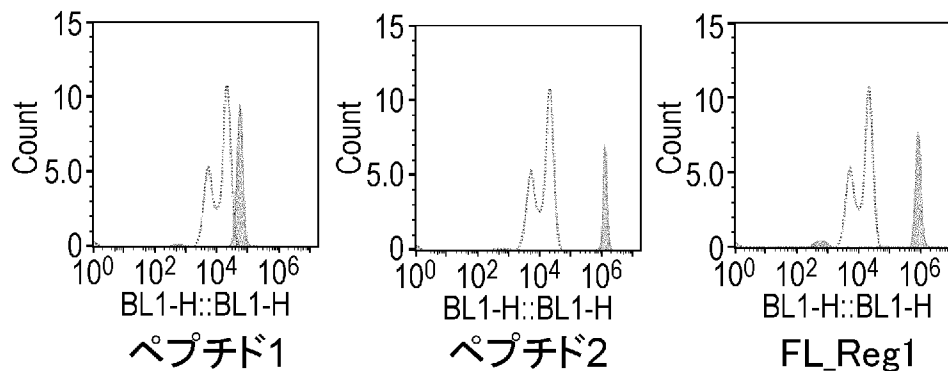
REB0007



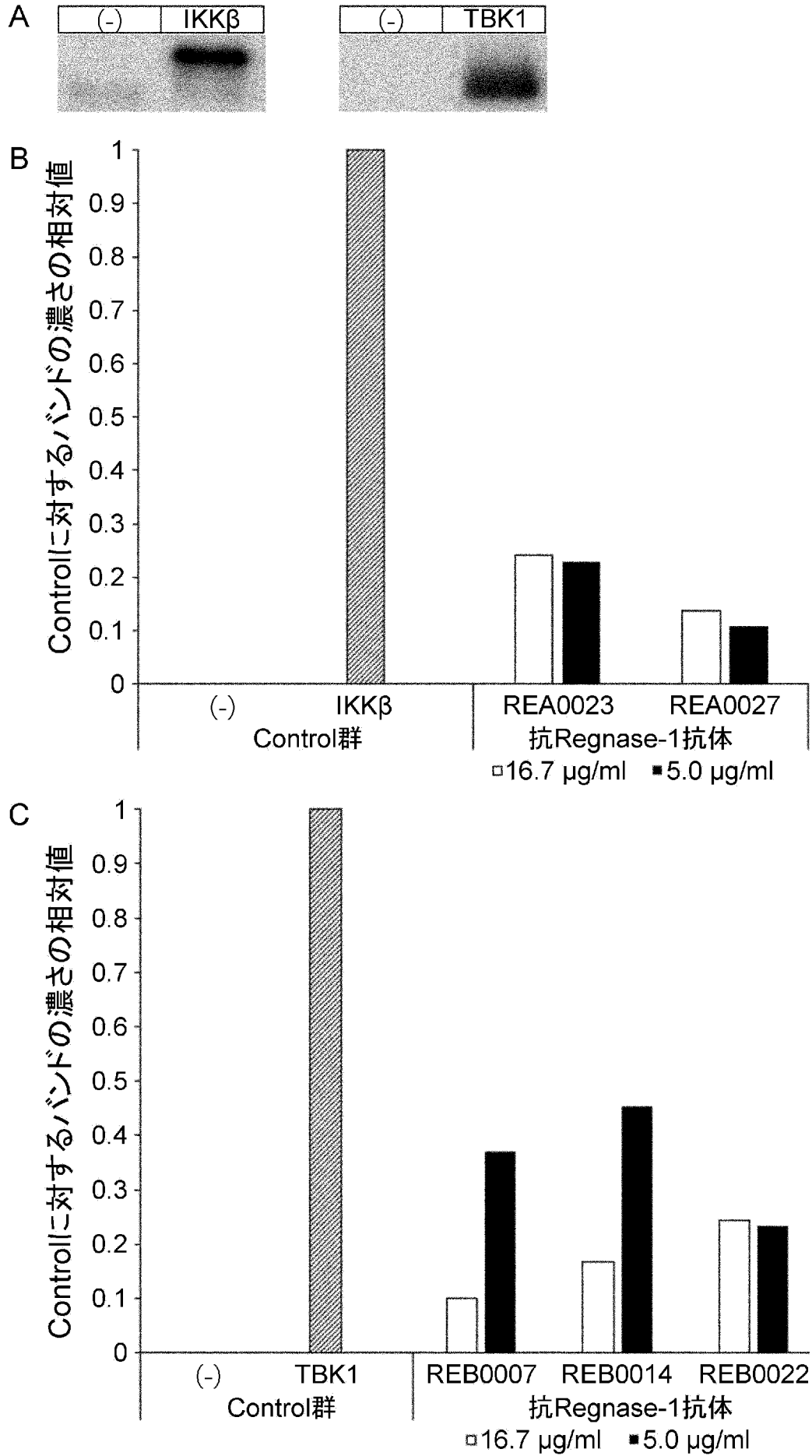
REB0014



REB0022

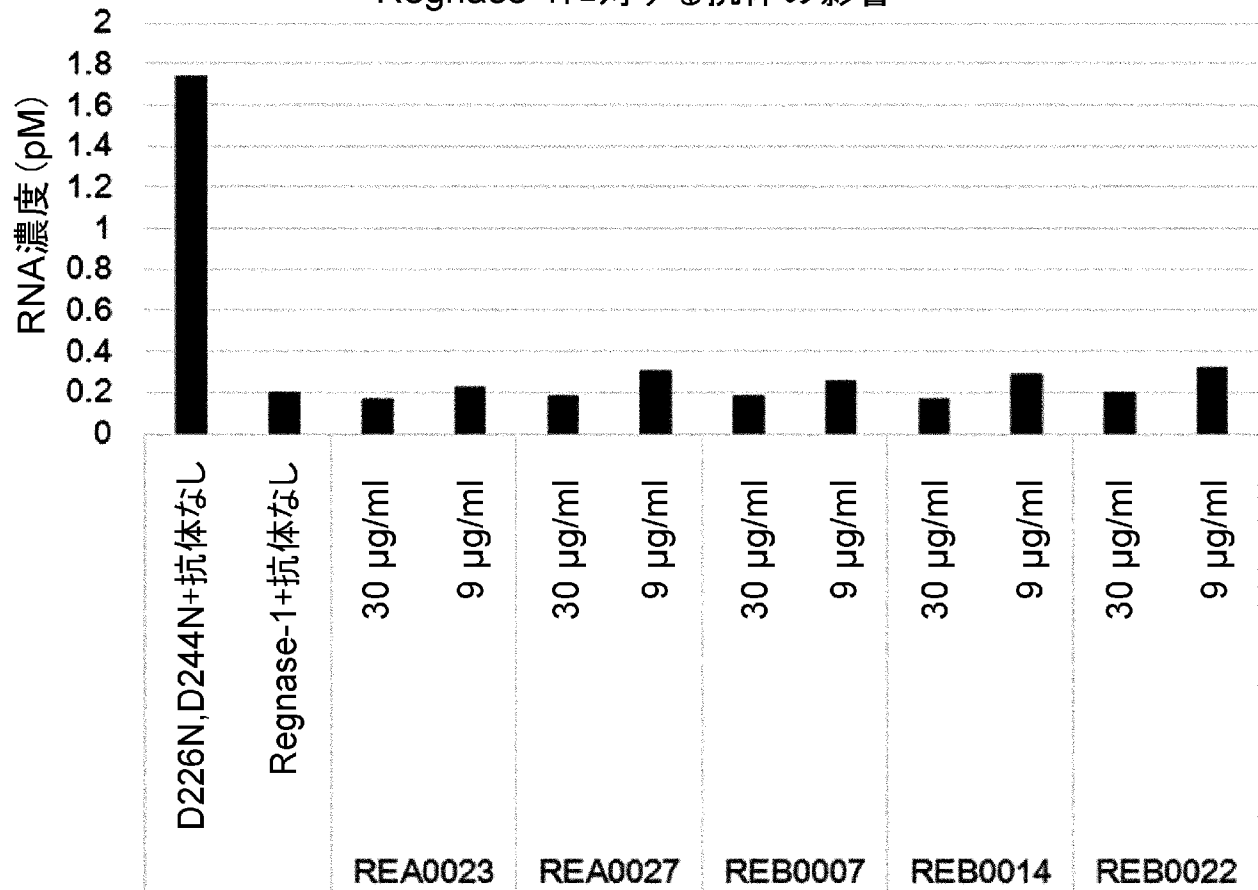


[図33]



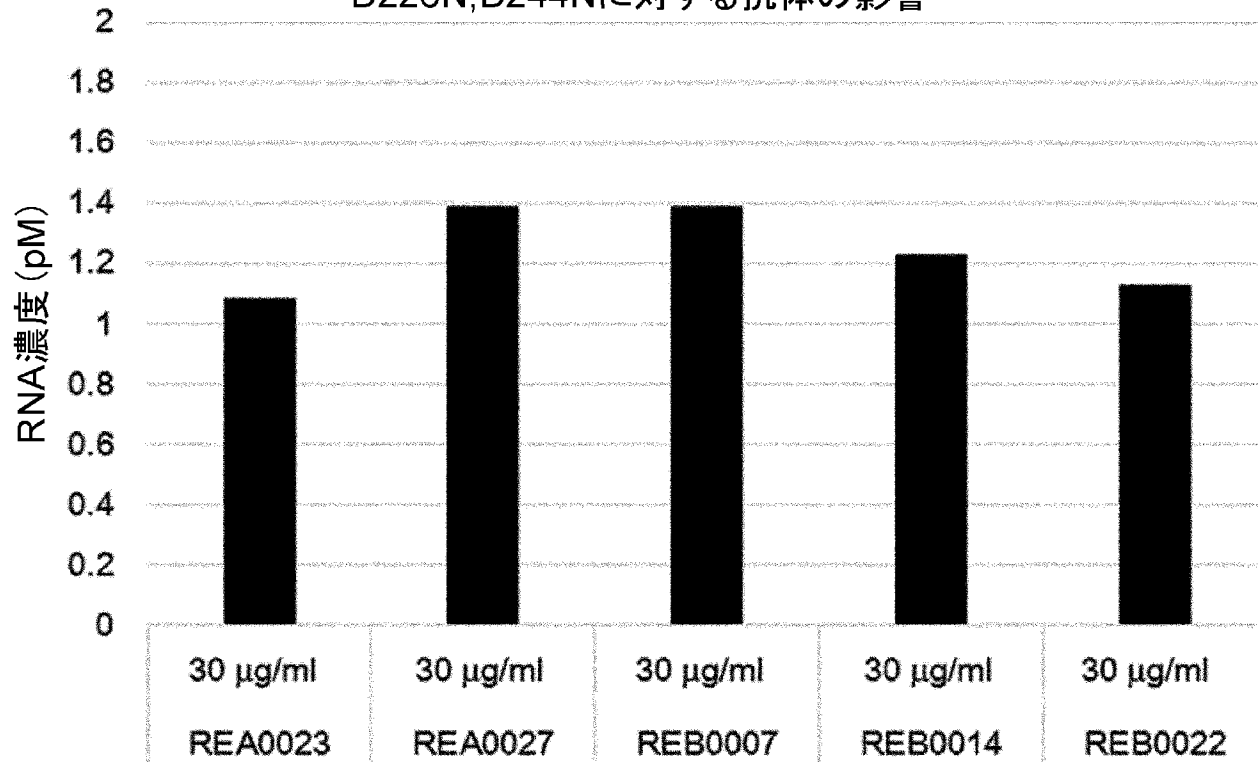
[図34]

Regnase-1に対する抗体の影響



[図35]

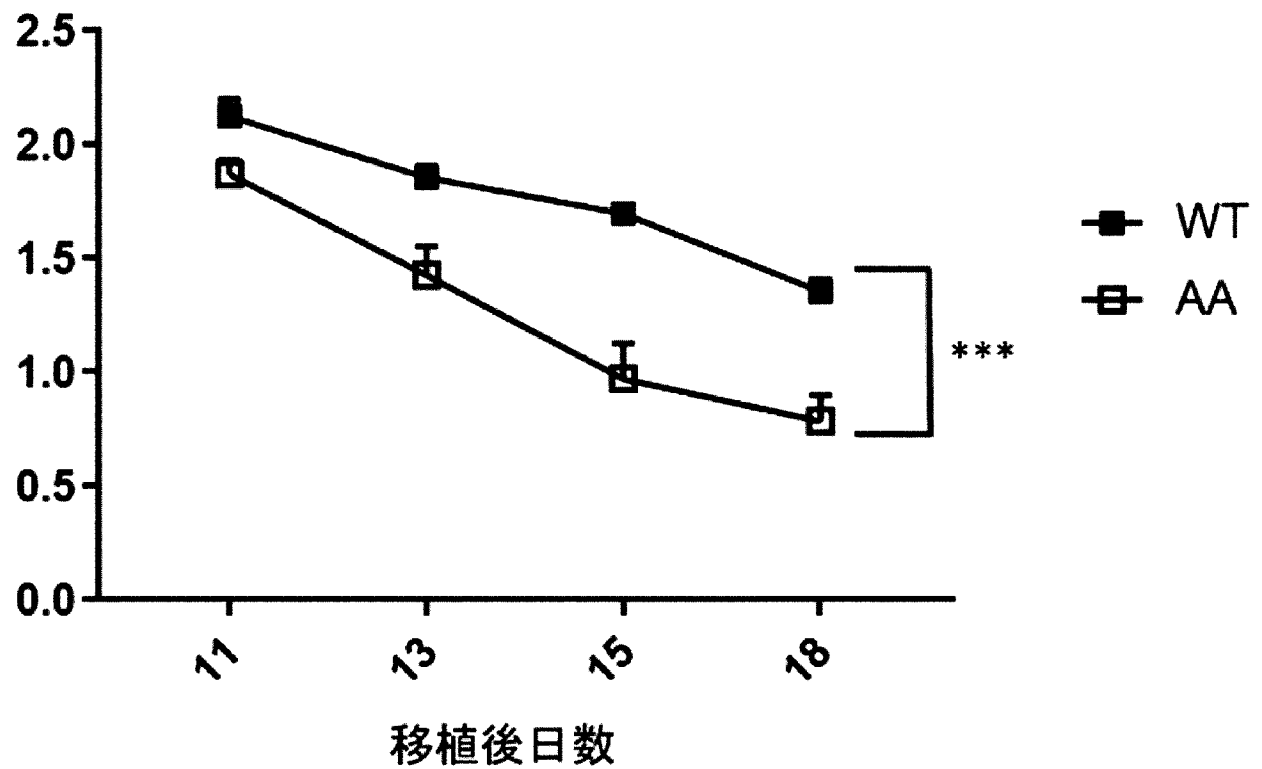
D226N, D244Nに対する抗体の影響



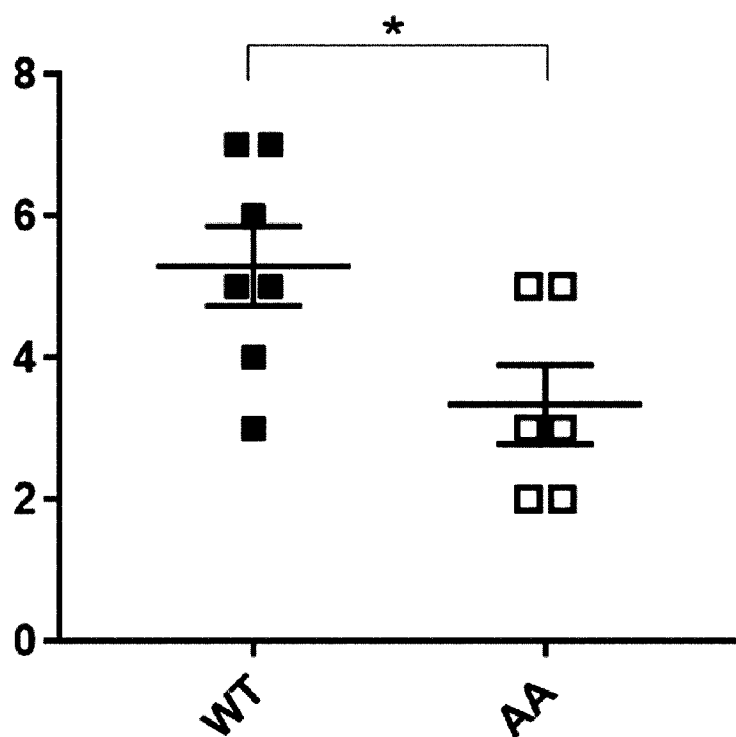
[図36]

A

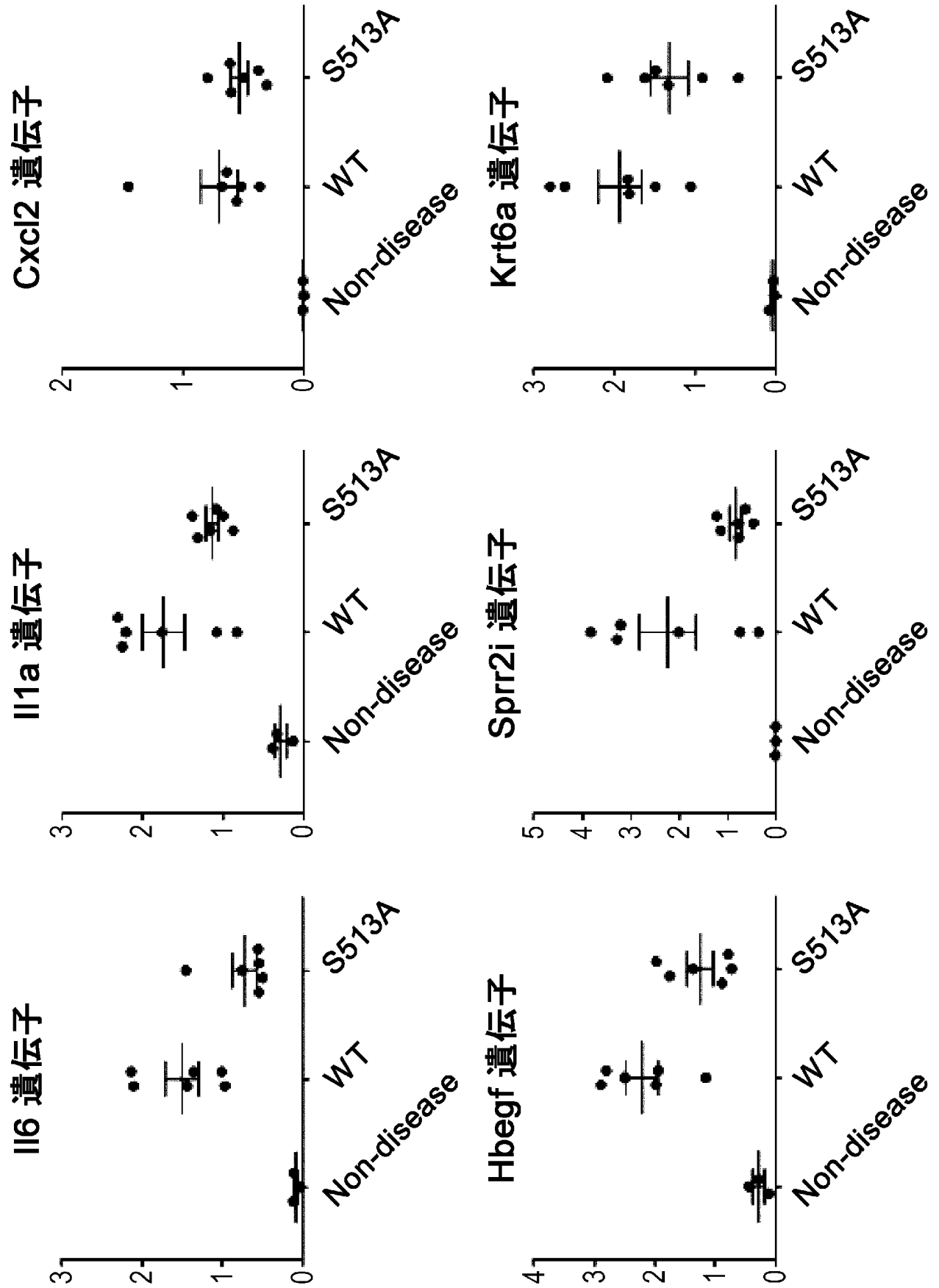
眼炎症スコア

**B**

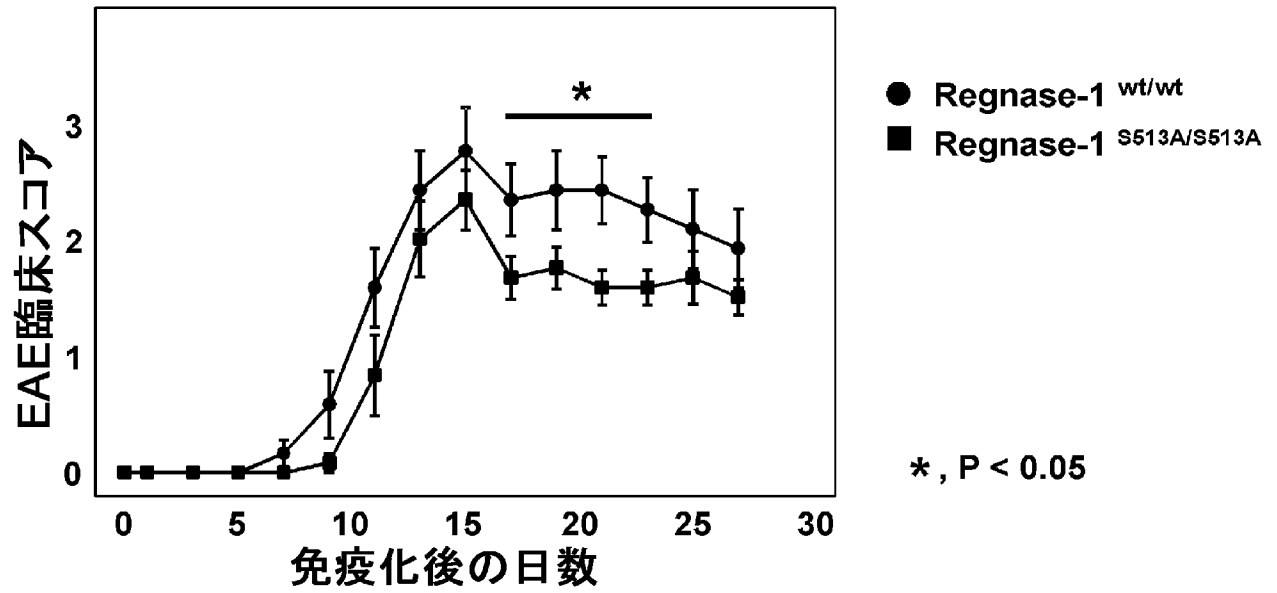
構造障害スコア



[図37]



[図38]



R⁴ = H or Me, PG: 保護基, D: アスパラギン酸

固相上からの切り出し → HR⁴N

C末端(cterm)
アリル基の脱保護

環化
環化体A

H₂N—GG—TFPI-タグ

固相上からの切り出し

脱保護

preparative HPLCによる精製

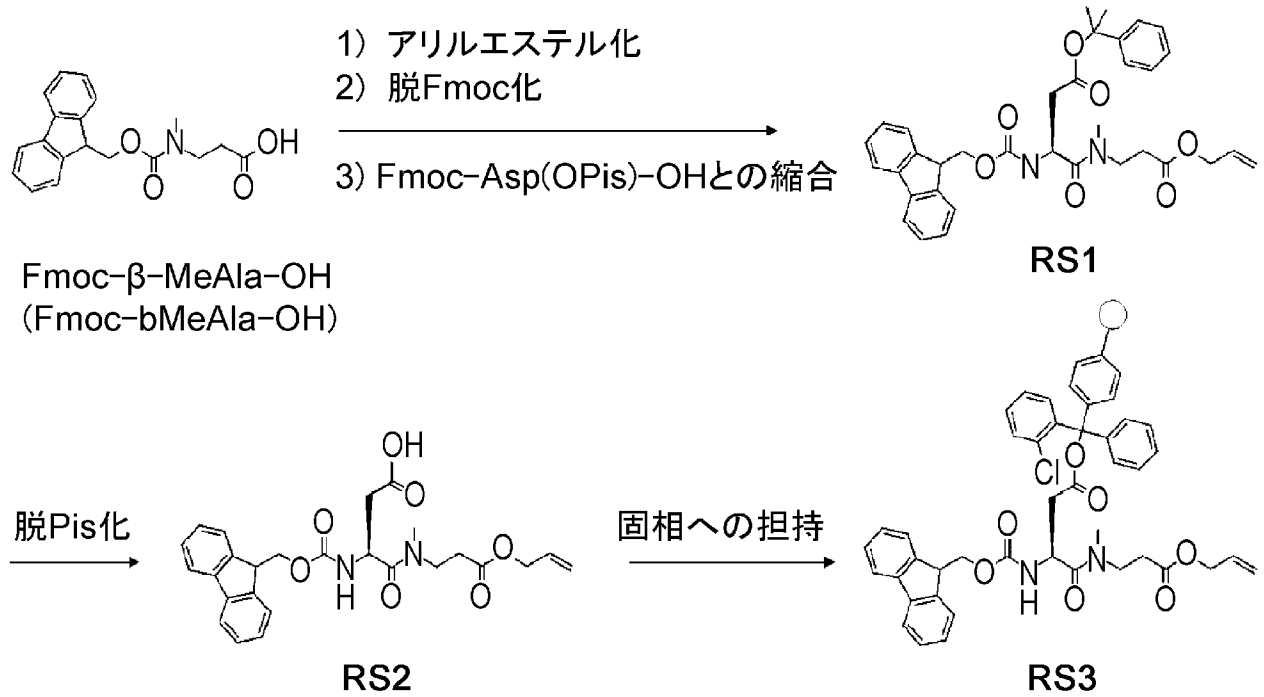
GG—TFPI-タグ = Gly|Gly|Thr|Gly|Thr|Gly|Thr|MePhe|Pro|Ile|Thr|MePhe|Pro|Ile (配列番号 : 60)

GG

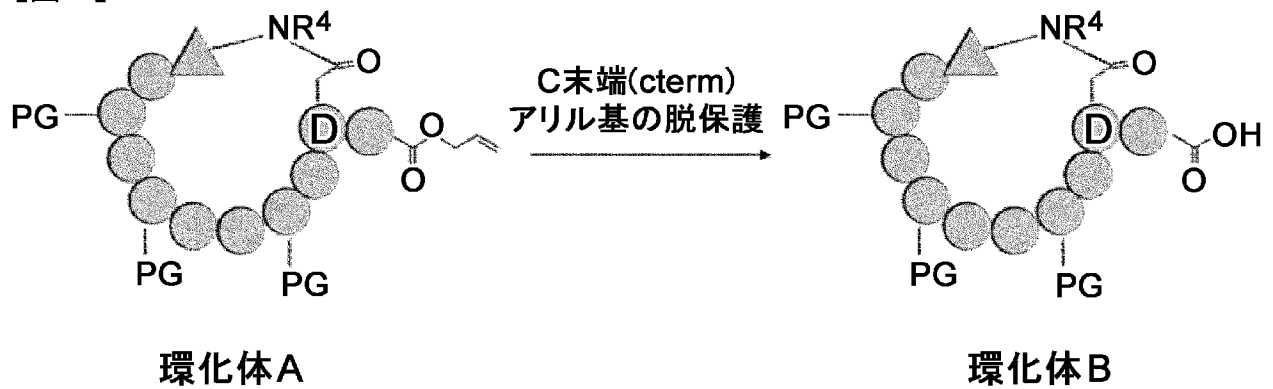
TFPI-タグ

環化体+GG-TFPI-タグ

[図40]



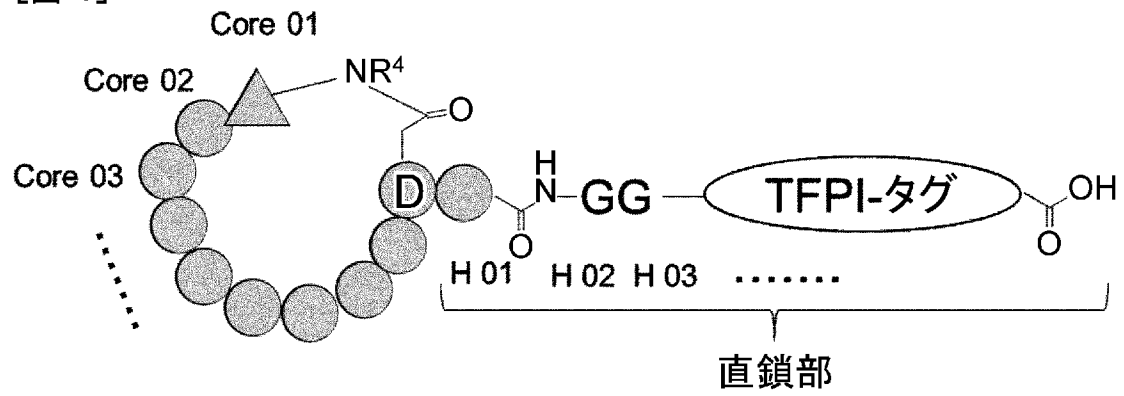
[図41]



1) 固相上での縮合反応



[図43]



環化体+GG-TFPI-タグ

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/022582

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. See extra sheet

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)

Int.Cl. A61K45/00, A61P9/00, A61P11/00, A61P11/06, A61P13/12, A61P17/00, A61P17/06, A61P19/02, A61P25/00, A61P29/00, A61P31/14, A61P37/06, A61P37/08, A61P43/00, C07K16/40, C12Q1/48, C12N15/52

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	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAlus/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.
Y	IWASAKI, H. et al., "The IκB kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1", Nat. Immunol., 2011,12(12), pp. 1167-75, abstract, page 1169, right column, paragraph [0002] to page 1171, left column, paragraph [0001], fig. 3, etc.	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 August 2019 (28.08.2019)

Date of mailing of the international search report
10 September 2019 (10.09.2019)

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/JP2019/022582

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MAO, R. et al., "Regnase-1, a rapid response ribonuclease regulating inflammation and stress responses", Cell Mol. Immunol., 2017, 14(5), pp. 412-422, page 413, left column, paragraph [0002] to page 414, left column, paragraph [0001], page 414, right column, paragraph [0003], etc.	1-16
P, X	TANAKA, H. et al., "Phosphorylation-dependent Regnase-1 release from endoplasmic reticulum is critical in IL-17 response", J. Exp. Med., 03 June 2019, 216(6), pp. 1431-1449, Epub 09 May 2019, entire text	1-16
A	TAKAISHI, M. et al., "Regnase-1, an immunomodulator, limits the IL-36/IL-36R autostimulatory loop in keratinocytes to suppress skin inflammation", J. Invest. Dermatol., June 2018, 138(6), pp. 1439-1442, Epub 12 January 2018, entire text	1-16
A	MONIN, L. et al., "MCPIP1/Regnase-1 restricts IL-17A- and IL-17C-dependent skin inflammation", J. Immunol., 2017, 198(2), pp. 767-775, entire text	1-16
A	MATSUSHITA, K. et al., "Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay", Nature, 2009, 458(7242), pp. 1185-90, entire text	1-16
A	WO 2010/098429 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 02 September 2010, entire text & US 2012/0070452 A1 & EP 2402031 A1	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/022582

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00 (2006.01) i,	A61P9/00 (2006.01) i,	A61P11/00 (2006.01) i,
A61P11/06 (2006.01) i,	A61P13/12 (2006.01) i,	A61P17/00 (2006.01) i,
A61P17/06 (2006.01) i,	A61P19/02 (2006.01) i,	A61P25/00 (2006.01) i,
A61P29/00 (2006.01) i,	A61P31/14 (2006.01) i,	A61P37/06 (2006.01) i,
A61P37/08 (2006.01) i,	A61P43/00 (2006.01) i,	C07K16/40 (2006.01) i,
C12Q1/48 (2006.01) i,	C12N15/52 (2006.01) n	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. 特別ページ参照

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00, A61P9/00, A61P11/00, A61P11/06, A61P13/12, A61P17/00, A61P17/06, A61P19/02, A61P25/00, A61P29/00, A61P31/14, A61P37/06, A61P37/08, A61P43/00, C07K16/40, C12Q1/48, C12N15/52

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019年

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)

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の 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 請求項の番号
Y	IWASAKI, H. et al., The I κ B kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1, Nat. Immunol., 2011, 12(12), p. 1167-75, 要約、第 1169 頁右欄第 2 段落-第 1171 頁左欄第 1 段落、Figure 3 等	1-16

C 欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「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

「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)

「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

「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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「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

「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

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.08.2019

国際調査報告の発送日

10.09.2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

名和 大輔

4 C

4 4 3 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の 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 請求項の番号
Y	MAO, R. et al., Regnase-1, a rapid response ribonuclease regulating inflammation and stress responses, Cell Mol. Immunol., 2017, 14(5), p. 412-422, 第 413 頁左欄第 2 段落—第 414 頁左欄第 1 段落、第 414 頁右欄第 3 段落等	1-16
P, X	TANAKA, H. et al., Phosphorylation-dependent Regnase-1 release from endoplasmic reticulum is critical in IL-17 response, J. Exp. Med., 2019-JUN-3, 216(6), p. 1431-1449, Epub 2019-MAY-9, 全文	1-16
A	TAKAISHI, M. et al., Regnase-1, an immunomodulator, limits the IL-36/IL-36R autostimulatory loop in keratinocytes to suppress skin inflammation, J. Invest. Dermatol., 2018-JUN, 138(6), p. 1439-1442, Epub 2018-JAN-12, 全文	1-16
A	MONIN, L. et al., MCP1/Regnase-1 restricts IL-17A- and IL-17C-dependent skin inflammation, J. Immunol., 2017, 198(2), p. 767-775, 全文	1-16
A	MATSUSHITA, K. et al., Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay, Nature, 2009, 458(7242), p. 1185-90, 全文	1-16
A	WO 2010/098429 A1 (国立大学法人大阪大学) 2010.09.02, 全文 & US 2012/0070452 A1 & EP 2402031 A1	1-16

発明の属する分野の分類

A61K45/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P11/06(2006.01)i,
A61P13/12(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P17/06(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i,
A61P25/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i,
A61P37/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K16/40(2006.01)i, C12Q1/48(2006.01)i,
C12N15/52(2006.01)n