

(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
2023年12月21日(21.12.2023)



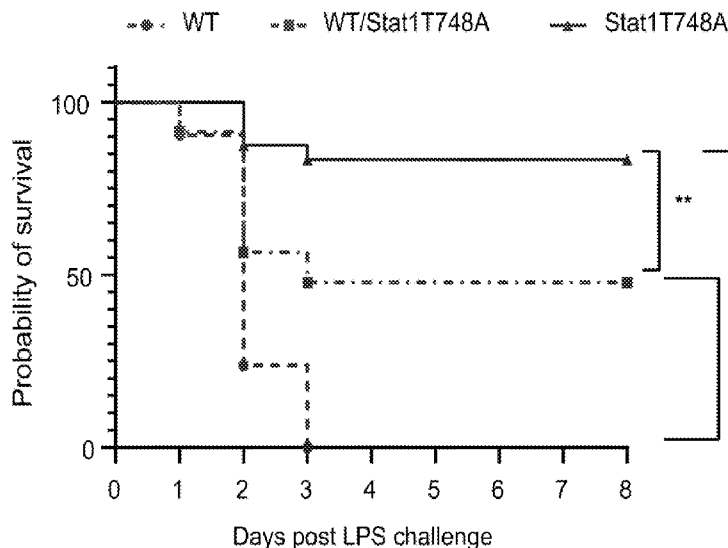
(10) 国際公開番号
WO 2023/243689 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) *A61P 17/02* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/022262
- (22) 国際出願日: 2023年6月15日(15.06.2023)
- (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 2022-097638 2022年6月16日(16.06.2022) 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). 国立大学法人富山大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION UNIVERSITY OF TOYAMA) [JP/JP]; 〒9308555 富山県富山市五福3190 Toyama (JP).
- (72) 発明者: 岸本 忠三 (KISHIMOTO Tadamitsu); 〒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). メトワリー ホザイファ サード ハッサン (METWALLY Hozaifa Saad Hassan); 〒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). 小澤 龍彦 (OZAWA Tatsuhiko); 〒9300194 富山県富山市杉谷2630 国立大学法人富山大学杉谷キャンパス内 Toyama (JP).

(54) Title: NOVEL INFLAMMATORY DISEASE TREATMENT AGENT AND SCREENING METHOD FOR SAME

(54) 発明の名称: 新規な炎症性疾患治療剤およびそのスクリーニング方法

[図1]



(57) Abstract: The present invention provides: a sepsis and/or septic shock therapeutic agent containing, as an active ingredient, a compound that suppresses phosphorylation of threonine at position 749 of human STAT1; a method for screening a candidate compound for an active ingredient of a sepsis and/or septic shock therapeutic agent including a step for selecting a compound that suppresses phosphorylation of threonine at position 749 of human STAT1; a colitis treatment agent containing, as an active ingredient, a compound that promotes phosphorylation of threonine at position 749 of human STAT1; a method for screening a candidate compound for an active ingredient of a colitis treatment agent including a step for selecting a compound that promotes phosphorylation of threonine at position 749 of human STAT1; a



WO 2023/243689 A1

(74) 代理人: 岩谷 龍 (IWATANI Ryo); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番31号 京阪堂島ビル6階 Osaka (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

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

systemic lupus erythematosus treatment agent containing, as an active ingredient, a compound that inhibits human STAT1; and a method for screening a candidate compound for an active ingredient of a systemic lupus erythematosus treatment agent including a step for selecting a compound that inhibits human STAT1.

(57) 要約: 本発明は、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を抑制する化合物を有効成分として含む、敗血症および/または敗血症性ショック治療剤、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を抑制する化合物を選択する工程を含む、敗血症および/または敗血症性ショック治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を促進する化合物を有効成分として含む、大腸炎治療剤、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を促進する化合物を選択する工程を含む、大腸炎治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法、ヒトSTAT1を阻害する化合物を有効成分として含む、全身性エリテマトーデス治療剤、ならびにヒトSTAT1を阻害する化合物を選択する工程を含む、全身性エリテマトーデス治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法を提供する。

明 細 書

発明の名称：

新規な炎症性疾患治療剤およびそのスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、新規な炎症性疾患治療剤およびそのスクリーニング方法に関するものである。

背景技術

[0002] 多細胞生物では、細胞間のコミュニケーションや、増殖、分化、恒常性維持、病原体に対する防御など、様々な細胞プロセスの調整に、細胞外からの刺激を認識することが必要である。30年前、インターフェロン（IFN）の抗ウイルスメカニズムに関する実験により、ヤヌスキナーゼ（JAK: Janus kinase）ーシグナル伝達兼転写活性化因子（STAT: Signal transducer and activator of transcription）経路が発見され、以来、膜から核へのシグナル伝達のパラダイムとなった。標準的なJAK-STATシグナル伝達は、STATタンパク質C末端の転写活性化ドメイン（TAD: transactivation domain）内の重要なチロシン残基がリン酸化されるまでSTATタンパク質が細胞質内に潜伏し、それは受容体関連JAK複合体によって媒介されると考えられている。

[0003] 哺乳類では、STATファミリーは、進化的に保存された7つのタンパク質、Stat1、2、3、4、5a、5b、6から構成されている。Stat1はユビキタスに発現しており、完全長の α アイソフォームとそのスプライスバリエントの β アイソフォームから構成されている。 β アイソフォームはTADの最後の38アミノ酸を欠いており、これらのアミノ酸がStat1の転写活性の特異性に寄与していると考えられる。JAKを介したStat1のチロシン701リン酸化は、IFNシグナル伝達およびIFN刺激遺伝子（ISG）の転写に不可欠である。708および727のセリンリン酸化などのいくつかの翻訳後修飾は、Stat1の転写活性の選択性に寄与した。

[0004] ウイルス感染に対する防御におけるStat1の役割は数十年にわたり広く研究

されているが、他の免疫学的関連シナリオ、特に炎症性刺激に対するStat1の役割は、まだ十分に理解されていない。本発明者らは、リポポリサッカライド (LPS) 刺激ヒトマクロファージにおいて、IKK関連キナーゼ β (IKK β) によって活性化されるSTAT1 TADのリン酸化部位としてスレオニン749が考えられることを明らかにした。トール様受容体4 (TLR4: toll-like receptor 4) のエンドサイトーシスは、STAT1の非標準的なリン酸化を引き起こし、標準的なJAK-Stat1経路とは無関係に炎症性サイトカインの産生に寄与した (非特許文献1)。しかし、この非標準的なリン酸化の生物学的意義や、Stat1活性への寄与については、まだ解明されていない。

先行技術文献

非特許文献

- [0005] 非特許文献1: SCIENCE SIGNALING, 24 Mar 2020, Vol 13, Issue 624. DOI: 10.1126/scisignal.aay0574

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、新規な炎症性疾患治療剤およびそのスクリーニング方法を提供することを課題とする。具体的には、新規な敗血症治療剤およびそのスクリーニング方法を提供すること、新規な大腸炎治療剤およびそのスクリーニング方法を提供すること、ならびに、新規な全身性エリテマトーデス治療剤およびそのスクリーニング方法を提供することを課題とする。さらに、本発明は、749位のスレオニンがリン酸化されたヒトSTAT1と結合する抗体、および、748位のスレオニンがリン酸化されたマウスSTAT1と結合する抗体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

- [0007] 本発明は、上記の課題を解決するために、以下の各発明を包含する。

[A1] ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を抑制する化合物を有効成分として含む、敗血症および/または敗血症性ショック治療剤。

[A2] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼを阻害する化合物である、[A1]に記載の治療剤。

[A3] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を阻害する化合物である、[A1]に記載の治療剤。

[A4] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンに特異的に結合可能な化合物である、[A1]に記載の治療剤。

[A5] 前記プロテインキナーゼがヒトTBK1および／またはヒトIKK β である、[A2] または [A3] に記載の治療剤。

[A6] ヒトSTAT1を阻害する化合物を有効成分として含む、敗血症および／または敗血症性ショック治療剤。

[A7] 前記化合物が、ヒトSTAT1の機能を阻害する化合物である、[A6]に記載の治療剤。

[A8] 前記化合物が、ヒトSTAT1の発現を阻害する化合物である、[A6]に記載の治療剤。

[0008] [A9] 敗血症および／または敗血症性ショック治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法であって、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を抑制する化合物を選択する工程を含む方法。

[A10] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼを阻害する化合物である [A9] に記載の方法。

[A11] (a) 被験化合物の存在下および非存在下で、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼによるヒトSTAT1のリン酸化を測定する工程、および(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下において前記ヒトSTAT1のリン酸化が抑制されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程、を含む、[A10]に記載の方法。

[A12] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を阻害する化合物である、[A9]に記載の方法。

[A13] (a) 被験化合物の存在下および非存在下で、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を測定する工程、および(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下において前記プロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合が抑制されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程、を含む、[A12]に記載の方法。

[A14] 前記プロテインキナーゼがヒトTBK1および／またはヒトIKK β である、[A10]～[A13]のいずれかに記載の方法。

[A15] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンに特異的に結合する化合物である、[A9]に記載の方法。

[A16] (a) 野生型のヒトSTAT1および749位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型のヒトSTAT1のそれぞれに被験化合物を接触させて、結合する被験化合物の量を測定する工程、および(b) 野生型のヒトSTAT1に結合する被験化合物の量と比較して、変異型のヒトSTAT1に結合する被験化合物の量が少ない場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程、を含む、[A15]に記載の方法。

[A17] 敗血症および／または敗血症性ショック治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法であって、ヒトSTAT1を阻害する化合物を選択する工程を含む方法。

[A18] 前記化合物が、ヒトSTAT1の機能を阻害する化合物である、[A17]に記載の方法。

[A19] (a) 被験化合物の存在下および非存在下でヒトSTAT1の機能を測定する工程、および(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下において前記ヒトSTAT1の機能が阻害されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程、を含む、[A18]に記載の方法。

[A20] 前記化合物が、ヒトSTAT1の発現を阻害する化合物である、[A17]に記載の方法。

[A21] (a) 被験化合物の存在下および非存在下でヒトSTAT1の発現を測定す

る工程、および(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下において前記ヒトSTAT1の発現が阻害されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程、を含む、[A20]に記載の方法。

[A22] 被験化合物が環状ポリペプチドである、[A9]または[A18]に記載の方法。

[0009] [A23] ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を阻害する化合物を投与する工程を含む、敗血症および／または敗血症性ショックを治療する方法。

[A24] 敗血症および／または敗血症性ショックの治療における使用のための、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を阻害する化合物。

[A25] 敗血症および／または敗血症性ショックの治療のための医薬品の製造における、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を阻害する化合物の使用。

[A26] ヒトSTAT1を阻害する化合物を投与する工程を含む、敗血症および／または敗血症性ショックを治療する方法。

[A27] 敗血症および／または敗血症性ショックの治療における使用のための、ヒトSTAT1を阻害する化合物。

[A28] 敗血症および／または敗血症性ショックの治療のための医薬品の製造における、トSTAT1を阻害する化合物の使用。

[0010] [B1] ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を促進する化合物を有効成分として含む、大腸炎治療剤。

[B2] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼを活性化する化合物である、[B1]に記載の治療剤。

[B3] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を促進する化合物である、[B1]に記載の治療剤。

[B4] 前記プロテインキナーゼがヒトTBK1および／またはヒトIKK β である、[B2]または[B3]に記載の治療剤。

[B5] 前記大腸炎が、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、コラーゲン性大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、空置大腸炎、ベーチェット病、感染性大腸炎、および不確定性大腸炎からなる群より選択される1種以上の疾患である、[B1]～[B4]のいずれかに記載の治療剤。

[0011] [B6] 大腸炎治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法であって、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を促進する化合物を選択する工程を含む方法。

[B7] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼを活性化する化合物である、[B6]に記載の方法。

[B8] (a) 被験化合物の存在下および非存在下で、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼによるヒトSTAT1のリン酸化を測定する工程、および(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下において前記ヒトSTAT1のリン酸化が促進されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程、を含む、[B7]に記載の方法。

[B9] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を促進する化合物である、[B6]に記載の方法。

[B10] (a) 被験化合物の存在下および非存在下で、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を測定する工程、および(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下において、前記プロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合が促進されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程、を含む、[B9]に記載の方法。

[B11] 前記プロテインキナーゼがヒトTBK1および／またはヒトIKK β である、[B7]～[B10]のいずれかに記載の方法。

[B12] 前記大腸炎が、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、コラーゲン性大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、空置大腸炎、ベーチェット病、感染性大腸炎、および不確定性大腸炎からなる群より選択される1種以

上の疾患である、[B6]～[B11]のいずれかに記載の方法。

[B13] 被験化合物が環状ポリペプチドである、[B6]に記載の方法。

[0012] [B14] ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を促進する化合物を投与する工程を含む、大腸炎を治療する方法。

[B15] 大腸炎の治療における使用のための、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を促進する化合物。

[B16] 大腸炎の治療のための医薬品の製造における、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を促進する化合物の使用。

[0013] [C1] ヒトSTAT1を阻害する化合物を有効成分として含む、全身性エリテマトーデス治療剤。

[C2] 前記化合物が、ヒトSTAT1の機能を阻害する化合物である、[C1]に記載の治療剤。

[C3] 前記化合物が、ヒトSTAT1の発現を阻害する化合物である、[C1]に記載の治療剤。

[0014] [C4] 全身性エリテマトーデス治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法であって、ヒトSTAT1を阻害する化合物を選択する工程を含む方法。

[C5] 前記化合物が、ヒトSTAT1の機能を阻害する化合物である、[C4]に記載の方法。

[C6] (a) 被験化合物の存在下および非存在下でヒトSTAT1の機能を測定する工程、および(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下において前記ヒトSTAT1の機能が阻害されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程、を含む、[C5]に記載の方法。

[C7] 前記化合物が、ヒトSTAT1の発現を阻害する化合物である、[C4]に記載の方法。

[C8] (a) 被験化合物の存在下および非存在下でヒトSTAT1の発現を測定する工程、および(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下において前記ヒトSTAT1の発現が阻害されている場合に、当該化合物を候補化合物

物として選択する工程、を含む、[C7] 方法。

[C9] 前記測定がヒトSTAT1を発現する細胞を用いて行われる、[C6] または [C8] に記載の方法。

[C10] 被験化合物が環状ポリペプチドである、[C4] に記載の方法。

[0015] [C11] ヒトSTAT1を阻害する化合物を投与する工程を含む、全身性エリテマトーデスを治療する方法。

[C12] 全身性エリテマトーデスの治療における使用のための、ヒトSTAT1を阻害する化合物。

[C13] 全身性エリテマトーデスの治療のための医薬品の製造における、ヒトSTAT1を阻害する化合物の使用。

[0016] [D1] C末端から2番目のスレオニンがリン酸化されたSTAT1と結合する抗体であって、該スレオニンがリン酸化されたSTAT1に対する結合親和性が、野生型STAT1に対する結合親和性より高いことを特徴とする抗体。

[D2] 749位のスレオニンがリン酸化されたヒトSTAT1と結合する抗体であって、749位のスレオニンがリン酸化されたヒトSTAT1に対する結合親和性が、野生型ヒトSTAT1に対する結合親和性より高いことを特徴とする抗体。

[D3] 748位のスレオニンがリン酸化されたマウスSTAT1と結合する抗体であって、748位のスレオニンがリン酸化されたマウスSTAT1に対する結合親和性が、野生型マウスSTAT1に対する結合親和性より高いことを特徴とする抗体。

[D4] ウサギモノクローナル抗体である [D1] ~ [D3] のいずれかに記載の抗体。

[D5] 敗血症および／または敗血症性ショック治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 被験化合物の存在下および非存在下で、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を [D1] または [D2] に記載の抗体を用いて測定する工程、および(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下において前記ヒトSTAT1のリン酸化が抑制されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程、を含む方法。

[D6] 大腸炎治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法であ

って、(a) 被験化合物の存在下および非存在下で、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を [D1] または [D2] に記載の抗体を用いて測定する工程、および(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下において前記ヒトSTAT1のリン酸化が促進されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程、を含む方法。

[0017] [E1] 749位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型ヒトSTAT1をコードする遺伝子がノックインされている、遺伝子改変ヒト細胞。

[E2] 748位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型マウスSTAT1をコードする遺伝子がノックインされている、遺伝子改変マウス細胞。

[E3] 敗血症および／または敗血症性ショック治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) (1) 野生型のヒトSTAT1を発現するヒト細胞、および

(2) (1)に記載の細胞に、749位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型のヒトSTAT1をコードする遺伝子がノックインされたヒト細胞、を提供する工程、

(b) (1)および(2)に記載の細胞のそれぞれに被験化合物を接触させ、それぞれの細胞におけるヒトSTAT1のリン酸化の状態を測定する工程、ならびに

(c) (1)に記載の細胞におけるヒトSTAT1のリン酸化の状態が、(2)に記載の細胞におけるヒトSTAT1のリン酸化の状態と等しい場合、当該化合物を候補化合物として選択する工程、を含む方法。

発明の効果

[0018] 本発明により、新規な敗血症治療剤およびそのスクリーニング方法、新規な大腸炎治療剤およびそのスクリーニング方法、ならびに、新規な全身性エリテマトーデス治療剤およびそのスクリーニング方法を提供することができる。また、本発明により、749位のスレオニンがリン酸化されたヒトSTAT1と結合する抗体、および、748位のスレオニンがリン酸化されたマウスSTAT1と結合する抗体を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]Wt/Stat1T748Aマウスの交配によるリターメイトのWt/Wtマウス、Wt/Stat1T748AマウスおよびStat1T748A/Stat1T748Aマウスに、LPS (12.5mg/kg) を腹腔内投与し、生存率を評価した結果を示す図である。

[図2]Stat1K0/Stat1T748Aの交配によるリターメイトのStat1K0/Stat1K0マウスおよびStat1T748Aマウスに、LPS (12.5mg/kg) を腹腔内投与し、生存率を評価した結果を示す図である。

[図3]LPSを投与していないWt/WtマウスおよびStat1T748A/Stat1T748Aマウス (リターメイト) の脾臓における内因性STAT関連タンパク質の発現を、ウェスタンブロッティングで検出した結果を示す図である。

[図4]Wt/WtマウスおよびStat1T748A/Stat1T748Aマウス (リターメイト) にデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を飲水で7日間投与して誘発した急性大腸炎を評価した結果を示す図であり、(A) がDSS投与期間中の体重変化、(B) が7日目の体重、(C) が結腸の長さ、(D) が結腸の病理組織検査における大腸炎の重症度スコアを示す。

[図5]Stat1K0/Stat1K0マウスおよびStat1T748Aマウス (リターメイト) にデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を飲水で7日間投与して誘発した急性大腸炎を評価した結果を示す図であり、(A) がDSS投与期間中の体重変化、(B) が7日目の体重、(C) が結腸の長さ、(D) が結腸の病理組織検査における大腸炎の重症度スコアを示す。

[図6]Wt/WtマウスおよびStat1T748A/Stat1T748Aマウス (リターメイト) に0.5mlのプリスタンを腹腔内投与して6か月間経過観察し、ループス病態を評価した結果を示す図であり、(A) がプリスタン投与後6か月間の生存率、(B) がプリスタン投与後6か月目の抗dsDNA血清力価、(C) が腎臓切片のヘマトキシリン・エオジン標本の顕微鏡画像である。

[図7]Stat1K0/Stat1K0マウスおよびStat1T748Aマウス (リターメイト) に0.5mlのプリスタンを腹腔内投与して6か月間経過観察し、ループス病態を評価した結果を示す図であり、(A) がプリスタン投与後6か月間の生存率、(B) がプリスタン投与後6か月目の抗dsDNA血清力価、(C) が腎臓切片のヘマトキシ

リン・エオジン標本の顕微鏡画像である。

[図8]0.5mlのプリスタンを腹腔内投与し、またはプリスタンを投与せずに、6か月経過後のWt/Wtマウス、Stat1T748A/Stat1T748AマウスおよびStat1K0/Stat1K0マウスのタンパク尿を測定した結果を示す図である。

[図9]748位のスレオニンがリン酸化されたマウスSTAT1ペプチドに対するリン酸化特異的モノクローナル抗体の反応性 (A)、749位のスレオニンがリン酸化されたヒトSTAT1ペプチドに対するリン酸化特異的モノクローナル抗体の反応性 (B) を、ELISA法を用いて解析した結果を示す図である。

[図10]図9の反応性解析から選択したクローンを精製し、これらが産生するモノクローナル抗体の連続希釈物のリン酸化選択性と交差反応性を、ELISA法を用いて解析した結果を示す図である。

[図11]選択した抗体分子全体をコードする γ 鎖および κ 鎖発現ベクターの両方をHEK293T細胞に共導入し、培養上清中のモノクローナル抗体を非還元条件および還元条件での電気泳動で分離した結果を示す図である。

[図12]HEK293T細胞に、ヒトまたはマウスの野生型STAT1発現ベクターおよび変異型STAT1T748A発現ベクターと、IKK β 発現ベクター組み合わせて導入し、作製したモノクローナル抗体で、748位のスレオニンがリン酸化されたマウスSTAT1および749位のスレオニンがリン酸化されたヒトSTAT1を検出した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0020] 〔炎症性疾患治療剤〕

本発明は、炎症性疾患治療剤を提供する。本発明の治療剤の治療対象である炎症性疾患は、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニン（以下、「スレオニン749」と記す）のリン酸化が、病態の発現および重症化に影響を及ぼす炎症性疾患であればよい。本発明の治療剤の治療対象である炎症性疾患としては、例えば、敗血症、敗血症性ショック、大腸炎、全身性エリテマトーデス等が挙げられる。

[0021] 敗血症は、病原体によって引き起こされた全身性炎症反応症候群 (SIRS; S

ystemic Inflammatory Response Syndrome) によって特徴付けられる疾患である。敗血症は、発熱、頻呼吸、頻脈、白血球増加等の症状を現し、進行すれば意識障害、血圧低下などの循環不全、さらに、腎・肺・肝・凝固機能異常などの臓器機能障害をきたす。そして重篤に至れば、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS; Acute Respiratory Distress Syndrome) や播種性血管内凝固症候群 (DIC; Disseminated Intravascular Coagulation) などを併発し、敗血症性ショックによる心停止・死亡に至る。敗血症は、段階が進むにつれて予後が悪くなり、死亡率が高くなるので、可能な限り初期の段階で早期診断・早期治療を行なう必要がある。

- [0022] 敗血症性ショックは重症の敗血症で、初期の輸液組成にほとんど反応しない臓器低灌流と低血圧を伴うものであり、その大部分は院内感染によるグラム陰性桿菌またはグラム陽性球菌によって引き起こされる。敗血症性ショックは免疫不全状態の患者、慢性および消耗性疾患患者でしばしばおこり、その死亡率の平均は約40%である。
- [0023] 大腸炎は大腸の炎症性疾患であれば特に限定されないが、例えば、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、コラーゲン性大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、空置大腸炎、ベーチェット病、感染性大腸炎、不確定性大腸炎などが挙げられる。
- [0024] 全身性エリテマトーデス (SLE; Systemic lupus erythematosus) は、抗核抗体または抗DNA抗体やその免疫複合体が各種臓器・組織に沈着することにより炎症反応が誘導されて生ずる全身性の自己免疫疾患である。抗核抗体または抗DNA抗体やその免疫複合体が腎糸球体に沈着するとループス腎炎が発症する。
- [0025] 本発明の治療剤としては、ヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を抑制する化合物、ヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を促進する化合物、ヒトSTAT1を阻害する化合物などが挙げられる。ここで、ヒトSTAT1のアミノ酸配列としては、例えばNCBIアクセッション番号NP_009330.1のアミノ酸配列 (配列番号1) が挙げられる。当該ヒトSTAT1をコードする塩基配列は、例えばNCBIア

クセッション番号NM_007315.4の塩基配列（配列番号2）が挙げられる。

[0026] (1) ヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を抑制する化合物

ヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を抑制する化合物としては、ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼを阻害する化合物であってもよく、ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を阻害する化合物であってもよい。ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼを阻害する化合物としては、当該プロテインキナーゼの発現を阻害する化合物であってもよく、当該プロテインキナーゼの機能を阻害する化合物であってもよい。ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を阻害する化合物としては、当該プロテインキナーゼと結合することによりヒトSTAT1との間の結合を阻害する化合物であってもよく、当該プロテインキナーゼと競合的にヒトSTAT1と結合することにより、両者の結合を阻害する化合物であってもよい。

[0027] ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼとしては、ヒトTBK1 (TANK Binding Kinase 1) であってもよく、ヒトIKK β (I kappa B kinase beta) であってもよく、ヒトTBK1とヒトIKK β との複合体であってもよい。TBK1とIKK β がヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を媒介することは公知である（例えば、非特許文献1）。ヒトTBK1のアミノ酸配列としては、例えばNCBIアクセス番号NP_037386.1のアミノ酸配列（配列番号3）が挙げられ、当該ヒトTBK1をコードする塩基配列としては、例えばNCBIアクセス番号NM_013254.4の塩基配列（配列番号4）が挙げられる。ヒトIKK β のアミノ酸配列としては、例えばNCBIアクセス番号NP_001547.1のアミノ酸配列（配列番号5）が挙げられ、当該ヒトIKK β をコードする塩基配列としては、例えばNCBIアクセス番号NM_001556.3の塩基配列（配列番号6）が挙げられる。

[0028] ヒトTBK1の発現または機能を阻害する化合物、および、ヒトIKK β の発現または機能を阻害する化合物としては、例えば、抗ヒトTBK1抗体や抗ヒトIKK β

抗体などのタンパク質、ヒトTBK1またはヒトIKK β を標的とするポリペプチド、ヒトTBK1またはヒトIKK β を標的とする核酸オリゴ、ヒトTBK1またはヒトIKK β を標的とする低分子化合物などが挙げられるが、特に限定されるものではない。好ましい例として、タンパク質が挙げられ、より好ましくは抗体（抗ヒトTBK1抗体または抗ヒトIKK β 抗体）が挙げられる。また、別の好ましい例として、核酸オリゴが挙げられ、より好ましくはsiRNAが挙げられる。さらに、別の好ましい例として、ポリペプチドが挙げられ、より好ましくは環状ポリペプチドが挙げられる。

[0029] ヒトTBK1またはヒトIKK β の発現阻害は、例えば各遺伝子の発現に対するRNA干渉（RNA interference）効果を利用することによって実現可能である。RNA干渉は、RNAを利用して遺伝子の発現を抑制する方法として報告された方法（Genes and Development, 16, 948-958(2002)）であり、標的遺伝子と同一もしくは類似した配列を有する二本鎖RNAを細胞に導入すると、導入した外来遺伝子および標的内在遺伝子の発現がいずれも抑制される現象である。具体的には、ヒトTBK1遺伝子の発現に対するRNA干渉効果を示すsiRNAやアンチセンス核酸を使用してヒトTBK1遺伝子の発現阻害が可能であり、ヒトIKK β 遺伝子の発現に対するRNA干渉効果を示すsiRNAやアンチセンス核酸を使用してヒトIKK β 遺伝子の発現阻害が可能である。

[0030] 「核酸オリゴ」は、標的遺伝子もしくはタンパク質の機能を制御する核酸のオリゴマーを意味する。核酸オリゴは、天然および非天然のRNAまたはDNAからなるオリゴであってもよい。核酸オリゴとしては、例えばsiRNA、shRNA、アンチセンス核酸、デコイ核酸、核酸アプタマー、リボザイム等が挙げられる。好ましくは、siRNAまたはshRNAが挙げられる。siRNAは、細胞で毒性を示さない範囲の短鎖からなる二本鎖RNAを意味し、例えば15bp~49bp、好適には15bp~35bp、さらに好適には21bp~30bpとすることができる。また、shRNAは、一本鎖のRNAがヘアピン構造を介して二本鎖を構成しているRNAである。

[0031] siRNAおよびshRNAは、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好

ましくは95%以上の配列同一性を有する。siRNAおよびshRNAにおけるRNA同士が対合した二本鎖RNAの部分は、完全に対合しているものに限らず、ミスマッチ（対応する塩基が相補的でない）、バルジ（一方の鎖に対応する塩基がない）などにより不対合部分が含まれていてもよい。

[0032] 「アンチセンス核酸」は、標的タンパク質をコードするDNAの転写産物と相補的なアンチセンス核酸である。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、RNA二本鎖認識によるRNase活性による分解、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造が作られた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエクソンの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらの中でも、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する。

[0033] 本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、標的mRNAの5'末端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であるものと考えられる。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく、非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含む核酸も、本発明で利用されるアンチセンス核酸に含まれる。アンチセンス核酸は標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害

するアンチセンスRNAの長さは、特に制限されない。

[0034] 「リボザイム」は、例えば、標的mRNAを切断するものをいい、標的タンパク質の翻訳を阻害するものをいう。リボザイムは標的タンパク質をコードする遺伝子配列より設計可能であり、例えば、ハンマーヘッド型リボザイムとしては、フェブス レター (FEBS Letter)、第228巻、第228-230頁 (1988) に記載の方法が用いることができる。また、ハンマーヘッド型リボザイムだけでなく、ヘアピン型リボザイム、デルタ型リボザイムなどのリボザイムの種類に関わらず、標的タンパク質のmRNAを切断して標的タンパク質の翻訳を阻害するものであればリボザイムに含まれる。

[0035] デコイ (decoy) とは、英語で「おとり」の意味であり、ある物質が本来結合あるいは作用すべきものと似せた構造を有するものをデコイと呼んでいる。「デコイ核酸」は、標的となる転写因子に結合して、その生物学的機能を阻害する二本鎖領域を含む、短い核酸分子をいう。通常は、ゲノムDNA上にある転写因子の結合領域と同じ塩基配列を有する二本鎖オリゴヌクレオチドが主にデコイ核酸として用いられる。デコイ核酸には、互いに相補的な二本鎖領域に加えて、非相補的な一本鎖領域が含まれていてもよい。デコイ核酸を投与することにより、対象となる転写因子の活性を低下させることができる。

[0036] 「核酸アプタマー」は、ワトソンクリック塩基対以外の相互作用を介して、高い特異性および親和性で標的に結合する、単離または精製された核酸である。アプタマーは、標的への特異的な結合形成に適した三次元構造を有する。従来の核酸結合とは異なり、アプタマー結合は一次的な塩基配列に依存せず、むしろ特定の二次または三次構造に依存している。典型的なアプタマーは、5~15 kDaの大きさ (15~45個のヌクレオチド) であり、ナノモルからサブナノモルの親和性で標的に結合し、密接に関連した標的を識別し得る (例えば、アプタマーは、同一の遺伝子ファミリーまたは機能的ファミリー由来の他のタンパク質に結合しない)。いくつかのアプタマーは、選択された標的に特異的に結合して、標的の機能を阻害または活性化するこ

とができる。

- [0037] 「環状ポリペプチド」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、アミド結合また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。本明細書におけるアミノ酸類縁体の例として、例えばヒドロキシカルボン酸（ヒドロキシ酸）を挙げることができる。
- [0038] 環状ポリペプチドの分子量は、500~4000、500~3000、500~2000であってよい。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。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、10~13であってよく、5~15、7~12、9~11であってよい。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および／またはアミノ酸類縁体の数は、1~8、1~5、1~3であってもよい。
- [0039] 環状ポリペプチドを製造する方法は特に限定されず、例えば環状ポリペプチドライブラリーから公知の方法を用いて同定してもよく、液相合成法、FmocやBoc等を用いた固相合成法等の化学合成方法により製造してもよい。
- [0040] 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 (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; 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。

[0041] (2) ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を促進する化合物

ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を促進する化合物としては、ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼを活性化させる化合物であってもよく、ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を促進する化合物であってもよい。ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼを活性化させる化合物としては、当該プロテインキナーゼの発現を促進する化合物であってもよく、当該プロテインキナーゼの機能を亢進させる化合物であってもよい。ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼの発現を促進する化合物としては、例えば、当該プロテインキナーゼをコードする核酸分子などが挙げられる。ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼの機能を促進させる化合物としては、例えば、当該プロテインキナーゼとその基質であるヒトSTAT1の両者に結合する二重特異的抗体、ヒトTBK1とヒトIKK β の両者に結合する二重特異的抗体などが挙げられる。ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を促進する化合物としては、当該プロテインキナーゼとその基質であるヒトSTAT1の両者に結合する二重特異的抗体などが挙げられる。

[0042] (3) ヒトSTAT1を阻害する化合物

ヒトSTAT1を阻害する化合物としては、ヒトSTAT1の機能を阻害する化合物であってもよく、ヒトSTAT1の発現を阻害する化合物であってもよい。ヒトSTAT1の機能または発現を阻害する化合物としては、例えば、抗ヒトSTAT1抗体などのタンパク質、ヒトSTAT1を標的とするポリペプチド、ヒトSTAT1を標的とする核酸オリゴ、ヒトSTAT1を標的とする低分子化合物などが挙げられるが、特に限定されるものではない。好ましい例として、タンパク質が挙げられ、より好ましくは抗体（抗ヒトSTAT1抗体）が挙げられる。また、別の好ましい例として、核酸オリゴが挙げられ、より好ましくはsiRNAが挙げられる。さらに、別の好ましい例として、ポリペプチドが挙げられ、より好ましくは環状ポリペプチドが挙げられる。各化合物の詳細は、上記（1）で説明した通りであり、ここでの説明は省略する。

[0043] 本発明の炎症性疾患治療剤において、敗血症および／または敗血症性ショック治療剤の有効成分として、ヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を抑制する化合物およびヒトSTAT1を阻害する化合物を使用することができる。また、大腸炎治療剤の有効成分として、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を促進する化合物を使用することができる。また、全身性エリテマトーデス治療剤の有効成分として、ヒトSTAT1を阻害する化合物を使用することができる。

[0044] 本発明の炎症性疾患治療剤には、保存剤や安定剤等の製剤上許容しうる材料が添加されていてもよい。製剤上許容しうるとは、それ自体が炎症性疾患の治療効果を有する材料であってもよいし、炎症性疾患の治療効果を有さない材料であってもよく、本発明の炎症性疾患治療剤とともに投与可能な製剤上許容される材料を意味する。また、治療効果を有さない材料であって、有効成分と併用することによって相乗的效果もしくは相加的な安定化効果を有する材料であってもよい。製剤上許容される材料としては、例えば滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、緩衝剤、防腐剤、界面活性剤、キレート剤（EDTA等）、結合剤等を挙げることができる。

[0045] 界面活性剤としては非イオン界面活性剤を挙げることができ、例えばソル

ビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリテート、グリセリンモノステアレート等のグリセリン脂肪酸エステル等のHLB6～18を有するもの、等を典型例として挙げるができる。

[0046] また、界面活性剤としては陰イオン界面活性剤も挙げることができ、例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数10～18のアルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が2～4でアルキル基の炭素原子数が10～18であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩；ラウリルスルホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が8～18のアルキルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセロリン脂質；スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質；炭素原子数12～18の脂肪酸のシヨ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げるができる。

[0047] 本発明の炎症性疾患治療剤には、これらの界面活性剤の1種または2種以上を組み合わせて添加することができる。本発明の製剤で使用する好ましい界面活性剤は、ポリソルベート20、40、60、80などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、ポリソルベート20および80が特に好ましい。また、ポロキサマー（プルロニックF-68（登録商標）など）に代表されるポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールも好ましい。

[0048] 緩衝剤としては、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、リンゴ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、コハク酸緩衝液、乳酸緩衝液、リン酸カリウム緩衝液、グルコン酸緩衝液、カプリル酸緩衝液、デオキシコール酸緩衝液、サリチル酸緩衝液、トリエタノールアミン緩衝液、フマル酸緩衝液等、その他の有機酸緩衝液等、炭酸緩衝液、トリス緩衝液、ヒスチジン緩衝液、イミダゾール緩衝液等を挙げるができる。

[0049] また溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって溶液製剤

を調製してもよい。緩衝液の濃度は一般には1~500mMであり、好ましくは5~100mMであり、さらに好ましくは10~20mMである。

- [0050] また、本発明の炎症性疾患治療剤は、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等のタンパク質、アミノ酸、多糖および単糖等の糖類や炭水化物、糖アルコールを含んでいてもよい。多糖および単糖等の糖類や炭水化物としては、例えばデキストラン、グルコース、フルクトース、ラクトース、キシロース、マンノース、マルトース、スクロース、トレハロース、ラフィノース等を挙げることができる。糖アルコールとしては、例えばマンニトール、ソルビトール、イノシトール等を挙げることができる。
- [0051] 注射用の水溶液とする場合には、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（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、PEG等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80、HC0-50）等と併用してもよい。所望によりさらに希釈剤、溶解補助剤、pH調整剤、無痛化剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含有してもよい。
- [0052] また、必要に応じ、マイクロカプセル（ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル）に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム（リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、ナノカプセル等）としたりすることもできる（"Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo E d., 1980等参照）。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明に適用し得る（Langer et al., J.Biomed.Mater.Res. 1981, 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. 1982, 12: 98-105; 米国特許第3,773,919号; 欧州特許出願公開(EP)第58,481号; Sidman et al., Biopolymers 1983, 22: 547-556; EP第133,988号）。
- [0053] 使用される製剤上許容しうる担体は、剤形に応じて上記の中から適宜ある

いは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

[0054] 本発明の炎症性疾患治療剤の有効成分をヒトや他の動物の医薬として使用する場合には、これらの有効成分を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。製剤化する場合には、上記に記載の製剤上許容される材料を添加してもよい。

[0055] 本発明の炎症性疾患治療剤は、医薬品の形態で投与することが可能であり、経口的または非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤などを選択することができ、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。有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.001mgから100mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり0.1~1000mg、好ましくは0.1~50mgの投与量を選ぶことができる。具体的には、例えば、体重1kgあたり1か月（4週間）に0.1mgから40mg、好ましくは1mgから20mgを1回から数回に分けて、例えば2回/週、1回/週、1回/2週、1回/4週などの投与スケジュールで点滴などの静脈内注射、皮下注射などの方法で、投与方法などである。投与スケジュールは、投与後の状態の観察および血液検査値の動向を観察しながら2回/週あるいは1回/週から1回/2週、1回/3週、1回/4週のように投与間隔を延ばしていくなど調整することも可能である。

[0056] [スクリーニング方法]

本発明は、敗血症および／または敗血症性ショック治療剤の有効成分の候補化合物のスクリーニング方法、大腸炎治療剤の有効成分の候補化合物のスクリーニング方法、および全身性エリテマトーデス治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法を提供する。本発明のスクリーニング方法において、「被験化合物」は特に限定されるものではなく、例えば天然化合物、有機化合物、無機化合物、核酸オリゴ、タンパク質、ポリペプチド、環状ポリペプチド等の単一物質、化合物ライブラリー、核酸オリゴライブラリー、ポリペプチドライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、原核

細胞抽出物、真核単細胞抽出物もしくは動物細胞抽出物等を挙げることができる。上記被験化合物は必要に応じて適宜標識して用いることができる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識等を挙げることができる。また、上記被験化合物に加えて、これらの被験化合物を複数種混合した混合物も含まれる。

[0057] 1. 敗血症および／または敗血症性ショック治療剤の有効成分の候補化合物のスクリーニング方法

本発明は、敗血症および／または敗血症性ショック治療剤の有効成分の候補化合物のスクリーニング方法（以下、「本発明の敗血症治療剤のスクリーニング方法」と記す）を提供する。

[0058] 本発明の敗血症治療剤のスクリーニング方法の第一の態様は、ヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を抑制する化合物として、ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼを阻害する化合物を選択する工程を含む方法である。具体的な工程は特に限定されず、例えば、以下の工程(a)および(b)を含むスクリーニング方法であってもよい。

(a) 被験化合物の存在下および非存在下で、ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼによるヒトSTAT1のリン酸化を測定する工程、および

(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてヒトSTAT1のリン酸化が抑制されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程。

[0059] 工程(a)では、プロテインキナーゼとしてヒトTBK1および／またはヒトIKK β を好適に使用することができる。工程(a)で使用されるヒトSTAT1、ヒトTBK1およびヒトIKK β は、上記の配列情報、または公知のデータベース（NCBI等）に登録された配列情報に基づいて、公知の遺伝子組み換え技術および組み換えタンパク質発現技術を用いて組み換えタンパク質として作製することができる。また、市販の組み換えヒトSTAT1、組み換えヒトTBK1および組み換えヒトIKK β を使用してもよい。以下に記載する別の態様において使用する場合

も同様である。

[0060] 工程(a)において、ヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を測定する方法は特に限定されず、公知の方法を適宜選択して用いることができる。例えば、基質である組み換えヒトSTAT1と、プロテインキナーゼである組み換えヒトTBK1および/または組み換えヒトIKK β と、ATPをリン酸基転移反応に適したバッファーに添加して反応を開始する。放射性標識されたATP（例えば、 ^{32}P - γ -ATP）を用いた場合は、液体シンチレーションカウンター、オートラジオグラフィ、ホスホイメージング等により測定することができる。放射性標識されたATPを用いない場合は、スレオニン749がリン酸化されたヒトSTAT1と特異的に結合する抗体を用いて、公知の免疫化学的測定法（例えば、ELISA、ウェスタンブロットティング等）により測定してもよい。具体的には、例えば、Wen et al., Cell (1995) 82: 241-250 に記載の方法、Ng et al., Proc Natl Acad Sci USA (2011) 108: 21170-21175 に記載の方法などを用いることができる。

スレオニン749がリン酸化されたヒトSTAT1と特異的に結合する抗体としては、本発明の抗体（後述）を好ましく用いることができる。例えば、実施例に記載の本発明者らが樹立したウサギモノクローナル抗体を用いてもよい。

[0061] 工程(b)では、被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下において前記ヒトSTAT1のリン酸化が抑制されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する。選択された化合物にはヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼを阻害する化合物が含まれ、当該化合物はヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を抑制することにより、敗血症および/または敗血症性ショックを治療する効果を示すものと考えられる。

[0062] 本発明の敗血症治療剤のスクリーニング方法の第二の態様は、ヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を抑制する化合物として、ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を阻害する化合物を選択する工程を含む方法である。具体的な工程は特に限定されず、例えば、以下の工程(a)および(b)を含むスクリーニング方法であってもよい。

(a) 被験化合物の存在下および非存在下で、ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を測定する工程、および

(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合が抑制されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程。

[0063] 工程(a)において、プロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を測定する方法は特に限定されず、公知の方法を適宜選択して用いることができる。例えば、ELISA法、蛍光偏光法、免疫染色法、質量分析法、免疫沈降法、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法などが挙げられる。ELISA法を用いる場合、組み換えヒトSTAT1およびプロテインキナーゼ (ヒトTBK1またはヒトIKK β) の組み換えタンパク質のいずれか一方を固相化し、そこに他方および被験化合物を添加して反応させ、ヒトSTAT1とプロテインキナーゼの結合レベルを適当な一次抗体および二次抗体を用いて検出することができる。

[0064] 工程(b)では、被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下において前記プロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合が抑制されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する。選択された化合物にはヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を阻害する化合物が含まれ、当該化合物はヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を抑制することにより、敗血症および/または敗血症性ショックを治療する効果を示すものと考えられる。

[0065] 本発明の敗血症治療剤のスクリーニング方法の第三の態様は、ヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を抑制する化合物として、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンに特異的に結合する化合物を選択する工程を含む方法である。具体的な工程は特に限定されず、例えば、以下の工程(a)および(b)を含むスクリーニング方法であってもよい。

(a) 野生型のヒトSTAT1および749位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型のヒトSTAT1のそれぞれに被験化合物を接触させて、結合する被験化

化合物の量を測定する工程、および

(b) 野生型のヒトSTAT1に結合する被験化合物の量と比較して、変異型のヒトSTAT1に結合する被験化合物の量が少ない場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程。

[0066] 工程(a)において、野生型ヒトSTAT1または変異型ヒトSTAT1と被験化合物との結合を測定する方法は特に限定されず、公知の方法を適宜選択して用いることができる。例えば、標識された被験化合物（放射標識、蛍光標識など）を用いることにより、測定することができる。また、樹脂やチップなどに野生型ヒトSTAT1および変異型ヒトSTAT1をそれぞれ固定化して被験化合物を接触させて結合を測定する方法、逆に樹脂やチップなどに被験化合物を固定化して野生型ヒトSTAT1および変異型ヒトSTAT1をそれぞれ接触させて結合を測定する方法、表面プラズモン共鳴（SPR）法などを用いることができる。

[0067] 工程(b)では、野生型のヒトSTAT1に結合する被験化合物の量と比較して、変異型のヒトSTAT1に結合する被験化合物の量が少ない場合に、当該化合物を候補化合物として選択する。選択された化合物にはヒトSTAT1の749位におけるスレオニンに特異的に結合する化合物が含まれ、当該化合物はヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を抑制することにより、敗血症および／または敗血症性ショックを治療する効果を示すものと考えられる。

[0068] 本発明の敗血症治療剤のスクリーニング方法の第四の態様は、ヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を抑制する化合物をスクリーニングするために、749位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型のヒトSTAT1をコードする遺伝子がノックインされた遺伝子改変ヒト細胞を使用する方法である。具体的な工程は特に限定されず、例えば、以下の工程(a)、(b)および(c)を含むスクリーニング方法であってもよい。

(a) (1) 野生型のヒトSTAT1を発現するヒト細胞、および

(2) (1)に記載の細胞に、749位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型のヒトSTAT1をコードする遺伝子がノックインされた遺伝子改変ヒト細胞、を提供する工程、

(b) (1)および(2)に記載の細胞のそれぞれに被験化合物を接触させる工程、
ならびに

(c) (1)に記載の細胞におけるヒトSTAT1のリン酸化の状態が、(2)に記載の細胞におけるヒトSTAT1のリン酸化の状態と等しい場合、当該化合物を候補化合物として選択する工程。

[0069] 工程(a)では、(1) 野生型のヒトSTAT1を発現するヒト細胞、および、(2) 当該ヒト細胞に749位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型のヒトSTAT1をコードする遺伝子がノックインされた遺伝子改変ヒト細胞を提供する。工程(a)で用いる野生型のヒトSTAT1を発現するヒト細胞は、特に限定されないが、例えば、ヒトSTAT1を生来的に発現するヒトプライマリー細胞もしくはヒト細胞株、またはヒトSTAT1をコードする遺伝子を外部から導入することによりヒトSTAT1を発現するよう改変された遺伝子組換えヒト細胞株などが挙げられる。749位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型のヒトSTAT1をコードする遺伝子がノックインされた遺伝子改変ヒト細胞は、公知のゲノム編集技術を用いて、上記野生型のヒトSTAT1を発現するヒト細胞のSTAT1遺伝子にT749A 変異を導入することにより、作製することができる。

[0070] 工程(b)では、(1)の細胞および(2)の細胞のそれぞれに、被験化合物を接触させる。細胞に被験化合物を接触させる方法は特に限定されず、公知の方法を適宜選択して用いることができる。例えば、細胞を培養している培地に被験化合物を添加する方法などが挙げられる。

[0071] 工程(b)において、被験化合物と接触した細胞におけるヒトSTAT1のリン酸化の状態を測定する方法は特に限定されず、公知の方法を適宜選択して用いることができる。例えば、公知の方法で細胞からタンパク質を抽出し、スレオニン749がリン酸化されたヒトSTAT1と特異的に結合する抗体を用いて、公知の免疫化学的測定法（例えば、ELISA、ウェスタンブロットティング等）、ペプチドマッピング法などにより測定することができる。

[0072] 工程(c)では、(1)の野生型のヒトSTAT1を発現するヒト細胞におけるヒトSTAT1のリン酸化の状態が、(2)の749位のスレオニンがアラニンに置換されている

変異型のヒトSTAT1をコードする遺伝子がノックインされた遺伝子改変ヒト細胞におけるヒトSTAT1のリン酸化の状態と等しい場合に、被験化合物を候補化合物として選択する。選択された化合物はヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を抑制することができるので、敗血症および／または敗血症性ショックを治療する効果を示すものと考えられる。

[0073] 本発明の敗血症治療剤のスクリーニング方法の第五の態様は、ヒトSTAT1を阻害する化合物として、ヒトSTAT1の機能を阻害する化合物を選択する工程を含む方法である。具体的な工程は特に限定されず、例えば、以下の工程(a)および(b)を含むスクリーニング方法であってもよい。

(a) 被験化合物の存在下および非存在下でヒトSTAT1の機能を測定する工程、および

(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてヒトSTAT1の機能が阻害されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程。

[0074] 工程(a)において、ヒトSTAT1の機能を測定する方法は特に限定されず、公知の方法を適宜選択して用いることができる。例えば、STAT1の転写因子としての機能をレポーター遺伝子アッセイで測定する方法などが挙げられる。

[0075] 工程(b)では、被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてヒトSTAT1の機能が阻害されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する。選択された化合物はヒトSTAT1を阻害することにより、敗血症および／または敗血症性ショックを治療する効果を示すものと考えられる。

[0076] 本発明の敗血症治療剤のスクリーニング方法の第六の態様は、ヒトSTAT1を阻害する化合物として、ヒトSTAT1の発現を阻害する化合物を選択する工程を含む方法である。具体的な工程は特に限定されず、例えば、以下の工程(a)および(b)を含むスクリーニング方法であってもよい。

(a) 被験化合物の存在下および非存在下でヒトSTAT1の発現を測定する工程、および

(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてヒトSTA

T1の発現が阻害されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程

[0077] 工程(a)において、ヒトSTAT1の発現を測定する方法は特に限定されず、公知の方法を適宜選択して用いることができる。例えば、ヒトSTAT1を発現する細胞を、被験化合物を含有する培地または含有しない培地で培養し、ヒトSTAT1のmRNA量またはタンパク質量を測定する方法が挙げられる。mRNA量を測定する場合は、公知の方法で細胞からRNAを抽出し、公知のmRNA量測定方法を用いて定量することができる。公知のmRNA量測定方法としては、ノーザンブロット法、RT-PCR法、定量RT-PCR法、RNaseプロテクションアッセイなどが挙げられる。タンパク質量を測定する場合は、公知の方法で細胞からタンパク質を抽出し、公知のタンパク質量測定方法を用いて定量することができる。公知のタンパク質量測定方法としては、例えば、ウェスタンブロット法、EIA法、ELISA法、RIA法、タンパク質測定試薬を用いる方法などが挙げられる。

[0078] 工程(b)では、被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてヒトSTAT1の発現が阻害されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する。選択された化合物はヒトSTAT1の発現を阻害することにより、敗血症および／または敗血症性ショックを治療する効果を示すものと考えられる。

[0079] 2. 大腸炎治療剤の有効成分の候補化合物のスクリーニング方法

本発明は、大腸炎治療剤の有効成分の候補化合物のスクリーニング方法（以下、「本発明の大腸炎治療剤のスクリーニング方法」と記す）を提供する。大腸炎は大腸の炎症性疾患であれば特に限定されないが、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、コラーゲン性大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、空置大腸炎、ベーチェット病、感染性大腸炎、または不確定性大腸炎であってもよい。

[0080] 本発明の大腸炎治療剤のスクリーニング方法の第一の態様は、ヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を促進する化合物として、ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼを活性化する化合物を選択する工程を

含む方法である。具体的な工程は特に限定されず、例えば、以下の工程(a)および(b)を含むスクリーニング方法であってもよい。

(a) 被験化合物の存在下および非存在下で、ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼによるヒトSTAT1のリン酸化を測定する工程、および

(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてヒトSTAT1のリン酸化が促進されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程。

[0081] 工程(a)では、プロテインキナーゼとしてヒトTBK1および／またはヒトIKK β を好適に使用することができる。また、工程(a)では、自作または市販の組み換えヒトSTAT1、組み換えヒトTBK1および組み換えヒトIKK β を使用することができる。

[0082] 工程(a)において、ヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を測定する方法は特に限定されず、公知の方法を適宜選択して用いることができる。例えば、本発明の敗血症治療剤のスクリーニング方法の第一の態様と同様の方法で測定することができる。

[0083] 工程(b)では、被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてヒトSTAT1のリン酸化が促進されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する。選択された化合物にはヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼを活性化する化合物が含まれ、当該化合物はヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を促進することにより、大腸炎を治療する効果を示すものと考えられる。

[0084] 本発明の大腸炎治療剤のスクリーニング方法の第二の態様は、ヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を促進する化合物として、ヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を促進する化合物を選択する工程を含む方法である。具体的な工程は特に限定されず、例えば、以下の工程(a)および(b)を含むスクリーニング方法であってもよい。

(a) 被験化合物の存在下および非存在下で、ヒトSTAT1のスレオニン749をリ

ン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を測定する工程、および

(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合が促進されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程。

[0085] 工程(a)において、プロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を測定する方法は特に限定されず、公知の方法を適宜選択して用いることができる。本発明の敗血症治療剤のスクリーニング方法の第二の態様と同様の方法で測定することができる。

[0086] 工程(b)では、被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合が促進されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する。選択された化合物にはヒトSTAT1のスレオニン749をリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を促進する化合物が含まれ、当該化合物はヒトSTAT1のスレオニン749のリン酸化を促進することにより、大腸炎を治療する効果を示すものと考えられる。

[0087] 3. 全身性エリテマトーデス治療剤の有効成分の候補化合物のスクリーニング方法

本発明は、全身性エリテマトーデス治療剤の有効成分の候補化合物のスクリーニング方法（以下、「本発明の全身性エリテマトーデス治療剤のスクリーニング方法」と記す）を提供する。

[0088] 本発明の全身性エリテマトーデス治療剤のスクリーニング方法の第一の態様は、ヒトSTAT1を阻害する化合物として、ヒトSTAT1の機能を阻害する化合物を選択する工程を含む方法である。具体的な工程は特に限定されず、例えば、以下の工程(a)および(b)を含むスクリーニング方法であってもよい。

(a) 被験化合物の存在下および非存在下でヒトSTAT1の機能を測定する工程、および

(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてヒトSTA

T1の機能が阻害されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程。

[0089] 工程(a)において、ヒトSTAT1の機能を測定する方法は特に限定されず、公知の方法を適宜選択して用いることができる。例えば、本発明の敗血症治療剤のスクリーニング方法の第五の態様と同様の方法で測定することができる。

[0090] 工程(b)では、被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてヒトSTAT1の機能が阻害されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する。選択された化合物はヒトSTAT1を阻害することにより、全身性エリテマトーデスを治療する効果を示すものと考えられる。

[0091] 本発明の全身性エリテマトーデス治療剤のスクリーニング方法の第二の態様は、ヒトSTAT1を阻害する化合物として、ヒトSTAT1の発現を阻害する化合物を選択する工程を含む方法である。具体的な工程は特に限定されず、例えば、以下の工程(a)および(b)を含むスクリーニング方法であってもよい。

(a) 被験化合物の存在下および非存在下でヒトSTAT1の発現を測定する工程、および

(b) 被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてヒトSTAT1の発現が阻害されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する工程

[0092] 工程(a)において、ヒトSTAT1の発現を測定する方法は特に限定されず、公知の方法を適宜選択して用いることができる。例えば、本発明の敗血症治療剤のスクリーニング方法の第六の態様と同様の方法で測定することができる。

[0093] 工程(b)では、被験化合物の非存在下と比較して、被験化合物の存在下においてヒトSTAT1の発現が阻害されている場合に、当該化合物を候補化合物として選択する。選択された化合物はヒトSTAT1の発現を阻害することにより、全身性エリテマトーデスを治療する効果を示すものと考えられる。

[0094] [749位のスレオニンがリン酸化されたヒトSTAT1と特異的に結合する抗体]

本発明は、749位のスレオニンがリン酸化されたヒトSTAT1と特異的に結合する抗体（以下、「本発明の抗体」と記す）を提供する。本発明の抗体は、748位のスレオニンがリン酸化されたマウスSTAT1と交差反応する抗体であってもよい。ここで、マウスSTAT1のアミノ酸配列としては、例えばNCBIアクセス番号NP_001192243.1のアミノ酸配列（配列番号7）が挙げられる。当該マウスSTAT1をコードする塩基配列は、例えばNCBIアクセス番号NM_01205314.1の塩基配列（配列番号8）が挙げられる。749位のスレオニンがリン酸化されたヒトSTAT1および748位のスレオニンがリン酸化されたマウスSTAT1に交差反応する本発明の抗体は、「C末端から2番目のスレオニンがリン酸化されたSTAT1と結合する抗体」と称してもよく、「最もC末端に近いスレオニンがリン酸化されたSTAT1と結合する抗体」と称してもよい。

[0095] 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、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）、抗体断片などの種々の抗体構造を包含する。抗体は、マウス、ウサギ、ヒト、ヒト化、キメラであってもよく、または他の種由来であってもよい。抗体は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgDおよびIgA）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスであり得る。「抗体断片」は、好ましくは抗体の可変ドメイン、または少なくとも抗体の抗原結合領域を含む、抗体の一部のことをいう。抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、線状抗体、一本鎖抗体（scFv）、sc(Fv)₂、Fab₃、ドメイン抗体（dAb）（国際公開第2004/058821号、国際公開第2003/002609号）、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ等が挙げられる。

[0096] 本発明の抗体は、標的のスレオニンがリン酸化されたSTAT1に対する結合親和性が、野生型STAT1に対する結合親和性より高いことを特徴とする。ここで、本明細書において「野生型STAT1」は、いずれのアミノ酸もリン酸化されていない非リン酸化STAT1を意味する。抗体の抗原に対する結合親和性は、例えばELISA法等の公知の方法で測定することができる。

- [0097] 本発明の抗体は、モノクローナル抗体であることが好ましい。モノクローナル抗体は、公知の方法で作製することができる。例えば、リン酸化されたスレオニン749を含むヒトSTAT1のフラグメントまたはリン酸化されたスレオニン748を含むマウスSTAT1のフラグメントをPBSに溶解し、所望により通常のアジュバント（例えばフロイント完全アジュバント）を適量混合したものを免疫原として哺乳動物（マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等）を免疫する。免疫方法は特に限定されず、例えば、1回または適当な間隔で複数回、皮下注射または腹腔内注射する方法であってもよい。免疫された哺乳動物から得た免疫細胞（例えば脾細胞）とミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを得、当該ハイブリドーマの培養物から抗体を採取することによって取得することができる。
- [0098] 本発明の抗体は、ウサギモノクローナル抗体であることが好ましい。ウサギ抗体は一般に高い親和性および高い特異性を有することが知られており、また、ウサギはマウスまたは他の動物において免疫原性に乏しい多くの抗原に対して抗体を産生することが知られているからである。ウサギモノクローナル抗体は、例えばISAAC (ImmunoSpot Array Assay on a Chip) 法 (Nat. Med., 15, 1088-1092, 2009, PLoS One, 7, 1-9, 2012) を用いて、抗体産生細胞をスクリーニングし、選択した抗体産生細胞から抗体遺伝子をクローニングして、宿主細胞に導入し、組み換え型のウサギモノクローナル抗体として作製することができる（実施例4参照）。
- [0099] 本発明の抗体は、実施例4で選択した抗体産生細胞クローン#1およびクローン#2が産生するウサギモノクローナル抗体であることが好ましい。抗体産生細胞クローン#1およびクローン#2が産生するウサギモノクローナル抗体は、749位のスレオニンがリン酸化されたヒトSTAT1および748位のスレオニンがリン酸化されたマウスSTAT1の両方に特異性が高く、交差反応性を有する抗体であり、非リン酸化ヒトSTAT1および非リン酸化マウスSTAT1に対する結合親和性が低いことが確認されている。
- [0100] 本発明の抗体は、ヒトSTAT1の749位におけるリン酸化の状態を迅速かつ特

異的に検出することが可能であり、本発明のスクリーニング方法に好適に用いることができる。また、本発明の抗体は、STAT1の研究用ツールとして非常に有用である。

[0101] 〔遺伝子改変細胞〕

本発明は、749位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型ヒトSTAT1をコードする遺伝子がノックインされている遺伝子改変ヒト細胞、および、748位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型マウスSTAT1をコードする遺伝子がノックインされている遺伝子改変マウス細胞を提供する。

[0102] 本発明の遺伝子改変細胞は、例えば公知のゲノム編集技術を用いて作製することができる。例えば、748位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型マウスSTAT1をコードする遺伝子がノックインされている遺伝子改変マウス細胞は、後段の実施例の〔実験材料および実験方法〕の「1. マウス」に記載された鋳型オリゴDNAと、crRNA/tracrRNA/Cas9複合体とを、マウス細胞に導入することにより作製することができる。同様に、ヒトSTAT1遺伝子にT749A 変異を導入するための鋳型オリゴDNAを設計し、当該鋳型オリゴDNAと、crRNA/tracrRNA/Cas9複合体とを、ヒト細胞に導入することにより、749位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型ヒトSTAT1をコードする遺伝子がノックインされている遺伝子改変ヒト細胞を作製することができる。また、後段の実施例の〔実験材料および実験方法〕の「1. マウス」に記載のStat1 T748A変異マウスから単離した細胞は、全て本発明の748位のスレオニンがアラニンに置換されている変異型マウスSTAT1をコードする遺伝子がノックインされている遺伝子改変マウス細胞である。

[0103] 本発明の遺伝子改変細胞は、被験化合物がヒトSTAT1の749位におけるリン酸化のみを特異的に抑制し得るかどうかを評価するツールとして有用であり、本発明のスクリーニング方法に好適に用いることができる（上記本発明の敗血症治療剤のスクリーニング方法の第四の態様を参照のこと）。

実施例

[0104] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定さ

れるものではない。

[0105] [実験材料および実験方法]

1. マウス

C57BL/6バックグラウンドのStat1T748A変異マウスは、CRISPR/Cas9法を用いて作製した。簡単に説明すると、T748A 変異（大文字下線）と遺伝子型判定用のEcoRI サイト（小文字下線）を導入するための鋳型オリゴDNA（5'-cca aagtcctgtactgaacctacattctgtctcttgcag ATGAGCGCTGTATGA tgaattctctg gcgacatttttttcccatctgtgattccttcctgctactgttcctt-3' : 配列番号9）を設計した。切断の頻発を防ぐため、いくつかのサイレント変異が導入された。C57BL/6受精卵に、crRNA/tracrRNA/Cas9複合体と鋳型オリゴをエレクトロポレーションで導入した。組換え後、野生型Stat1のスレオニン（T）をコードする配列ACAは、アラニン（A）をコードするGCTに置き換わった。C57BL/6バックグラウンドのStat1K0（Kimura et al., J. Exp. Med., 206, 2027-2035, 2009）は、Stat1T748A変異マウスと3世代にわたって戻し交配された。Wt/Stat1T748A、Stat1K0/Stat1T748Aを交配させ、アイソジェニックリターメイトを得た。繁殖はメンデルの遺伝パターンに従った。マウスはpathogen-free環境で飼育、繁殖させた。本文中で特に指示のない限り、週齢と性別が一致したリターメイトを実験に使用した。すべての動物実験は、大阪大学動物愛護委員会のガイドラインに従って実施された。

[0106] 2. 遺伝子型判定およびDNA配列解析

Tail lysis buffer with proteinase K（ナカライテスク）で尾部からゲノムDNAを抽出した。Protein Precipitation Solution（プロメガ）でDNAを洗浄し、イソプロパノールでDNAを沈殿させた。その後、70%エタノールでDNAを洗浄し、Tris-EDTA（TE）バッファーで溶出した。Wt/Stat1T748Aの遺伝子型判定には、以下のPCRプライマーを使用した。PCR産物のサイズは970 bpである。

forward: 5'-ACAGCCACCTAAGACATCTGG-3'（配列番号10）

reverse: 5'-AGCACTTGGCACTGATTACAGAC-3'（配列番号11）

その後、PCR産物を制限酵素EcoRIまたはAfeIで消化し、DNA電気泳動を行って遺伝子型に対応した異なるバンドパターンが得られることを確認した。今回の研究では、T748A変異部位（AGCGCT）を直接消化するAfeI酵素を遺伝子型判定に使用した。

[0107] Stat1K0/Stat1T748Aの遺伝子型判定では、共通のフォワードプライマーとStat1エクソンまたはStat1エクソンに代わるネオマイシンカセット（Stat1K0）に対応する異なるリバースプライマーを用いて2種類のPCR反応を実施した。使用したプライマーを以下に示す。Stat1T748AのPCR産物のサイズは360bp、Stat1K0のPCR産物のサイズは440bpである。

common forward: 5'-TCTAAGGCAGAGATGGTTAGCATGG-3'（配列番号12）

Stat1 reverse: 5'-CAGTGCCTCTCAACCTTCCTGACAC-3'（配列番号13）

neomycin reverse: 5'-ATTGCGAGGGCATCGCCTTCTAT-3'（配列番号14）

[0108] Stat1T748A変異をDNA配列解析で確認するため、PCR産物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いてPCR産物を精製した。DNAシーケンスプライマーには5'-AGGAGGCCAGACAGTAATAACC-3'（配列番号15）を使用した。

[0109] 3. リポポリサッカライド（LPS）誘発敗血症性ショックモデル

10～12週齢の雄のリターメイトマウスに、PBSに溶解したLPS（L2880、シグマ）を腹腔内注射した。LPS誘発致死のために、マウスに12.5mg/kg体重を注射した。1日2回、マウスの生存を評価した。実験解析のために、マウスに7.5mg/kg体重の亜致死量のLPSを指示された時点で注射した。LPS注射後、指示された時点で、CO₂過剰投与により動物を安楽死させ、直ちに解剖した。下流の解析のために脾臓を摘出し、単一細胞を調製した。

[0110] 4. デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発大腸炎モデル

10～12週齢の雄のリターメイトマウスに、1.5%（w/v）DSS（36-50 kDa、MP Biomedical）溶液を飲水で7日間自由摂取させ、急性大腸炎を誘発した。マウスの体重、便および結腸組織の変化を分析した。1.5%DSS投与開始後7日目のマウスを安楽死させ大腸を摘出した。大腸全体の糞便を丁寧に除去し、4% PBS緩衝パラホルムアルデヒドで固定した。病理組織標本作製およびヘマトキ

シリン・エオジン (H&E) 染色は株式会社栄養・病理学研究所 (京都、日本) に依頼した。画像はBZ-X710顕微鏡 (キーエンス) を用いて撮影した。大腸炎の重症度は、既報 (Sato et al., Sci. Rep., 5, 2015) に従い盲検法で評価した。

[0111] 5. プリスタン誘発ループモデル

7~8週齢の雌のリターメイトマウスに0.5mlのプリスタン (シグマ) を腹腔内投与し、6か月間経過観察した。マウスの生存率、抗dsDNA血清力価、タンパク尿を分析した。血清中の抗dsDNA抗体価は、LBIS Mouse anti-dsDNA ELISA Kit (富士フイルム和光純薬) で測定した。アルブミン尿は、中流尿のクレアチニンmgあたりのアルブミン μ gとして、Mouse Urinary Albumin Quantitative ELISA Kit (Ethos Bioscience) とUrinary Creatinine Quantitation Kit Creatinine Companion (Ethos Bioscience) を用いて、製造者のプロトコルに従って測定した。糸球体腎炎を評価するために、プリスタン投与マウスまたはプリスタン非投与マウスから採取した腎臓を4%PBS緩衝パラホルムアルデヒドで1時間固定した。その後、緩衝液を10%、20%のPBS緩衝サッカライドに変更した。病理組織標本作製およびヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色は株式会社栄養・病理学研究所 (京都、日本) に依頼した。画像はBZ-X710顕微鏡 (キーエンス) を用いて撮影した。

[0112] 6. プラスミドコンストラクションおよび変異誘発

ヒトFlag-STAT1WT、ヒトFlag-STAT1T749A、ヒトHA-IKK β をコードする組換え過剰発現ベクターを既報 (Metwally, H et al., SCIENCE SIGNALING, 2020 Mar 24;13(624):eaay0574) に従い使用した。マウスFlag-Stat1WTおよびマウス3xFlag-Ikk β は、In-Fusion HD cloning kit (Clontech) を用いて、メーカーのプロトコルにしたがって作製した。Stat1 (ENSMUST00000070968.14) および Ikkb (ENSMUST00000033939.13) のコンストラクトは、マウスマクロファージのcDNAからPCR増幅によって作製した。マウスFlag-Stat1T748A変異コンストラクトは、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて、メーカーのプロトコルに従って作製した。使用したプライマーを以下に示す。

マウス Stat1 F : 5' -ATGTCACAGTGGTTCGAGCTTC-3' (配列番号 16)

マウス Stat1 R : 5' -TTATACTGTGCTCATCACTGTC-3' (配列番号 17)

マウス Ikk β F : 5' -ATGAGCTGTCACCGTCCCTC-3' (配列番号 18)

マウス Ikk β R : 5' -TCAGTCACAGGCCTGCTCCAG-3' (配列番号 19)

[0113] 7. ウェスタンブロットおよび免疫沈降

Pierce IP Lysis Buffer (Thermo Fisher) を用いて、全細胞ライセートを調製した。タンパク質濃度は、DC protein assay (BioRad、500-0116) を用いて定量した。ライセートはSDSサンプルバッファー (ナカライテスク) で96℃、5分間煮沸し、5-20%SDS-PAGEゲル (ナカライテスク) で分離した。分子マーカーとしてPrecision Plus Protein 2 Color Standard (BioRad) を使用した。Criterion Blotter (BioRad) を用いた湿式転写システムにより、0.45 μ M polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare) にタンパク質を転写した。転写後、メンブレンを0.1% Tween-20を含む1×Tris-Buffered Saline (TBST) に懸濁した5% w/v スキムミルクで、室温で2時間ブロッキングした。メンブレンをTBSTで洗浄し、Can Get Signal Immunereaction Enhancer (TOYOBO, NKB-101T) Solution 1 (1/1000で希釈) 中の一次抗体と4℃で一晩インキュベートした。メンブレンをTBSTで3回洗浄し、Can Get Signal Immunereaction Enhancer Solution 2 (1/10000で希釈) 中のAmersham ECL anti-rabbit or anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugated (GE Healthcare) と共に室温で1時間インキュベートした。pThr Stat1の検出には、一次抗体をTBST中の3%BSAで希釈し、二次抗体を5%スキムミルクで希釈したものを使用した。二次抗体のインキュベーション後、メンブレンをTBSTで3回洗浄し、ブロットをECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytvia) で現像し、Image Quant LAS800 (GE Healthcare) で画像撮影を行った。

ビオチン化pThr Stat1の検出のために、タンパク質測定工程の前に、全細胞ライセートをストレプトアビジン磁気ビーズ (NEB) で前処理した。

[0114] 免疫沈降は、全細胞ライセートを前処理し、指定の抗体を用いて4℃で一晩

ライセート中のタンパク質を免疫沈降させた。その後、Dynabeads Protein G for Immunoprecipitation (Thermo Fisher) を添加し、4°Cで2時間免疫複合体を回収した。その後、抗体結合ビーズをリシスバッファーで4回洗浄し、Pierce IgG Elution Buffer (Thermo Fisher) を用いて溶出させた。溶出液をSDSサンプルバッファー中で96°C、5分間煮沸し、ウェスタンブロット解析に供した。

- [0115] ウェスタンブロッティングおよび免疫沈降に使用した抗体を以下に示す。これらの抗体は、Cell Signaling and Technology (CST) から購入した。Stat1 (D1K9Y) Rabbit mAb (#14994)、IKK β (D30C6) Rabbit mAb (#8943)、Stat2 (D9J7L) Rabbit mAb (#72604)、Stat3 (D3Z2G) Rabbit mAb (#12640)、Stat5 (D206Y) Rabbit mAb (#94205)、I κ B α (44D4) Rabbit mAb (#4812)、p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb (#4695)、Phospho-Stat1 (Tyr701) (58D6) Rabbit mAb (#9167)、Phospho-Stat1 (Ser727) (D3B7) Rabbit mAb (#8826)、 β -Actin (8H10D10) Mouse mAb (HRP Conjugate) (#12262)、Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody (#7074)、Streptavidin-HRP (#3999)。

[0116] 8. 統計解析

生存率はKaplan-Meier曲線とlog-rank (Mantel-Cox) 検定を用いて解析した。p値の決定には、一元配置のANOVAと、post-hoc Tukey検定、Welchの補正を加えた対応のない両側Student t検定、Mann-Whitney U 検定、Kruskal-Wallisとpost-hoc Dunn検定が使われた。p値<0.05は統計的に有意であるとみなした。すべての統計解析は、GraphPad Prismソフトウェアを用いて行った。

- [0117] [実施例1 : LPS誘発敗血症性ショックにおけるスレオニン748リン酸化Stat1の評価]

1-1 LPSチャレンジ後の生存率

(1) 野生型マウス (Wt/Wt) 、ヘテロ接合マウス (Wt/Stat1T748A) および変異型マウス (Stat1T748A/Stat1T748A) における生存率の評価

Wt/Stat1T748Aマウスの交配によるリターメイトのWt/Wt (以下「Wt」) 、Wt/Stat1T748A (以下「ヘテロ接合体」) およびStat1T748A/Stat1T748A (以下

「Stat1T748A」) に、LPS (12.5mg/kg) を腹腔内投与し、生存率を評価した。結果を図1に示した。Stat1T748Aの生存率が最も高く、WtはLPS投与3日目で全例死亡し、ヘテロ接合体の生存率は両群の間であった。この結果から、Stat1T748のリン酸化が敗血症性ショックの宿主炎症反応を促進していることが示唆された。なお、図1のデータは4つの独立した実験から集めたものであり、各実験において遺伝子型ごとにn=4-6匹のマウスを使用した。

[0118] (2) Stat1欠損マウス (Stat1K0/Stat1K0) および変異型マウス (Stat1T748A/Stat1T748A) における生存率の評価

Stat1K0/Stat1T748Aの交配によるリターメイトのStat1K0/Stat1K0 (以下「Stat1K0」) およびStat1T748Aに、LPS (12.5mg/kg) を腹腔内投与し、生存率を評価した。結果を図2に示した。Stat1K0はLPSによる致死に対して抵抗性であった。また、Stat1T748Aは図1と同様に、高い生存率を示した。なお、図2のデータは4つの独立した実験から集めたものであり、各実験において遺伝子型ごとにn=4-6匹のマウスを使用した。

[0119] 1-2 Wt、Stat1T748AおよびStat1K0の脾細胞における内因性タンパク質の発現

LPSを投与していないWtとStat1T748A (Wt/Stat1T748Aマウスの交配によるリターメイト) およびStat1K0から脾臓を摘出し、全細胞のライセートを調製してSDS-PAGEで分離した後、ウェスタンブロッティング分析を行った。結果を図3に示した。Stat1T748Aは、Stat1や他のSTATタンパク質の発現に異常がないことが確認された。

[0120] 以上の結果から、LPS誘発敗血症性ショックにおいて、Stat1のスレオニン748のリン酸化がStat1の炎症機能に大きく寄与していることが明らかになった。したがって、マウスStat1のスレオニン748に対応するヒトStat1のスレオニン749のリン酸化を阻害すること、またはヒトStat1の機能または発現を阻害することにより、敗血症性ショックおよび/または敗血症を治療できることが示唆された。また、マウスStat1のスレオニン748に対応するヒトStat1のスレオニン749のリン酸化を阻害する物質、またはヒトStat1の機能もしくは発

現を阻害する物質は、敗血症性ショックおよび／または敗血症治療薬の候補物質となり得ることが示された。

[0121] 〔実施例2：デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発大腸炎におけるスレオニン748リン酸化Stat1の評価〕

（1）野生型マウス（Wt）および変異型マウス（Stat1T748A）における大腸炎の評価

Wt/Stat1T748Aマウスの交配によるリターメイトのWtおよびStat1T748Aに、1.5%（w/v）DSS溶液を飲水で7日間自由摂取させ、急性大腸炎を誘発した。投与前（Day0）から毎日体重を測定した。DSS投与開始後7日目（Day7）のマウスを安楽死させ大腸を摘出し、結腸の長さを測定した。また、結腸の病理組織標本作製し、大腸炎の重症度を評価した。

[0122] 結果を図4に示した。（A）がDSS投与期間中の体重変化、（B）が7日目の体重、（C）が結腸の長さ、（D）が結腸の病理組織検査における大腸炎の重症度スコアである。Wtと比較してStat1T748Aは、体重が有意に減少し、結腸の長さが有意に短くなり、大腸炎の重症度スコアが有意に高く、腸に重度の炎症を起こしていることが示された。なお、図4のデータは4つの独立した実験から集めたものであり、各実験において遺伝子型ごとにn=3匹のマウスを使用した。

[0123] （2）Stat1欠損マウス（Stat1K0）および変異型マウス（Stat1T748A）における大腸炎の評価

Stat1K0/Stat1T748Aの交配によるリターメイトのStat1K0およびStat1T748Aに、1.5%（w/v）DSS溶液を飲水で7日間自由摂取させ、急性大腸炎を誘発した。投与前（Day0）から毎日体重を測定した。DSS投与開始後7日目（Day7）のマウスを安楽死させ大腸を摘出し、結腸の長さを測定した。また、結腸の病理組織標本作製し、大腸炎の重症度を評価した。

[0124] 結果を図5に示した。（A）がDSS投与期間中の体重変化、（B）が7日目の体重、（C）が結腸の長さ、（D）が結腸の病理組織検査における大腸炎の重症度スコアである。Stat1T748Aの体重、結腸の長さ、および大腸炎の重症度

スコアは、いずれもStat1K0と同等であった。なお、図5のデータは4つの独立した実験から集めたものであり、各実験において遺伝子型ごとにn=4-5匹のマウスを使用した。

[0125] 以上の結果から、Stat1のスレオニン748のリン酸化が、大腸炎の重症化の抑制に重要であることが明らかになった。したがって、マウスStat1のスレオニン748に対応するヒトStat1のスレオニン749のリン酸化を促進することにより、大腸炎を治療できることが示唆された。また、マウスStat1のスレオニン748に対応するヒトStat1のスレオニン749のリン酸化を促進する物質は、大腸炎治療薬の候補物質となり得ることが示された。

[0126] [実施例3：プリスタン誘発ループスにおけるスレオニン748リン酸化Stat1の評価]

プリスタン誘発ループスモデルマウスは、核酸関連抗原に対するIgG自己抗体の産生、糸球体腎炎等のヒトの全身性エリテマトーデス（SLE）に類似した症状を呈することから、SLEモデルと認識されている。

[0127] (1) 野生型マウス（Wt）および変異型マウス（Stat1T748A）におけるループス病態の評価

Wt/Stat1T748Aマウスの交配によるリターメイトのWtおよびStat1T748Aに、0.5mlのプリスタンを腹腔内投与して6か月間経過観察し、マウスの生存率、抗dsDNA血清力価、タンパク尿を分析した。また、プリスタン投与マウスまたは非投与マウスから採取した腎臓の病理組織標本を作製し、糸球体腎炎を評価した。

[0128] 結果を図6に示した。(A)がプリスタン投与後6か月間の生存率、(B)がプリスタン投与後6か月目の抗dsDNA血清力価、(C)が腎臓切片のヘマトキシリン・エオジン標本の顕微鏡画像である。また、次の(2)の結果と合わせたタンパク尿の結果を図8に示した。Stat1T748Aの生存率は約50%でWtと同等であった。抗dsDNA血清力価、タンパク尿および糸球体腎炎の病理組織画像についても、両者は同等であった。

[0129] (2) Stat1欠損マウス（Stat1K0）および変異型マウス（Stat1T748A）にお

けるループス病態の評価

Stat1K0/Stat1T748Aの交配によるリターメイトのStat1K0およびStat1T748Aに、0.5mlのプリスタン腹腔内投与して6か月間経過観察し、マウスの生存率、抗dsDNA血清力価、タンパク尿を分析した。また、プリスタン投与マウスまたは非投与マウスから採取した腎臓の病理組織標本を作製し、糸球体腎炎を評価した。

[0130] 結果を図7に示した。(A)がプリスタン投与後6か月間の生存率、(B)がプリスタン投与後6か月目の抗dsDNA血清力価、(C)が腎臓切片のヘマトキシリン・エオジン標本の顕微鏡画像である。Stat1K0マウスは、Stat1T748Aマウスと比較して、プリスタンによる死亡に抵抗性があり、抗dsDNA血清力価も低かった。また、タンパク尿および糸球体腎炎の組織画像の病態も軽度であった。

[0131] 以上の結果から、Stat1K0はプリスタンが誘発する全身性エリテマトーデスの病態を抑制するが、Stat1のスレオニン748のリン酸化は全身性エリテマトーデスの病態の抑制に関与しないことが明らかになった。したがって、ヒトStat1の機能または発現を阻害することにより、全身性エリテマトーデスを治療できることが示唆された。また、ヒトStat1の機能または発現を阻害する物質は、全身性エリテマトーデス治療薬の候補物質となり得ることが示された。

[0132] [実施例4：748位のスレオニンがリン酸化されたマウスSTAT1（以下「pThr748 mStat1」）に対するウサギモノクローナル抗体および749位のスレオニンがリン酸化されたヒトSTAT1（以下「pThr749 hStat1」）に対するモウサギモノクローナル抗体の作製]

pThr748 mStat1ペプチドとして、マウスStat1のC末端領域（配列番号7の736位～749位）の748位のスレオニンがリン酸化されたペプチド（RIVGPEFDSMM S(pT)V、配列番号20）を使用した。このペプチドのN末端側にシステイン（C）を介してKLH（Keyhole limpet hemocyanin：スカシガイヘモシアニン）をコンジュゲートした。得られたpThr748 mStat1ペプチドのKLHコンジュゲート

500 μ gを完全フロイントアジュバント（ミリポア）と混合し、12～13週齢のニュージーランド白ウサギに皮下接種して免疫した。一次免疫の2、4、6週間後に、pThr748 mStat1ペプチドのKLHコンジュゲート500 μ gを不完全フロイントアジュバント（ミリポア）と混合し、ブースト接種した。最終接種の1週間後に採血し、フィコールハイパック比重遠心法により末梢血白血球（PBLs）を分離し、ウサギIgG特異抗体結合マイクロビーズ（Miltenyi Biotec）およびMSカラム（Miltenyi Biotec）を用いて、製造者の説明書に従いウサギIgG+細胞を単離した。

[0133] pThr748 mStat1特異的抗体産生細胞およびpThr749 hStat1特異的抗体産生細胞はISAAC（ImmunoSpot Array Assay on a Chip）法を用いてスクリーニングした。マイクロウェルアレイチップおよびISAAC法については、Jinら（*Nat. Med.*, 15, 1088-1092, 2009）およびOzawaら（*PLoS One*, 7, e52383, 2012）を参照した。簡単に説明すると、pThr748 mStat1ペプチド特異的IgGの分泌を検出するために、チップの表面に10 μ g/mlのウサギIgG特異抗体（MP Biomedicals社製）をコーティングした。チップ上で細胞を37°C、3時間培養し、細胞が分泌したIgGを、コーティングしたウサギIgG特異抗体で捕捉した。穏やかに洗浄した後、10 μ g/mlの非リン酸化マウスStat1-ペプチドまたは非リン酸化ヒトStat1-ペプチドをチップに添加し、30分間インキュベートした。リン酸化Stat1-ペプチド特異的IgG分泌を検出するために、穏やかに洗浄した後、10 μ g/mlのビオチン化pThr748 mStat1ペプチドまたはビオチン化pThr749 hStat1ペプチドを添加し、30分間インキュベートした。この後、穏やかに洗浄した後、Cy3標識ストレプトアビジン（シグマ社）を添加し、30分間インキュベートした。穏やかに洗浄した後、最後に、1 μ M Oregon Green（Molecular Probes）で室温5分間染色した。単一細胞から放出された抗原特異的な抗体を蛍光顕微鏡（BX51WI, Olympus）で観察した。

[0134] 蛍光顕微鏡下で、キャピラリー（プライムテック）を取り付けたマイクロマニピュレーター（TransferMan NK2、エッペンドルフ）を用いて個々のウェルから単一の抗原特異的抗体分泌細胞を回収し、細胞溶解液とウサギ γ およ

び κ の一定領域の特異プライマーの入ったマイクロチューブに排出した。回収した細胞からのVH断片およびVL断片に関する抗体のcDNAを、単一細胞5'-RACE法を用いて増幅した(特開2014-073100、Ozawa et al., PLoS One, 7, e52383, 2012等、参照)。すなわち、15UのSuperScript III(商品名、Invitrogen)により、それぞれ0.25pmolのIg γ -RT(5'-GCGAGTAGAGGCCTGAGGAC-3'、配列番号21)およびIg κ -RT(5'-GATGCCAGTTGTTTGGGTGGT-3'、配列番号22)プライマー、1UのRNase阻害剤(New England Biolabs)、0.5mMのそれぞれのdNTP、5mM DTT、0.2% Triton-X100、および1×1st strand cDNA緩衝液(Invitrogen)を用いて、55°Cで1時間逆転写を実施した。cDNAの3'テイリング(3'-tailing)を、20Uの末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ(Roche)により、4mM MgCl₂、0.5mM dGTP、50mM P-K緩衝液(25mM K₂HPO₄および25mM KH₂PO₄、pH7.0)および1U RNase阻害剤を用いて、37°Cで1時間実施した。第1PCRを、dCアダプタープライマー(5'-AGCAGTAGCAGCAGTTCGATAACTTCGAATTC TGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCCCCCCCCCCCDN-3'、配列番号23)ならびに γ 鎖および κ 鎖の定常領域(Ig γ -1st: 5'-CGAGTTCCAAGTCACGGTCA-3'、配列番号24)およびIg κ -1st: 5'-CTCCCAGGTGACGGTGACAT-3'、配列番号25)の混合物を用いて実施した。それぞれの産生物の増幅を、primeSTAR DNAポリメラーゼ(TaKaRa)を用いて、製造業者の説明書にしたがって実施した: 30サイクルの、94°Cで15秒間の変性、55°Cで5秒間のアニーリング、および72°Cで1分30秒間の伸長。次に、結果として得られたPCR産物を水で4倍希釈し、それぞれ2 μ lをネステッドPCRのために用いた。ネステッドPCRをアダプタープライマー(5'-AGCAGTAGCAGCAGTTCGATAA-3') (配列番号26)および γ 鎖(Ig γ -nest: 5'-GCCTTTGACCAAGCAGCCCAA-3'、配列番号27)または κ 鎖定常領域(Ig κ -nest: 5'-CGGGAAAGTATTTATTTCGCCACA-3') (配列番号28)に特異的なそれぞれのネステッドプライマーにより、primeSTAR DNAポリメラーゼを用いて実施した。得られたPCR産物を、ウサギ γ 鎖または κ 鎖の定常領域全体のcDNAを含む発現ベクターに、それぞれ挿入した。その後、Expi293F Expression System(Invitrogen)を用いて、抗体分子全体をコードする γ 鎖お

よび κ 鎖の両発現ベクターをExpi293細胞に共導入し、3日後に培養細胞の上清を回収した。

[0135] 36クローン (A1~C12) のリコンビナント抗体の抗原特異性を、ELISAで調べた。結果を図9に示した。(A) がマウスのリン酸化ペプチド (pThr748 mStat1ペプチド) を固相化したウェル (上段) と非リン酸化ペプチドを固相化したウェル (下段) における発色を測定した数値を示し、(B) がヒトのリン酸化ペプチド (pThr749 hStat1ペプチド) を固相化したウェル (上段) と非リン酸化ペプチドを固相化したウェル (下段) における発色を測定した数値を示す。この結果から、マウスおよびヒトのリン酸化ペプチドの両方に特異性が高く、かつ交差反応性を有する8クローン (太字) を選択した。

[0136] 選択した8クローンのうち5クローンについて、リン酸化選択性と交差反応性をリン酸化ペプチドおよび非リン酸化ペプチドの連続希釈サンプルを用いてELISAで試験した。結果を図10に示した。(A) がマウスのリン酸化ペプチド (pThr748 mStat1ペプチド) の希釈系列 (左) と非リン酸化ペプチドの希釈系列 (右) における発色を測定した数値を示し、(B) がヒトのリン酸化ペプチド (pThr749 hStat1ペプチド) の希釈系列 (左) と非リン酸化ペプチドの希釈系列 (右) における発色を測定した数値を示す。この結果から、マウスおよびヒトの非リン酸化ペプチドに対する結合性が低いクローン#1とクローン#2を選択した。

[0137] 選択した抗体分子全体をコードする γ 鎖および κ 鎖発現ベクターの両方を、Lipofectamine LTX (Thermo Fisher) を用いてHEK293T細胞に共導入した。HEK293T (ATCC) は、10% FCS (Sigma) を添加した DMEM (ナカライテスク) で培養した。48時間培養後、モノクローナル抗体を含む上清を回収し、TCS抗体精製キット (Abcam) を用いて、製造者のプロトコルにしたがってモノクローナル抗体を精製した。精製されたモノクローナル抗体の溶出物を、非還元条件および還元条件での電気泳動に供し、クマシーブルー染色でバンドを確認した。結果を図11に示した。

[0138] HEK293T細胞に、以下に示す発現ベクターを一過性に導入または共導入し、

24時間培養後に全細胞ライセートを調製してSDS-PAGEで分離した後、ウェスタンブロッティング分析を行った。pThr748 mStat1およびpThr749 hStat1の検出には、作製したモノクローナル抗体を用いた。

- ・ ヒトFlag-STAT1WT発現ベクター
- ・ ヒトFlag-STAT1T749A発現ベクター
- ・ ヒトFlag-STAT1WT発現ベクターおよびヒトHA-IKK β 発現ベクター
- ・ ヒトFlag-STAT1T749A発現ベクターおよびヒトHA-IKK β 発現ベクター
- ・ マウスFlag-Stat1WT発現ベクター
- ・ マウスFlag-Stat1T748A発現ベクター
- ・ マウスFlag-Stat1WT発現ベクターおよびマウス3xFlag-Ikk β 発現ベクター
- ・ マウスFlag-Stat1T748A発現ベクターおよびマウス3xFlag-Ikk β 発現ベクター

結果を図12に示した。作製した2クローンのモノクローナル抗体は、pThr748 mStat1およびpThr749 hStat1の両方を検出できるものであった。

[0139] なお本発明は上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

請求の範囲

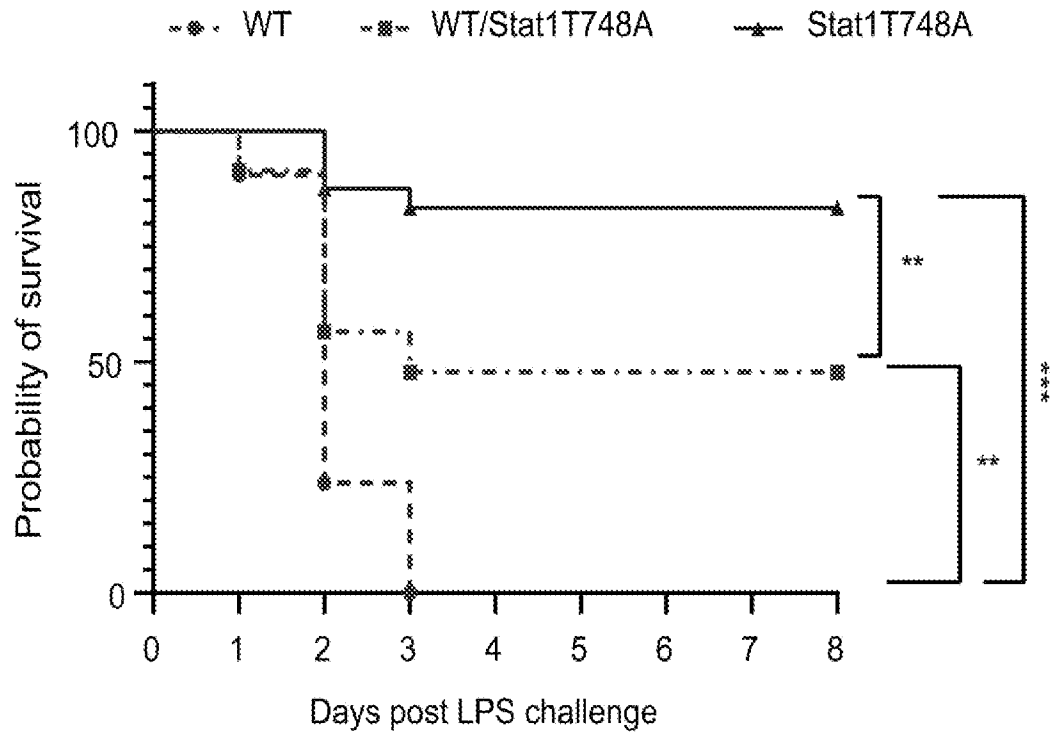
- [請求項1] ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を抑制する化合物を有効成分として含む、敗血症および／または敗血症性ショック治療剤。
- [請求項2] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼを阻害する化合物である、請求項1に記載の治療剤。
- [請求項3] 前記プロテインキナーゼがヒトTBK1および／またはヒトIKK β である、請求項2に記載の治療剤。
- [請求項4] ヒトSTAT1を阻害する化合物を有効成分として含む、敗血症および／または敗血症性ショック治療剤。
- [請求項5] 前記化合物が、ヒトSTAT1の機能または発現を阻害する化合物である、請求項4に記載の治療剤。
- [請求項6] 敗血症および／または敗血症性ショック治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法であって、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を抑制する化合物を選択する工程を含む方法。
- [請求項7] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼを阻害する化合物である、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を阻害する化合物である、請求項6に記載の方法。
- [請求項9] 前記プロテインキナーゼがヒトTBK1および／またはヒトIKK β である、請求項7または8に記載の方法。
- [請求項10] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンに特異的に結合する化合物である、請求項6に記載の方法。
- [請求項11] 敗血症および／または敗血症性ショック治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法であって、ヒトSTAT1を阻害する化合

物を選択する工程を含む方法。

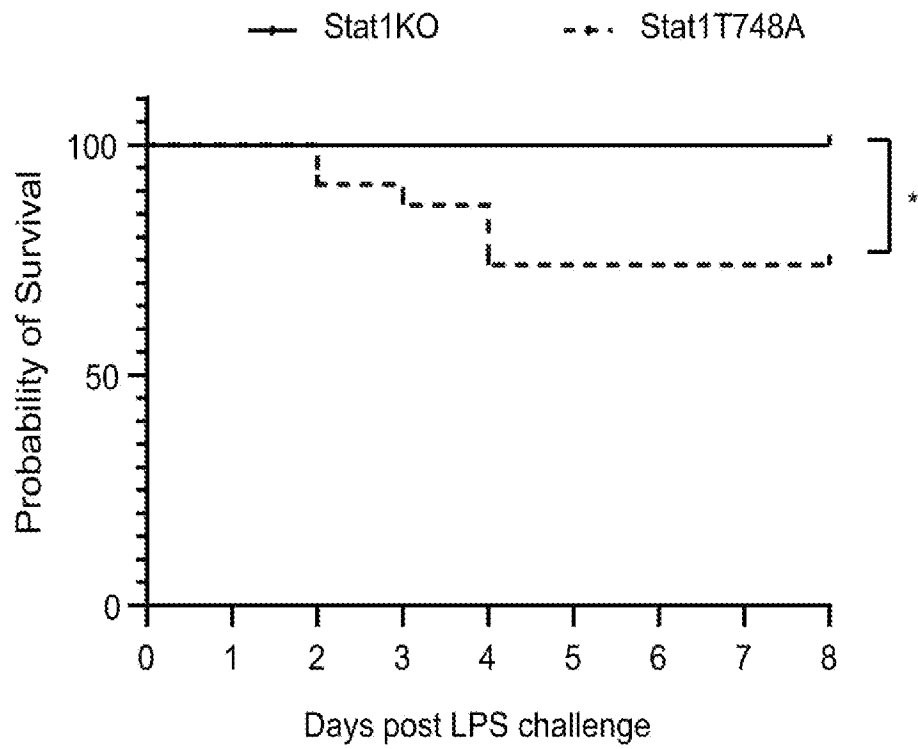
- [請求項12] 前記化合物が、ヒトSTAT1の機能または発現を阻害する化合物である、請求項11に記載の方法。
- [請求項13] ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を促進する化合物を有効成分として含む、大腸炎治療剤。
- [請求項14] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼを活性化する化合物である、請求項13に記載の治療剤。
- [請求項15] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を促進する化合物である、請求項13に記載の治療剤。
- [請求項16] 前記プロテインキナーゼがヒトTBK1および／またはヒトIKK β である、請求項14または15に記載の治療剤。
- [請求項17] 大腸炎治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法であって、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を促進する化合物を選択する工程を含む方法。
- [請求項18] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼを活性化する化合物である、請求項17に記載の方法。
- [請求項19] 前記化合物が、ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンをリン酸化するプロテインキナーゼとヒトSTAT1との間の結合を促進する化合物である、請求項17に記載の方法。
- [請求項20] 前記プロテインキナーゼがヒトTBK1および／またはヒトIKK β である、請求項18または19に記載の方法。
- [請求項21] 前記大腸炎が、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、コラーゲン性大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、空置大腸炎、ベーチェット病、感染性大腸炎、および不確定性大腸炎からなる群より選択される1種以上の疾患である、請求項17に記載の方法。

- [請求項22] ヒトSTAT1を阻害する化合物を有効成分として含む、全身性エリテマトーデス治療剤。
- [請求項23] 前記化合物が、ヒトSTAT1の機能または発現を阻害する化合物である、請求項22に記載の治療剤。
- [請求項24] 全身性エリテマトーデス治療剤の有効成分の候補化合物をスクリーニングする方法であって、ヒトSTAT1を阻害する化合物を選択する工程を含む方法。
- [請求項25] 前記化合物が、ヒトSTAT1の機能または発現を阻害する化合物である、請求項24に記載の方法。

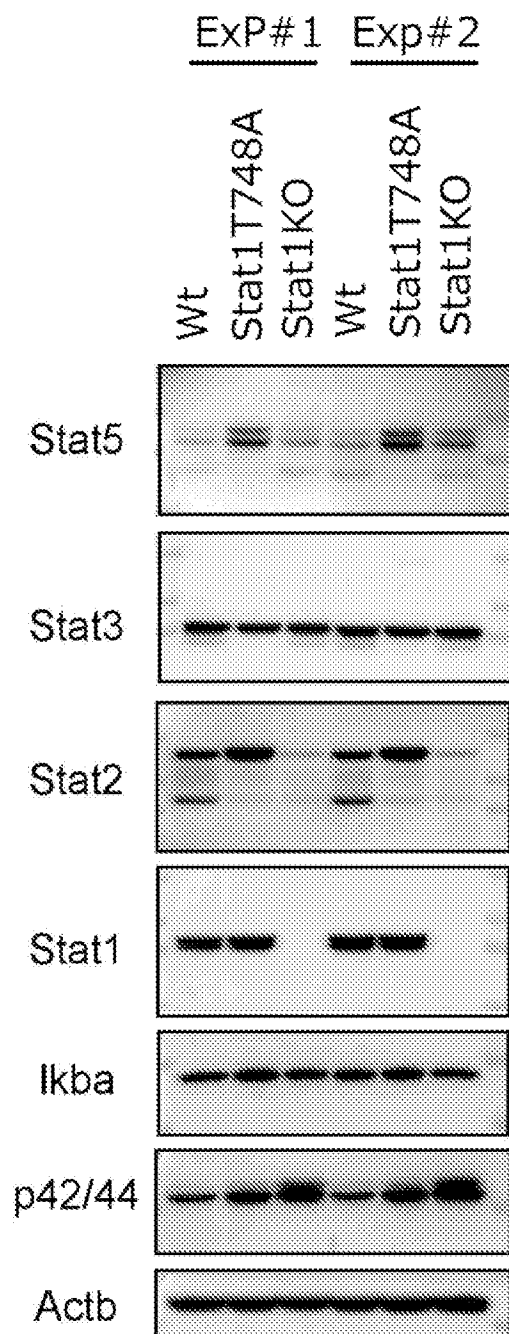
[圖1]



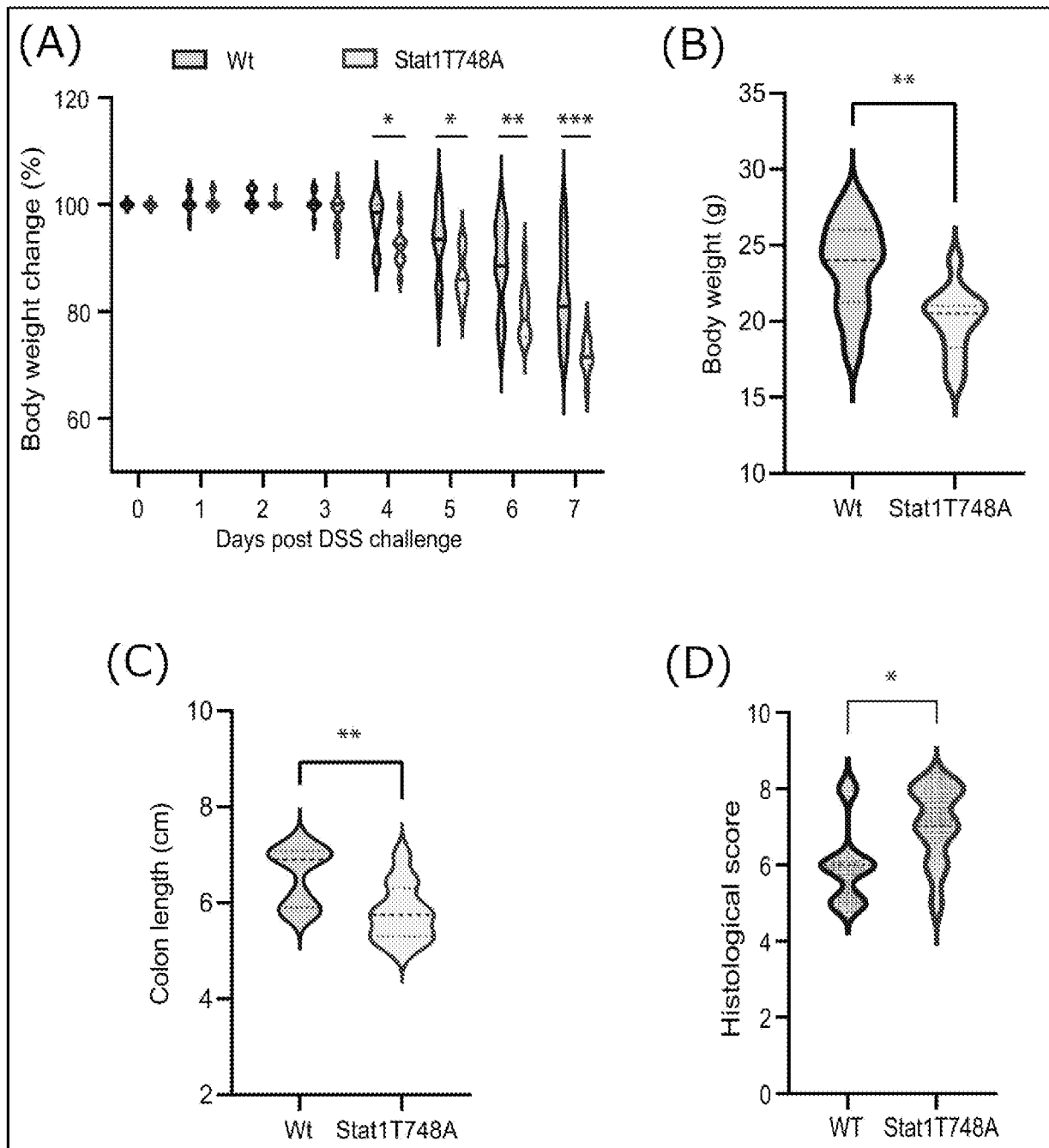
[圖2]



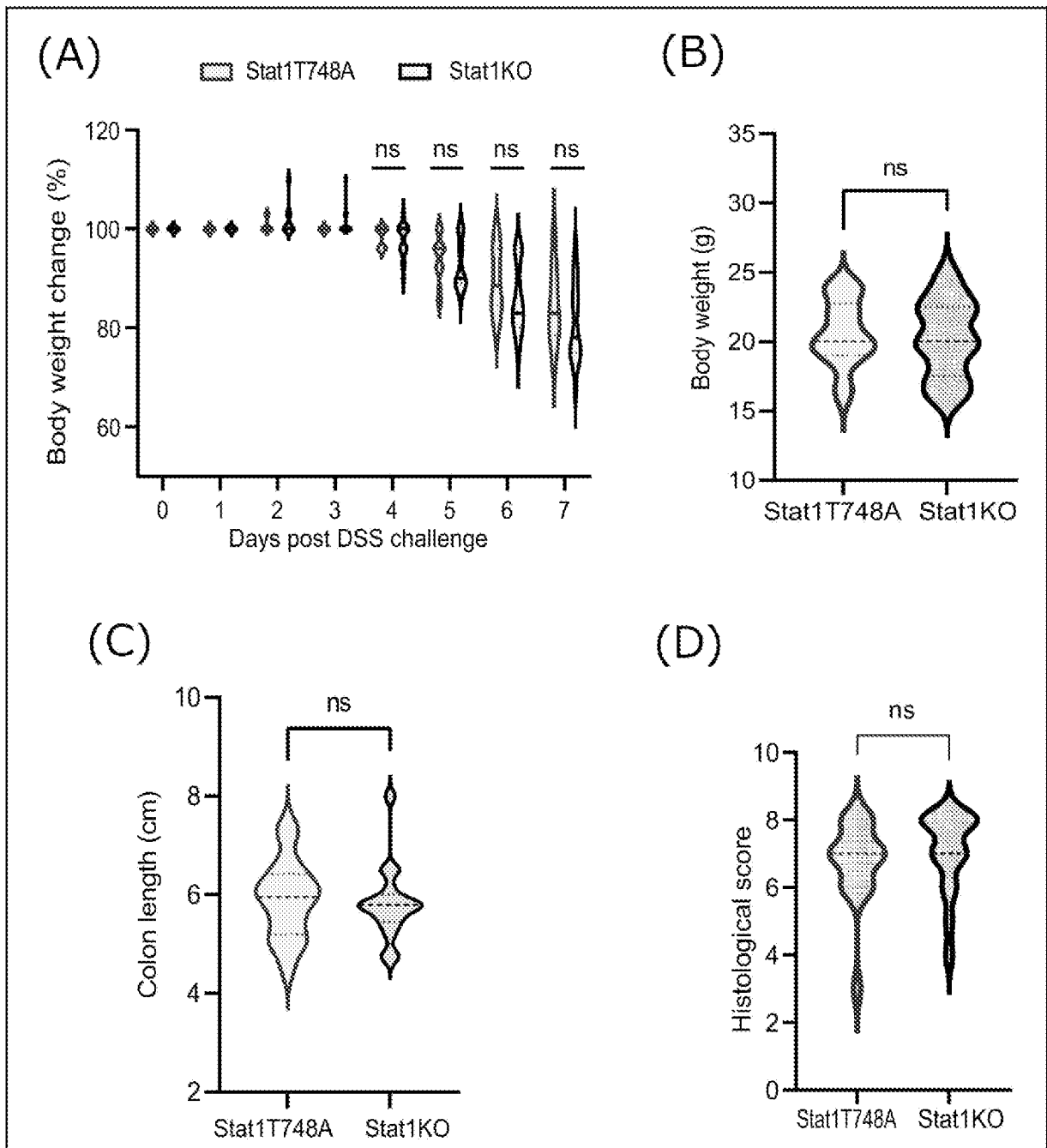
[圖3]



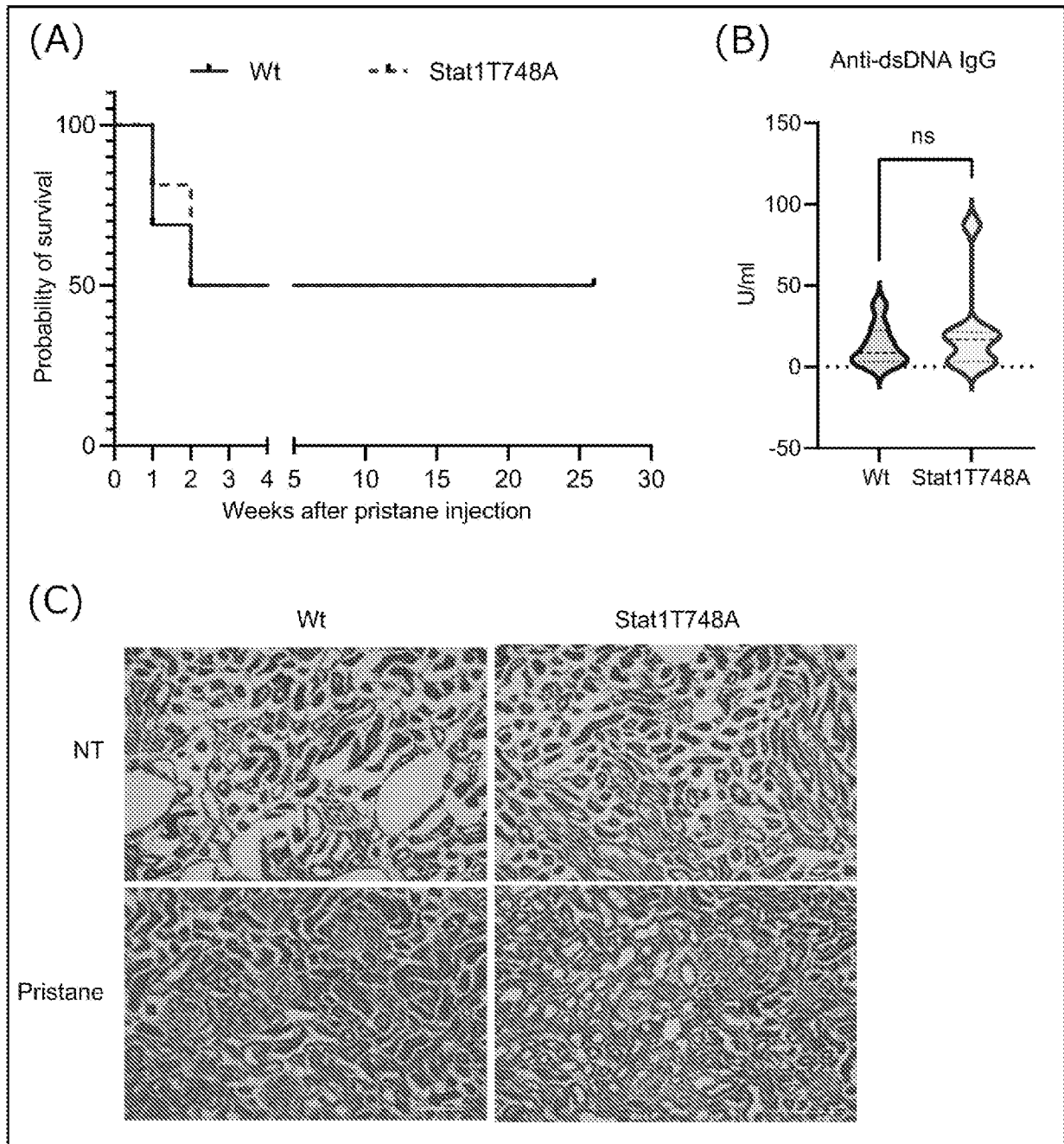
[圖4]



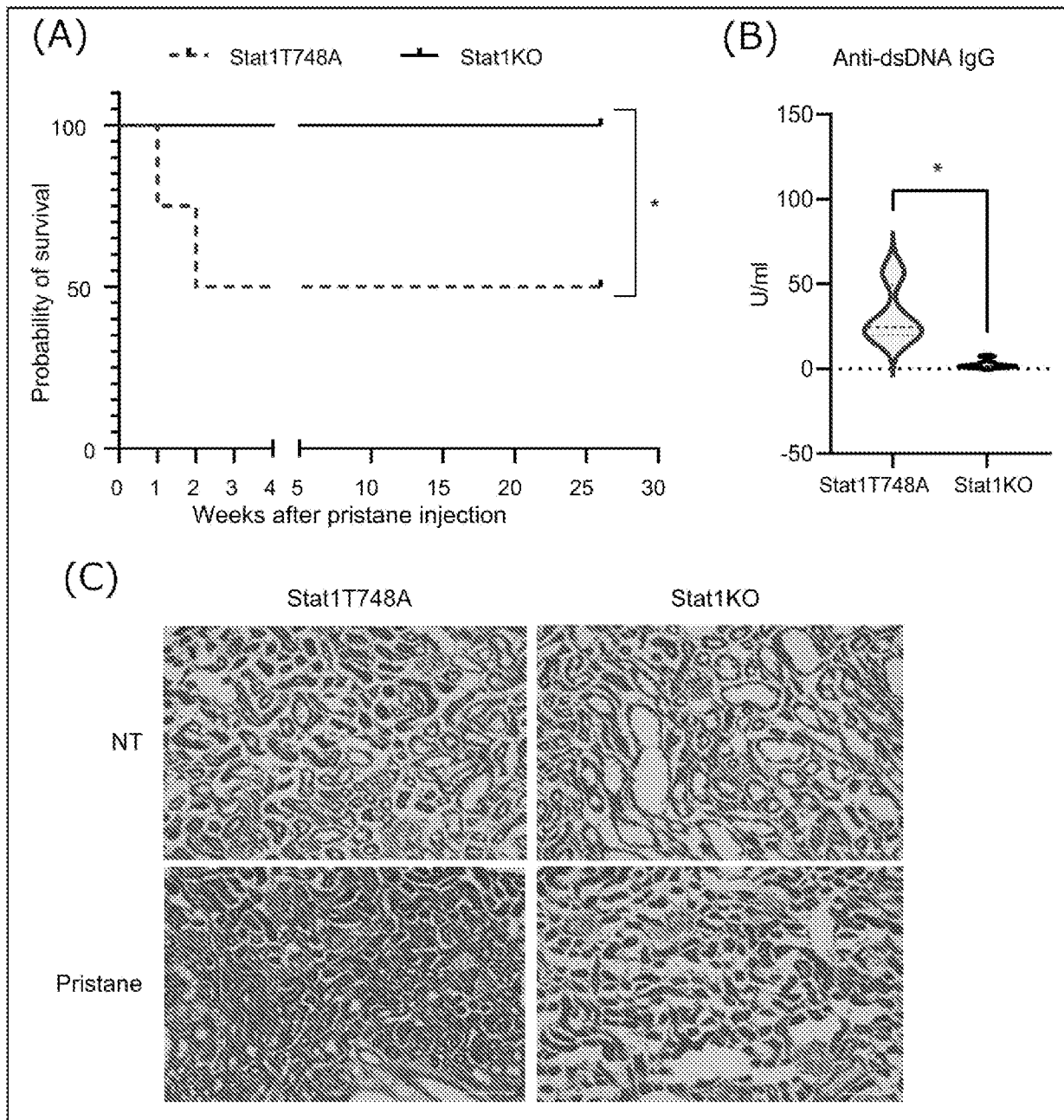
[5]



[圖6]

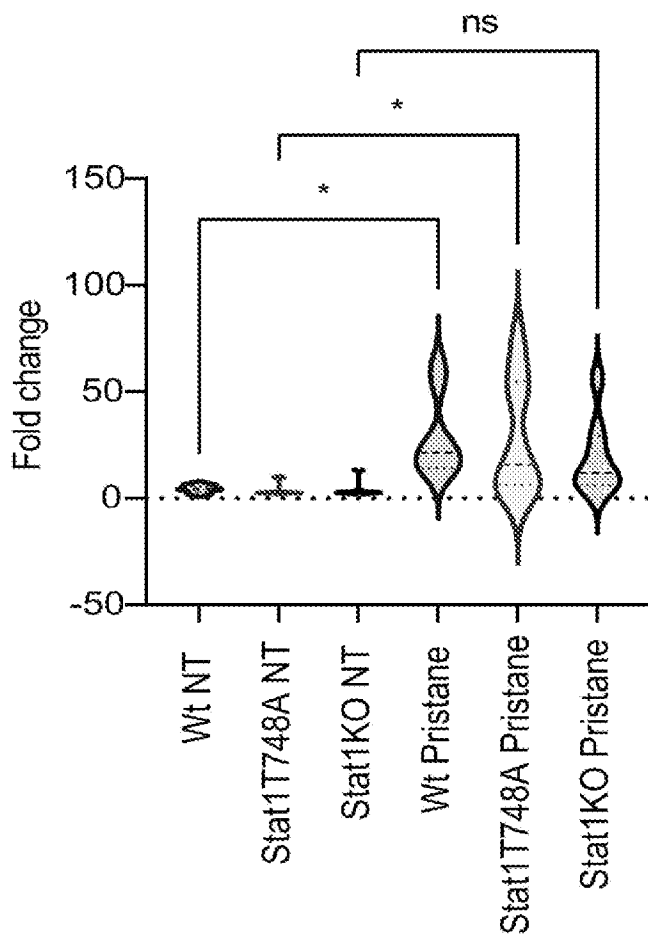


[7]



[8]

Albumin (ug) per creatinine (mg)



[9]

(A) mAbs against phosphorylated Thr⁷⁴⁸ Stat1 (Mouse)

		Phospho peptide											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		1.19E-01	1.64E-01	1.47E-01	1.85E-01	1.69E-01	5.89E-02	1.67E-01	5.42E-02	2.65E-02	2.45E-02	1.09E-01	5.19E-02
B		1.40E-01	1.05E-01	5.30E-02	5.53E-02	1.07E-01	5.56E-02	1.80E-01	1.88E-01	1.94E-01	1.14E-01	1.15E-01	5.12E-02
C		1.05E-01	5.54E-02	5.37E-02	5.73E-02	5.00E-02	5.59E-02	6.39E-02	5.12E-02			5.23E-02	5.19E-02
		Non-phospho peptide											
A		6.76E-02	5.62E-02	6.17E-02	6.57E-02	6.29E-02	6.27E-02	6.39E-02	6.33E-02	6.42E-02	6.44E-02	6.37E-02	7.54E-02
B		7.22E-02	7.02E-02	6.60E-02	6.84E-02	6.91E-02	6.61E-02	2.43E-01	6.69E-02	6.52E-02	5.92E-02	6.90E-02	7.09E-02
C		6.88E-02	6.55E-02	6.45E-02	7.00E-02	6.58E-02	6.64E-02	7.03E-02	6.48E-02	4.19E-02	4.32E-02	4.19E-02	4.36E-02

(B) mAbs against phosphorylated Thr⁷⁴⁹ STAT1 (Human)

		Phospho peptide											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		2.36E-01	3.03E-01	1.86E-01	3.06E-01	3.09E-01	5.89E-02	3.34E-01	1.41E-02	6.85E-02	6.79E-02	1.07E-01	5.14E-02
B		2.97E-01	2.01E-01	5.33E-02	5.34E-02	1.26E-01	5.81E-02	4.12E-01	3.82E-01	3.84E-01	1.63E-01	2.04E-01	3.25E-02
C		2.00E-01	5.54E-02	5.81E-02	5.71E-02	5.97E-02	6.09E-02	5.75E-02	4.89E-02			5.11E-02	5.19E-02
		Non-phospho peptide											
A		7.23E-02	6.39E-02	6.32E-02	8.13E-02	6.25E-02	6.04E-02	6.06E-02	5.91E-02	6.22E-02	5.99E-02	6.51E-02	6.75E-02
B		7.15E-02	6.29E-02	6.25E-02	8.10E-02	7.07E-02	6.45E-02	1.24E-01	6.33E-02	6.28E-02	6.27E-02	6.64E-02	7.40E-02
C		7.23E-02	6.67E-02	5.69E-02	6.48E-02	6.58E-02	6.40E-02	6.64E-02	5.97E-02	3.70E-02	3.83E-02	3.87E-02	3.66E-02

[10]

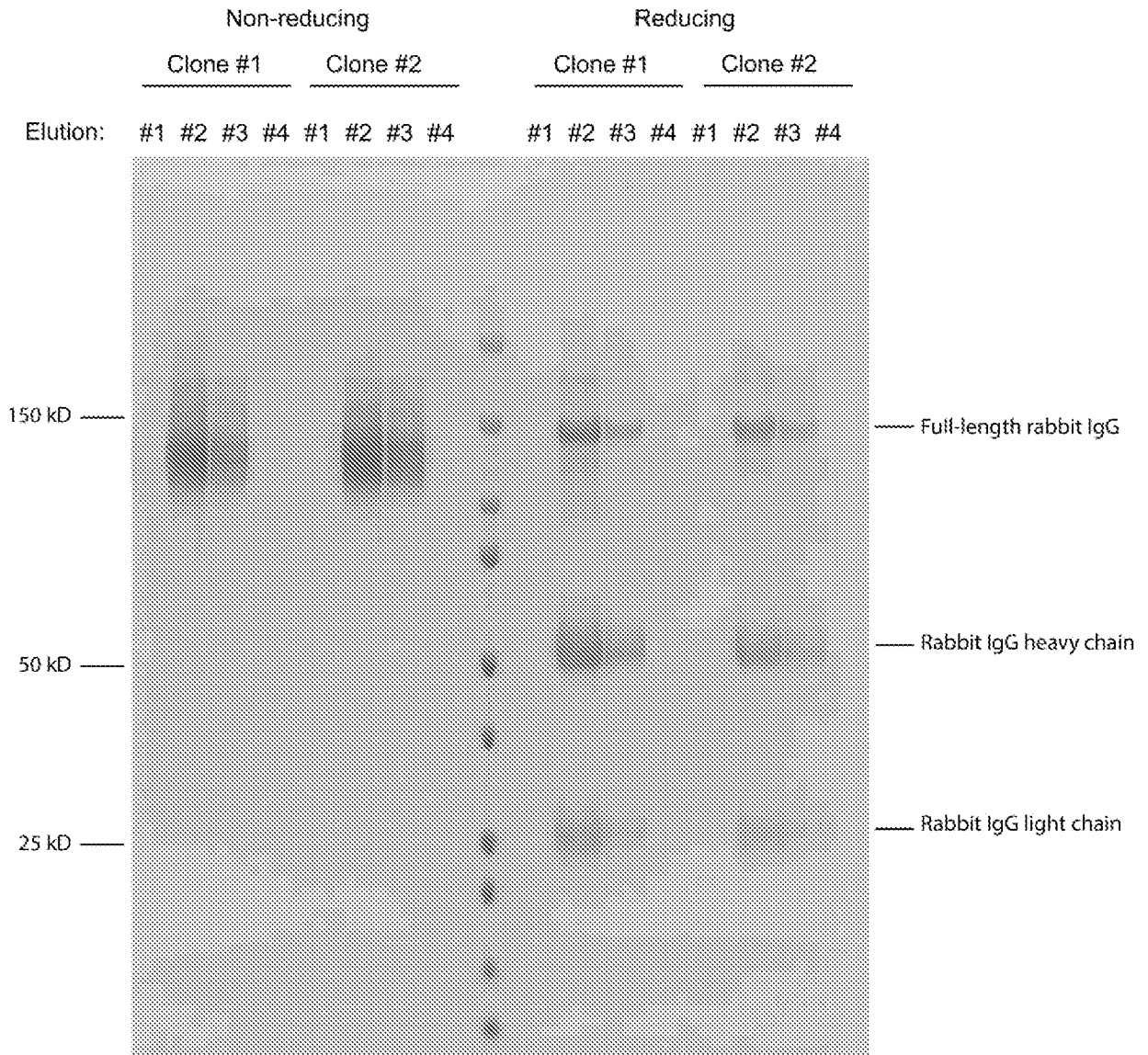
(A) mAbs against phosphorylated Thr⁷⁴⁸ Stat1 (Mouse)


mAb clone#	Dilution factor					Supernatant	Dilution factor					Supernatant
	50	500	5000	50,000	500,000		50	500	5000	50,000	500,000	
#2	2.83E+00	2.40E+00	2.64E+00	2.22E+00	6.73E-01	2.15E+00	5.37E-01	2.73E-01	1.19E-01	7.05E-02	7.11E-02	7.83E-02
#3	2.64E+00	2.61E+00	2.58E+00	1.93E+00	7.73E-01	1.82E+00	1.26E+00	1.51E+00	1.74E-01	6.73E-02	7.31E-02	6.99E-02
#4	2.70E+00	2.63E+00	2.68E+00	2.03E+00	7.97E-01	1.96E+00	8.79E-01	7.08E-01	2.47E-01	8.44E-02	6.88E-02	7.32E-02
#5	3.22E+00	3.01E+00	2.88E+00	2.05E+00	7.79E-01	2.58E+00	2.87E+00	2.54E+00	2.14E+00	7.85E-01	1.41E-01	1.10E+00
#1	2.64E+00	2.64E+00	2.26E+00	2.16E+00	6.03E-01	2.74E+00	1.09E-01	8.66E-02	1.28E-01	8.50E-02	8.45E-02	8.03E-02
	Phospho peptide						Non-phospho peptide					

(B) mAbs against phosphorylated Thr⁷⁴⁹ STAT1 (Human)

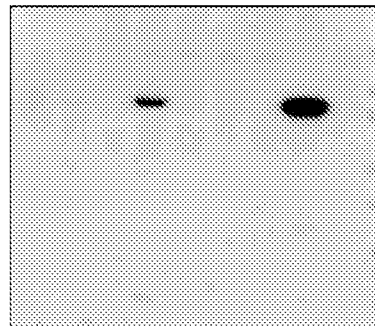
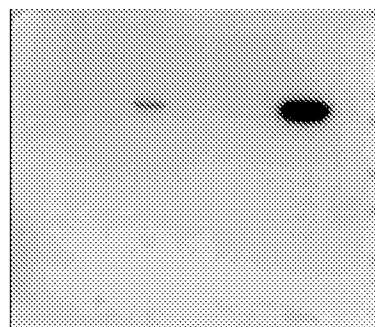
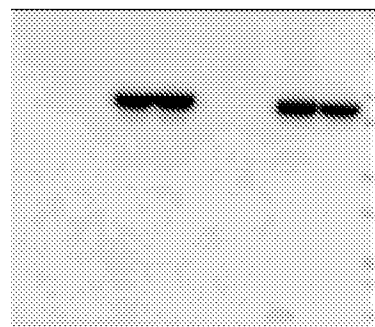
mAb clone#	Dilution factor					Supernatant	Dilution factor					Supernatant
	50	500	5000	50,000	500,000		50	500	5000	50,000	500,000	
#2	2.22E+00	2.24E+00	2.41E+00	1.69E+00	5.16E-01	1.85E+00	1.10E-01	6.45E-02	6.49E-02	6.32E-02	6.16E-02	6.07E-02
#3	2.14E+00	2.27E+00	2.24E+00	1.69E+00	6.01E-01	1.70E+00	8.99E-02	7.30E-02	6.79E-02	6.13E-02	6.16E-02	6.52E-02
#4	2.08E+00	2.13E+00	2.32E+00	1.72E+00	6.52E-01	1.63E+00	4.75E-01	1.58E-01	7.33E-02	6.96E-02	6.90E-02	7.09E-02
#5	2.79E+00	2.74E+00	2.72E+00	2.26E+00	5.06E-01	2.51E+00	2.83E+00	2.61E+00	1.42E+00	3.32E-01	9.99E-02	4.47E-01
#1	2.31E+00	2.42E+00	2.36E+00	1.74E+00	5.12E-01	2.34E+00	9.59E-02	8.01E-02	8.20E-02	7.84E-02	8.39E-02	7.71E-02
	Phospho peptide						Non-phospho peptide					

[圖11]

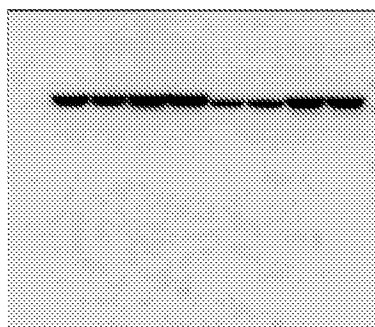


[12]

mouse-IKKb	-	-	-	+	+	-	-	-	-
mouse-Stat1 Wt	-	+	-	+	-	-	-	-	-
mouse-Stat1 T748A	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Human-IKKb	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Human-Stat1 Wt	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Human-Stat1 T749A	-	-	-	-	-	-	+	-	+

pThr^{748/9} Stat1
(clone# 1)pThr^{748/9} Stat1
(clone# 2)

IKKb



Stat1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/022262

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>A61K 45/00(2006.01)i; A61P 1/04(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A61P 17/02(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i FI: A61K45/00 ZNA; A61P31/04; A61P43/00 111; A61P1/04; A61P17/02; A61P37/02; G01N33/15 Z</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K45/00; A61P1/04; A61P31/04; A61P37/02; A61P43/00; A61P17/02; G01N33/15		
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 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE, Seung Jun et al. Drug repositioning of TANK-binding kinase 1 inhibitor CYT387 as an alternative for the treatment of Gram-negative bacterial sepsis. International Immunopharmacology. 04 June 2019, vol. 73, pp. 482-490, http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.051 abstract, p. 483, left column, third paragraph, p. 486, right column, p. 488, left column, first column, p. 489, left column, last paragraph to right column, first paragraph, fig. 4, 5	1-3, 6-10
Y		1-3, 6-10
X	KIM, Taekyun. Pheophorbide a suppresses toll-like receptor signaling via IKK β /NF κ B/TBK1/IRF3 to improve survival in septic mice. Abstracts of Papers. 256th National Meeting (2018), 2018, https://www.morressier.com/o/event/5fc6413703137aa525805a17/article/5fc642112d78d1fec4658121 abstract, title	1-3, 6-10
Y		1-3, 6-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 28 August 2023		Date of mailing of the international search report 05 September 2023
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/022262

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VON BULOW, Verena et al. Zinc-dependent suppression of TNF-alpha production is mediated by protein kinase A-induced inhibition of Raf-1, I kappa B kinase beta, and NF-kappa B. Journal of Immunology. 2007, vol. 179, no. 6, pp. 4180-4186 abstract	1-3, 6-10
Y		1-3, 6-10
Y	METWALLY, Hozaiifa et al. Noncanonical STAT1 phosphorylation expands its transcriptional activity into promoting LPS-induced IL-6 and IL-12p40 production. Science Signaling. 24 March 2020, vol. 13, no. 624, article no. eaay0574, pp. 1-16 abstract, p. 2, left column, first paragraph, p. 5, left column, second paragraph to right column, first paragraph, p. 8, left column, last paragraph to right column, second paragraph, fig. 5	1-3, 6-10
Y	田中潤也, 敗血症治療のターゲットとなりうるシグナル伝達経路としてのJAK/STAT系 -催眠鎮静薬ブロムワレリル尿素を用いた研究からの考察-, Shock. 2014, vol. 29, no. 2, pp. 40-46, (TANAKA, Junya. Discussion - from a study using JAK/STAT system - sedative hypnotic bromovalerylurea as the signaling pathway which can become the target of the septicemic treatment.) p. 44, last paragraph	1-3, 6-10

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

"In the form of an Annex C/ST.25 text file" above should be understood as "in ST.26 format".

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

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

Document 1: LEE, Seung Jun, et al. Drug repositioning of TANK-binding kinase 1 inhibitor CYT387 as an alternative for the treatment of Gram-negative bacterial sepsis. *International Immunopharmacology*. 04 June 2019, vol. 73, pp. 482-490, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.051>

Document 2: KIM, Taekyun. Pheophorbide a suppresses toll-like receptor signaling via IKK β /NF κ B/TBK1/IRF3 to improve survival in septic mice. *Abstracts of Papers. 256th National Meeting (2018)*, <https://www.morressier.com/event/5fc6413703137aa525805a17/article/5fc642112d78d1fec4658121>

Document 3: von BULOW, Verena, et al. Zinc-dependent suppression of TNF-alpha production is mediated by protein kinase A-induced inhibition of Raf-1, I kappa B kinase beta, and NF-kappa B. *Journal of Immunology*. 2007, vol. 179, no. 6, pp. 4180-4186

Document 4: METWALLY, Hozafa, et al. Noncanonical STAT1 phosphorylation expands its transcriptional activity into promoting LPS-induced IL-6 and IL-12p40 production. *Science Signaling*. 24 March 2020, vol. 13, no. 624, Article No. eaay0574, pp. 1-16

Document 5: 田中潤也, 敗血症治療のターゲットとなりうるシグナル伝達経路としてのJAK/STAT系-催眠鎮静薬ブロムワレリル尿素を用いた研究からの考察-, *Shock*. 2014, vol. 29, no. 2, pp. 40-46, (TANAKA, Junya. Discussion - from a study using JAK/STAT system - sedative hypnotic bromovalerylurea as the signaling pathway which can become the target of the septicemic treatment.)

The claims are classified into the following four inventions.

(Invention 1) Claims 1-3 and 6-10

Claims 1-3 and 6-10 have the special technical feature of a "therapeutic agent for sepsis and/or septic shock, comprising, as an active component, a compound that suppresses phosphorylation of threonine at position 749 in human STAT1", and thus are classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 4, 5, 11 and 12

Claims 4, 5, 11 and 12 do not share a technical feature with claim 1 classified as invention 1. Even if it were assumed that a therapeutic agent for sepsis constituted a shared technical feature with claim 1, this technical feature is well known as described in documents 1-3 and 5 and does not make a contribution over the prior art in light of the contents described in the documents. Therefore, this feature cannot be said to be a special technical feature. In addition, even if it were assumed that a "compound inhibiting ... human STAT1" constituted a shared technical feature with claim 1, this technical feature is well known as described in document 5 and does not make a contribution over the prior art in light of the contents described in the document. Therefore, this feature cannot be said to be a special technical feature. Further, there are no other same or corresponding special technical features between claims 4, 5, 11 and 12 and claim 1.

In addition, claims 4, 5, 11 and 12 are not dependent on claim 1, and are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

Thus, claims 4, 5, 11 and 12 cannot be classified as invention 1.

Claims 4, 5, 11 and 12 have the special technical feature of a "therapeutic agent for sepsis and/or septic shock, comprising, as an active component, a compound inhibiting human STAT1", and thus are classified as invention 2.

(Invention 3) Claims 13-21

Claims 13-21 do not share a technical feature with claim 1 classified as invention 1 and claim 4 classified as invention 2. Even if it were assumed that "phosphorylation of threonine at position 749 in human STAT1" constituted a shared technical feature with claim 1, this technical feature is well known as described in document 4 and does not make a contribution over the prior art in light of the contents described in the document. Therefore, this feature cannot be said to be a special technical feature. Further, there are no other same or corresponding special technical features between claims 13-21 and claim 1 or 4.

In addition, claims 13-21 are not dependent on claim 1 or 4, and claims 13-21 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1 or 2.

Thus, claims 13-21 cannot be classified as either invention 1 or 2.

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

Claims 13-21 have the special technical feature of a "therapeutic agent for colitis, comprising, as an active component, a compound that promotes phosphorylation of threonine at position 749 in human STAT1", and thus are classified as invention 3.

(Invention 4) Claims 22-25

Claims 22-25 do not share a technical feature with claim 1 classified as invention 1, claim 4 classified as invention 2 and claim 13 classified as invention 3. Even if it were assumed that a "compound inhibiting human STAT1" constituted a shared technical feature with claim 4, this technical feature is well known as described in document 5 and does not make a contribution over the prior art in light of the contents described in the document. Therefore, this feature cannot be said to be a special technical feature. Further, there are no other same or corresponding special technical features between claims 22-25 and claims 1, 4 and 13.

In addition, claims 22-25 are not dependent on claims 1, 4 and 13, and are not substantially identical or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1, 2 or 3.

Thus, claims 22-25 cannot be classified as invention 1, 2 or 3.

Claims 22-25 have the special technical feature of a "therapeutic agent for systemic lupus erythematosus, comprising, as an active component, a compound inhibiting human STAT1", and thus are classified as invention 4.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Claims 1-3 and 6-10**

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

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 45/00(2006.01)i; A61P 1/04(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A61P 17/02(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i FI: A61K45/00 ZNA; A61P31/04; A61P43/00 111; A61P1/04; A61P17/02; A61P37/02; G01N33/15 Z</p>																	
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K45/00; A61P1/04; A61P31/04; A61P37/02; A61P43/00; A61P17/02; G01N33/15</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年							
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年																
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年																
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>LEE, Seung Jun, et al., Drug repositioning of TANK-binding kinase 1 inhibitor CYT387 as an alternative for the treatment of Gram-negative bacterial sepsis, International immunopharmacology, 2019.06.04, Vol.73, pp.482-490, http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.051 Abstract、第483頁左欄第3段落、第486頁右欄、第488頁左欄第1段落、第489頁左欄最終段落－右欄第1段落、Fig.4、Fig.5</td> <td>1-3,6-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-3,6-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>KIM, Taekyun, Pheophorbide a suppresses toll-like receptor signaling via IKKβ/NFκB/TBK1/IRF3 to improve survival in septic mice, Abstracts of Papers, 256th National Meeting (2018), 2018, https://www.morressier.com/o/event/5fc6413703137aa525805a17/article/5fc642112d78d1fec4658121 Abstract、題名</td> <td>1-3,6-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-3,6-10</td> </tr> </tbody> </table>			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	X	LEE, Seung Jun, et al., Drug repositioning of TANK-binding kinase 1 inhibitor CYT387 as an alternative for the treatment of Gram-negative bacterial sepsis, International immunopharmacology, 2019.06.04, Vol.73, pp.482-490, http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.051 Abstract、第483頁左欄第3段落、第486頁右欄、第488頁左欄第1段落、第489頁左欄最終段落－右欄第1段落、Fig.4、Fig.5	1-3,6-10	Y		1-3,6-10	X	KIM, Taekyun, Pheophorbide a suppresses toll-like receptor signaling via IKK β /NF κ B/TBK1/IRF3 to improve survival in septic mice, Abstracts of Papers, 256th National Meeting (2018), 2018, https://www.morressier.com/o/event/5fc6413703137aa525805a17/article/5fc642112d78d1fec4658121 Abstract、題名	1-3,6-10	Y		1-3,6-10
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															
X	LEE, Seung Jun, et al., Drug repositioning of TANK-binding kinase 1 inhibitor CYT387 as an alternative for the treatment of Gram-negative bacterial sepsis, International immunopharmacology, 2019.06.04, Vol.73, pp.482-490, http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.051 Abstract、第483頁左欄第3段落、第486頁右欄、第488頁左欄第1段落、第489頁左欄最終段落－右欄第1段落、Fig.4、Fig.5	1-3,6-10															
Y		1-3,6-10															
X	KIM, Taekyun, Pheophorbide a suppresses toll-like receptor signaling via IKK β /NF κ B/TBK1/IRF3 to improve survival in septic mice, Abstracts of Papers, 256th National Meeting (2018), 2018, https://www.morressier.com/o/event/5fc6413703137aa525805a17/article/5fc642112d78d1fec4658121 Abstract、題名	1-3,6-10															
Y		1-3,6-10															
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																	
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“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</p> <p>“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）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“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</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>																	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>28.08.2023</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>05.09.2023</p>																
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>佐々木 大輔 4U 3962</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>																

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
X	von BULOW, Verena, et al., Zinc-dependent suppression of TNF-alpha production is mediated by protein kinase A-induced inhibition of Raf-1, I kappa B kinase beta, and NF-kappa B, Journal of immunology, 2007, Vol.179, No.6, pp.4180-4186 Abstract	1-3, 6-10
Y		1-3, 6-10
Y	METWALLY, Hozaifa, et al., Noncanonical STAT1 phosphorylation expands its transcriptional activity into promoting LPS-induced IL-6 and IL-12p40 production, Science Signaling, 2020.03.24, Vol.13, No.624, Article No.eaay0574, pp.1-16 Abstract、第2頁左欄第1段落、第5頁左欄第2段落－右欄第1段落、第8頁左欄最終段落－右欄第2段落、Fig.5	1-3, 6-10
Y	田中潤也, 敗血症治療のターゲットとなりうるシグナル伝達経路としてのJAK/STAT系—催眠鎮静薬プロムワレリル尿素を用いた研究からの考察—, Shock, 2014, Vol.29, No.2, pp.40-46 第44頁最終段落	1-3, 6-10

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:
- 上記「附属書 C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

文献1：LEE, Seung Jun, et al., Drug repositioning of TANK-binding kinase 1 inhibitor CYT387 as an alternative for the treatment of Gram-negative bacterial sepsis, International immunopharmacology, 2019.06.04, Vol.73, pp.482-490, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.051>

文献2：KIM, Taekyun, Pheophorbide a suppresses toll-like receptor signaling via IKK β /NF κ B/TBK1/IRF3 to improve survival in septic mice, Abstracts of Papers, 256th National Meeting (2018), <https://www.morressier.com/o/event/5fc6413703137aa525805a17/article/5fc642112d78dlfec4658121>

文献3：von BULOW, Verena, et al., Zinc-dependent suppression of TNF-alpha production is mediated by protein kinase A-induced inhibition of Raf-1, I kappa B kinase beta, and NF-kappa B, Journal of immunology, 2007, Vol.179, No.6, pp.4180-4186

文献4：METWALLY, Hozaiifa, et al., Noncanonical STAT1 phosphorylation expands its transcriptional activity into promoting LPS-induced IL-6 and IL-12p40 production, Science Signaling, 2020.03.24, Vol.13, No.624, Article No.eaay0574, pp.1-16

文献5：田中潤也, 敗血症治療のターゲットとなりうるシグナル伝達経路としてのJAK/STAT系 - 催眠鎮静薬プロムワレリル尿素を用いた研究からの考察 -, Shock, 2014, Vol.29, No.2, pp.40-46

請求の範囲は、以下の4つの発明に区分される。

(発明1) 請求項1-3、6-10

請求項1-3、6-10は、「ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を抑制する化合物を有効成分として含む、敗血症および/または敗血症ショック治療剤」という特別な技術的特徴を有しているため、発明1に区分する。

(発明2) 請求項4、5、11、12

請求項4、5、11、12は、発明1に区分された請求項1と共通の技術的特徴を有していない。仮に、敗血症治療剤であることが請求項1との共通の技術的特徴であるとしても、当該技術的特徴は文献1-3、5に記載されているように公知であるから、該文献の開示内容に照らして先行技術に対する貢献をもたらすものではなく、特別な技術的特徴であるとは言えない。また、仮に、「ヒトSTAT1...を阻害する化合物」が請求項1との共通の技術的特徴であるとしても、当該技術的特徴は文献5に記載されているように公知であるから、該文献の開示内容に照らして先行技術に対する貢献をもたらすものではなく、特別な技術的特徴であるとは言えない。さらに、請求項4、5、11、12と請求項1との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらにまた、請求項4、5、11、12は請求項1の従属請求項ではなく、請求項4、5、11、12は発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にない。

したがって、請求項4、5、11、12は発明1に区分できない。

そして、請求項4、5、11、12には、「ヒトSTAT1を阻害する化合物を有効成分として含む、敗血症および/または敗血症ショック治療剤」という特別な技術的特徴を有しているため、発明2に区分する。

(発明3) 請求項13-21

請求項13-21は、発明1に区分された請求項1と発明2に区分された請求項4と共通の技術的特徴を有していない。仮に、「ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化」が請求項1との共通の技術的特徴であるとしても、当該技術的特徴は文献4に記載されているように公知であるから、該文献の開示内容に照らして先行技術に対する貢献をもたらすものではなく、特別な技術的特徴であるとは言えない。また、請求項13-21と請求項1又は請求項4との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項13-21は請求項1又は請求項4の従属請求項ではなく、請求項13-21は発明1又は発明2に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にない。

したがって、請求項13-21は発明1及び発明2のいずれにも区分できない。

そして、請求項13-21は「ヒトSTAT1の749位におけるスレオニンのリン酸化を促進する化合物を有効成分として含む、大腸炎治療剤」という特別な技術的特徴を有しているため、発明3に区分する。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

（発明4） 請求項22-25

請求項22-25は、発明1に区分された請求項1と発明2に区分された請求項4と発明3に区分された請求項13と共通の技術的特徴を有していない。仮に、「ヒトSTAT1を阻害する化合物」が請求項4との共通の共通の技術的特徴であるとしても、当該技術的特徴は文献5に記載されているように公知であるから、該文献の開示内容に照らして先行技術に対する貢献をもたらすものではなく、特別の技術的特徴であるとは言えない。また、請求項22-25と請求項1、4、13との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項22-25は請求項1、4、13の従属請求項ではなく、請求項22-25は発明1又は発明2又は発明3に区分されたいずれの請求項に対して実質同一又はそれに準ずる関係にない。

したがって、請求項22-25は発明1及び発明2及び発明3のいずれにも区分できない。

そして、請求項22-25は「ヒトSTAT1を阻害する化合物を有効成分として含む、全身性エリテマトーデス治療剤」という特別な技術的特徴を有しているので、発明4に区分する。

- 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
- 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
- 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
- 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。 請求項1-3、6-10

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。