

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-516989

(P2015-516989A)

(43) 公表日 平成27年6月18日 (2015.6.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-510379 (P2015-510379)
 (86) (22) 出願日 平成25年4月30日 (2013.4.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年12月22日 (2014.12.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/038840
 (87) 国際公開番号 W02013/166000
 (87) 国際公開日 平成25年11月7日 (2013.11.7)
 (31) 優先権主張番号 13/460,408
 (32) 優先日 平成24年4月30日 (2012.4.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514273103
 バーバー, グレン, エヌ.
 BARBER, Glen, N.
 アメリカ合衆国 フロリダ州 33157
 , パルメットベイ, エスタブリッシュ 168
 番テラス 8598
 (74) 代理人 110001302
 特許業務法人北青山インターナショナル
 (72) 発明者 バーバー, グレン, エヌ.
 アメリカ合衆国 フロリダ州 33157
 , パルメットベイ, エスタブリッシュ 168
 番テラス 8598
 Fターム (参考) 4C084 AA17 NA14 ZB07 ZB11 ZB26
 ZB35

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫反応の変調

(57) 【要約】

STINGのモジュレーターは、免疫反応をアップレギュレートまたはダウンレギュレートすることが可能である。そのようなモジュレーターの投与を用いて、直接または他の作用剤との組合せのいずれかで被験体における疾患または他の望ましくない病態を治療することが可能である。

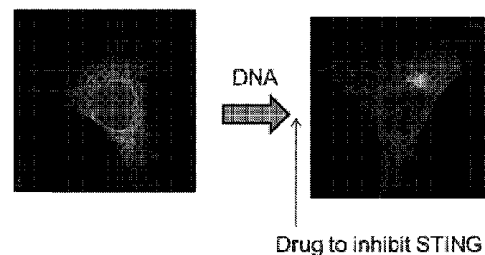


FIGURE 24

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

異常 S T I N G 機能に関連付けられる疾患または障害を有する被験体の免疫反応を変調する方法において、S T I N G 機能を変調する作用剤と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を、前記医薬組成物が前記被験体の異常 S T I N G 機能を改善するのに有効な量で、前記被験体に投与するステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、前記作用剤が S T I N G 機能を増加させる低分子であることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法において、前記作用剤が S T I N G 機能を減少させる低分子であることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法において、前記作用剤が細胞内条件下で S T I N G に結合する核酸分子であることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 5 に記載の方法において、前記核酸分子が 40 ~ 150 塩基対長の一本鎖 DNA であることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法において、前記核酸分子が 40 ~ 150 塩基対長の二本鎖 DNA であることを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 5 に記載の方法において、前記核酸分子が 60 ~ 120 塩基対長の二本鎖 DNA であることを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 5 に記載の方法において、前記核酸分子が 80 ~ 100 塩基対長の二本鎖 DNA であることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 5 に記載の方法において、前記核酸分子が 85 ~ 95 塩基対長の二本鎖 DNA であることを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 4 に記載の方法において、前記核酸分子がヌクレアーゼ耐性ヌクレオチドを含むことを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 4 に記載の方法において、前記核酸分子が前記核酸分子の膜貫通輸送を促進する分子に関連付けられることを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法において、前記疾患または障害が DNA 依存性炎症性疾患であることを特徴とする方法。

【請求項 13】

炎症性免疫細胞で浸潤された癌性腫瘍を有する被験体の癌を治療する方法において、S T I N G の機能および発現をダウンレギュレートする作用剤と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を、前記医薬組成物が前記癌性腫瘍に浸潤する炎症性免疫細胞の数を少なくとも 50 % 低減するのに有効な量で、前記被験体に投与するステップを含むことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

10

20

30

40

50

政府の権利

本明細書に記載の発明は、国立衛生研究所 (National Institutes of Health) により授与された助成金第 R01A1079336 号に基づいて米国政府の支援を受けた。米国政府は、本発明に関する一定の権利を有する。

【0002】

本発明の実施形態は、被験体において先天性免疫および適応免疫を変調するための、ならびに / または免疫関連障害、癌、自己免疫を治療するための、感染症を治療および予防するための、組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

病原体侵入に対する細胞宿主防御反応には、抗病原体遺伝子の誘導をもたらす、リポ多糖または鞭毛タンパク質を含むウイルス核酸や細菌細胞壁成分などの病原体関連分子パターン (PAMP) の検出が主に必要とされる。たとえば、ウイルス RNA は、小胞体 (ER) および / またはエンドソームに存在する膜結合 Toll 様レセプター (TLR) (たとえば、TLR3 および 7/8) により、またはレチノイン酸誘導遺伝子 1 (RIG-I) として参照される TLR 非依存性細胞内 DE x D / H ボックス RNA ヘリカーゼもしくは黒色腫分化関連抗原 5 (IFIH1 およびヘリカードとしても参照される MDA5) により、検出可能である。これらのイベントの結果、下流シグナリングイベント (その多くは未知のままである) が活性化され、I 型 IFN を含む、NF- κ B 依存性遺伝子および IRF3 / 7 依存性遺伝子の転写がもたらされる。

【発明の概要】

【0004】

先天性免疫反応で重要な役割を果たす分子 STING (インターフェロン遺伝子のステイミュレーター) は、主に小胞体 (ER) に存在する 5 つの推定膜貫通 (TM) 領域を含み、NF- κ B および IRF3 の両方の転写経路を活性化させて I 型 IFN を誘導するとともに発現後に強力な抗ウイルス状態を発揮することが可能である。米国特許出願第 13 / 057,662 号明細書および国際出願第 PCT / US2009 / 052767 号パンフレットを参照されたい。STING の損失により、I 型 IFN を活性化するポリ IC の能力が低下し、標的相同組換えにより STING の欠如したネズミ胚性線維芽細胞 (MEF) が生成され、水疱性口内炎ウイルス (VSV) 感染症に罹患しやすくなった。STING の不在下では DNA 媒介 I 型 IFN 反応が阻害されたことから、STING は、ウイルス、細菌、および細胞に感染可能な他の病原体に由来する DNA を認識するうえで重要な役割を果たしうることを示唆された。酵母ツーハイブリッドおよび共免疫沈降の研究の結果、STING は、RIG-I と相互作用すること、かつ翻訳後に ER 膜を横切るタンパク質移行に必要とされるトランスロコン関連タンパク質 (TRAP) 複合体のメンバー Ssr2 / TRAP と相互作用すること、が示唆された。TRAP の RNAi 破壊により、STING 機能が阻害され、ポリ IC に反応する I 型 IFN の産生が妨害された。

【0005】

さらなる実験の結果、STING は、それ自体が病原体由来 DNA やアポトーシス DNA などの一本鎖および二本鎖の DNA を含めて核酸に結合し、DNA 媒介関節炎や癌などの炎症病態において炎症誘発性遺伝子発現を調節するうえで中心的な役割を果たすことが示された。本明細書には、STING の発現または機能をアップレギュレートする種々の新しい方法および組成物が、STING と相互作用する他の細胞分子のさらなる特徴付けと共に、記載されている。これらの発見により、免疫系および他の系を調節する新しいアジュバント、ワクチン、および療法の設計が可能になる。

【0006】

本明細書には、異常 STING 機能に関連付けられる疾患または障害を有する被験体において免疫反応を変調する方法が記載されている。本方法は、STING 機能を変調する作用剤と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を、医薬組成物が被験体の異常 ST

10

20

30

40

50

ING機能を改善するのに有効な量で、被験体に投与するステップを含みうる。作用剤は、STING機能を増加もしくは減少させる低分子または細胞内条件下でSTINGに結合する核酸分子でありうる。STING結合核酸分子は、40～150塩基対長の一本鎖DNAまたは40～150、60～120、80～100、もしくは85～95塩基対長の二本鎖DNAまたはそれよりも長いものでありうる。STING結合核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性でありうる。たとえば、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオチドで構成されうる。それはまた、膜貫通輸送を促進する分子に関連するものでありうる。本方法では、疾患または障害は、DNA依存性炎症性疾患でありうる。

【0007】

本明細書にはまた、炎症性免疫細胞が浸潤した癌性腫瘍を有する被験体において癌を治療する方法も記載されている。本方法は、STINGの機能および発現をダウンレギュレートする作用剤と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を、医薬組成物が、癌性腫瘍に浸潤する炎症性免疫細胞の数を少なくとも50%（たとえば、少なくとも50、60、70、80、もしくは90%、または炎症性細胞浸潤の低減が組織診もしくは走査により検出可能に低減されるまで）低減するのに有効な量で、被験体に投与するステップを含みうる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1A～Gは、STING依存性先天性免疫シグナリングを示している。図1A：ヒトテロメラーゼ線維芽細胞（hTERT-BJ1）を種々のヌクレオチド（3μg/mL）で16時間トランスフェクトした。内因性IFNレベルを測定した。効率的トランスフェクションを保証するために、hTERT-BJ1細胞をFITCコンジュゲート化dsDNA90でトランスフェクトして蛍光顕微鏡法により検査した。図1B：hTERT-BJ1細胞をモック、ランダム、または2種の非依存性ヒトSTING siRNA（siRNA3または4）で3日間トランスフェクトし、続いてdsDNA90トランスフェクション（3μg/mL）を16時間行った。内因性IFNレベルを測定した。

- アクチンを対照として用いて、hSTINGタンパク質のサイレンシングを免疫プロットングにより実証した。図36C：初代STING⁺/⁺、STING⁻/⁻、STAT1⁺/⁺、またはSTAT1⁻/⁻MEFをdsDNA90（3μg/mL）でまたはそれなしで3時間トランスフェクトした。全RNAを精製し、Illumina Sentrix BeadChip Array（Mouse WG6バージョン2）により遺伝子発現を検査した。図1D：hTERT-BJ1細胞をNSまたはSTING siRNAで処理した。3日後、細胞をdsDNA90、ssDNA90、またはssDNA45（3μg/mL）で処理した。16時間後、IFN mRNAレベルをリアルタイムRT-PCRにより測定した。図1E：hTERT-BJ1細胞をNSまたはSTING siRNAで処理した。3日間で、細胞をdsDNA90、ssDNA90、またはssDNA45（3μg/mL）で処理した。16時間後、内因性IFNレベルを測定した。図1F：初代STING⁺/⁺またはSTING⁻/⁻MEFをdsDNA90（3μg/mL）でまたはそれなしでトランスフェクトした。3時間後、図1Cと同一に行った。図1G：hTERT-BJ1細胞をdsDNA90（3μg/mL）でまたはそれなしで3時間処理し、抗HA抗体でおよびカルレティキュリンをERマーカーとして染色した。

【図2】図2A～Jは、STINGがDNAに結合することを示している。図2A：293T細胞を指示プラスミドでトランスフェクトした。細胞溶解物をビオチン-dsDNA90アガロースで沈降させ、抗HA抗体を用いて免疫プロットすることにより分析した。図2B：STING突然変異体の概略図。図2C：図2Aと同一である。図2D：図2Aと同一である。DNAに結合できないSTING変異体は、赤色で表示されている。図2E：hTERT-BJ1細胞をビオチンコンジュゲート化dsDNA90（B-dsDNA90、3μg/mL）で6時間トランスフェクトし、そしてDSSで処理した。ストربتアビジンアガロースを用いて溶解物を沈降させ、抗HA抗体を用いて免疫プロットす

10

20

30

40

50

ることにより分析した。図 2 F : S T I N G を 2 9 3 T 細胞で発現させ、36 時間後、溶解物をコンペティター d s D N A 9 0、ポリ (I : C)、B - D N A、または s s D N A 9 0 の存在下で d s D N A 9 0 アガロースと共にインキュベートし、そして抗 H A 抗体を用いて免疫プロットすることにより分析した。図 2 G : 2 9 3 T 細胞を H A タグ付きの S T I N G、G F P、または T R E X 1 でトランスフェクトした。細胞を溶解し、ビオチン標識された s s D N A または d s D N A をストレプトアビジンアガロースビーズと共に添加した。抗 H A 抗体を用いて免疫プロットすることにより沈降物を分析した。図 2 H : 2 9 3 T 細胞を I F N - ルシフェラーゼおよび S T I N G 変異体でトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性を測定した。図 2 I : h T E R T - B J 1 細胞を d s D N A 9 0 でトランスフェクトし、ホルムアルデヒドで架橋した。S T I N G を沈降させ、d s D N A 9 0 特異的プライマーを用いて P C R により結合 D N A を検出した。N C : 陰性対照。P C : 陽性対照、d s D N A 9 0。図 2 J : S T I N G ⁺ / ⁺ または S T I N G ⁻ / ⁻ M E F を d s D N A 9 0 でトランスフェクトし、次いで図 2 I と同一に行った。エラーバーは、標準偏差を表す。データは、少なくとも 2 つの独立した実験に対応する。

【図 3】図 3 A ~ 3 H は、T R E X 1 が S T I N G シグナリングの陰性レギュレーターであることを示している。図 3 A : s i R N A 処理 h T E R T - B J 1 細胞における S T I N G および / または T R E X 1 ノックダウンを確認する免疫プロット。図 3 B : s i R N A 処理 h T E R T - B J 1 細胞を d s D N A 9 0 (3 μ g / m L) でトランスフェクトした。16 時間後、内因性 I F N レベルを測定した。* P < 0 . 0 5。図 3 C : s i R N A 処理 h T E R T - B J 1 細胞に H S V - 1 を感染させ (感染多重度 = 1)、ウイルス力価を測定した。* P < 0 . 0 5。図 3 D : s i R N A 処理 h T E R T - B J 1 細胞に 3 4 . 5 欠失 H S V を感染させ、ウイルス力価を測定した。図 3 E : S T I N G ノックダウンを確認する、N S または S T I N G s i R N A 処理された T R E X 1 ⁺ / ⁺ または T R E X 1 ⁻ / ⁻ M E F の免疫プロット。図 3 F : s i R N A 処理された T R E X 1 ⁺ / ⁺ または T R E X 1 ⁻ / ⁻ M E F を d s D N A 9 0 で処理し、16 時間後、I F N レベルを測定した。* P < 0 . 0 5。図 3 G : s i R N A 処理された T R E X 1 ⁺ / ⁺ または T R E X 1 ⁻ / ⁻ M E F に H S V - 1 を感染させ (感染多重度 = 1)、ウイルス力価を測定した。* P < 0 . 0 5。図 3 H : d s D N A 9 0 でまたはそれなしでトランスフェクトされた h T E R T - B J 1 細胞の抗 T R E X 1 抗体または抗 S T I N G 抗体を用いた免疫蛍光分析。* P < 0 . 0 5、スチューデントの t 検定。エラーバーで標準偏差を表した。データは、少なくとも 2 つの独立した実験に対応する。

【図 4】図 4 A ~ J は、T R E X 1 がオリゴサッカリルトランスフェラーゼ複合体に会合することを示している。図 4 A は、T R E X 1 の概略図を示している。赤色は、R P N 1 結合部位を表す。図 4 B は、S T I N G の概略図を示している。赤色は、D A D 1 結合部位を表す。図 4 C : R P N 1 は、酵母ツーハイブリッド解析において T R E X 1 と相互作用する (1 . p G B K T 7、2 . p G B K T 7 - N F A R M 9、3 . p G B K T 7 - T R E X 1、4 . p G B K T 7 - S T I N G 全長、5 . p G B K T 7 - S T I N G C 末端)。図 4 D : 2 9 3 T 細胞を T R E X 1 - t G F P および R P N 1 - M y c で共トランスフェクトした。抗 M y c 抗体を用いて溶解物を免疫沈降させ、免疫プロットングにより分析した。図 4 H : h T E R T - B J 1 細胞を d s D N A 9 0 (3 μ g / m L) でまたはそれなしで処理した。トランスフェクションの 6 時間後、抗 S T I N G 抗体または抗 D A D 1 抗体を用いて免疫蛍光により細胞を検査した。図 4 I : 指示抗体を用いたスクロース勾配遠心分離後のマイクロソーム画分の免疫プロット分析。I : 入力。図 4 J : h T E R T - B J 1 細胞を T R E X 1、S e c 6 1 A 1、T R A P、N S、または S T I N G s i R N A で処理した。72 時間後、細胞を d s D N A 9 0 (3 μ g / m L) で 16 時間処理し、次いで内因性 I F N レベルを測定した。* P < 0 . 0 5、スチューデントの t 検定。エラーバーで標準偏差を表した。データは、少なくとも 2 つの独立した実験に対応する。

【図 5】図 5 A ~ G は、細胞質 D N A が h T E R T - B J 1 細胞で S T I N G 依存性遺伝子を誘導することを示している。図 5 A : h T E R T - B J 1 細胞を S T I N G s i R

10

20

30

40

50

NAで処理した。3日後、細胞をdsDNA90でまたはそれなしで3時間処理した。全RNAを精製し、Human HT-12__V4__Bead Chipを用いて遺伝子発現に関して検査した。図5B~G: hTERT-BJ1細胞を図5Aと同様に処理した。IFN (図5B)、PMAIP1 (図5C)、IFIT1 (図5D)、IFIT2 (図5E)、IFIT3 (図5F)、およびPTGER4 (図5G)に関して全RNAをリアルタイムPCRにより検査した。TaqMan gene Expression Assay (Applied Biosystem)を用いてリアルタイムPCRを行った。
* $P < 0.05$ 、スチューデントのt検定。エラーバーで標準偏差を表した。データは、少なくとも2つの独立した実験に対応する。

【図6】図6A~Hは、STING依存性遺伝子がMEFで細胞質DNAにより誘導されることを示している。初代STAT1^{+/+}またはSTAT1^{-/-}MEFをdsDNA90、IFN、またはdsDNA90とIFNで処理した。全RNAを精製し、IFN (図6A)、IFIT1 (図6B)、IFIT2 (図6C)、IFIT3 (図6D)、CXCL10 (図6E)、GBP1 (図6F)、RSAD2 (図6G)、およびCCL5 (図6H)に関してリアルタイムPCRにより検査した。
* $P < 0.05$ 、スチューデントのt検定。エラーバーで標準偏差を表した。データは、少なくとも2つの独立した実験に対応する。

【図7】図7A~Hは、細胞質DNAがMEFでSTING依存性遺伝子を誘導することを示している。図7A~Hでは、STING^{+/+}またはSTING^{-/-}MEFをdsDNA45、dsDNA90、ssDNA45、またはssDNA90でまたはそれなしで3時間処理した。全RNAを精製し、IFN (図7A)、IFIT1 (図7B)、IFIT2 (図7C)、IFIT3 (図7D)、CCL5 (図7E)、CXCL10 (図7F)、RSAD2 (図7G)、またはGBP1 (図7H)に関してリアルタイムPCRにより検査した。
* $P < 0.05$ 、スチューデントのt検定。エラーバーで標準偏差を表した。データは、少なくとも2つの独立した実験に対応する。

【図8】図8A~Dは、STINGの局在化および二量化を示している。図8A: STING-HAを安定に発現するMEFをssDNA45、dsDNA45、ssDNA90、またはdsDNA90で処理した。3時間後、抗HA抗体または抗カルレチキュリン抗体を用いて細胞を染色した。図8B: 293T細胞をSTING-HAおよびMyc-STINGでトランスフェクトした。溶解物を抗Myc抗体により沈降させ、抗HA抗体を用いて免疫プロットすることにより分析した。図8C: hTERT-BJ1細胞を架橋剤DSSでまたはそれなしで処理した。細胞溶解物を抗STING抗体を用いた免疫プロットに付した。図8D: 293T細胞を指示プラスミドでトランスフェクトし、DSSで処理した。抗HA抗体を用いて免疫プロットすることにより細胞溶解物を分析した。

【図9】図9A~Iは、DNAウイルスがMEFでSTING依存性遺伝子を誘導することを示している。図9A: MEFに34.5欠失HSVを3時間感染させた(感染多重度=1)。全RNAを精製し、Illumina Sentrix Bead Chipアレイ(Mouse WGSバージョン2)を用いて遺伝子発現に関して検査した。図9B~I: STING^{+/+}、STING^{-/-}、またはSTAT1^{-/-}/STING^{+/+}MEFをdsDNA90、HSV、または34.5欠失HSVでまたはそれなしで3時間処理した。全RNAを精製し、IFN (図9B)、IFIT1 (図9C)、IFIT2 (図9D)、IFIT3 (図9E)、CCL5 (図9F)、CXCL10 (図9G)、RSAD2 (図9H)、またはGBP1 (図9I)に関してリアルタイムPCRにより検査した。エラーバーは、標準偏差を表す。

【図10】図10A~Fは、STINGがIRF3/7およびNF- κ Bと相互作用することを示している。図10A: STING依存性dsDNA90刺激性遺伝子のプロモーター領域のIRF7結合部位。図10B~D: モック処理またはdsDNA90処理されたSTING^{+/+}またはSTING^{-/-}MEFから核抽出物を単離し、IRF3 (図10B)、IRF7 (図10C)、およびNF- κ B (図10D)の活性化に関して製造業者の説明書に従って検査した。核抽出物キット、TransAM IRF3、Tran

10

20

30

40

50

s A M I R F 7、および T r a n s A M N F B ファミリー E l i s a キットは、A c t i v e M o t i f 製であった。* $P < 0.05$ 、スチューデントの t 検定。エラーバーで標準偏差を表した。データは、少なくとも2つの独立した実験に対応する。図10E: S T I N G ⁺ / ⁺ または S T I N G ⁻ / ⁻ M E F をポリ (I : C)、d s D N A 90、または H S V 1 で処理し、細胞を抗 I R F 3 抗体により染色した。図10F。S T I N G ⁺ / ⁺ または S T I N G ⁻ / ⁻ M E F を d s D N A 90 または H S V 1 で処理し、細胞を抗 p 6 5 抗体により染色した。S T I N G の損失は、ポリ (I : C) 媒介先天性免疫シグナリングに影響を及ぼさなかった。

【図11】図11A~Fは、S T I N G が i n v i t r o で D N A に結合することを示している。図11A: i n v i t r o 翻訳産物をビオチンコンジュゲート化 d s D N A 90 で沈降させ、抗 H A 抗体により免疫プロットした。図11B: S T I N G 変異体の概略図。図11C、11D: 図11Aと同一である。a a 2 4 2 ~ 3 4 1 の欠如した S T I N G 変異体 (赤色) は、D N A に結合できなかった。図11E~F: i n v i t r o 翻訳産物をビオチンコンジュゲート化 s s D N A 90 で沈降させ、抗 H A 抗体により免疫プロットした。

【図12】図12A~Gは、S T I N G が i n v i v o および i n v i t r o で D N A に結合することを示している。h T E R T B J 1 細胞をビオチン - d s D N A 90 でトランスフェクトし、U V により架橋した。細胞を溶解し、ストレプトアビジンアガロースにより沈降させ、免疫プロットングにより分析した。図12B~C h T E R T - B J 1 細胞を I F I 1 6 (図12B) または S T I N G (図12C) s i R N A で処理し、次いで図12Aと同一に行った。図12D: S T I N G ⁺ / ⁺ または S T I N G ⁻ / ⁻ M E F を図12Aと同様に処理した。図12E: S T I N G - F l a g 発現 2 9 3 T 細胞をビオチン - d s D N A 90 でまたはそれなしで処理し、D S S により架橋した。溶解物を沈降させ、免疫プロットングにより分析した。図12F: 2 9 3 T 細胞を d s D N A 90 または s s D N A 90 でトランスフェクトし、U V または D S S により架橋し、次いで沈降させ、免疫プロットングにより分析した。図12G: S T I N G - F l a g 発現 2 9 3 T 細胞を溶解し、d s D N A 90 またはポリ (I : C) およびビオチン - d s D N A 90 アガロースと共にインキュベートし、次いで図12Eと同一に行った。

【図13】図13A~Cは、S T I N G がウイルス D N A に結合することを示している。図13A: H S V、サイトメガロウイルス (C M V)、またはアデノウイルス (A D V) のオリゴヌクレオチド配列。図13B~C: 2 9 3 T 細胞を指示プラスミドでトランスフェクトした。細胞溶解物を b i o l i n - d s D N A 90、ビオチン - H S V D N A 1 2 0 m e r、ビオチン - A D V D N A 1 2 0 m e r、またはビオチン - C M V D N A 1 2 0 m e r アガロースで沈降させ、抗 H A 抗体を用いて免疫プロットすることにより分析した。

【図14】図14A~Cは、S T I N G が D N A に結合することを示している。図14A: S T I N G E L I S A の概略図。図14B: S T I N G E L I S A の一実施形態に係るプロセス。図14C: d s D N A 90 の結合能を E L I S A により測定した。* $P < 0.05$ 、スチューデントの t 検定。エラーバーで標準偏差を表した。データは、少なくとも2つの独立した実験に対応する。

【図15】図15A~Dは、T R E X 1 が S T I N G シグナリングの負のレギュレーターであることを示している。図15A: h T E R T - B J 1 細胞を T R E X 1、S T I N G、または S T I N G および T R E X 1 s i R N A で処理した。3日後、細胞に H S V - L u c を 4 8 時間感染させた (感染多重度 = 1)。溶解物をルシフェラーゼ活性に関して測定した。図15B: 初代 T R E X 1 ⁺ / ⁺ または T R E X ⁻ / ⁻ M E F を N S または S T I N G s i R N A でトランスフェクトした。3日後、細胞に H S V - L u c を 4 8 時間感染させた (感染多重度 = 1)。溶解物を測定した。図15C: 初代 T R E X 1 ⁺ / ⁺ または T R E X 1 ⁻ / ⁻ M E F を野生型 T R E X 1 でトランスフェクトした。4 8 時間後、細胞に H S V を感染させ、H S V 複製を測定した。T R E X 1 発現を免疫プロットングにより検査した。* $P < 0.05$ 、スチューデントの t 検定。エラーバーで標準偏差を

10

20

30

40

50

表した。データは、少なくとも2つの独立した実験に対応する。図15D: STING⁺ / ⁺またはSTING⁻ / ⁻ MEFをdsDNA90でまたはそれなしで3時間処理した。全RNAを精製し、Illumina Sentrix Bead Chipアレイ(Mouse WG6バージョン2)により遺伝子発現に関して検査した。

【図16】図16は、STINGがTREX⁻ / ⁻ MEFでssDNA90媒介IFN産生を調節することを示している。siRNA処理TREX1⁺ / ⁺またはTREX1⁻ / ⁻ MEFをssDNA45またはssDNA90で処理し、16時間後、IFNレベルを測定した。^{*} P < 0.05、スチューデントのt検定。エラーバーで標準偏差を表した。データは、少なくとも2つの独立した実験に対応する。

【図17】図17A~Hは、TREX1がSTING依存性遺伝子の負のレギュレーターではないことを示している。図17A: TREX1⁺ / ⁺またはTREX1⁻ / ⁻ MEFをHSV1、IFN、dsDNA90、三リン酸RNA(TPRNA)、およびVSVで処理した。TPRNAおよびVSVは、IFN誘導遺伝子を弱く活性化した。全RNAを精製し、Illumina Sentrix Bead Chipアレイ(Mouse WG6バージョン2)により遺伝子発現に関して検査した。図17B~H: IFN(図17B)、IFIT1(図17C)、IFIT2(図17D)、IFIT3(図17E)、CCL5(図17F)、CXCL10(図17G)、RSAD2(図17H)に関して全RNAをRT-PCRにより検査した。IFN誘導遺伝子の有意差は、TREX1欠如細胞で観測されなかった。^{*} P < 0.05、スチューデントのt検定。エラーバーで標準偏差を表した。データは、少なくとも2つの独立した実験に対応する。

【図18】図18A~Dは、TREX1がオリゴサッカリルトランスフェラーゼ複合体に会合することを示している。IFN処理hTERT cDNAライブラリーを用いて酵母ツーハイブリッドライブラリー(AH109)を開発した。全長TREX1をベイトとして用いてライブラリーをスクリーニングした。約500万個のcDNA発現酵母をスクリーニングした(Clontech)。3つの独立した酵母接合手順に基づいて44個のクローンを単離した。RPN1を合計8回(スクリーン1で3回、スクリーン2で2回、およびスクリーン3で3回)単離した。RPN1以外のクローンの大部分は、再試験後、IREX1と相互作用できなかった。これらの8つのRPN1単離クローンのうち、4つのクローンはaa258~397、2つのクローンはaa220~390、および2つのクローンはaa240~367をコードしていた。TREX1変異体を発生させ、TREX1(aa241~369)とRPN1(aa256~397)との相互作用をマッピングした。DAD1を単離するために、STINGのC末端領域(aa173~379)を用いて同一のライブラリーをスクリーニングした。24個の単離クローン(全長DADI)が2回見いだされた。DAD1以外のクローンの大部分は、再確認試験後、STINGと相互作用しなかった。全長DAD1は、STINGの領域242~310への会合が見られた。図18A: TREX1突然変異体の概略図。図18B: TREX1またはTREX1~4に融合されたGAL4結合ドメインは、酵母ツーハイブリッドスクリーニングにおいてGAL4活性化ドメインに融合されたRPN1と相互作用する。図18C: STING突然変異体の概略図。図18D。STING-C末端またはSTING-C2に融合されたGAL4結合ドメインは、酵母ツーハイブリッドスクリーニングにおいてGAL4活性化ドメインに融合されたDAD1と相互作用する。

【図19】図19A~Cは、TREX1およびSTINGがオリゴサッカリルトランスフェラーゼ複合体に会合することを示している。図19A: 293T細胞をTREX1-tGFPおよびRPN1-Mycで共トランスフェクトした。溶解物を抗tGFP抗体またはIgG対照で免疫沈降させ、指示抗体を用いて免疫プロットすることにより分析した。図19B: 293T細胞をMyc-STINGまたはGFP-DAD1で共トランスフェクトし、細胞を溶解した。溶解物を抗Myc抗体またはIgG対照で免疫沈降させ、抗GFP抗体を用いて免疫プロットした。図19C: 293T細胞をTREX1-tGFPおよびRPN1-My c、GFP-DAD1、またはSTING-HAで共トランスフェクトした。溶解物を抗tGFP抗体またはIgG対照により免疫沈降させ、抗tGFP抗体

10

20

30

40

50

、抗Myc抗体、抗GFP抗体、または抗HA抗体を用いて免疫プロットすることにより分析した。

【図20】図20は、TREX1が小胞体に局在化することを示している。hTERT-BJ1細胞をRPN1-Mycでトランスフェクトした。48時間後、抗TREX1抗体（赤色）、抗Myc抗体（緑色）、または小胞体マーカーとして抗カルレティキュリン抗体（青色）を用いて免疫蛍光により細胞を検査した。

【図21】図21A～Hは、293T細胞で外因的に発現されたSTINGがdsDNA 90反応を再構成することを示している。図21A：293T細胞に対照レンチウイルスまたはhSTINGレンチウイルスを感染させた。感染1日後、細胞をdsDNA 90で処理した。6時間後、抗STING抗体または抗カルレティキュリン抗体を用いて細胞を染色した。図21B：細胞溶解物（図56Aから）を抗STING抗体を用いた免疫プロットに付した。図21C～D：レンチウイルス感染293T細胞をdsDNA 90で6時間刺激した。全RNAを精製し、IFN（図21C）またはIFIT2（図21D）に関してリアルタイムPCRにより検査した。図21E：対照またはhSTINGレンチウイルスで安定に形質導入された293T細胞をフロー図に示されるようにブレフェルジンA（BFA）実験に付した。図21F：細胞溶解物（図21Eから）を抗STING抗体を用いた免疫プロットに付した。図21G：細胞溶解物（図21Eから）をIFN-ルシフェラーゼ活性に関して測定した。図21H：初代STING^{-/-}MEFに対照またはmSTINGを安定に形質導入した。細胞をdsDNA 90で処理し、内因性IFNレベルをELISAにより測定した。* P < 0.05、スチューデントのt検定。エラーバーで標準偏差を表した。データは、少なくとも2つの独立した実験に対応する。

【図22】図22は、トランスロコンメンバーがHSV1複製を調節することを示している。hTERT-BJ1細胞をTREX1、Sec61A1、TRAP、NS、またはSTING siRNAで処理した。

【図23】図23A～Cは、IFI16がhTERT-BJ1細胞でdsDNA 90によるIFN産生に必要とされないことを示している。図23A：hTERT-BJ1細胞をNS、IFI16、STING、またはTREX1 siRNAで処理した。3日後、細胞を溶解し、発現レベルに関して免疫プロットングにより検査した。図23B：siRNA処理hTERT-BJ1細胞をdsDNA 90で刺激し、IFN産生をELISAにより測定した。図23C：siRNA処理hTERT-BJ1細胞にHSV-ルシフェラーゼを感染させた（感染多重度 = 0.1）。感染2日後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定した。* P < 0.05、スチューデントのt検定。エラーバーで標準偏差を表した。データは、少なくとも2つの独立した実験に対応する。

【図24】図24は、STING細胞ベースのアッセイの一実施形態を示している。

【図25】図25は、薬剤「A」がSTING輸送を誘導することを示している。

【図26】図26は、薬剤「X」がIFN mRNA産生を阻害することを示している。

【図27】図27は、STINGが細胞質DNAに反応してリン酸化されることを示す概略図である。hTERT-BJ1細胞を4 μg/mLのISDで6時間トランスフェクトした。細胞溶解物をTNE緩衝液中に調製し、抗STING抗体による免疫沈降に付し、次いでSDS-PAGEに付した。ゲルをCBBで染色し、次いでSTINGを含むバンドをHarvard Mass Spectrometry and Proteomics Resource LaboratoryでMLC/MS/MSにより分析した。異なる種由来のSTINGアミノ酸配列のアライメントおよび質量分析により同定されたリン酸化部位。セリン345、358、366、および379が質量分析により同定された。セリン358およびS366は、STING機能に重要である。

【図28】図28は、STINGのセリン366（S366）が細胞質DNA経路におけるIFN産生に重要であることを示している。突然変異体STINGをコードするプラスミドおよびレポータープラスミドで293T細胞をトランスフェクトした。36時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。STING^{-/-}MEF細胞を突然変異体STING

10

20

30

40

50

で再構成し、次いで、培養培地中の I F N の量を E L I S A により測定した。S 3 6 6 は、S T I N G による I F N 産生に重要であり、S 3 5 8 もまた、おそらく重要な役割を果たす。

【図 2 9】図 2 9 A ~ D は、S T I N G 欠損マウスが D M B A 誘発炎症および皮膚腫瘍形成に耐性であることを示している。S T I N G ⁺ / ⁺ および S T I N G ⁻ / ⁻ マウスの剃毛背部にアセトン処理または 1 0 μ g D M B A 処理のいずれかを 2 0 週間にわたり毎週 1 回行った。図 2 9 A : S T I N G 欠損動物は、皮膚癌を引き起こす D N A 損傷剤に耐性である。皮膚腫瘍なしのマウスのパーセントをカプラン・マイヤー曲線に示した。図 2 9 B : 各処理群の代表的マウスの写真を示した。図 2 9 C : モック処理または D M B A 処理された皮膚 / 皮膚腫瘍の生検試料で H & E 染色により病理組織学的検査を行った。2 0 倍の倍率で画像を得た。図 2 9 D : 発癌性物質に暴露された S T I N G 発現マウスにおけるサイトカインアップレギュレーション。モック処理または D M B A 処理された皮膚 / 皮膚腫瘍の生検試料から抽出された R N A を、I l l u m i n a S e n t r i x B e a d C h i p A r r a y (M o u s e W G 6 バージョン 2) によりデュプリケート方式で、分析した。全遺伝子発現を分析した。最も変動しやすい遺伝子を選択した。行は、個別の遺伝子を表し、列は、個別のサンプルを表す。擬似カラーは、転写レベルが平均よりも少ないか、平均に等しいか、または平均よりも多いかを表す (それぞれ、緑色、黒色、および赤色)。遺伝子発現の変化倍率は、l o g 1 0 スケールで - 5 ~ 5 の範囲内である。サイトカインは、S T I N G 欠損動物の皮膚で観測されなかった。

【発明を実施するための形態】

【0 0 0 9】

本明細書には、異常 S T I N G 機能に関連付けられる疾患または障害を有する被験体において免疫反応を変調するための方法および組成物が記載されている。以下に記載の好ましい実施形態には、この組成物および方法の適応が例示されている。それにもかかわらず、この実施形態の説明から、本発明の他の態様を以下に提供される説明に基づいて作成および / または実施することが可能である。

【0 0 1 0】

異常 S T I N G 機能に関連付けられる疾患または障害を有する被験体 (たとえば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヤギ、ブタなど) において免疫反応を変調するための方法および組成物は、S T I N G 機能を変調する作用剤と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を必要とする。ただし、その量は、医薬組成物が被験体において異常 S T I N G 機能を改善するのに有効な量である。

【0 0 1 1】

異常 S T I N G 機能に関連付けられる疾患または障害は、S T I N G の機能および発現の欠損した細胞が疾患または障害の身体症状を引き起こすものまたはそれを増悪するもののいずれかでありうる。通常、そのような疾患または障害、たとえば、炎症病態、自己免疫病態、癌 (たとえば、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、卵巣癌、白血病、肺癌、子宮内膜癌、または肝臓癌)、アテローム硬化症、関節炎 (たとえば、骨関節炎または関節リウマチ)、炎症性腸疾患 (たとえば、潰瘍性結腸炎またはクローン病)、末梢血管疾患、脳血管偶発症候 (発作)、慢性炎症が存在するもの、炎症性細胞浸潤を有する病変により特徴付けられるもの、脳にアミロイド斑が存在するもの (たとえば、アルツハイマー病)、アイカルディ・グチエール症候群、若年性関節炎、骨粗鬆症、筋萎縮性側索硬化症、または多発性硬化症は、免疫系細胞により媒介される。

【0 0 1 2】

作用剤は、S T I N G の機能および発現を増加もしくは減少させる低分子 (すなわち、5 0 0、1 0 0 0、もしくは 2 0 0 0 ダルトン未満の分子量を有する有機もしくは無機の分子) または細胞内条件下 (すなわち、S T I N G が正常に位置する細胞内条件下) で S T I N G に結合する核酸分子でありうる。作用剤はまた、一本鎖 (s s) または二本鎖 (d s) の R N A または D N A でありうる S T I N G 結合核酸分子でありうる。好ましくは、核酸は、4 0 ~ 1 5 0、6 0 ~ 1 2 0、8 0 ~ 1 0 0、もしくは 8 5 ~ 9 5 塩基対長で

あるか、またはそれよりも長い。S T I N G 結合核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性でありうる。たとえば、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオチドで構成されうるか、または環状ジヌクレオチド形態でありうる。それはまた、膜貫通輸送を促進する分子に関連するものでありうる。

【 0 0 1 3 】

炎症性免疫細胞で浸潤された癌性腫瘍を有する被験体において癌を治療するための方法および組成物は、S T I N G の機能および発現をダウンレギュレートする作用剤と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を必要とする。ただし、その量は、医薬組成物が、癌性腫瘍に浸潤する炎症性免疫細胞の数を少なくとも 5 0 % (たとえば、少なくとも 5 0、6 0、7 0、8 0、もしくは 9 0 %、または炎症性細胞浸潤の低減が組織診もしくはは走査により検出可能に低減されるまで) 低減するのに有効な量である。

10

【 0 0 1 4 】

本明細書に記載の組成物は、経口投与、直腸投与、腔投与、局所投与、経真皮投与、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、吹送投与、髄腔内投与、および鼻腔内投与をはじめとするさまざまな経路により投与可能な医薬組成物を作製するために、1 種以上の薬学的に許容可能な担体または賦形剤と共に含まれうる。本発明で使用するのに好適な製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985) に見いだされる。

【 0 0 1 5 】

活性成分は、賦形剤と混合可能であるか、賦形剤により希釈可能であるか、および/またはカプセル剤、サシェ剤、ペーパー剤、もしくは他の容器の形態をとりうる担体内に封入可能である。賦形剤が希釈剤として機能する場合、それは、活性成分に対する媒体、担体、または媒質として作用する固体材料、半固体材料、または液体材料でありうる。組成物は、錠剤、丸剤、粉末剤、ロゼンジ剤、サシェ剤、カシェ剤、エリキシル剤、サスペンション剤、エマルジョン剤、溶液剤、シロップ剤、エアロゾル剤(固体としてまたは液体媒質中)、軟膏剤、軟質および硬質のゼラチンカプセル剤、坐剤、無菌注射用溶液剤、鼻腔内投与用の無菌液剤(たとえば、スプレー装置)、または無菌パッケージ化粉末剤の形態をとりうる。製剤は、滑沢剤、たとえば、タルク、マグネシウムステアレート、および鉱油、湿潤剤、乳化剤および懸濁化剤、保存剤、たとえば、メチルベンゾエートおよびブ

20

30

【 0 0 1 6 】

錠剤などの固形製剤を調製するために、組成物を医薬賦形剤と混合して化合物の均一混合物を含有する固形プレ製剤組成物を形成することが可能である。錠剤または丸剤を被覆して、さもなければ配合して、遷延作用の利点を与える製剤を提供しうる。たとえば、錠剤または丸剤は、内側投与成分と外側投与成分とを含み、後者は、前者を覆う包囲体の形態をとりうる。胃内での崩壊に耐えるようにつかつ内側成分をインタクトな状態で十二指腸内に送るかまたはその放出を遅延するように機能する腸溶層により、二成分を分離することが可能である。そのような腸溶層または腸溶コーティングに対してさまざまな材料を使用することが可能であり、そのような材料としては、いくつかの高分子酸および高分子酸とシェラック、セチルアルコール、セルロースアセテートなどの材料との混合物が挙げられる。

40

【 0 0 1 7 】

液体形態の製剤としては、サスペンション剤およびエマルジョンが挙げられる。血清中半減期を増大させるために、製剤をカプセル化したり、リボソームのルーメンに導入したり、コロイドとして調製したり、またはリボソームの層に組み込んだりしうる。たとえば、S z o k a らの米国特許第 4, 235, 871 号明細書、同第 4, 501, 728 号明細書、および同第 4, 837, 028 号明細書(それぞれ参照により本明細書に組み込ま

50

れる)に記載されるように、リボソームを調製するためにさまざまな方法が利用可能である。

【0018】

組成物は、好ましくは、活性成分のユニット製剤の形態で製剤化される。患者への投与量は、投与されるもの、投与の目的(たとえば、予防または治療)、患者の状態、投与の方法などに依存して異なるであろう。それらはすべて、認定医および認定薬剤師の技能の範囲内である。治療用途では、組成物は、疾患およびその合併症を治癒したりまたはその症状を少なくとも部分的に停止させたりするのに十分な量で、すでに疾患に罹患している患者に投与される。この使用に有効な量は、治療される疾患病態に依存するであろう。さらには、症状の重症度、患者の年齢、体重、および全身状態などの因子に依存して担当臨床医が判断されるであろう。

10

【0019】

本明細書に挙げられた文書はすべて、参照により本明細書に組み込まれる。本出願に引用された出版物および特許文書はすべて、あたかもそれぞれ個別の出版物または特許文書が個別に示されたのと同程度まで、あらゆる目的で参照により組み込まれる。本文書に種々の参考文献を引用することにより、出願人は、いかなる特定の参考文献も本発明に対する「先行技術」であることを容認するものではない。発明の組成物および方法の実施形態は、以下の実施例で例示される。

【実施例】

【0020】

実施例1：先天性免疫を調節する細胞質DNAとのトランスロコン関連STING複合体線維芽細胞、マクロファージ、および樹状細胞(DC)で細胞質dsDNAさらにはDNAウイルスおよび細胞内細菌に反応するI型IFNの産生に不可欠であることが実証されたSTING(インターフェロン遺伝子のステイミュレーター)として参照される小胞体(ER)の新しい膜貫通成分の単離については、すでに記載された(米国特許出願第13/057,662号明細書および国際出願第PCT/US2009/052767号パンフレットを参照されたい)。ネズミ細胞でSTING依存性I型IFNシグナリングを活性化するのに必要とされるdsDNAの最小サイズは、ネズミ細胞で約45塩基対であることが確認された。しかしながら、正常ヒト細胞(hTERT)では、I型IFNを完全に活性化するために約90塩基対のdsDNA(本明細書ではインターフェロン刺激性dsDNA90として参照される)が必要とされることが観測された。RNAiノックダウン手順を用いて、STINGは、hTERTでI型IFNの産生に実際に不可欠であることがさらに確認された(図1B)。mRNA発現を測定するマイクロアレイ手順を用いたさらなる分析から、細胞質dsDNAは、hTERT細胞でI型IFNのほかに広範にわたる一連の先天性免疫遺伝子を誘導可能であることが示唆された(図5A~G)。hTERTでのSTINGのRNAiノックダウンが細胞質dsDNAによる刺激を大きく排除したので、IFITファミリーのメンバーを含むこれらの先天性分子の誘導は、STING依存性であるように思われた(図5A~G)。細胞質dsDNAがSTING依存的にさまざまな先天性免疫遺伝子を誘導することは、STING⁺/⁺または⁻/⁻ネズミ胚性線維芽細胞(MEF)を用いて確認された(図1C)。これらのmRNAの誘導がSTING依存性遺伝子(SDG)でありかつI型IFN依存性オートクリンまたはパラクリンシグナリングにより刺激されないことを確認するために、I型IFNシグナリング欠損STAT1⁻/⁻MEFを同様にdsDNAで処理してSDGの産生が影響されない状態を維持することを検証した(図1C)。逆転写酵素(RT)PCR分析によりアレイ結果を確認した(図6A~Hおよび7A~H)。45ヌクレオチドのssDNA(ssDNA45)は、先天性免疫遺伝子産生をhTERTSでは弱くMEFではさらに弱く誘導することが確認された。しかしながら、90ヌクレオチドを含むトランスフェクトssDNA(ssDNA90)は、hTERT細胞でI型IFNを含めて一連の遺伝子をよりロバーストに活性化することが観測された(図1D、1E)。細胞質ssDNA90がSTING依存的に先天性免疫遺伝子の産生を誘導することは、STING⁺/⁺または⁻/⁻ネ

20

30

40

50

ズミ胚性線維芽細胞 (MEF) を用いて同様に確認された (図 1 F および 7 A ~ H)。STING は、おそらくヒト細胞およびネズミ細胞の両方の ER でホモ二量体として存在し、細胞質 ssDNA または dsDNA リガンドの存在下で ER から核周囲領域に移行して I 型 IFN 依存性転写因子を活性化することが観測された (図 1 G および 8 A ~ E)。HSV 1 は、STING 依存的に先天性免疫遺伝子産生を活性化することが同様に観測された (図 9 A ~ I)。SDG の多くは、それらのプロモーター領域に IRF 7 結合部位を含有することが確認された (図 10 A ~ F)。したがって、トランスフェクトプラスミド DNA を含めて細胞質 ssDNA または dsDNA は、STING に依存する広範にわたる一連の先天性免疫関連遺伝子の転写を強力に誘導可能である。

【0021】

STING 自体が DNA 種に会合しうる可能性をさらに評価するために、293T 細胞を STING でトランスフェクトし、細胞溶解後、ビオチン標識 dsDNA 90 を用いて STING の C 末端領域 (aa 181 ~ 349) を沈降させることを観測した (図 2 A)。STING の N 末端領域 (aa 1 ~ 195) および 3 つの同様に HA タグ付けされた対照 (GFP、NFAR1、および IPS1) は、dsDNA 90 に会合しなかった。DNA 結合エキソヌクレアーゼ TREX1 は、陽性対照として機能した。さらなる一連の広範な研究から、STING のアミノ酸領域 242 ~ 341 は、この領域の欠如した STING 変異体が核酸に会合できなかったのも、おそらく dsDNA への結合に関与することが示唆された (図 2 B ~ D)。in vitro 発現された STING もまた、高塩かつ高界面活性剤の条件下で dsDNA に結合した (同様に領域 242 ~ 341 の欠如した変異体を除く) (図 11 A ~ F)。ビオチン標識 dsDNA 90 を hTERT にトランスフェクトし、そのような細胞を可逆架橋試薬 (DSS) または UV 光で処理することにより、STING がおそらく二量体として dsDNA と複合体を形成しうることを示すさらなる証拠を得た。両方の処理の場合で、STING は、細胞溶解後、DNA への会合を維持することが観測された (図 2 E および 図 12 A ~ G)。hTERT 細胞で STING の RNAi ノックダウンを行うと、観測された結合は排除され、STING-DNA 複合体は、野生型 MEF (+/+) でのみ同様に観測され、STING の欠如した MEF (-/-) では観測されなかった (図 12 A ~ G)。HSV 1、サイトメガロウイルス (CMV)、さらにはアデノウイルス (ADV) に関連する dsDNA の競争実験から、STING はまた、dsDNA だけでなく ssDNA (ssDNA 90) にも結合しうるが、dsRNA には結合しえないことが示唆されることが同様に確認された (図 2 F)。このことは、in vitro で STING を発現させて ssDNA 90 との会合を観測することにより、確認された (図 2 G)。分析された STING 変異体はすべて、293T 細胞で IFN 型プロモーターを活性化する能力が欠如していた (図 2 H)。また、dsDNA を hTERT または MEF 細胞にトランスフェクトし、ホルムアルデヒドで処理して細胞タンパク質を核酸に架橋した。STING ブルダウンに続く後続の CHIP 分析から、トランスフェクト DNA は、dsDNA 90 特異的プライマーを用いて決定したとき、STING に直接会合可能であることがさらに確認された (図 2 I および 2 J)。STING は、ELISA アッセイでビオチン標識 DNA に結合しうることを観測された (図 14 A ~ C)。ssDNA および dsDNA 媒介先天性シグナリングイベントは、STING に依存することがデータから示唆され、さらに、STING 自体がこれらの核酸構造に複合体化してこれらのイベントの誘発を支援しうることを示す証拠が示唆された。

【0022】

3' 5' DNA エキソヌクレアーゼ TREX1 もまた、ER 関連分子であり、それがなければ免疫系を活性化しうるチェックポイント活性化 ssDNA 種の分解に重要である。hTERT 細胞で TREX1 をサイレンシングするために使用される RNAi は、dsDNA 90 による I 型 IFN の STING 依存性産生を有意に増加させた (図 3 A および 3 B)。付随的に、dsDNA ウイルス HSV 1 の複製は、おそらく I 型 IFN および抗ウイルス IFN 刺激遺伝子 (ISG) の産生の増加に起因して、TREX1 の欠如した hTERT 細胞で大幅に低減された (図 3 C および D)。ルシフェラーゼ遺伝子を発現する

10

20

30

40

50

組換えHSVからのルシフェラーゼ発現もまた、TREX1をサイレンシングするためにRNAiで処理されたhTERT感染細胞で有意に低下した(図15A~D)。これらの観測がTREX1欠損MEFを用いて拡張されたことから、細胞質dsDNA依存性遺伝子誘導は、TREX1の不在下で大きく増加し、かつHSV1複製は、有意に低減されることが同様に示唆された(図3E~G)。STINGがTREX1の不在下で観測されたI型IFNの産生の増加に関与していたかを決定するために、TREX1欠如hTERTまたはTREX1^{-/-}MEFでSTINGをサイレンシングし、これらの細胞を細胞質dsDNAまたはHSV1で処理した。STINGの欠如したTREX1欠損細胞(hTERTおよびMEFの両方)でI型IFN産生の大幅な低減が、結果から示唆されたことから、TREX1の不在下で観測されたI型IFNのレベルの増加は、STING依存性であることが示唆される(図3A~F)。同様に、TREX1^{-/-}MEFでSTINGのRNAiノックダウンを行っても、ssDNA90媒介I型IFN産生および先天性遺伝子刺激が排除されることが確認された(図16)。TREX1およびSTINGは、ERに共局在化されることが、共焦点分析から確認された(図3H)。しかしながら、細胞質dsDNAは、STINGと同様にERから核周囲領域へのTREX1の輸送を強力に誘導しなかった(図3H)。したがって、共免疫沈降分析により決定したとき、STINGおよびTREX1は、ロバストに相互作用しないことが観測された。非刺激条件下のTREX1^{+/+}またはTREX1^{-/-}MEFでは、STING依存性遺伝子の発現の劇的な差は、確認されなかった(図17A~H)。しかしながら、TREX1はdsDNA誘導遺伝子であり、このことは、確認されており、STING依存的にアップレギュレート可能である(図17A~H)。したがって、dsDNA種は、STINGおよびアクセサリー分子と複合体を形成して、輸送イベントと、TREX1を含む一次先天性免疫遺伝子の誘導に与する転写因子IRF3/7およびNF- κ Bを活性化する下流シグナリングイベントと、を媒介する可能性が高い。STING活性化TREX1がER領域に存在し、アクチベーターdsDNAを分解して負のフィードバックの形で細胞質dsDNAシグナリングを抑制することが、証拠から示唆される。したがって、TREX1は、STINGの負のレギュレーターである。

【0023】

STINGは、トランスロコン複合体の一部としてERに存在し、トランスロコン関連タンパク質 (TRAP) に会合することが、本明細書のデータから実証された。トランスロコン複合体は、TRAP、およびに結合されたSec61、およびを含み、リボソームに結合可能である。分泌タンパク質および膜タンパク質は、エクスポートされる前に適正なフォールディングおよびグリコシル化のためにER内に移行される。TREX1結合パートナーを同定するために、全長TREX1をツーハイブリッド酵母スクリーンでベイトとして使用した。TREX1は、68kDaのI型膜貫通タンパク質かつオリゴサッカリルトランスフェラーゼ(OST)複合体のメンバーであるリボホリンI(RPN1)として参照されるタンパク質と反復的に相互作用することが、結果から示唆された(図4A~E、図18A~D)。OST複合体は、トランスロコンを介してERに入ると、新生ポリペプチドのアスパラギン残基へのマンノースオリゴ糖の転移を触媒する。RPN1、RPN2、OST48、OST4、STT3A/B、TUSC3、およびDAD1を含めて、少なくとも7種のタンパク質がOST複合体を含む。重要なこととして、STINGをベイトとして用いた類似のスクリーンでは、STINGはまた、16kDaの膜貫通タンパク質であるDAD1(アポトーシス細胞死に対するディフェンダー)に会合しうることが確認された(図14F~H)。酵母ツーハイブリッド法を用いたこれらの会合のさらなる分析から、膜貫通領域を含むTREX1のC末端領域(アミノ酸241~369)がRPN1のアミノ酸258~397への結合に関与することが示唆された(図18A~D)。さらに、STINGのアミノ酸242~310は、全長DAD1との会合に関与した(図18A~D)。共免疫沈降研究から、これらの分子の相互作用が確認された(図4Dおよび4Gおよび図29A~C)。さらなる共免疫沈降実験から、TREX1とDAD1との会合が示唆された(図19A~C)。共焦点分析から、細胞内

に共局在化された T R E X 1 および R P N 1 は、細胞質 d s D N A に反応して輸送されないことが確認された (図 4 E および図 2 0)。同様に、S T I N G および D A D 1 は、細胞の E R 内に共局在化されたが、後者の分子は、細胞質 d s D N A の存在下で S T I N G をエンドソーム区画に連行しなかった (図 4 H)。E R を含む細胞ミクロソーム区画を分画により単離し、スクロース勾配分析により検査した。T R E X 1 および S T I N G は、E R マーカーである R P N 1 および R P N 2、D A D 1、ならびにカルレティキュリンと共分画されるが、核ヒストン H 3 とは共分画されないことが、この研究から示唆されたことから、それらの細胞内局在化は、トランスロコン / O S T 複合体の成分から識別できないことが確認された (図 4 I)。したがって、T R E X 1 は、S T I N G を含む E R の O S T / トランスロコン複合体にターゲティングされ、この会合は、R P N 1 との会合を介して行われるが、T R E X 1 の T M 領域は、E R への T R E X 1 の局在化に関与することが分かった。O S T、T R A P、または S R P (シグナル認識ペプチド) 複合体のメンバーが d s D N A 依存性シグナリングに影響を及ぼすかを同定するために、R N A i スクリーンを行ってこれらの成分の発現をサイレンシングした。しかしながら、S T I N G (D N A 媒介 I 型 I F N 産生に不可欠、図 2 1 A ~ H) の抑制および T R E X 1 の抑制 (I 型 I F N 産生を大きく増加させる) 以外では、S e c 6 1 および T R A P のサイレンシングのみが、シグナリングおよび H S V 1 複製に有意に影響を及ぼしたことから、この経路の制御におけるこれらのトランスロコンメンバーの役割が実証された (図 4 J および図 2 2)。細胞質 D N A センシングにも関与する I F I 1 6 のサイレンシングは、少なくとも h T E R T 細胞では、d s D N A 依存性シグナリングをロバストに抑制しないことが観測された (図 2 3 A ~ C)。I F I 1 6 レスキューの損失は、S T I N G の損失と同様に、T R E X 1 の不在下で d s D N A による I F N 産生を拡大させた (図 2 3 A ~ C)。しかしながら、I F I 1 6 を低減させたところより効果的な H S V 1 遺伝子発現が可能になったことから、ウイルス複製に影響を及ぼすこの分子の重要な役割が確認された。また、R P N 1 または 2 をサイレンシングしても、H S V 1 遺伝子発現の増加がもたらされるが、I 型 I F N 産生に有意に影響を及ぼさなかったことから、O S T のこれらの成分は、主に N - グリコシル化に関与しうることが実証された。

【 0 0 2 4 】

S T I N G は、プラスミドベースの D N A および遺伝子療法ベクターを含みうる細胞質細胞内 s s D N A および d s D N A と複合体を形成可能であり、広範にわたる一連の先天性免疫遺伝子、たとえば、I 型 I F N、I F I T ファミリー、ならびに抗ウイルス活性および適応免疫反応の開始に重要なさまざまなケモカインの誘導を調節可能であることが、データから実証される。S T I N G 活性化は、クラスリン被覆エンドソーム区画への T B K 1 のエスコートを促進して、いまだに十分に解明されていない機序により I R F 3 / 7 を活性化する可能性が高い。T R E X 1 は、細胞内に低レベルで存在するように思われ、それ自体は、S T I N G により誘導可能である。翻訳後、T R E X 1 は、非活性化 S T I N G (同様に O S T / トランスロコン複合体に存在する) にごく近接して O S T 複合体に局在化し、そこでおそらく、それがなければ S T I N G 作用を誘発可能な D N A 種を分解する。この時点では S T I N G と T R E X 1 とを含むトランスロコン / O S T 複合体の成分は、細胞質 s s D N A および d s D N A 媒介先天性免疫シグナリングを調節する。T R E X 1 が損失すると I 型 I F N 産生の増加を介して自己免疫障害が現われるので、この疾患は、S T I N G 活性を介して誘発される可能性がある。

【 0 0 2 5 】

実施例 2 : S T I N G モジュレーター

S T I N G の発現、機能、活性などを変調する作用剤を同定するために、薬剤ライブラリーをスクリーニングした。図 2 4 は、S T I N G 細胞ベースアッセイのステップを示している。

【 0 0 2 6 】

ライブラリーは、B i o M o l I C C B 既知生物活性剤ライブラリー (5 0 0 種の標的)、薬理活性化合物の L O P A C 1 2 8 0 (商標) ライブラリー、E n z o L i f e

10

20

30

40

50

Sciences, Screen-Well (商標) ホスファターゼ阻害剤ライブラリー (33種の既知ホスファターゼ阻害剤) を含んでいた。

【0027】

MicroSource スペクトルコレクション 2000種の成分、50%の薬剤成分、30%の天然物、20%の他の生物活性成分、EMD: Inhibitor Select (商標) 96 ウェルプロテインキナーゼ阻害剤ライブラリー I、Inhibitor Select (商標) 96 ウェルプロテインキナーゼ阻害剤ライブラリー II、Inhibitor Select (商標) 96 ウェルプロテインキナーゼ阻害剤ライブラリー III Ia、キナーゼライブラリー B キナーゼ True Clone コレクション、キナーゼ欠損 True Clone コレクション。

10

【0028】

1種の薬剤(「薬剤A」と称される)は、STING輸送を誘導することが、結果から示された(図60)。他の薬剤(「薬剤X」と称される)は、IFN mRNA産生を阻害した(図61)。

表2: 以下のものがSTING阻害剤として同定された。

名称	化学名	内容
ジクロフェナクナトリウム	2-[(2,6-ジクロロフェニル)アミノ]ベンゼン酢酸ナトリウム	シクロオキシゲナーゼ阻害剤; 抗炎症剤
R(-)-2,10,11-トリヒドロキシアポルフィン	R(-)-2-ヒドロキシアポモルフィン	D2ドーパミンレセプター
ヒドロプロミド	ヒドロプロミド	アゴニスト
ジプロピルドーパミン		ドーパミンレセプターアゴニスト
ヒドロプロミド		
2,2'-ビピリジル	α, α' -ビピリジル	メタロプロテアーゼ阻害剤
(\pm) trans-U-50488	trans-(\pm)-3,4-ジクロロ-N-メチル-N-[2-(1-ピロリジニル)-シクロヘキシル]-ベンゼンアセトアミド	選択的 κ オピオイド
メタンスルホネート	メタンスルホネート	レセプターアゴニスト
SP600125	アントラピラゾロン; 1,9-ピラゾロアントロン	選択的c-Jun N末端 キナーゼ(c-JNK)阻害剤.
ドキサゾシンメシレート	1-(4-アミノ-6,7-ジメトキシ-2-キナゾリニル)-4-[4-(1,4-ベンゾジオキサン-2-イル)カルビペラジン-1-イル]]-6,7-ジメトキシキナゾリンメシレート	$\alpha 1$ アドレノレセプターブロッカー
ミトキサントロン	1,4-ジヒドロキシ-5,8-ビス([2-([2-ヒドロキシエチル]アミノ)エチル]アミノ)-9,10-アントラセンジオン	DNA合成阻害剤
MRS 2159		P2X1レセプターアンタゴニスト

20

30

40

ネマジピン-A	1,4-ジヒドロ-2,6-ジメチル-4-(ペンタフルオロフェニル)-3,5-ピリジンジカルボン酸ジエチルエステル	L型カルシウムチャネル α1サブユニットアンタゴニスト.	
(±)-PPHTヒドロクロリド	(±)-2-(N-フェニルエチル)-N-プロピル)アミノ-5-ヒドロキシテトラリンヒドロクロリド	強力D2ドーパミン レセプターアゴニスト	
SMER28	6-ブロモ-N-2-プロペニ-4-キナゾリンアミン	哺乳動物オートファジーの 低分子モジュレーター.	10
硫酸キニーネ		K+チャネルブロッカー; 抗マラリア剤, 抗コリン作動剤, 抗高血圧剤および血糖降下剤; キナ類の南米樹木の樹皮から 単離されたアルカロイド	
(+)-キスカル酸	L(+)-α-アミノ-3,5-ジオキソ-1,2,4-オキサジアゾリジン-2-プロパン酸	キスカル酸の活性エナンチオマー; グルタミン酸レセプターの興奮性 アミノ酸; 駆虫剤	20

【 0 0 2 9 】

STINGのアクチベーターは、ジヒドロウアバインおよびBNTXマレエート塩水和物を含んでいた。

【 0 0 3 0 】

実施例3：STINGは自己DNA依存性炎症性疾患を発症する

骨髄誘導マクロファージ(BMDM)をSting^{+/+}およびSting^{-/-}マウスから取得し、STING経路を活性化する90塩基対dsDNA(dsDNA90)でまたはデキサメタゾン(Dex)処理胸腺細胞に由来するアポトーシスDNA(aDNA)でそれらをトランスフェクトした。両方のタイプのDNAによりBMDMおよび通常の樹状細胞(BMDc)でSTING依存的にIFN γ の産生が強力に誘導されることが観測された。DNAマイクロアレイ実験から、aDNAは、BMDMでTNF α さらにはIFN γ などの広範にわたる一連の先天性免疫サイトカインおよび炎症関連サイトカインのSTING依存性産生を誘発することが確認された(表3)。これらのデータは、aDNAで処理されたSting^{+/+}またはSting^{-/-}BMDMでサイトカイン産生を測定することにより確認された。したがって、STINGは、BMDMさらにはBMDcでアポトーシスDNA媒介炎症誘発性遺伝子産生を促進可能である。

【 0 0 3 1 】

表3は、アポトーシスDNA(aDNA)で処理されたBMDMでより高発現された遺伝子の遺伝子発現を示している。

30

40

シンボル	STING (Sting ^{+/+})			Sting ^{-/-} (Sting ^{-/-})		
	シグナル		増加倍率	シグナル		増加倍率
	モック	RNAi		モック	RNAi	
Cxcl3	6.336	1.281	33.903	-1.102	-1.524	1.339
Ifnb1	5.504	0.728	26.162	-0.846	-0.916	1.049
Ifna14	4.548	0.065	22.861	-0.332	-0.004	1.823
Ifna6	4.403	-0.030	21.716	-0.008	-0.037	-1.820
Ccl8	4.251	0.480	20.947	-1.056	-0.702	2.461
Fam25f	4.493	0.597	14.888	-2.052	-1.000	-1.008
Ifna8	3.931	0.020	14.044	-1.619	-3.705	-1.019
AA467197	2.490	-1.303	13.822	0.000	-0.342	1.268
Ifna2	3.665	-0.055	13.178	0.000	-0.129	1.094
Ifna9	3.698	-0.064	12.697	-0.088	-0.027	-1.026
Rgs18	2.342	-1.180	10.788	-1.600	-2.737	2.116
Hspa	3.416	0.037	10.400	-0.070	-0.200	1.016
Hdc	3.161	0.120	8.346	-0.094	-0.214	1.096
Oasl1	3.747	0.688	8.330	-0.715	-0.786	1.036
Gm14446	4.130	1.078	8.294	-1.742	-3.029	1.109
Ifi202	3.805	0.768	8.093	-1.931	-3.199	1.051
Oasl1	4.202	1.106	8.021	-0.565	-1.865	1.096
Rgs18	4.507	1.500	8.011	-1.881	-0.100	1.013
LOC100544382	2.807	0.041	7.381	0.478	-1.534	3.511
Gbp5	3.952	1.063	6.913	-2.076	-3.180	1.125
Gja4	2.969	0.209	6.895	0.241	-0.840	-1.000
Oasl1	4.312	1.547	6.795	-0.505	-1.865	1.602
Ii33	2.754	-0.010	6.792	-2.038	-3.039	1.001
Plekha4	3.398	0.672	6.523	0.750	-0.248	-1.011
Ccl2	3.454	0.700	6.501	-1.814	-2.863	1.002
Hsp7	2.844	0.181	6.300	0.004	-0.002	1.005
Gm12897	2.570	-0.072	6.243	-0.659	-1.629	1.013
Serpina3f	2.607	0.022	6.000	0.644	-0.261	1.203
Cxcl1	2.310	-0.373	5.994	-0.785	-1.001	4.761
LOC100544383	2.932	0.020	5.708	-0.405	-1.372	-1.004
Ifna4	2.488	-0.002	5.658	0.541	-0.304	-1.014
Upp1	2.188	-0.275	5.515	0.460	-0.414	1.395
Ccl8	2.579	0.122	5.490	-0.141	-0.234	1.066
Atn	2.549	0.101	5.455	-0.136	-0.127	-1.006
Phf11	3.545	1.113	5.387	0.606	-0.244	1.303
Geo7	1.364	-1.043	5.305	1.452	0.027	-1.003
Ifna2	2.282	-0.000	5.200	0.001	-0.718	1.003
Phf11	3.572	1.233	5.080	1.484	0.708	1.000
Lif	2.209	-0.127	5.040	0.292	-0.485	-1.033
Lcn3	2.408	0.060	5.020	0.440	-0.322	1.287

10

20

30

40

【 0 0 3 2 】

STINGがDNアーゼII関連炎症性疾患で一定の役割を果たすかを決定するために、RNAiを用いてTHP1細胞またはBMDMでSTINGおよび/またはDNアーゼIIをノックダウンしたところ、DNアーゼIIの損失によりαDNAに反応してSTING依存的にI型IFNを含むサイトカインのアップレギュレーションが促進されることが分かった。DNアーゼII^{-/-}マウスは、通常、出生前に死亡するので、DNアーゼII^{-/-}、Sting^{-/-}、またはSting^{-/-}DNアーゼII^{-/-}DKOの17日胚(E17日)を分析した。RT-PCRおよび免疫プロットを含めて、遺伝子型解析から、胚は、Sting、DNアーゼII、または両方の機能性遺伝子が欠如してい

50

ることが確認された。DNアーゼII^{-/-}胚は、以上に記載したように、貧血を呈することが観測され、Sting^{-/-}DNアーゼII^{-/-}DKO胚またはこの表現型が顕著に欠如した対照とは有意な相違を示した。致死性貧血は、発生時における赤血球新生のI型IFN阻害に起因することが報告されてきた。続いて、DNアーゼII^{-/-}胚の肝臓は、高レベルのサイトカインの産生に關与する貪食されたアポトーシス細胞で満たされた多数の浸潤マクロファージを含有することが、ヘマトキシリンおよびエオシン染色により観測された。対照マウスとは対照的に、Sting^{-/-}DNアーゼII^{-/-}胚の肝臓は、類似の表現型を呈した。TUNEL（末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ媒介dUTPピオチンニック末端標識化）による胎仔肝臓の分析から、Sting^{-/-}DNアーゼII^{-/-}胚およびDNアーゼII欠損ただし非野生型の胎仔の肝臓は、多数の大きい不適切に消化された死細胞を含有することが確認された。in vitro分析から、野生型マウスまたはDNアーゼII^{-/-}マウスの胚のマクロファージは、アポトーシス細胞を十分に貪食することが示唆された。しかしながら、貪食されたアポトーシス細胞のDNAは、野生型マクロファージのリソソームでは効率的に分解されるが、DNアーゼII^{-/-}マクロファージは、貪食された核を蓄積してDNAを消化できない。このイベントは、先天性免疫シグナリング経路の刺激および自己免疫関連サイトカインの産生をもたらす。このことを考慮して、アポトーシス細胞の貪食およびDNAの消化を行うかに関して、DNアーゼIIおよびSTINGの両方が欠如した胚性肝臓由来マクロファージの能力を評価した。Sting^{-/-}DNアーゼII^{-/-}マクロファージは、DNアーゼII^{-/-}マクロファージと同様に、野生型マウスまたはSting^{-/-}マウスから採取された対照マクロファージと比較して、デキサメタゾン処理されたアポトーシス胸腺細胞からの貪食された核を消化できないことが確認された。したがって、Sting^{-/-}DNアーゼII^{-/-}胚性マウスの肝臓から採取されたマクロファージは、DNアーゼII^{-/-}マクロファージと類似して、同様に、貪食されたアポトーシス細胞を消化する能力を示さない。

【0033】

胚性マウスの肝臓でmRNA発現レベルを分析することにより、以上の分析を補完した。この研究から、野生型胚またはSting^{-/-}胚の肝臓でごくわずかな炎症性遺伝子産生が示唆された。しかしながら、DNアーゼII^{-/-}胚の肝臓は、異常に高レベルのサイトカイン関連mRNAを含有することが観測された。重要なこととして、Sting^{-/-}DNアーゼII^{-/-}マウスの肝臓では、DNアーゼII^{-/-}マウスと比較して、先天性免疫遺伝子発現活性のレベルが劇的に低減された。これらの結果は、RT-PCRにより胚性肝臓で所定の先天性免疫遺伝子のmRNA発現レベルを解析することにより、確認された。たとえば、IFNの産生は、DNアーゼII^{-/-}マウスと比較して、Sting^{-/-}DNアーゼII^{-/-}マウスで数分の1に低減された。2'-5'オリゴアデニル酸シンターゼ(OAS)、テトラトリコペプチドリピートを有するインターフェロン誘導タンパク質(IFIT)インターフェロン誘導タンパク質27(IFIT27)、ユビキチン様モディファイヤー(USG15)などのインターフェロン刺激遺伝子(USG)の産生もまた、劇的に低減された。TNFやIL1などの炎症誘発性サイトカインもまた、DNアーゼII^{-/-}マウスと比較して、Sting^{-/-}およびSting^{-/-}DNアーゼII^{-/-}の胚性肝臓で低減された。先天性免疫遺伝子の産生は、STINGの不在で劇的に抑制されたが、いくつかの遺伝子の存在は、アレイ分析により決定したとき、Sting^{-/-}DNアーゼII^{-/-}マウスで低レベルではあるがわずかに増加した状態を維持した。これは、分析された動物間でのmRNA発現の変動によるかまたはおそらく他の経路の刺激によるものであろう。これらの遺伝子の多くは、NF- κ B経路およびインターフェロン調節因子(IRF)経路により調節される。したがって、これらの転写因子の機能を14日胚(E14日)から発生させたSting^{-/-}DNアーゼII^{-/-}または対照のネズミ胚性線維芽細胞(MEF)で評価した。ほとんどの場合、細胞質DNAに暴露された時、Sting^{-/-}DNアーゼII^{-/-}MEFでNF- κ B活性(p65リン酸化)の欠損が観測された。細胞質DNAだけでなくアポト

ーシスDNAに暴露された時も、Sting^{-/-} DNアーゼII^{-/-} BMDMで同一の欠損が得られた。このことは、NF- κ BさらにはIRF3もまた、dsDNAへの暴露後、Sting^{-/-} DNアーゼII^{-/-} MEFでは移行できないが、対照MEFでは移行できることに注目することにより、確認された。したがって、STINGは、おそらく、致死性胚性赤血球新生の誘発に關与する自己DNA誘導炎症性サイトカイン産生の制御に關与する。

【0034】

自己DNAにより促進される致死性赤血球新生を媒介するうえでのSTINGの重要性を強調するために、DNアーゼII^{-/-} マウスがSTINGの不在で出生可能であるかを評価した。重要なこととして、Sting^{-/-} バックグラウンドに交配した場合、DNアーゼII^{-/-} マウスが明白なメンデルの頻度で出生されることが観測された。PCR遺伝子型解析、ノーザンブロット解析、RT-PCR解析、および免疫ブロット解析から、後代マウスでDNアーゼIIおよびSTINGの欠損が確認された。Sting^{-/-} DNアーゼII^{-/-} ダブルノックアウトマウス(DKO)は、正常に成長するように思われ、対照マウスと比較して、類似のサイズおよび体重を呈したが、Sting^{-/-} マウスは、依然として不明な理由でややより大きいことが確認された。予備的免疫学的評価からもまた、Sting^{-/-} DNアーゼII^{-/-} DKO動物は、Sting^{-/-} マウスおよび野生型マウスに類似して、類似のCD4⁺/CD8⁺ プロファイルを共有したが、DKOは、加齢に伴って巨脾症の発症が認められることが示唆された。巨脾症はまた、I型IFNシグナリングの欠如した生存DNアーゼII欠損マウス(DNアーゼII^{-/-} Ifnar1^{-/-} マウス)でも認められ、赤髄の腫脹が原因であると報告されてきた。しかしながら、Sting^{-/-} DNアーゼII^{-/-} マウスの血清の分析から、一般的な測定可能な低レベルのサイトカインが産生されるため、8週齢の対照マウスと比較して、検出可能な異常サイトカイン産生は、示唆されなかった。これらの研究を通じて、*in vitro*では、Sting^{-/-} DNアーゼII^{-/-} マクロファージは、DNアーゼII^{-/-} マクロファージと同様に、野生型マウスまたはSting^{-/-} マウスから採取された対照マクロファージと比較して、アポトーシス胸腺細胞(Dex⁺)からの貪食された核を消化できないことが確認された。WT胸腺細胞を標的(Dex⁻)として使用した場合、DNアーゼII^{-/-} Sting^{-/-} マクロファージ内の未消化のDNAの蓄積は、それほど顕著ではなかった。したがって、Sting^{-/-} DNアーゼII^{-/-} マウスに由来するBMDMもまた、アポトーシス細胞のDNAを消化できないが、DNアーゼII^{-/-} BMDMとは対照的に、炎症性サイトカイン反応を生成しない。

【0035】

DNアーゼII⁺ マウスとI型IFN欠損Ifnar1^{-/-} マウスとを交配することによりDNアーゼII媒介胚致死を回避することが可能であるが、得られる後代は、未消化DNAが先天性免疫シグナリング経路を活性化してTNFなどの炎症性サイトカインの産生を誘発するので、出生の約8週間後、重症多発性関節炎(関節炎スコア2)に罹患する。重要なこととして、Sting^{-/-} DNアーゼII^{-/-} マウスは、出生後、多発性関節炎の徴候がなんら現れないことが確認された。関節炎スコアは、Sting^{-/-} DNアーゼII^{-/-} では、12ヶ月齢まで約0(スコアなし)に維持されたが、これとは対照的に、報告されたDNアーゼII^{-/-} Ifnar1^{-/-} マウスでは、類似の期間後、7までの関節炎スコアを呈した。DNアーゼII^{-/-} Sting^{-/-} マウスの脾臓組織および胸腺組織のH&E染色およびTUNEL染色では、アポトーシスDNAをも含有する浸潤マクロファージの存在が示されたが、6ヶ月齢のSting^{-/-} DNアーゼII^{-/-} マウスの関節の組織診断では、関節構造にパンヌス浸潤の証拠がなく、正常な硬骨(B) 滑膜関節(S)、および軟骨(C)の構造を呈した。Sting^{-/-} DNアーゼII^{-/-} マウスの血清からのTNF、IL1、およびIL6のレベルは、STINGの欠如したBMDMでの我々のアレイ解析から予想されるように、低レベルの状態を維持した(表3)。Sting^{-/-} DNアーゼII^{-/-} マウスの関節

内では、CD4、CD68、またはTRAP陽性の細胞浸潤の証拠は、存在しなかった。また、Sting^{-/-}DNアーゼI^{-/-}マウスの血清の分析から、リウマチ因子(RF)、抗dsDNA抗体、またはMMP3のレベルの上昇は、示唆されなかった。したがって、STINGの損失により、自己DNA媒介多発性関節炎に關与する炎症誘発性サイトカイン産生が回避される。

【0036】

STINGは、たとえば、アイカルディ・グチエール症候群(AGS)などの炎症性疾患に關与する。AGSは、遺伝的に決定される脳症であり、基底核および白質の石灰化、脱髄により特徴付けられる。脳脊髄液中の高レベルのリンパ球およびI型IFN。特徴は、慢性感染症によく似ている。I型IFNの血清中レベルもまた、自己免疫症候群の全身性紅斑性狼瘡(SLE)で上昇する。AGSは、3'-5' DNAエキソヌクレアーゼTREX1の突然変異により引き起こされる。TREX1機能が損失すると、DNA種は、細胞のER内に蓄積し、細胞質DNAセンサー(STING)を活性化する。TREX1は、このDNA源を消化して先天性免疫遺伝子活性化を防止する(ハウスキーピング機能)。

【0037】

STINGがアポトーシス欠損マウスで炎症性疾患に關与すると思われることを考慮して、次に、他の型の自己DNA誘発疾患がSTING経路の活性化を介して起こるかを評価した。たとえば、3'修復エキソヌクレアーゼ1(Trex1)欠損患者は、脳脊髄液中に高レベルのI型IFN産生が存在することにより特徴付けられる致死性脳炎を引き起こすアイカルディ・グチエール症候群(AGS)に罹患する。Trex1欠損マウスは、サイトカイン産生の誘発および致死性炎症性悪性心筋炎の誘発を行ういまだに特徴付けられていない自己DNA(おそらく通常はTrex1により消化される)が細胞内DNAセンサーを活性化するので、約10週間のメジアン寿命を呈する。STINGの損失によりTrex1^{-/-}マウスの寿命を伸ばすことが可能であるが、その原因は不明であることが、最近のデータから示唆される。これらの研究を拡張し、dsDNA90に暴露されたTrex1欠損BMDC(Trex1^{-/-}BMDC)でI型IFN産生のレベルがわずかに増加することを確認した。重要なこととして、STINGの損失(Sting^{-/-}Trex1^{-/-}BMDC)により、Trex1欠損BMDCでI型IFN産生を増加させるDNAの能力が排除された。興味深いことに、Trex1^{-/-}マウスと比較してSting^{-/-}Trex1^{-/-}、Sting^{-/+}Trex1^{-/-}の心臓のサイズ減少が観測された。また、心筋炎の証拠は、Trex1^{-/-}単独と比較してSting^{-/-}Trex1^{-/-}で劇的に低減されることが確認された。それに加えて、Trex1^{-/-}マウスの血清中にかなり蔓延していることが観測された抗核自己抗体(ANA)は、Sting^{-/-}Trex1^{-/-}マウスの血清中にはほぼ完全に不在であった。Sting^{-/-}Trex1^{-/-}、Sting^{-/+}Trex1^{-/-}の心臓中の炎症誘発性遺伝子のレベルがTrex1^{-/-}マウスと比較して劇的に低減されることが、マイクロアレイ解析から実証された。まとめると、これらのデータから、STINGは、Trex1欠損マウスおよびおそらくAGSで炎症誘発性遺伝子誘導に關与することが示唆される。

【0038】

実施例4: STINGのS366に対するキナーゼのスクリーニング

基質としての2種のペプチド(A366およびS366)に対して、217種のプロテインキナーゼ標的の活性を評価した。プロテインキナーゼを各ペプチドおよび次いで³³P-ATPと混合し、活性(CPM)を測定した。以下のキナーゼは、STING中のS366をリン酸化するものとして同定された。このセリンを標的とするキナーゼの同定は、薬剤発見の道を開く。この会合を標的とする薬剤は、STING活性を阻害しうる。また、治療目的でSTING活性を阻害するために使用しうる。STINGの過剰活性は、癌を増悪する可能性のある炎症性疾患をもたらしうる。

【0039】

表 4 : S T I N G の S 3 6 6 に対するキナーゼのスクリーニング

プロテインキナーゼ	活性(cpm)		誘導倍率
	A366ペプチド	S366ペプチド	
CK1δ	15569	25185	1.62
GRK7	7263	13124	1.81
IKKα	2432	6889	2.83
IRAK4	7435	50353	6.77
MEKK1	11316	24866	2.20
NEK2	8702	162331	18.65
NEK6	5512	35556	6.45
NEK7	3619	19112	5.28
NEK9	6977	26284	3.77
PIM2	1414	3715	2.63
PKCι	6812	12820	1.88
RIPK5	1327	15966	12.03
TBK1	6603	16651	2.52
ULK1	12221	209014	17.10
ULK2	7377	155880	21.13

10

【 0 0 4 0 】

実施例 5 : S T I N G は炎症関連癌に関与する

S T I N G W T および S T I N G ^{-/-} の動物を DNA 損傷剤で処理したところ、S T I N G の欠如したマウスは、腫瘍形成に対して耐性であった。この理由は、樹状細胞、マクロファージなどの浸潤免疫細胞が、壊死またはアポトーシスを受けた損傷細胞を貪食し、そのような細胞の DNA または他のリガンドが、S T I N G および腫瘍形成を促進するサイトカインの産生を活性化することにある。S T I N G は、多種多様な他の癌で腫瘍進行の促進に関与しうる。

20

【 0 0 4 1 】

図 2 9 A ~ D は、S T I N G 欠損マウスが D M B A 誘発炎症および皮膚腫瘍形成に耐性であることを示している。S T I N G ^{+/+} および S T I N G ^{-/-} マウスの剃毛背部にアセトン処理または 1 0 μ g D M B A 処理のいずれかを 2 0 週間にわたり毎週 1 回行った。図 2 9 A : S T I N G 欠損動物は、皮膚癌を引き起こす DNA 損傷剤に耐性である。皮膚腫瘍なしのマウスのパーセントをカプラン・マイヤー曲線に示した。図 2 9 B : 各処理群の代表的マウスの写真を示した。図 2 9 C : モック処理または D M B A 処理された皮膚 / 皮膚腫瘍の生検試料で H & E 染色により病理組織学的検査を行った。2 0 倍の倍率で画像を得た。図 2 9 D : 発癌性物質に暴露された S T I N G 発現マウスにおけるサイトカインアップレギュレーション。モック処理または D M B A 処理された皮膚 / 皮膚腫瘍の生検試料から抽出された RNA を、I l l u m i n a S e n t r i x B e a d C h i p A r r a y (M o u s e W G 6 バージョン 2) によりデュプリケート方式で、分析した。全遺伝子発現を分析した。最も変動しやすい遺伝子を選択した。行は、個別の遺伝子を表し、列は、個別のサンプルを表す。擬似カラーは、転写レベルが平均よりも少ないか、平均に等しいか、または平均よりも多いかを表す。遺伝子発現の変化倍率は、l o g 1 0 スケールで - 5 ~ 5 の範囲内である。サイトカインは、S T I N G 欠損動物の皮膚で観測されなかった。

30

40

【 図 1 】

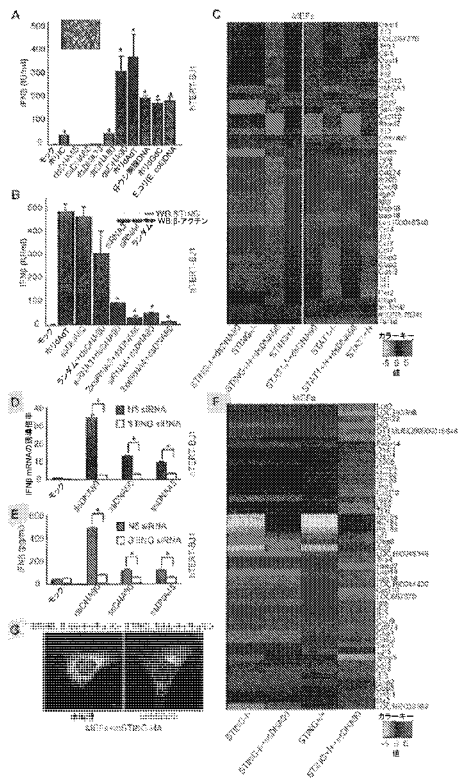
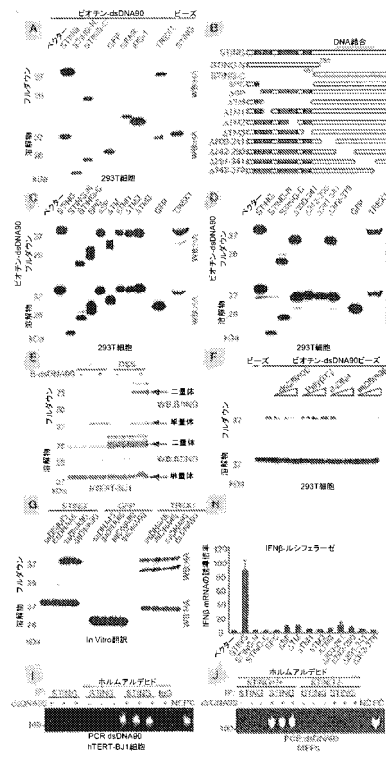


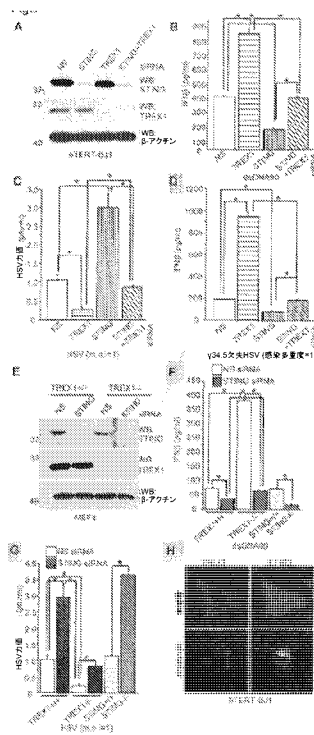
図1A-1G

【圖 2】



2A-2J

【 図 3 】



☒ 3A-3H

【 図 4 】

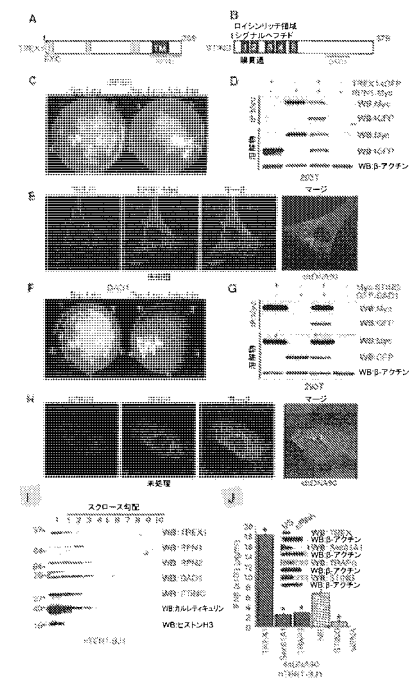


図4A-4J

【図5】

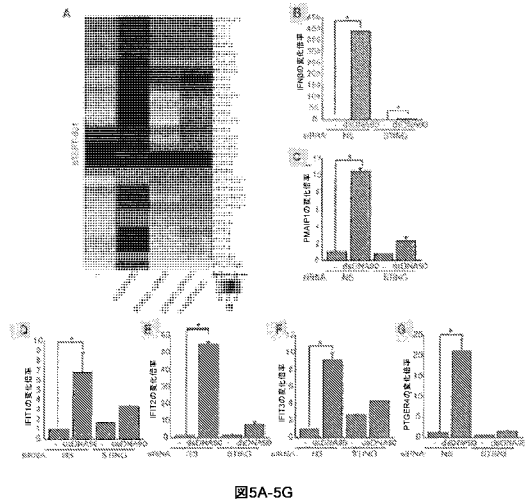


図5A-5G

【図6】

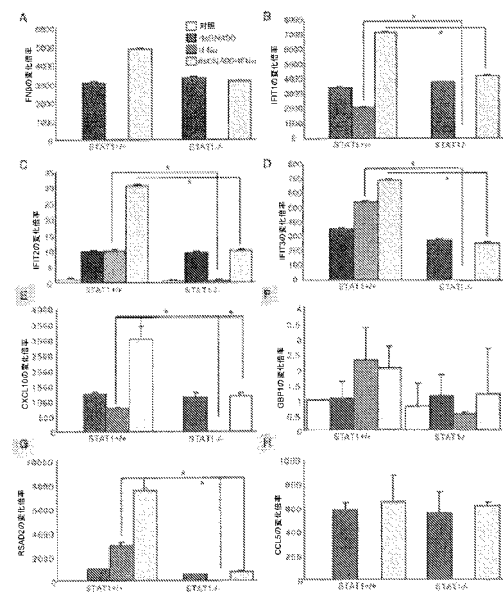


図6A-6H

【図7】

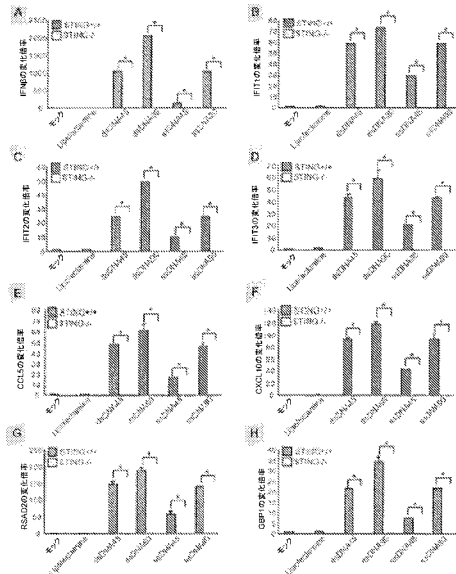


図7A-7H

【図8】

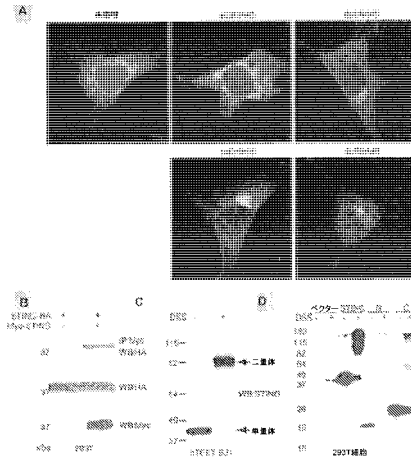


図8A-8D

【図 9】

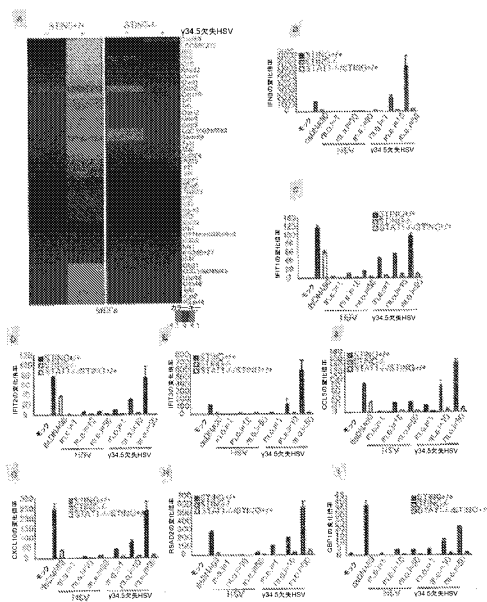


図9A-9I

【図 10】

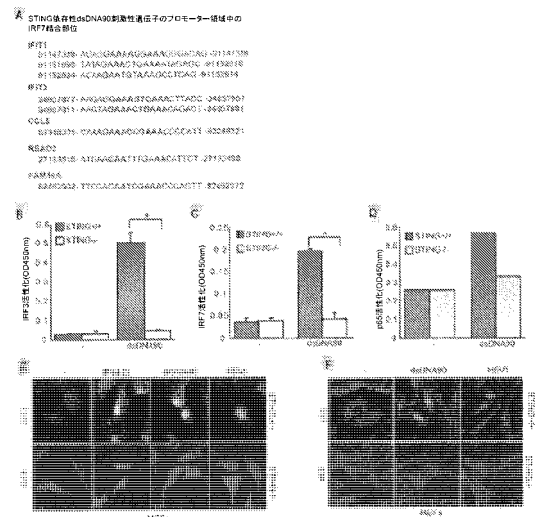


図10A-10F

【図 11】

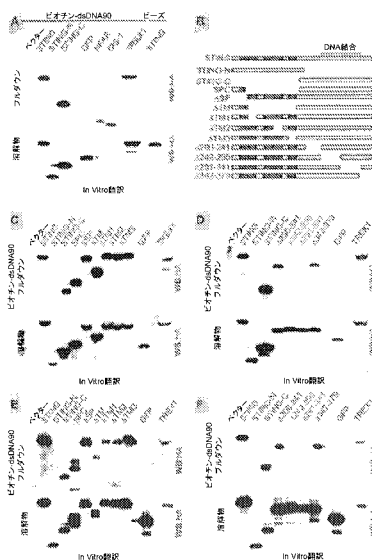


図11A-11F

【図 12】

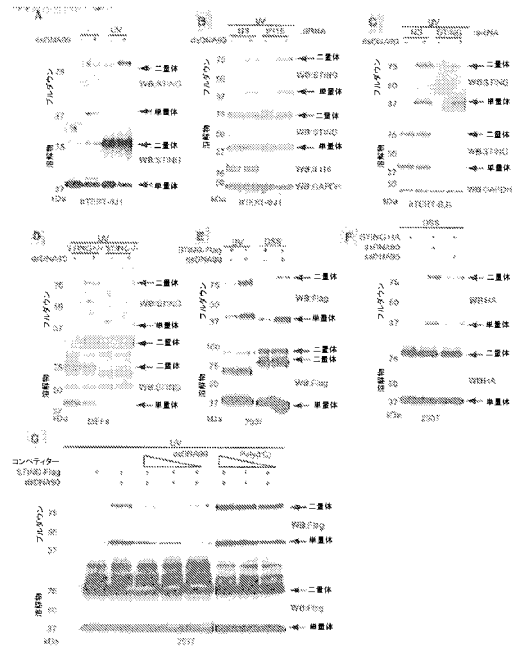


図12A-12G

【図 13】

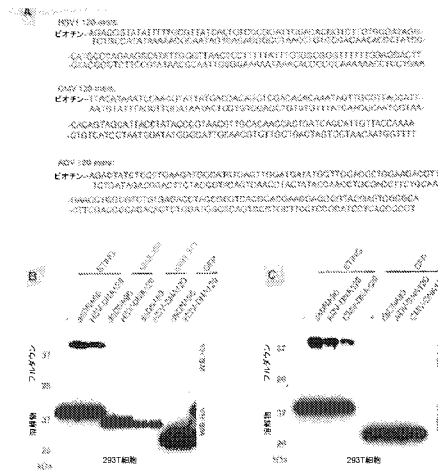


図13A-13C

【図 14】

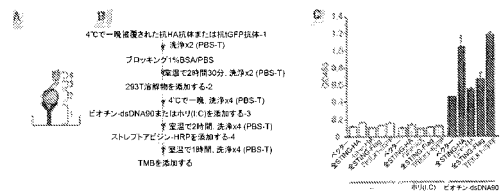


図14A-14C

【図 15】

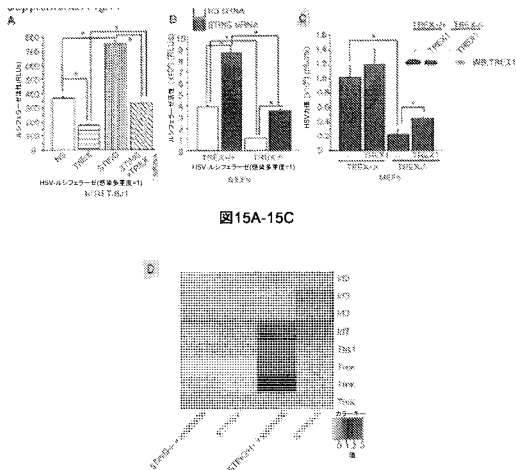


図15A-15C

図15D

【図 16】

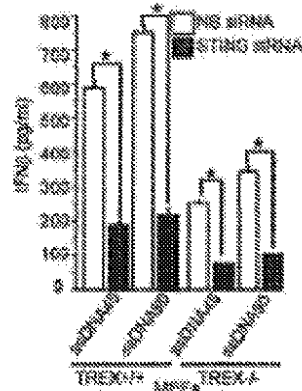


FIGURE 16

【 図 1 7 - 2 】

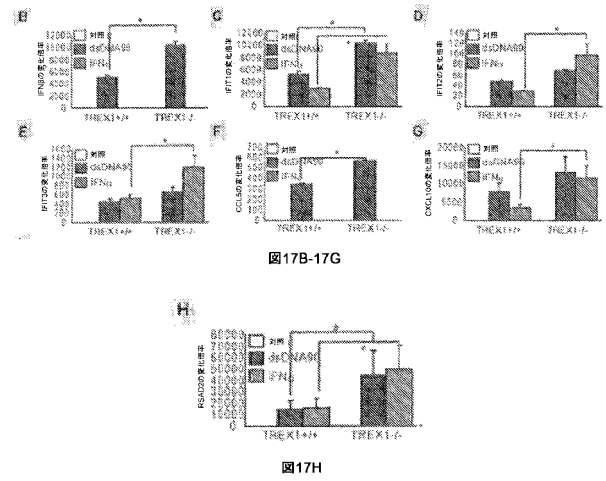
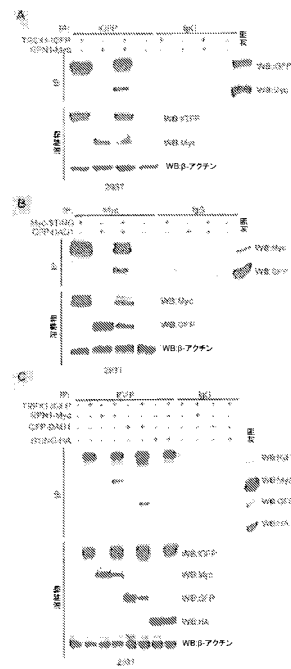


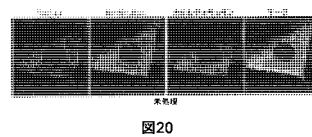
图17H

【 図 1 9 】



☒ 19A-19C

【 図 2 0 】



【図 2 1】

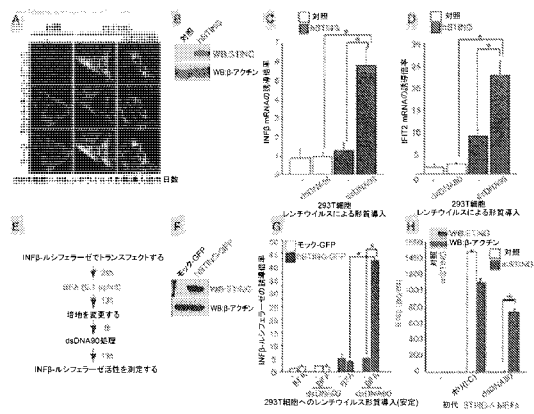


図21A-21H

【図 2 2】

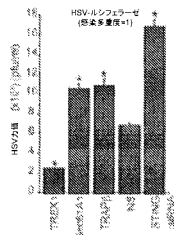


図22

【図 2 4】

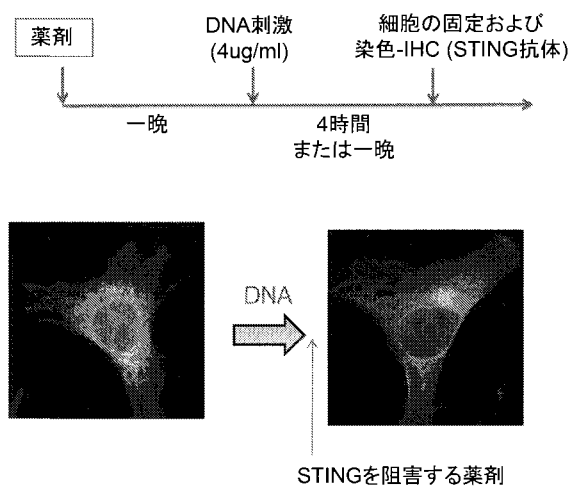


図24

【図 2 3】

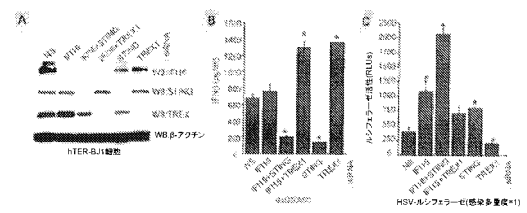


図23A-23C

【図 2 5】

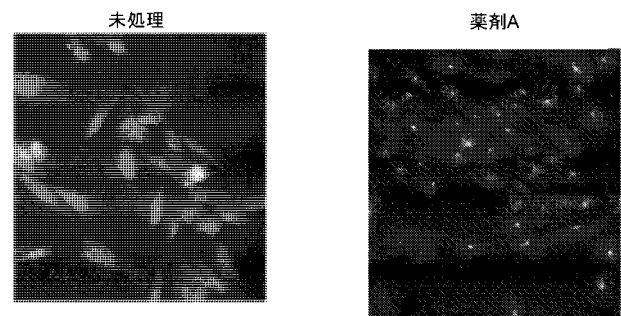


図25

【図 2 6】

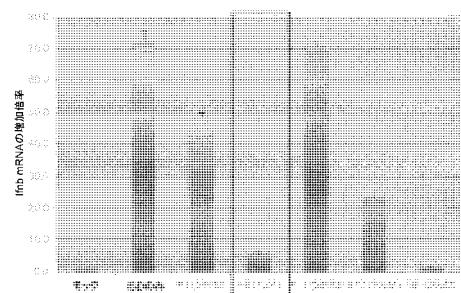
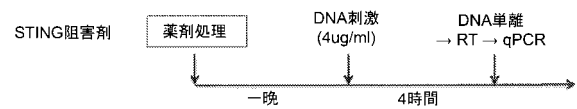


図26

【図 29 - 3】

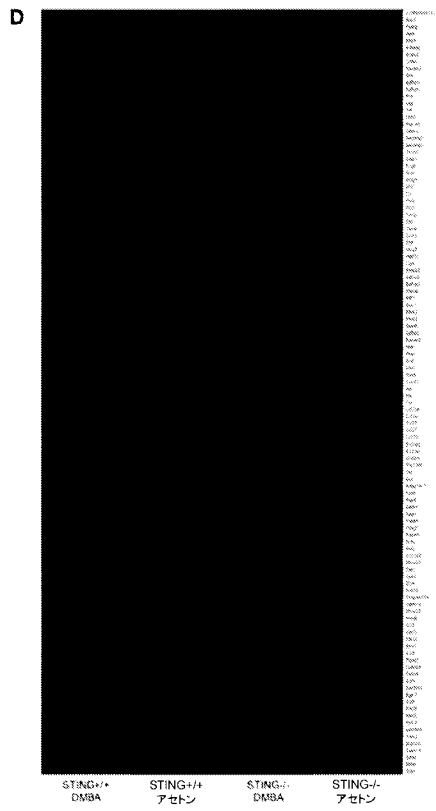


図29D

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 2013/038840
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 15/11 (2006.01)</i> <i>A61K 48/00 (2006.01)</i> 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)		
C12N 15/11, A61K 48/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
PatSearch, EMBL, NCBI, PAJ, Esp@cenet, DWPI, PCT Online, USPTO DP, CIPO (canada PO), SIPO DB, Freepatentsonline, FASTA, ProteinBlast		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/0262485 A1 (UNIVERSITY OF MIAMI) 27.10.2011, abstract, paragraphs [0002], [0005], [0048], [0057], [0065]-[0069], [0074], [0076], [0080], [0089], [0092], [0097], [0115], [0119]-[0122], [0138]-[0141], [0224]-[0282], [0329]-[0345], claims 18,20	1-13
A	GLEN N BARBER. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. Current Opinion in Immunology, 2011, 23, pp. 10-20, especially, p. 13, paragraph 2, p. 15-16, 18, paragraph 2	1-13
A	HIROKI ISHIKAWA et al. The STING pathway and regulation of innate immune signaling in response to DNA pathogens. Cell. Mol. Life Sci., 2011, 68, pp. 1157-1165, especially, p. 1159-1161	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is 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 04 July 2013 (04.07.2013)		Date of mailing of the international search report 05 September 2013 (05.09.2013)
Name and mailing address of the ISA/ FIPS Russia, 123995, Moscow, G-59, GSP-5, Berezhkovskaya nab., 30-1		Authorized officer Y. Kuzmenko
Facsimile No. +7 (499) 243-33-37		Telephone No. 8(495)531-65-15

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	

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

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB07 ZB11 ZB26 ZB35