

(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9月14日(14.09.2023)



(10) 国際公開番号  
**WO 2023/171789 A1**

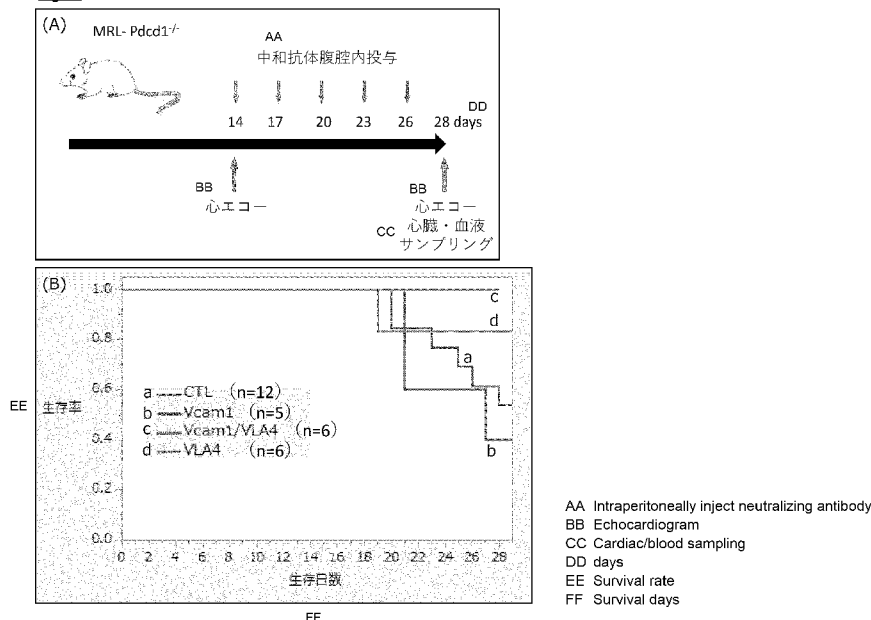
- (51) 国際特許分類:  
A61K 45/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 31/517 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)  
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)  
A61K 31/713 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/009251
- (22) 国際出願日: 2023年3月10日(10.03.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2022-038575 2022年3月11日(11.03.2022) 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).
- (72) 発明者: 松岡 研(MATSUOKA, Ken); 〒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). ▲高▼島 成二 (TAKASHIMA, Seiji); 〒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). 瀬川 貴嗣(SEGAWA, Takatsugu); 〒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).
- (74) 代理人: 弁理士法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜コニシビル Osaka (JP).

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING MYOCARDITIS, COMPRISING VLA-4 INHIBITOR

(54) 発明の名称: VLA-4の阻害物質を含む、心筋炎を予防、又は治療するための組成物

[図7]

Fig. 7



(57) Abstract: The present addresses the problem of providing a novel composition for treating myocarditis and/or a novel composition for preventing myocarditis. Provided is a composition for preventing or treating myocarditis, the composition comprising a VLA-4 inhibitor.

(57) 要約: 本発明は、新たな心筋炎の治療用組成物、及び／又は心筋炎の予防用組成物を提供することを課題とする。VLA-4の阻害物質を含む、心筋炎を予防、又は治療するための組成物を提供する。

WO 2023/171789 A1

(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, 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:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

## 明 細 書

発明の名称：

**V L A - 4 の阻害物質を含む、心筋炎を予防、又は治療するための組成物**  
**技術分野**

[0001] 明細書には、VLA-4の阻害物質を含む、心筋炎を予防、又は治療するための組成物、心筋炎患者の予後を改善するための組成物、心筋炎の増悪を予防するための組成物、及び心機能の低下を伴う心筋炎を治療するための組成物が開示される。

### 背景技術

[0002] 心筋炎は、心筋を主座とした炎症性疾患である。心筋炎は、突然死の原因の約10%を占め、また、心筋症例の約30%が、慢性心筋炎（拡張型心筋症）に移行する。心筋炎の死亡率は22%であり、中でも劇症型心筋炎の死亡率は43%に達する。非特許文献1によれば、心筋炎は、組織学的特徴から、リンパ球性心筋炎、巨細胞性心筋炎、好酸球性心筋炎、肉芽腫性心筋炎に分類される。リンパ球性心筋炎の病因は、コクサッキーウイルス、アデノウイルス等のウイルス感染によるものが多いとされる。巨細胞性心筋炎、好酸球性心筋炎、肉芽腫性心筋炎は心毒性物質、薬物、自己免疫、全身性疾患などの合併症が多いとされている。薬物としては、アントラサイクリン、フルオロウラシル、免疫チェックポイント阻害剤、コロナワクチン等が心筋炎の原因になることが報告されている。中でも免疫チェックポイント阻害剤に関し、抗PD-1抗体単独投与例において0.5%、抗PD-L1抗体単独投与例において2.4%、抗CTLA4単独投与例において3.3%の心筋炎発症例が報告されている。免疫チェックポイント阻害剤に起因すると思われる心筋炎の病巣では、Tリンパ球優位の組織浸潤像が確認されている。さらに、免疫チェックポイント阻害剤の投与に起因して心筋炎を発症した場合、死亡率は、心不全による死亡率、及び心原性の死亡率を合わせると46%に上る（非特許文献2）。

### 先行技術文献

## 非特許文献

[0003] 非特許文献1: Kociol, R. D. et al: Recognition and Initial Management of Fulminant Myocarditis -A Scientific Statement From the American Heart Association, Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Myocarditis Foundation. *Circulation*. 2020;141

非特許文献2: Mahmood, SS: *J Am Coll Cardiol* 2018;71:1755-64

非特許文献3: Hokibara, S: *Clin Exp Immunol* 1998;114:236-244

非特許文献4: Grabmaier, U: *Circulation* 2012;126:A14885

非特許文献5: Ammirati, E: *J Am Coll Cardiol*. 2019 Jul 23;74(3):299-31

1

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0004] 現在、心筋炎の治療として、ステロイドパルス療法、シクロスポリン投与等の免疫抑制療法、抗ウイルス療法等が採用されている。また、好酸球性心筋炎モデルマウスに対して、VLA-4中和抗体で好酸球浸潤が軽減することが報告されている（非特許文献3）。さらに、慢性期の自己免疫性心筋炎モデルラットにおいて、VLA-4中和抗体の投与によりT cell relapseと線維化が改善することが報告されている（非特許文献4）。しかし、非特許文献5によれば、この10年間で予後は改善されていない。

本発明は、新たな心筋炎の治療用組成物、及び／又は心筋炎の予防用組成物を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0005] 本発明は、以下の態様を含む。

項1. VLA-4の阻害物質を含む、心筋炎を予防、又は治療するための組成物。

項2. 前記VLA-4の阻害物質が、抗VLA-4抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントであるか、VLA-4アンタゴニストであるか、VLA-4 mRNAを標的とするsiRNA、shRNA、miRNA、及びアンチセンスRNAよりなる群から選ばれる少な

くとも一種のRNA分子又は該RNA分子を発現することができるベクターであるか、VLA-4遺伝子を標的とするゲノム編集システムである、項1に記載の組成物。

項3. 前記抗VLA-4抗体が、VLA-4を中和する機能を有する、項2に記載の組成物。

項4. 前記VLA-4アンタゴニストが、カロテグラストメチルである、項2に記載の組成物。

項5. 前記心筋炎が、好酸球性心筋炎以外の心筋炎である、項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

項6. 前記心筋炎が、免疫チェックポイント阻害剤に起因する心筋炎である、項1から5のいずれか一項に記載の組成物。

項7. 前記心筋炎が、心機能の低下を伴う、項1から6のいずれか一項に記載の組成物。

項8. 抗Vcam-1抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントを含む組成物と組み合わせて使用される、項1から7のいずれか一項に記載の組成物

項9. VLA-4の阻害物質を含む、心筋炎の増悪を予防するための組成物。

項10. VLA-4の阻害物質を含む、心機能の低下を伴う心筋炎を治療するための組成物。項11. VLA-4の阻害物質を含む、心筋炎を疑う患者、又は心筋炎患者の予後を改善するための組成物。

## 発明の効果

[0006] 本発明によれば、心筋炎を治療することができる。また、本発明によれば、心筋炎を予防することができる。

## 図面の簡単な説明

[0007] [図1]Day 12、Day 19、及びDay 25における心臓のマクロ画像と、組織のhematopoietic染色像の弱拡大画像及び強拡大画像を示す。

[図2]シングルセル解析による心筋組織内の細胞のポピュレーション解析結果を示す。

[図3]CTL、day 8、day 14、day 21、day 25におけるVcam-1の発現を示す。

[図4] (A) 接着実験のスケジュールを示す。(B) Vcam-1の発現に関するウエスタンブロッティングの結果を示す。(C) TNF $\alpha$ 依存的な、心臓線維芽細胞と単核球の接着性を示す。

[図5] (A) 実験のスケジュールを示す。(B) siVcam-1によるVcam-1遺伝子発現抑制効果を示す。(C) 心臓線維芽細胞と単核球の接着性を示す。

[図6] (A) Vcam-1中和抗体とVLA-4中和抗体の投与スケジュールを示す。(B) CTL群、中和抗体群全てのマウスの心エコーにより測定した左室内径短縮率(%fractional shortening ; FS)を示す。(C) (B)と同じマウスの28日目の左室拡張末期径と左室内径短縮率箱ひげ図を示す。(D) CTL群と中和抗体投与群のKaplan-Meier曲線を示す。

[図7] (A) 中和抗体の投与スケジュールを示す。(B) 各群のKaplan-Meier曲線を示す。

[図8] (A) 生後3週目の野生型マウス(WT)、野生型マウスとMRL-Pdcd1<sup>-/-</sup>を交配させたF1(hetero:MRL-Pdcd1<sup>-/-</sup>)、MRL-Pdcd1<sup>-/-</sup>(homo)の%FS値を示す。(B) homo群を%FSの高い群(心機能良好群:n=11)と%FSの低い群(心機能低下群:n=20)にわけた結果を示す。(C) VLA-4中和抗体の投与スケジュールを示す。

[図9] CTL群、VLA-4群、及びnormal EF群の臨床データを示す。

[図10] CTL群(符号a)、及びVLA-4群(符号b)のKaplan-Meier曲線を示す。

[図11] CTL群(符号a)、VLA-4群(符号b)、及びnormal EF群(符号c)のKaplan-Meier曲線を示す。

[図12] MRL-Pdcd1<sup>-/-</sup>にVLA4阻害剤投与を行った時の各群のKaplan-Meier曲線を示す。図中符号aはAJM300(+)群を示し、符号bはAJM300(-)群を示す。

[図13] MRL-Pdcd1<sup>-/-</sup>にVLA4阻害剤投与を行った時の各群の心拍数と左室収縮能:%Fractional Shortening(%)の結果を示す。

[図14] 健常人(CTL)3名、Covid関連心筋炎(Covid related)4名、リンパ球性心筋炎(Lym)8名、好酸球性心筋炎(Eosi)6名、巨細胞性心筋炎(Giant)3名の血清中の可溶性Vcam-1濃度を示す。

[図15]リンパ球性心筋炎患者の急性期及び回復期における血清中sVcam-1濃度を示す。

### 発明を実施するための形態

#### [0008] 1. 心筋炎を予防、又は治療するための組成物

本実施態様にかかる、心筋炎を予防、又は治療するための組成物は、VLA-4の阻害物質を含む。

[0009] 本明細書において「心筋炎」は、心筋を主座とした炎症性疾患である。心筋炎には、臨床経過に基づく分類では、急性心筋炎と慢性心筋炎が含まれる。また、急性心筋炎には、劇症型心筋炎と劇症型心筋炎以外の心筋炎が含まれる。慢性心筋炎には、心室の肥大を伴う拡張型心筋症と拡張型心筋症以外の慢性心筋炎が含まれる。

[0010] また、組織学的な分類では、心筋炎には、リンパ球性心筋炎、巨細胞性心筋炎、好酸球性心筋炎、肉芽腫性心筋炎等が含まれる。リンパ球性心筋炎の病因として、ウイルス感染が報告されている。原因ウイルスとして、コクサッキーウイルス（A群又はB群）、エコーウイルス、及びポリオウイルス等を含むエンテロウイルス感染；肝炎ウイルス（A型又はC型）；インフルエンザウイルス（A型又はB型）；RSウイルス；ムンプスウイルス；麻疹ウイルス；デング熱ウイルス；黄熱病ウイルス；チクニングニアウイルス；狂犬病ウイルス；HIVウイルス；ワクチニアウイルス；带状疱疹ウイルス；サイトメガロウイルス；単純ヘルペスウイルス；EBウイルス；麻疹ウイルス；アデノウイルス；パルボウイルス等のウイルス感染によるものが多いとされる。巨細胞性心筋炎、好酸球性心筋炎、巨細胞性心筋炎は、細菌感染が原因となることが報告されている。好酸球性心筋炎は、真菌感染症が原因となることが報告されている。肉芽腫性心筋炎はリケッチア感染症、スピロヘータ感染症、原虫感染症、寄生虫感染症等の感染症；薬剤、化学物質の摂取；アレルギー、自己免疫疾患；川崎病；サルコイドーシス；放射被爆；熱射病などに合併することが多いとされている。心筋炎を惹起する可能性のある薬剤として、アントラサイクリン、フルオロウラシル、免疫チェックポイント阻害剤、コロ

ナワクチン等を挙げることができる。免疫チェックポイント阻害剤として、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体を挙げることができる。本実施態様に係る、組成物は、好ましくは好酸球性心筋炎の以外の、特に免疫チェックポイント阻害剤に起因する心筋炎を疑う患者、又は免疫チェックポイント阻害剤に起因する心筋炎と診断された心筋炎患者に好適に用いることができる。

- [0011] 心筋炎の診断は、一般的に心内膜心筋生検により心筋組織を採取し、その組織画像から確定診断を行う。したがって、心筋炎患者は、心筋炎であると確定診断がついた患者を意図する。心筋炎を疑う患者とは、確定診断には至っていないものの、心電図；脈拍；心エコー（断層画像；左室内径短縮率、左室駆出率等の心機能評価）；血液中のCRP、AST、LDH、CK-MB、心筋トロポニン（T又はI）、sVcam-1の測定；胸部X線；心臓MRI等の検査により心筋炎の可能性が示唆された患者を意図する。
- [0012] 本実施形態において、心筋炎の予防には、心筋炎の発症を防ぐこと、心筋炎の再発を防ぐことを含み得る。心筋炎の治療には、心筋炎の症状を改善すること、心筋炎を治癒させること、心筋炎による心機能低下や心不全を防ぐことを含みうる。
- [0013] 心筋炎の程度は、例えば、心電図；脈拍；心エコー（断層画像；左室内径短縮率、左室駆出率等の心機能評価）；血液中のCRP、AST、LDH、CK-MB、心筋トロポニン（T又はI）、sVcam-1の測定；胸部X線；心臓MRI等の検査により評価することができる。
- [0014] 心筋炎が増悪しているか否かは、患者本人の同一検査項目の過去の検査データと比較して評価することができる。例えば、検査項目を左室内径短縮率、左室駆出率を指標として心筋炎が増悪しているか否かを判定する場合、患者本人の過去の左室内径短縮率、又は左室駆出率と比較して、患者本人の現時点における検査項目の検査データが低くなっていれば、心筋炎が増悪していると判断することができる。また、患者本人の過去の左室内径短縮率、又は左室駆出率と比較して、患者本人の現時点における検査項目の検査データ



が同じか、それ以上であれば、心筋炎は増悪していないと判断することができる。

[0015] 本明細書において、VLA-4は、integrin subunit alpha 4、又はCD49Dとも呼ばれるタンパク質であり、ヒトの場合、National Center for Biotechnology Informationに、Gene ID: 3676 として登録される遺伝子から発現されるたんぱく質である。VLA-4は、vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1 ; CD106; INCAM-100) のリガンドである。

VLA-4の阻害物質として、例えば、抗VLA-4抗体、又はその抗原結合ドメインを含むフラグメントを挙げることができる。

[0016] 本発明において、「抗VLA-4抗体」は、VLA-4タンパク質に特異的に結合し、その機能発現を抑制できる限り制限されない。当該抗体はポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のいずれであってもよい。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、いずれも当業者が公知の方法により適宜作成することができる。当該抗体がモノクローナル抗体である場合は、公知の方法により作成されるキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体であってもよい。また、前記抗体は、Fab、F(ab)<sub>2</sub>、ダイアボディ、scFv、ミニボディ、ペプチボディ、ミメティボディ等の抗体フラグメントであってもよい。好ましくは、抗VLA-4抗体は、中和抗体である。例えば、抗VLA-4抗体として、InVivoMAb anti-mouse/human VLA-4 (CD49d) (クローンNo. PS/2、Cat No. BE0071、Bio X Cell)、文献:Ferreira, E.F.B. et al (Current Medicinal Chemistry, 2021, 28, 5884-5895) に記載のVedolizumab等を挙げるすることができる。

[0017] 本実施態様において、VLA-4アンタゴニストは、VLA-4を競合的に阻害するタイプ（競合阻害型）であっても、非競合的に阻害するタイプ（非競合阻害型）であってもよい。好ましくは、非競合阻害型である。VLA-4アンタゴニストは、化合物であってもペプチドであってもよい。

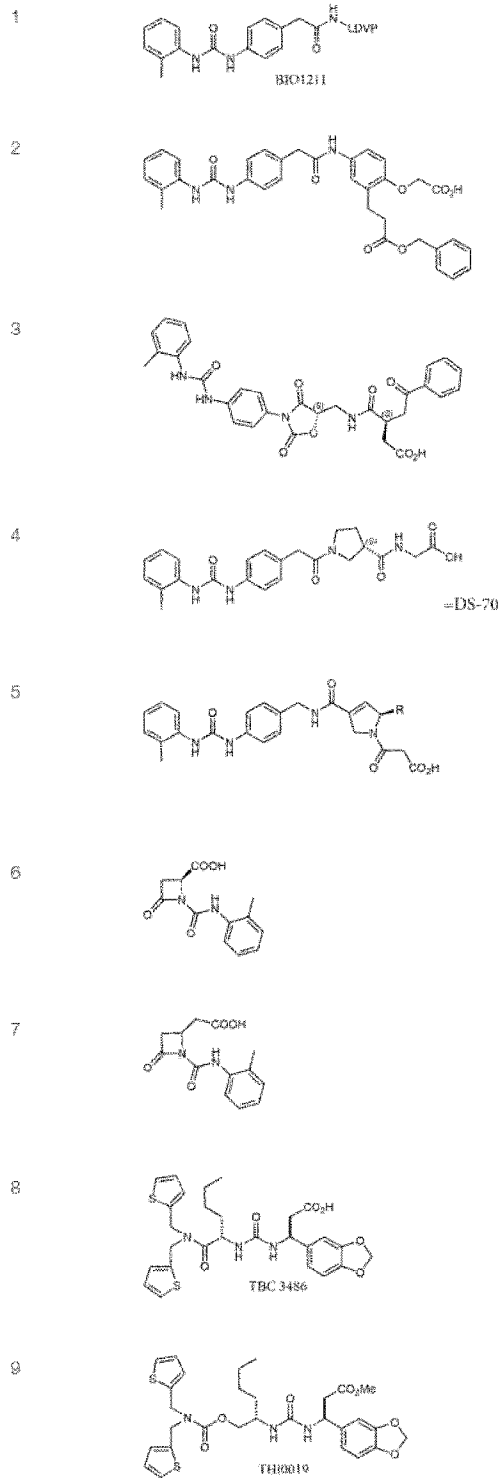
[0018] VLA-4アンタゴニストとして、例えば、カロテグラストメチル（文献：国際公開第2016/051828号）；文献:Ferreira, E.F.B. et al (Current Medicinal Chemistry, 2021, 28, 5884-5895) に記載のSB683699/Firateg

rast、R411/valategrast、CT7758/CDP323、DS-70、及びTBC3486；文献：Slack, RJ(Nature Reviews Drug Discovery volume 21, pages60-78 (2022))に記載のPN-943、及びMORF-057；文献：Baiula, M et al (Front Chem . 2019 Jul 9;7:489)に記載のBI01211、及びBI05192；文献：Ohkuro, M et al (Nat Commun. 2018 May 17;9(1):1982ER464195-01) に記載のER464195-01；ER464195-01の類縁体であるE6007を挙げる事ができる。PN-943は、ペプチドである。

[0019] さらに、VLA-4アンタゴニストとして、例えば、文献：Baiula, M et al (Front Chem . 2019 Jul 9;7:489)に記載の下記化合物を挙げる事ができる。

[0020]

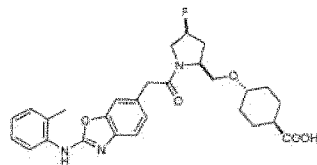
[化1]



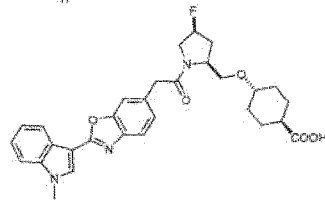
[0021]

[化2]

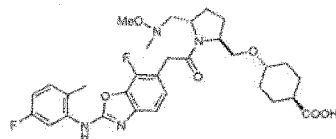
10



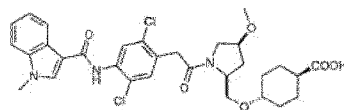
11



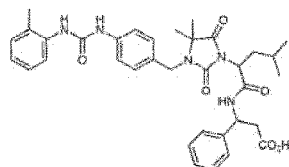
12



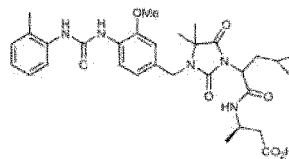
13



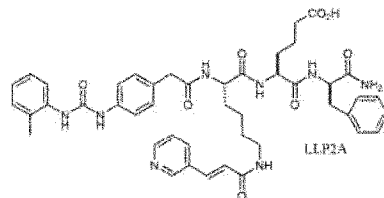
14



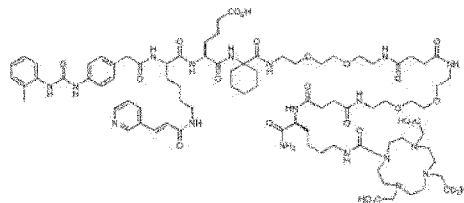
15



16



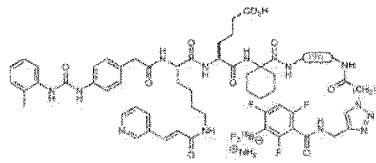
17



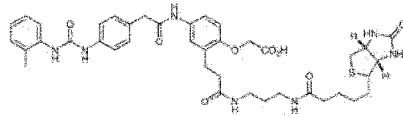
[0022]

[化3]

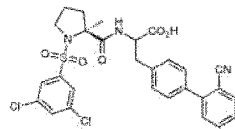
18



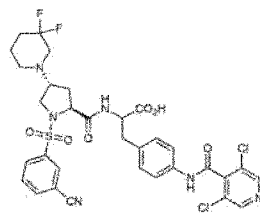
19



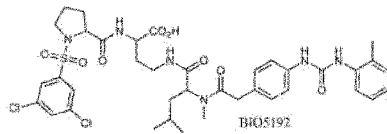
20



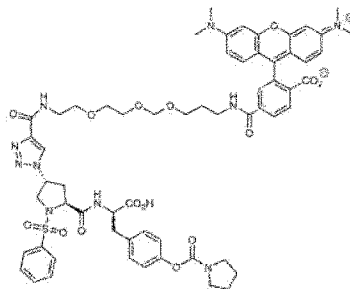
21



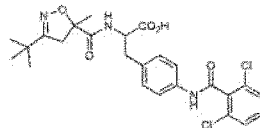
22



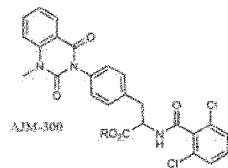
23



24



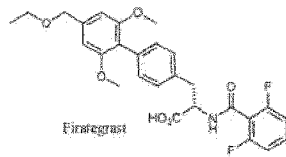
25



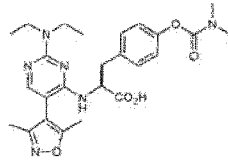
[0023]

[化4]

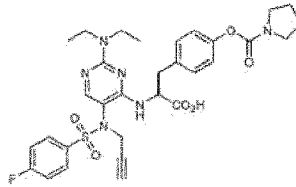
26



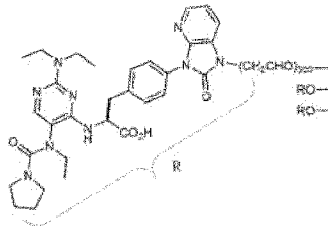
27



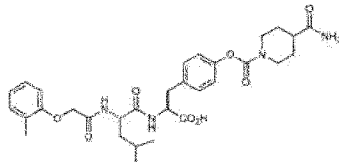
28



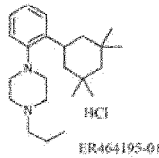
29



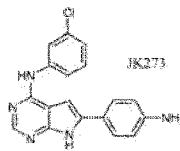
30



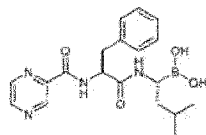
31



32



33



[0024] VLA-4の阻害物質として、VLA-4 mRNAを標的とするRNA分子を挙げることができる。前記RNA分子は、VLA-4 mRNA を標的とし、VLA-4 mRNA の発現を抑制

できる限り制限されない。前記RNAとして、RNA分子siRNA、shRNA、miRNA、及びアンチセンスRNAよりなる群から選ばれる少なくとも一種等の標的mRNAを分解する作用を有するもの、及び／又は標的mRNAの翻訳を抑制するものを挙げることができる。これらのRNA分子の配列は、標的である上記遺伝子の塩基配列の情報に基づいて、当業者が公知の手法により適宜設計することができる。また、当該RNA分子は公知の手法に基づいて作製してもよく、市場に流通するものを入手して用いることもできる。例えば、VLA-4のアンチセンスRNAとして、文献：Limmroth, V. et al (Neurology 83 November 11, 2014)に記載のATL1102を挙げることができる。RNA分子又は該RNA分子を発現することができるベクターを挙げることができる。

[0025] VLA-4 mRNAを標的とするRNA分子を発現できるベクターは、個体の体内、又は細胞内で当該VLA-4タンパク質の発現を抑制するRNA分子を発現できる限り特に制限されない。例えば、ヘアピン型RNA発現ベクター等を挙げることができる。ヘアピン型RNA発現ベクターは、例えばU6プロモーター等の短鎖RNAの発現に適したプロモーター塩基配列の下流に、標的mRNAのセンス鎖と同じ配列（但しmRNAのウラシルはチミンに変わる）を有するセンス鎖DNA塩基配列と；転写後にループ構造を形成するループ塩基配列と；前記センス鎖DNA塩基配列と全体又は一部が相補的に結合することができるアンチセンス鎖DNA塩基配列と；ターミネーター配列を少なくとも含む。ベクターは、プラスミドベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等を例示することができる。

[0026] VLA-4の阻害物質として、VLA-4遺伝子を標的とするゲノム編集システムを挙げることができる。VLA-4遺伝子を標的とするゲノム編集システムは、個体の体内においてVLA-4遺伝子内に組換えを起こすことができるシステムである限り制限されない。例えば、CompoZr Zinc Finger Nuclease(ZFN)システム、TAL effector nuclease (TALEN)システム、及びClustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9(CRISPR/Cas9)システム等を挙げることができる。好ましくは、CRISPR/Cas9システムで

ある。好ましくは、ベクターを用いたCRISPR/Cas9システムである。ベクターを用いたCRISPR/Cas9システムにおいて、CRISPRをコードする核酸とCas9をコードする核酸は、異なるベクター上にあってもよく、また1つのベクター上にあってもよい。CRISPRを機能させるためのプロモーターは特に制限されないが、U6プロモーターが好ましい。Cas9を機能させるためのプロモーターは特に制限されないが、サイトメガロウイルスプロモーター等の哺乳類細胞内で発現されるプロモーターが好ましい。CRISPR/Cas9システムとして好ましくは、pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9ベクター等の市販のベクターを使用することができる。

[0027] CRISPR配列に組み込まれる、VLA-4遺伝子を標的とする配列（以下、“VLA-4遺伝子標的配列”ともいう）は、CRISPR/Cas9システムによってガイドRNA（gRNA、crRNAともいう）に組み込まれて転写され、VLA-4遺伝子を組換えることができる配列である限り制限されない。一般的には、VLA-4遺伝子標的配列としては、VLA-4遺伝子内に存在する塩基配列「NGG」の5'側上流域の20塩基前後の配列を選択することができるといわれている。VLA-4遺伝子標的配列は、Optimized CRISPR design tool (Massachusetts Institute of Technology, ZhangLabのウェブページ(<http://crispr.mit.edu/>))、E-CRISP(<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/> (ドイツがん研究センター))、ZiFiT Targeter(<http://zifit.partners.org/ZiFit/> (Zing Finger コンソーシアム))、Cas9 design(<http://cas9.cbi.pku.edu.cn> (北京大学))、CRISPRdirect(<http://crispr.dbcls.jp> (東京大学))、CRISPR-P(<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/> (華中農業大学))等において公開されている公知のデザインツールを使用してデザインすることができる。

[0028] 組成物は、VLA-4の阻害物質と適当な担体又は添加剤を組み合わせることで調製することができる。組成物の調製に用いられる担体や添加剤としては組成物の剤形に応じて通常の薬剤に汎用される各種のもの、例えば賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤、界面活性剤等を例示できる。また、VLA-4の阻害物質がペプチド、抗体、抗体フラグメント、RNA分子、プラ



スミドベクター等の場合には、上記担体としてポリマー、脂質、磁気等を含むトランスフェクション試薬を使用してもよい。

[0029] 組成物が、非経口投与されるものである場合には、注射剤、及び点滴剤等を例示できる。また、組成物が経口投与されるものである場合の剤形は、特に制限されないが、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤（硬質カプセル剤及び軟質カプセル剤を含む）、液剤、丸剤、懸濁剤、及び乳剤等を例示できる。

[0030] 組成物が、錠剤、散剤、顆粒剤、丸剤、カプセル剤等の経口用固形組成物である場合の調製に際しては、担体として例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸、メチルセルロース、グリセリン、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム等の賦形剤；単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、エチルセルロース、水、エタノール、リン酸カリウム等の結合剤；乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤；白糖、ステアリン酸、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤；ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤；グリセリン、デンプン等の保湿剤；デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤；精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を使用できる。さらに錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠、二重錠、多層錠等とすることができる。

[0031] 上記医薬組成物が、丸剤の経口用固形組成物である場合の調製に際しては、担体として、例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤；アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン等の結合剤；ラミナラン、カンテン等の崩壊剤等を使用できる。

[0032] 上記医薬組成物が、カプセル剤の経口用固形組成物である場合の調製に際しては、カプセル剤は有効成分を上記で例示した各種の担体と混合し、硬質カプセル、又は軟質カプセル等に充填して調製される。

上記製剤が液剤の場合には、水性又は油性の懸濁液、溶液、シロップ、エリキシル剤であってもよく、通常の添加剤を用いて常法に従い、調製される。

[0033] 上記医薬組成物が注射剤の場合の調製に際しては、担体として例えば水、エチルアルコール、マクロゴール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等の希釈剤；クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム等のpH調整剤；リン酸二カリウム、リン酸三ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、クエン酸ナトリウム等の緩衝剤；ピロ亜硫酸ナトリウム、EDTA、チオグリコール酸、チオ乳酸等の安定化剤；凍結乾燥した際の成形剤として例えばマンニトール、イノシトール、マルトース、シュクロース、ラクトース等の糖類を使用できる。なお、この場合等張性の溶液を調整するに十分な量のブドウ糖或いはグリセリンを医薬製剤中に含有せしめてもよく、また通常の溶解補助剤、無痛化剤、局所麻酔剤等を添加しても良い。これらの担体を添加して、常法により皮下、筋肉内、静脈内用注射剤を製造することができる。

上記製剤が点滴剤の場合には、投与化合物を生理食塩水、リンゲル液等を基本とした等張電解質輸液製剤に溶解して調製することができる。

組成物の投与量としては、本発明の効果が奏される限り特に限定されず、剤型、患者の年齢、性別、病状の程度等によって適宜設定され得る。

[0034] 例えば、組成物が抗VLA-4抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントを含むとき、組成物を静注等で全身投与する場合には、成人体重1kgあたり抗VLA-4抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントのタンパク質量に換算して、0.01~1,000 mg/日となるように投与することができる。投与は、例えば、毎日、2日おき、3日おき、4日おき、5日おき、1週間おき、2週間

おき、3週間おき、4週間おきに行うことができる。投与期間は、心筋炎が改善するまで継続することができる。好ましくは、急性期から6ヶ月程度投与することができる。心筋炎が改善するとは、心エコーにおいて心機能が改善すること、及び／又は患者の血液中（好ましくは血清中）のsVcam-1又は心筋トロポニンの濃度が基準値以下になることを意図する。基準値は、例えば健康人の血液中のsVcam-1の濃度の平均値、最大値、第3四分位、第2四分位（中央値）、第1四分位、最小値の中から選択される。

[0035] 例えば、組成物がVLA-4アンタゴニストを、静注等で全身投与する場合には、成人体重1kgあたりVLA-4アンタゴニストの量に換算して0.01~1,000 mg/日となるように投与することができる。VLA-4アンタゴニストがカロテグラストメチルである場合、経口投与が可能であり、成人体重1kgあたりカロテグラストメチルの量に換算して0.01~1,500 mg/日となるように投与することができる。投与は、例えば、毎日、2日おき、3日おき、4日おき、5日おき、1週間おき、2週間おき、3週間おき、4週間おきに行うことができる。投与期間は、心筋炎が改善するまで継続することができる。好ましくは、急性期から6ヶ月程度投与することができる。心筋炎の改善及び基準値の定義は、上述のとおりである。

[0036] VLA-4 mRNAを標的とするsiRNA、shRNA、miRNA及びアンチセンスRNAからなる群から選ばれる少なくとも1種のRNA分子又は該RNA分子を発現することができるベクターは、全身投与の場合、成人体重1kgあたり0.1~1,000 mg/日程度となるように投与することができる。ベクターは必要に応じて直鎖化することができる。

[0037] VLA-4 mRNAを標的とするsiRNA、shRNA、miRNA及びアンチセンスRNAからなる群から選ばれる少なくとも1種のRNA分子又は該RNA分子を発現することができるベクターを局所投与する場合には、ベクター又はVLA-4 mRNAを標的とするsiRNA、shRNA、miRNA及びアンチセンスRNAからなる群から選ばれる少なくとも1種のRNA分子又は該RNA分子を発現することができるベクターを注射器やカテーテルを用いて、標的の組織に注入することができる。この場合、

リポソーム等の核酸デリバリー試薬を併用してもよい。局所投与の場合、標的組織1 cm<sup>2</sup>あたり、0.01~100 mg/日となるように投与することができる。

[0038] VLA-4 mRNAを標的とするsiRNA、shRNA、miRNA及びアンチセンスRNAからなる群から選ばれる少なくとも1種のRNA分子又は該RNA分子を発現することができるベクターの投与回数は、全身投与の場合であっても、局所投与の場合であっても、単回、又は複数回行うことができる。複数回投与する場合には、2日おき、4日おき、一週間おきに投与を繰り返すことができる。複数回投与する場合には、2回、5回、10回、15回、20回、又は24回投与することができる。好ましくは、急性期から6ヶ月程度投与することができる。心筋炎の改善及び基準値の定義は、上述のとおりである。

[0039] VLA-4遺伝子を標的とするゲノム編集システムを個体へ投与する場合、全身性に、又は局所に投与することができる。全身性に投与する場合には、静注することが好ましい。ゲノム編集システムに含まれる核酸がDNAを基本とするシステムである場合には、ベクターとしてレンチウイルス、アデノウイルス、AAV等由来の個体内で発現できるベクターを使用してもよい。

[0040] VLA-4遺伝子を標的とするゲノム編集システムを全身投与する場合、成人体重1 kgあたり $10^{10}$ ~ $10^{18}$ vg/日となるように投与することができる。前記ゲノム編集システムの投与回数は、全身投与の場合であっても、局所投与の場合であっても、単回、又は複数回行うことができる。複数回投与する場合には、2日おき、4日おき、一週間おきに投与を繰り返すことができる。複数回投与する場合には、2回、5回、10回、15回、20回、又は24回投与することができる。好ましくは、急性期から6ヶ月程度投与することができる。心筋炎の改善及び基準値の定義は、上述のとおりである。リポソーム等の核酸デリバリー試薬と共にベクターを個体に投与してもよい。ゲノム編集システムに含まれる核酸がRNAを基本とするシステムである場合には、リポソームと共に投与することができる。また、ベクターは、必要に応じて直鎖化することが好ましい。

[0041] 2. 心機能の低下を伴う心筋炎を治療するための組成物

上記1. において述べた組成物は、心機能の低下を伴う心筋炎を治療するための組成物としても使用することができる。したがって、上記1. における組成物に関する説明は、ここに援用する。また、心筋炎に関する説明も上記1. における説明をここに援用する。

[0042] 心機能は、例えば、心エコー（断層画像；左室内径短縮率、左室駆出率等の心機能評価）等により評価することができる。心機能は、各検査項目の基準値と、患者の各検査項目の測定データを比較して、基準値よりも低下していれば、前記患者の心機能が低下していると決定することができる。

[0043] 3. 心筋炎を疑う患者、又は心筋炎患者の予後を改善するための組成物

上記1. において述べた組成物は、心筋炎を疑う患者、又は心筋炎患者の予後を改善するための組成物としても使用することができる。したがって、上記1. における組成物に関する説明は、ここに援用する。また、心筋炎に関する説明も上記1. における説明をここに援用する。

[0044] 本実施態様において、予後とは生存期間を意図し、予後の改善とは、生存期間の延長を意図する。生存期間の延長とは、例えば、本実施態様に係る組成物を投与しなかった患者群の生存期間から算出される基準値よりも生存期間が長くなることを意図する。基準値として、例えば、患者群の生存期間の中央値、第1四分位、第3四分位、平均値等を挙げることができる。

[0045] 4. 各組成物と組み合わせて使用される抗Vcam-1抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントを含む組成物

上記1. から3. において述べた組成物は、抗Vcam-1抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントを含む組成物と組み合わせて使用してもよい。

[0046] 抗Vcam-1抗体は、Vcam-1タンパク質に特異的に結合し、その機能発現を抑制できる限り制限されない。当該抗体はポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のいずれであってもよい。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、いずれも当業者が公知の方法により適宜作成することができる。当該抗体がモノクローナル抗体である場合は、公知の方法により作成されるキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体であってもよい。また、前記抗体は、Fab、

F(ab)<sub>2</sub>、ダイアボディ、scFv、ミニボディ、ペプチボディ、ミメティボディ等の抗体フラグメントであってもよい。好ましくは、抗Vcam-1抗体は、中和抗体である。例えば、抗Vcam-1抗体として、InVivoMAb anti-mouse CD106 (VCA M-1) (クローンNo. M/K-2.7、Cat No. BE0027、Bio X Cell) を挙げるができる。

[0047] 組成物は、抗Vcam-1抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントと、適当な担体又は添加剤を組み合わせる調製することができる。組成物の調製に用いられる担体や添加剤の説明は、上記1. の説明をここに援用する。

[0048] 抗Vcam-1抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントを含む組成物を静注等で全身投与する場合には、成人体重1 kgあたり抗Vcam-1抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントのタンパク質量に換算して、0.01~1,000 mg/日となるように投与することができる。投与は、例えば、毎日、2日おき、3日おき、4日おき、5日おき、1週間おき、2週間おき、3週間おき、4週間に行うことができる。投与期間は、心筋炎が改善するまで継続することができる。

[0049] 上記1. から3. において述べた組成物と、抗Vcam-1抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントを含む組成物とを組み合わせるタイミングは、上記1. から3. において述べた組成物を投与し、後から抗Vcam-1抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントを含む組成物の投与を行うか、上記1. から3. において述べた組成物と抗Vcam-1抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントを含む組成物の投与を行うか、どちらであってもよい。ここで上記1. から3. において述べた組成物を投与する前に抗Vcam-1抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントを含む組成物の投与を行うことは避けることが好ましい。抗Vcam-1抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントの単独投与は、患者の予後を改善しない可能性があるためである。

## 実施例

[0050] 以下に実施例を示して本発明についてより詳細に説明する。しかし、本発明は、実施例に限定して解釈されるものではない。

[0051] また、本実施例における全ての動物実験は実験動物の管理と使用に関する指針 (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) に従い、大阪大学動物実験委員会の承認を得て行った。

[0052] 1. 自己免疫性心筋炎ラットモデルを使ったシングルセル解析

(1) 自己免疫性心筋炎ラットモデル

自己免疫性心筋炎ラットモデルはルイスラット (オス、8週齢) にPig Cardiac Myosin (ブタ心臓から自家精製) 10mg/mlと Adjuvant (CFA 10mg/ml; Chondrex社、7002) を投与し作成した。Pig Cardiac Myosinの投与日をDay 0とした。このモデルにおいて、Day 21に心筋炎の極期を迎えた。図1に、Day 12、Day 19、及びDay 25における心臓のマクロ画像と、組織のhematopoietic染色像の弱拡大画像及び強拡大画像を示す。Day 12で心筋組織内への炎症性細胞の浸潤が始まり、Day 19では、さらに強い炎症性細胞の浸潤を認めた。Day 25では、炎症による心筋組織の破壊が認められた。いずれの病期においても好酸球浸潤は認めなかった。

[0053] (2) シングルセル解析による心筋組織内の細胞のポピュレーション解析

シングルセル解析は、ラット心臓を酵素 (Liberase TM (Roche, 5401119001 / Liberase DH (Roche, 5401054001))で細胞分散し、Chromium (10x Genomics)で解析することにより行った。図2に結果を示す。図中“CTL”は抗原未投与のコントロールを示し、“Myocarditis day…”は、Pig Cardiac Myosin投与からの経過日数を示す。Day 21では、T細胞及び好中球の数が増加し、血管内皮細胞は相対的に減少した。また、単球及びマクロファージの数が増加したが、NK細胞は減少し、B細胞は確認されなかった。好酸球もまた検出されなかった。さらに、CTLとは異なり、活性化した心臓線維芽細胞集団が増加した。

[0054] 図3に、各CTL、day 8、day 14、day 21、day 25におけるVcam-1の発現を示す。Vcam-1は、血管内皮細胞に発現が認められたが、活性化心臓線維芽細胞 (Postn<sup>+</sup>/FAP<sup>+</sup>) においても高い発現を示した。

[0055] 2. in vitroにおける心臓線維芽細胞を用いた単核球の接着実験

炎症性サイトカインである、TNF  $\alpha$  の刺激によりVcam-1の発現が変化するか、また、TNF  $\alpha$  の刺激により心臓線維芽細胞と単核球との接着性に変化が起こるかを確認するため本実験を行った。

[0056] (1) 培養条件と接着条件

図4 (A) に接着実験のスケジュールを示す。

心臓線維芽細胞として、ラット新生児から摘出した心臓をCollagenase type 2 (Worthington Biochemical Corporation, LS004176) で細胞分散後に単離した線維芽細胞を96well plateに培養した。脾臓単核球は、野生型マウスより脾臓を摘出し、ホモジナイズ後にOptiprep (Serumwerk Bernburg, 1893) による比重分離で単核球分画を採取した。接着実験は心臓線維芽細胞を96well plateに48時間培養し、TNF  $\alpha$  +/-の培地交換を行いさらに24時間培養した。蛍光染色 (Hoechst 33342 (同人化学, 341-07901) , もしくはCytored (同人化学, 342-08531) ) した脾臓単核球を加え、30分37°Cでインキュベートした。PBS(-)で6回Washを行い、非接着単核球を除去後に、In Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare Life Sciences) で接着単核球のカウントを行った。

TNF  $\alpha$  (Peprotech, 300-01A) は、終濃度で5~15 ng/mlとなるようにウェルに添加した。

[0057] TNF  $\alpha$  によるVcam-1の誘導をウエスタンブロッティングで確認した。ウエスタンブロッティングの一次抗体としてAnti-Vcam1抗体EPR5047 (Abcam, ab134047) を使用した。検出にはHRP標識抗Rabbit抗体を使用し、発光試薬はケミルミワンL (Nacalai tesque, 07880-70) を使用した。インターナルコントロールとして、GAPDHのウエスタンブロッティングを行った。

[0058] (2) 結果

ウエスタンブロッティングの結果を図4 (B) に示す。ウエスタンブロッティングは、各サンプルにつきディuplicateで行った。Vcam-1の発現は、TNF  $\alpha$  の添加0 hrにおいてもわずかに認められた。しかし、TNF  $\alpha$  の添加12 hrs、及び24 hrsでより発現が増加した。また、図4 (C) は、In Cell Analyzer 6000による撮像画像である。図4 (C) に示すように、TNF  $\alpha$  の刺激を受けるこ



とにより、心臓線維芽細胞は単核球との接着が強くなることが示された。

[0059] 3. in vitroにおけるsiRNAを用いた心臓線維芽細胞と単核球の接着実験

心臓線維芽細胞と単核球にVcam-1が直接接着していることを確認するため、siRNAを用いてV-cam-1をノックダウンした心臓線維芽細胞を使用し、単核球との接着性を確認した。

[0060] (1) 実験条件

図5 (A) に本実験のスケジュールを示す。

心臓線維芽細胞の培養、及び接着実験は、上記2. (1) と同様に行った。

Vcam-1 siRNA (Silencer™ Select Pre-Designed siRNA, siRNA ID s129593, Thermo; siVcam-1とも呼ぶ) は、終濃度30nMとなるように、Lipofectamine™ mRNAiMAX Transfection Reagent (Thermo, 13778075) を使って、ウェルに播種後2時間の心臓線維芽細胞にトランスフェクトした。心臓線維芽細胞をウェルに播種してから72時間後に単核球との接着実験を行った。siRNAのコントロール (siCTL) として、Silencer™ Select Negative Control No.1 siRNA (Thermo, 4390843) を使用した。トランスフェクション量は、siVcam-1と同量とした。また、トランスフェクション後46時間後にTNF  $\alpha$  を5 ng/mlとなるように添加した。

Vcam-1のウエスタンブロッティングは、上記2. (1) と同様に行った。

[0061] 単核球の検出には、In Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare Life Sciences) で接着単核球のカウントを行った。

[0062] (2) 結果

図5 (B) に示す様に、siCTLをトランスフェクトした心臓線維芽細胞では、Vcam-1のシグナルが検出されたが、siVcam-1をトランスフェクトした心臓線維芽細胞ではVcam-1のシグナルが検出されなかった。このことから、siVcam-1は、心臓線維芽細胞内においてVcam-1の発現を抑制していることが示された。この実験系を用い、単核球との接着性を確認した。その結果を図5 (C) に示す。siVcam-1をトランスフェクトした細胞では、単核球の接着が減少し

ていた。一方、siCTLをトランスフェクトした細胞では、単核球の接着が認められた。このことから、心臓線維芽細胞と単核球との接着は、Vcam-1を介していることが示された。

[0063] 4. Vcam-1中和抗体とVLA-4中和抗体との併用による心筋炎の予後改善効果の検証

文献：Int Immunol. 2010 Jun;22(6):443-52によれば、自然発症型全身性エリテマトーデスマウスモデルであるMRL-Fas<sup>lpr/lpr</sup>とPD-1ノックアウトマウスであるC57BL/6-Pdcd1<sup>-/-</sup>を交配したMRL-Pdcd1<sup>-/-</sup>は、生後4週から8週で96%が心筋炎を発症するリンパ球性心筋炎自然発症モデルマウスである。また、生後10週における生存率は30%程度であり、野生型マウスと比較して著しく低い。このMRL-Pdcd1<sup>-/-</sup>を使用し、以下の心筋炎の実験を行った。

[0064] (1) Vcam-1中和抗体とVLA-4中和抗体の併用投与

13匹のMRL-Pdcd1<sup>-/-</sup>をコントロール (CTL: n=7) とVcam-1中和抗体とVLA-4中和抗体の併用投与 (中和抗体群: n=7) の2群に分けた。生後14日目からCTL群には生理食塩水を腹腔内に投与し、中和抗体群にはVcam-1中和抗体とVLA-4中和抗体を投与した。Vcam-1中和抗体として、InVivoMAb anti-mouse CD106 (VCAM-1) (クローンNo. M/K-2.7、Cat No. BE0027、Bio X Cell) を使用した。VLA-4中和抗体の中和抗体としてInVivoMAb anti-mouse/human VLA-4 (CD49d) (クローンNo. PS/2、Cat No. BE0071、Bio X Cell) 。それぞれの投与量は、10 µg/gとした。投与スケジュールは、図6 (A) に示すように、生後14日目から3日おきに生後26日目まで行った。生後14日目と、28日目に心エコーを行った。また、生後28日目の心エコーデータ取得後に、全てのマウスについて採血と心臓の採取を行った。

[0065] (2) 結果

図6 (B) にCTL群、中和抗体群全てのマウスの心エコーにより測定した左室内径率 (%fractional shortening ; FS) を示す。CTL群では生後14日目に比較し、生後28日目では心室の収縮性が著しく低下した。一方、中和抗体投与群では、CTL群と比較し心室の収縮性の低下が軽度であった。図6 (C) に

、図6 (B) に示した個体の28日目の左室拡張末期径 [LVDD (mm)] と左室内径短縮率 [%FS(%)] の箱ひげ図を示す。CTL群と中和抗体投与群の間のLVDDに優位な差は認められなかった ( $p=0.22$ )。一方%FSは、中和抗体投与群で優位に高かった ( $p=0.0103$ )。図6 (D) にCTL群と中和抗体投与群のKaplan-Meier曲線を示す。図中符号aはCTL群を示し、符号bは中和抗体群を示す。生後28日間までの検討では、CTL群では生後20日目から絶命する個体が増えた。一方、中和抗体投与群では絶命する個体は認められなかった。両群の差は、Log-rank解析において、 $p=0.033$ であり有意差が認められた。このことから、Vcam-1中和抗体とVLA-4中和抗体の併用投与により、心筋炎による死亡率が改善されることが示された。

#### [0066] 5. VLA-4中和抗体の効果

Vcam-1中和抗体とVLA-4中和抗体のどちらが心筋炎による死亡率の低下に貢献するか検討するため以下の検討を行った。

#### [0067] (1) 抗体投与

29匹のMRL-Pdcd1<sup>-/-</sup>をコントロール (CTL:  $n=12$ ) と、Vcam-1中和抗体のみを投与するVcam-1群 ( $n=5$ ) と、VLA-4中和抗体を投与するVLA-4群 ( $n=6$ ) と、Vcam-1中和抗体とVLA-4中和抗体の併用投与するVcam-1/VLA-4群 ( $n=6$ ) の4群に分けた。

各抗体の投与量は上記4. (1) と同量とした。図7 (A) に示すように、中和抗体の投与スケジュールも上記4. (1) と同様とした。

#### [0068] (2) 結果

図7 (B) に各群のKaplan-Meier曲線を示す。図中符号aはCTL群を示し、符号bはVcam-1群を示し、符号cはVcam-1/VLA-4群を示し、符号dはVLA-4群を示す。生後28日間までの検討では、CTL群 (符号a) では生後19日目から絶命する個体が増えた。Vcam-1群 (符号b) も生後20日から絶命する個体が増えた。一方、Vcam-1/VLA-4群 (符号c) では、絶命した個体は認められなかった。VLA-4群 (符号d) は、18日目で1個体絶命したものの、残る個体は生後28日目まで生存していた。このことから、心筋炎の予後の改善に貢献しているのは、V

LA-4中和抗体であることが示された。

[0069] 6. 心機能が低下したマウス群におけるVLA-4中和抗体の効果

図8 (A) に、生後3週目の野生型マウス (WT)、野生型マウスとMRL-Pdcd1<sup>-/-</sup>を交配させたF1 (hetero : MRL-Pdcd1<sup>-/-</sup>)、MRL-Pdcd1<sup>-/-</sup> (homo) の%FS値を示す。WT群の%FS値は、75%以上でありばらつきは第1四分位と第4四分位間の差は少なくばらつきは少なかった。一方homo群とhetero群の%FS値は、高い個体もあれば、低い個体もあり、全体としてブロードに分布していた。

[0070] そこで、図8 (B) に示す様にhomo群を%FSの高い群 (心機能良好群 : n=11) と%FSの低い群 (心機能低下群 : n=20) にわけ、さらに心機能低下群を、VLA-4中和抗体を投与しないコントロール群 (CTL群) とVLA-4中和抗体を投与するVLA-4投与群 (VLA-4群) に分けVLA-4中和抗体の効果を検討した。心機能良好群 (normal EF群) と心機能低下群とのカットオフ値は、70%とし、70%以上の群を心機能良好群とし、70%よりも低い群を心機能低下群とした。その上で、図8 (C) に示すスケジュールでVLA-4中和抗体を投与した。各群の体重 (BW)、脈拍 (HR)、%FS値を図9に示す。CTL群とVLA-4群間で各パラメータに有意差はなかった。

[0071] 図10に、CTL群 (符号a) とVLA-4群 (符号b) のKaplan-Meier曲線を示す。Log-rank解析の結果、 $p=0.0285$ であり、VLA-4群は優位に生存率が延長していた。

[0072] 図11に、さらに、normal EF群 (符号c) の生存曲線を追加したKaplan-Meier曲線を示す。normal EF群は心機能が良好であり、VLA-4中和抗体を投与しなかった群であるが、VLA-4群と比較して有意に生存率が低いことが示された (Log-rank解析の結果、 $p=0.0275$ )。

[0073] このことから、各個体の心機能データに捕らわれることなく、心筋炎個体にVLA-4中和抗体を投与することは、心筋炎の予後を改善することが示唆された。また、心筋炎個体にVLA-4中和抗体を投与することは、心筋炎の予防、又は治療に有効であることが示唆された。

[0074] 7. VLA4阻害剤投与の効果

VLA4阻害剤の1つであるAJM300（カロテグラストメチル）の投与が心筋炎による死亡率の低下に貢献するか検討するため以下の検討を行った。

[0075] (1) AJM300投与

44匹のMRL-Pdcd1<sup>-/-</sup>をAJM300を投与しないAJM300（-）群（n=13）と、AJM300を投与するAJM300（+）群（n=12）の2群に分けた。

AJM300群（+）には、生後2週から死ぬまでAJM300 1%混合給餌投与した。

また、AJM300（-）群のうちの9匹と、AJM300（+）群のうちの10匹は、28日齢になったときに心エコー心機能の評価を行い、安楽死させ心臓及び血液サンプルを採取した。

[0076] (2) 結果

図12に各群のKaplan-Meier曲線を示す。図中符号aはAJM300（+）群を示し、符号bはAJM300（-）群を示す。AJM300（+）群は、AJM300（-）群と比較して有意に生存期間が延長していた（Log rank解析 p=0.0022）。このことから、VLA4阻害剤の投与は心筋炎の予後の改善に貢献することが示された。

[0077] 図13に心エコー心機能検査によって測定した心拍数と左室収縮能：%Fractional Shortening（%）の結果を示す。AJM300（+）群は、AJM300（-）群と比較して有意に徐脈が改善していた（t検定 p=0.0231）。また、AJM300（+）群は、AJM300（-）群と比較して有意に左室収縮能が改善していた（t検定 p=0.0231）。このことから、VLA4阻害剤の投与は心機能の改善に貢献することが示された。

[0078] 8. ヒトにおける血清中の可溶性Vcam-1 濃度

可溶性Vcam-1（sVcam-1）の血清中の濃度を健常人と心筋炎患者の間で比較した。

健常人（CTL）3名、Covid関連心筋炎（Covid related）4名、リンパ球性心筋炎（Lym）8名、好酸球性心筋炎（Eosi）6名、巨細胞性心筋炎（Giant）3名の結果を図14に示す。リンパ球性心筋炎を含むいずれのタイプの心筋炎でも健常人と比較して血清中sVcam-1濃度の上昇を認めた。このことから、心

筋炎発症においてVLA-4/Vcam-1経路が関与していることが示唆された。

[0079] 9. 心筋炎病態における血清中sVcam-1の推移

3名のリンパ球性心筋炎患者の急性期及び回復期における血清中sVcam-1濃度を比較した。

結果を図15に示す。患者3名の血清中sVcam-1濃度は急性期には非常に公知を示していたが、回復期には、健常人レベルまで改善していた。

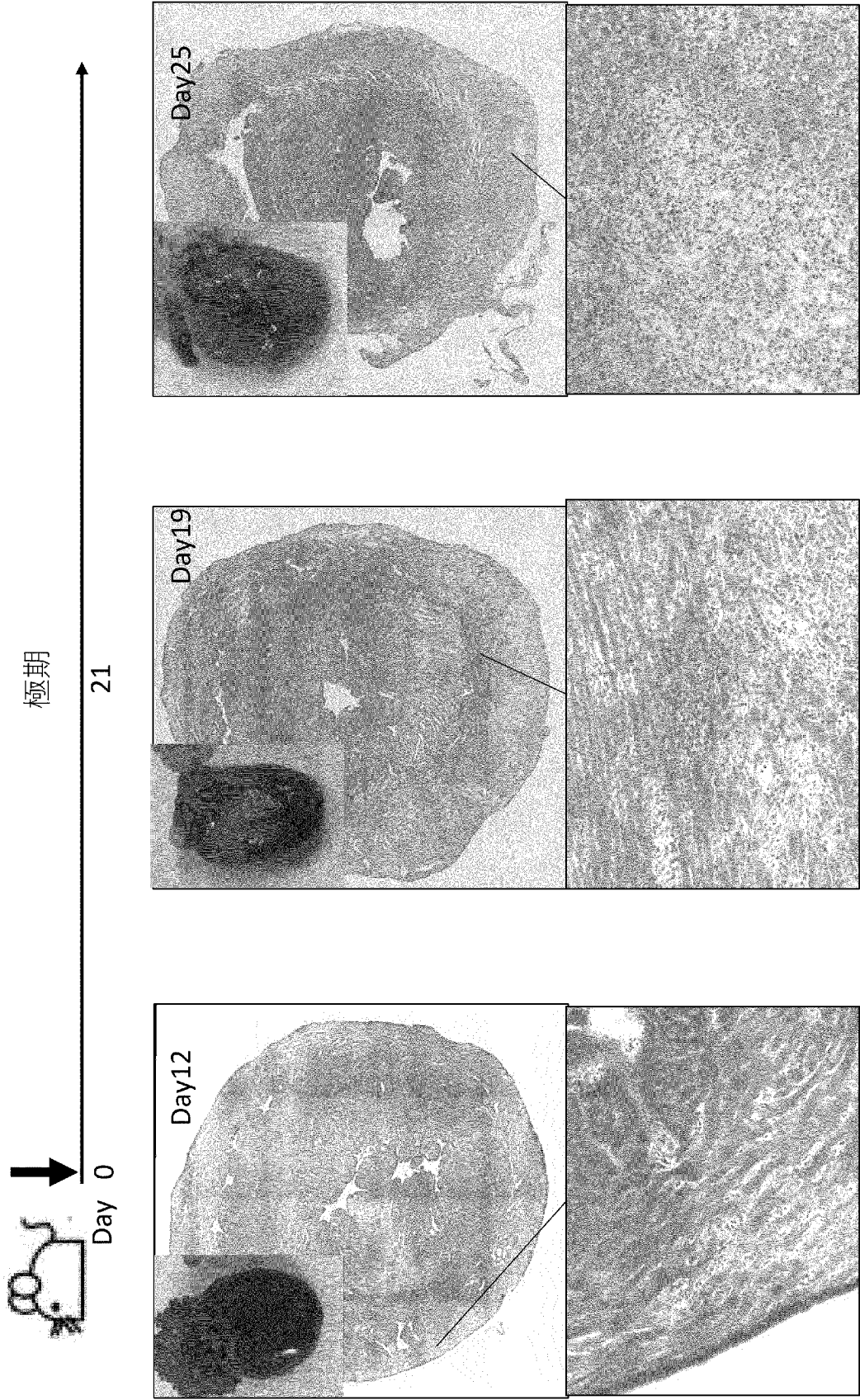
このことから、心筋炎においてVLA-4/Vcam-1経路が関与していることが示唆された。

## 請求の範囲

- [請求項1] VLA-4の阻害物質を含む、心筋炎を予防、又は治療するための組成物。
- [請求項2] 前記VLA-4の阻害物質が、  
抗VLA-4抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントであるか、  
、  
VLA-4アンタゴニストであるか、  
VLA-4 mRNAを標的とするsiRNA、shRNA、miRNA、及びアンチセンスRNAよりなる群から選ばれる少なくとも一種のRNA分子又は該RNA分子を発現することができるベクターであるか、  
VLA-4遺伝子を標的とするゲノム編集システムである、  
請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 前記抗VLA-4抗体が、VLA-4を中和する機能を有する、請求項2に記載の組成物。
- [請求項4] 前記VLA-4アンタゴニストが、カロテグラストメチルである、請求項2に記載の組成物。
- [請求項5] 前記心筋炎が、好酸球性心筋炎以外の心筋炎である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項6] 前記心筋炎が、免疫チェックポイント阻害剤に起因する心筋炎である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項7] 前記心筋炎が、心機能の低下を伴う、請求項1に記載の組成物。
- [請求項8] 抗Vcam-1抗体、又はその抗原結合ドメインフラグメントを含む組成物と組み合わせて使用される、請求項1に記載の組成物。
- [請求項9] VLA-4の阻害物質を含む、心筋炎の増悪を予防するための組成物。
- [請求項10] VLA-4の阻害物質を含む、心機能の低下を伴う心筋炎を治療するための組成物。
- [請求項11] VLA-4の阻害物質を含む、心筋炎を疑う患者、又は心筋炎患者の予後を改善するための組成物。

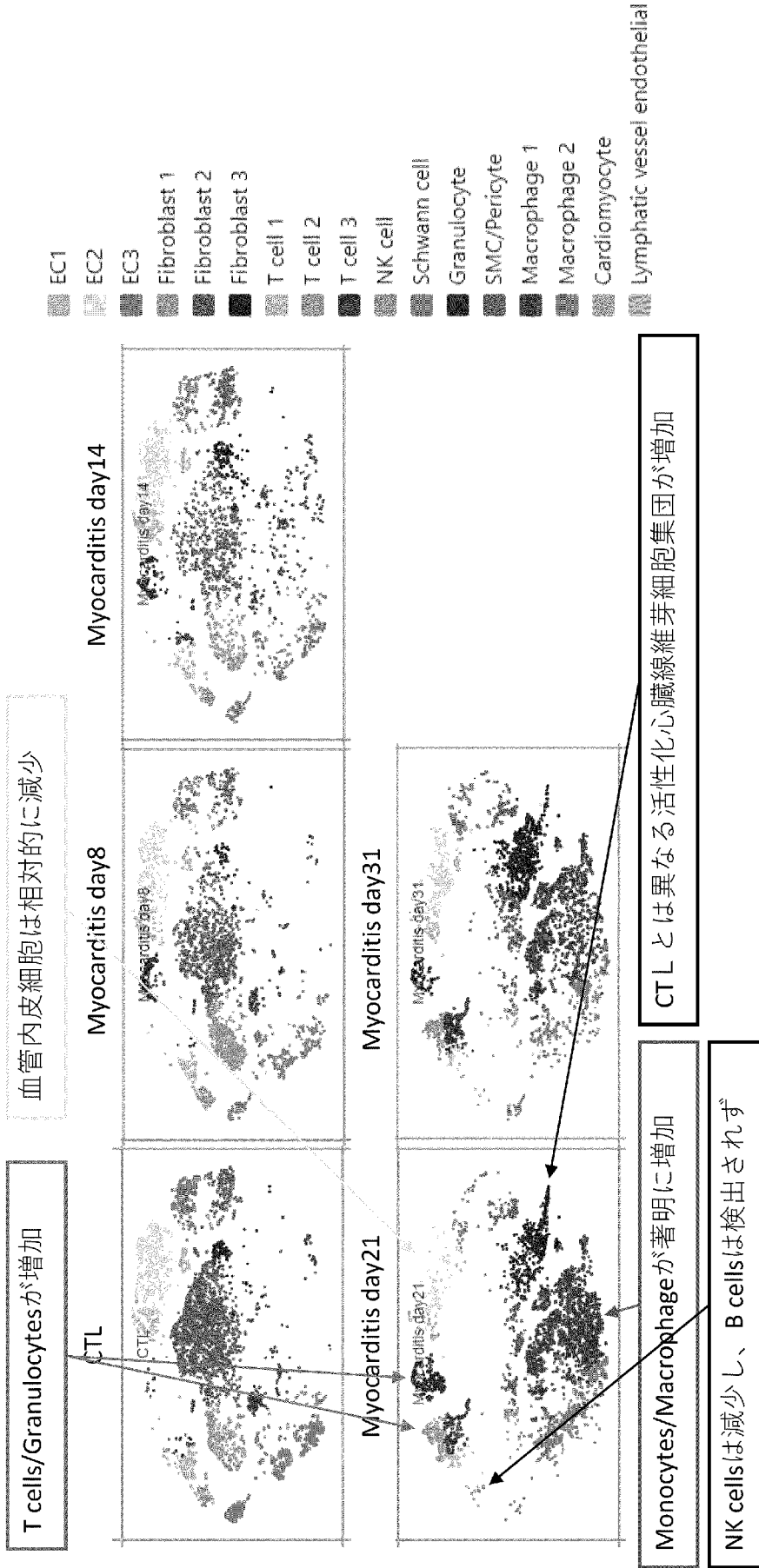
[図1]

Fig.1 Lewis rat Pig Cardiac Myosin 10mg/ml + Adjuvant (CFA)





[図2]



[図3]

# Vcam1発現

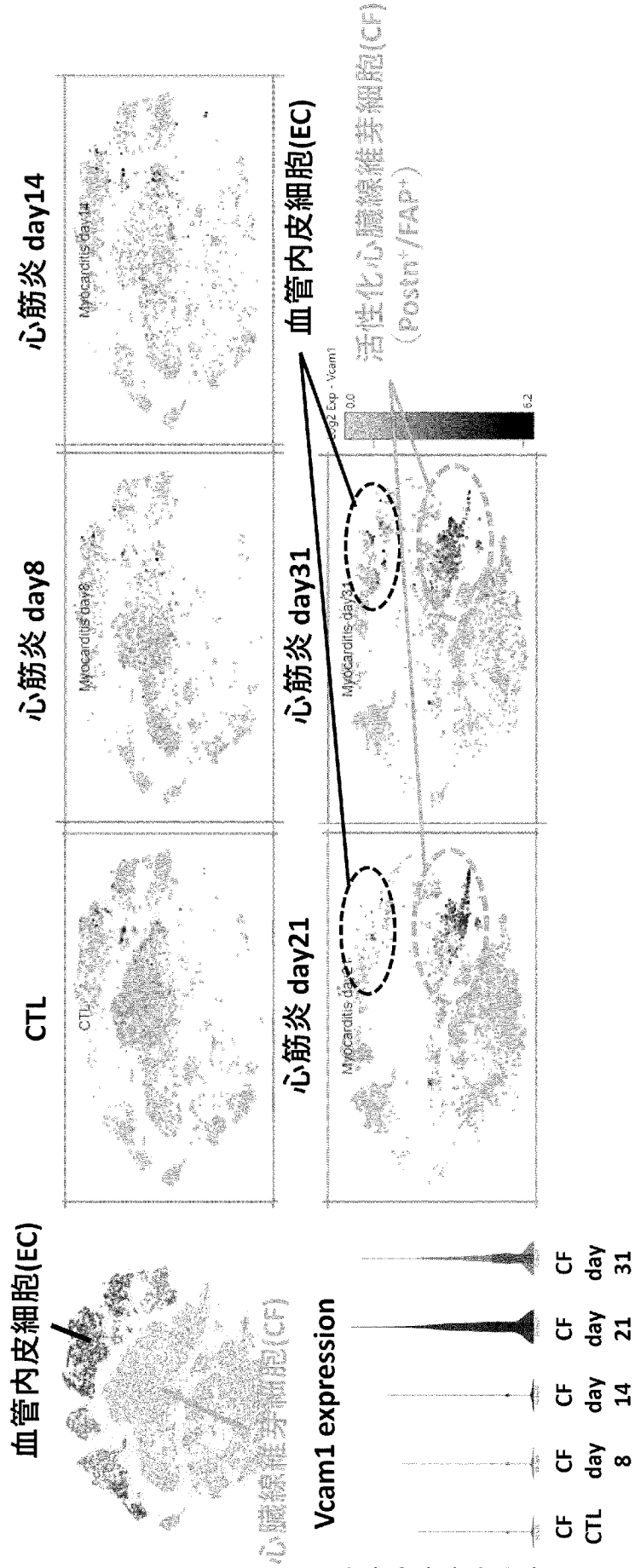
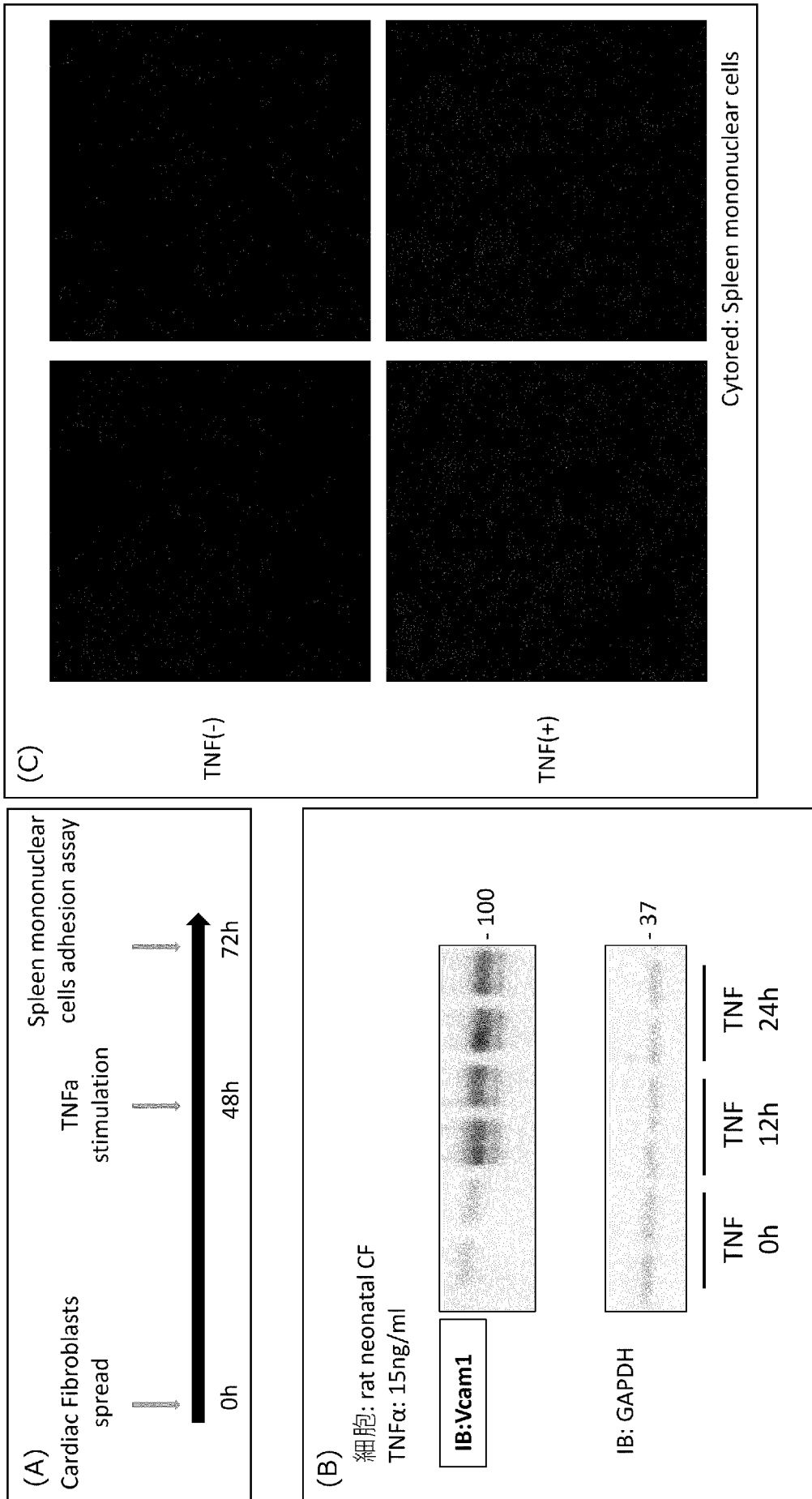
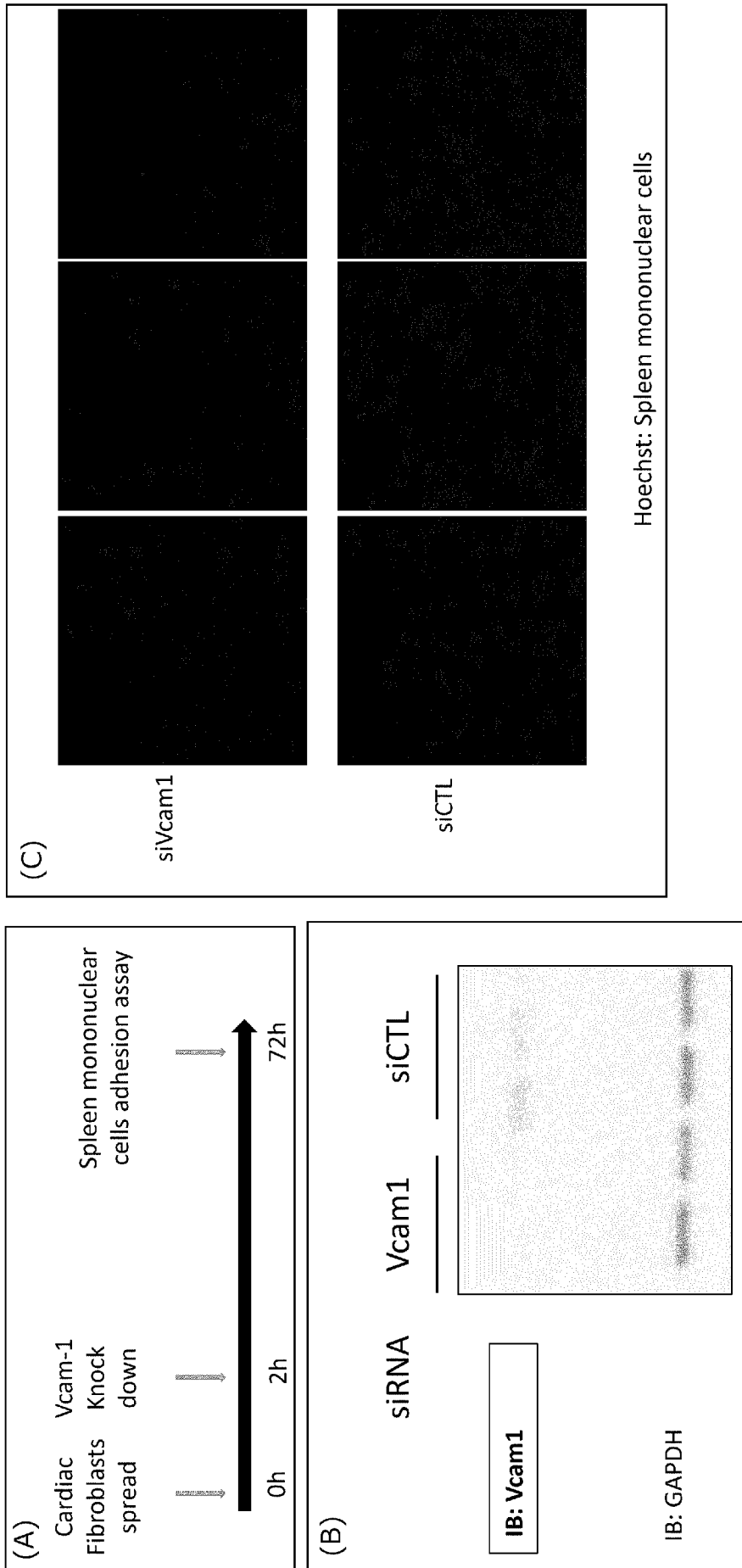


Fig. 3

[図4]

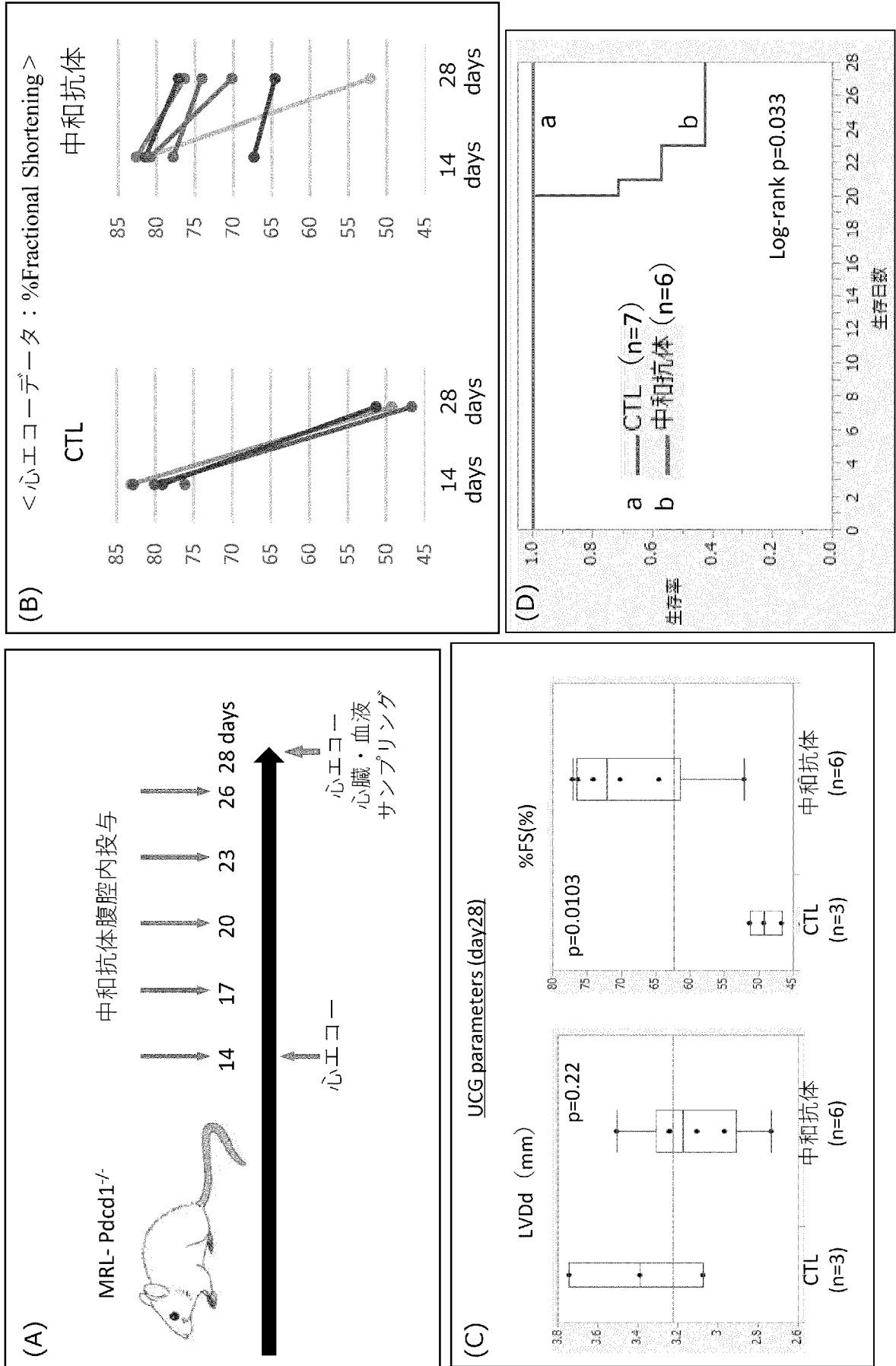


[5]



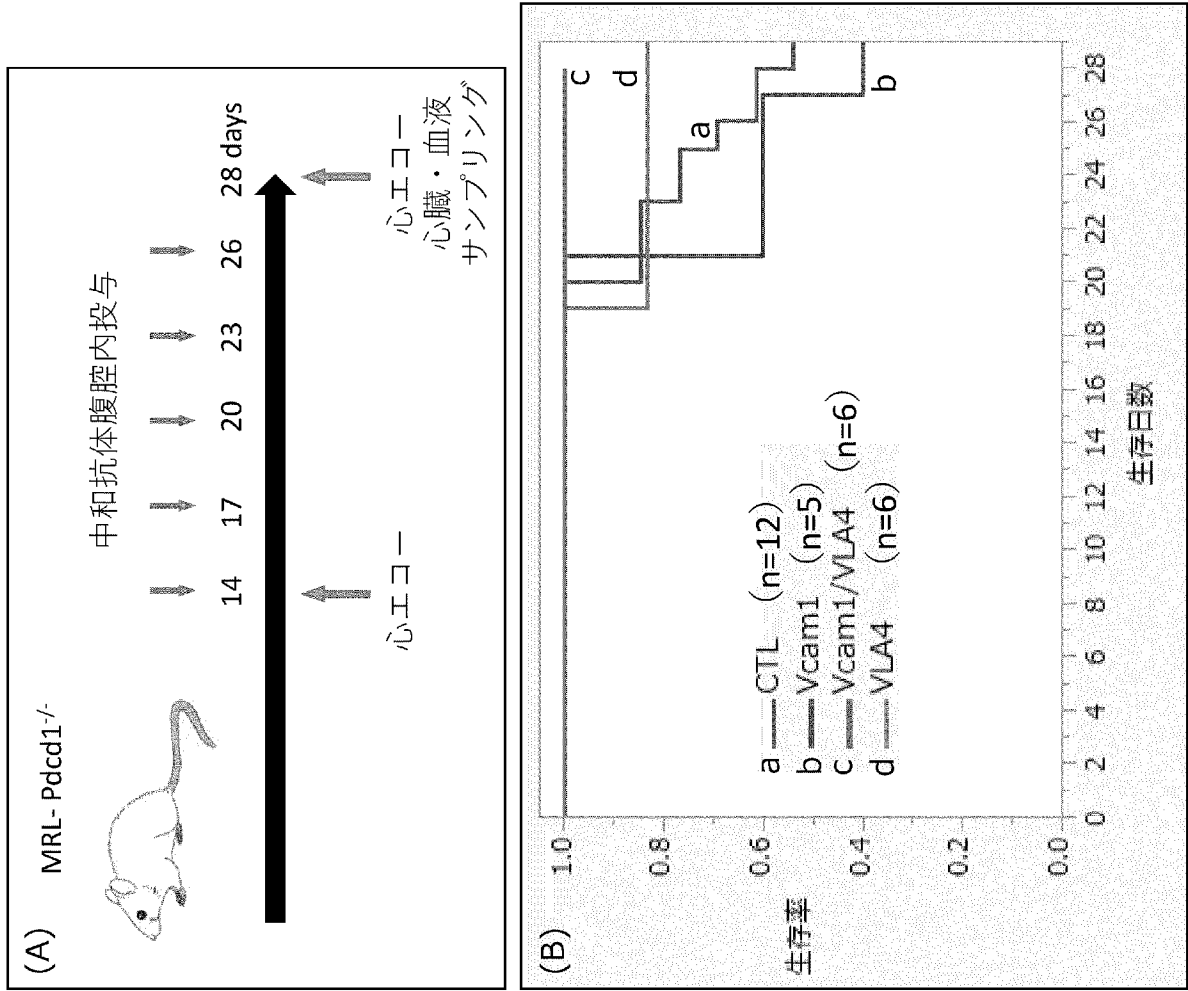
[図6]

Fig. 6



[図7]

Fig. 7



[図8]

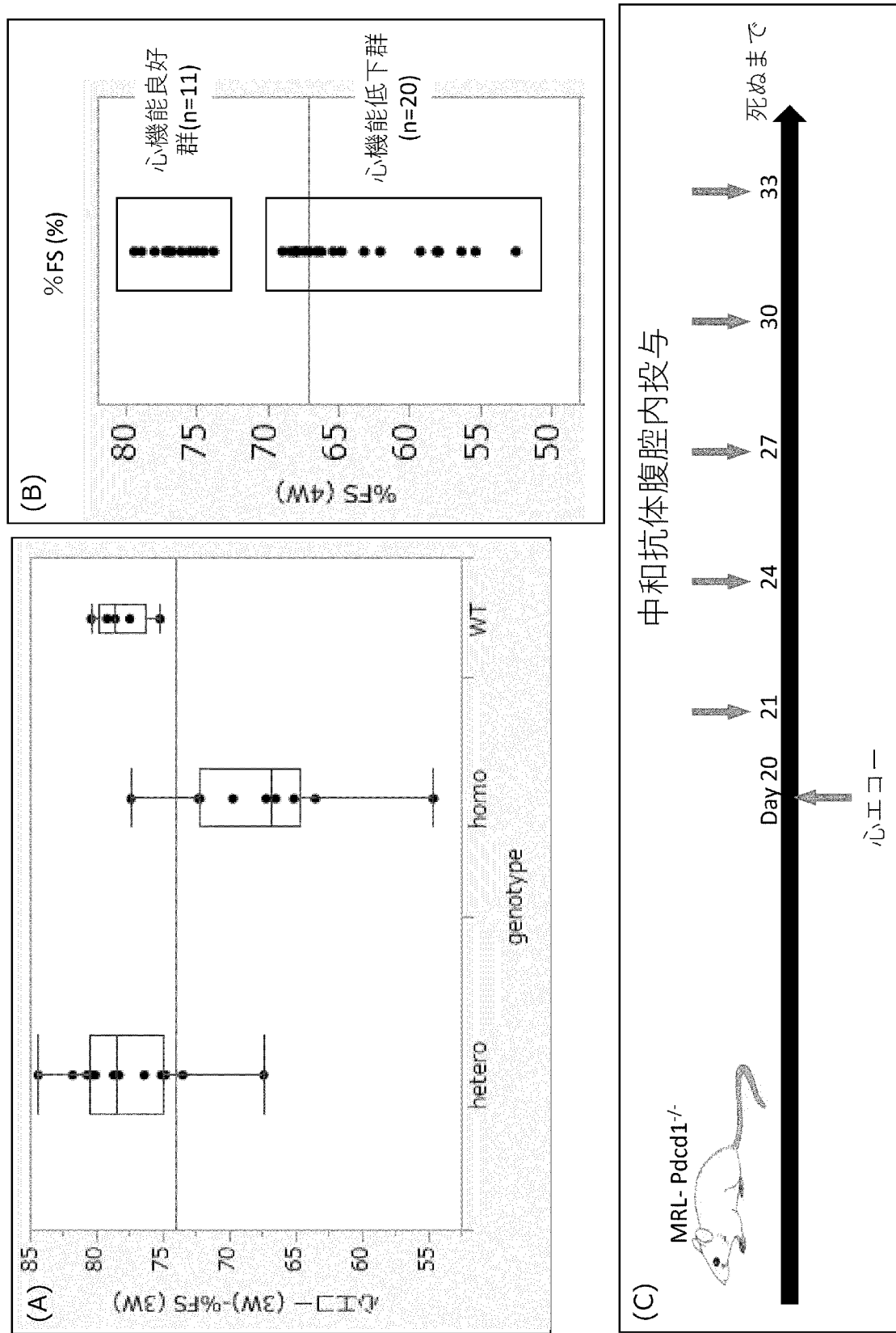


Fig. 8

[ 9 ]

		CTL	VLA4	normal EF
BW (g)	平均	9.85	11.09	11.63636
	標準偏差	2.1062078	1.833909	2.06217
	25%	8.4	9.175	10
	中央値	9.7	10.8	11.3
	75%	11.25	13.1	13
HR (bpm)	平均	359.887	392.783	536.3318
	標準偏差	136.44131	100.833	36.00411
	25%	243.7046	338.0853	507.0423
	中央値	373.2173	426.4087	541.3534
	75%	497.4138	456.5058	560.3113
%FS (%)	平均	62.740536	64.11208	76.55061
	標準偏差	6.2522019	4.291629	1.779386
	25%	56.6693	61.33264	75
	中央値	65.76594	65.06455	76.74271
	75%	67.87828	67.5147	77.96296

Fig. 9



[図10]

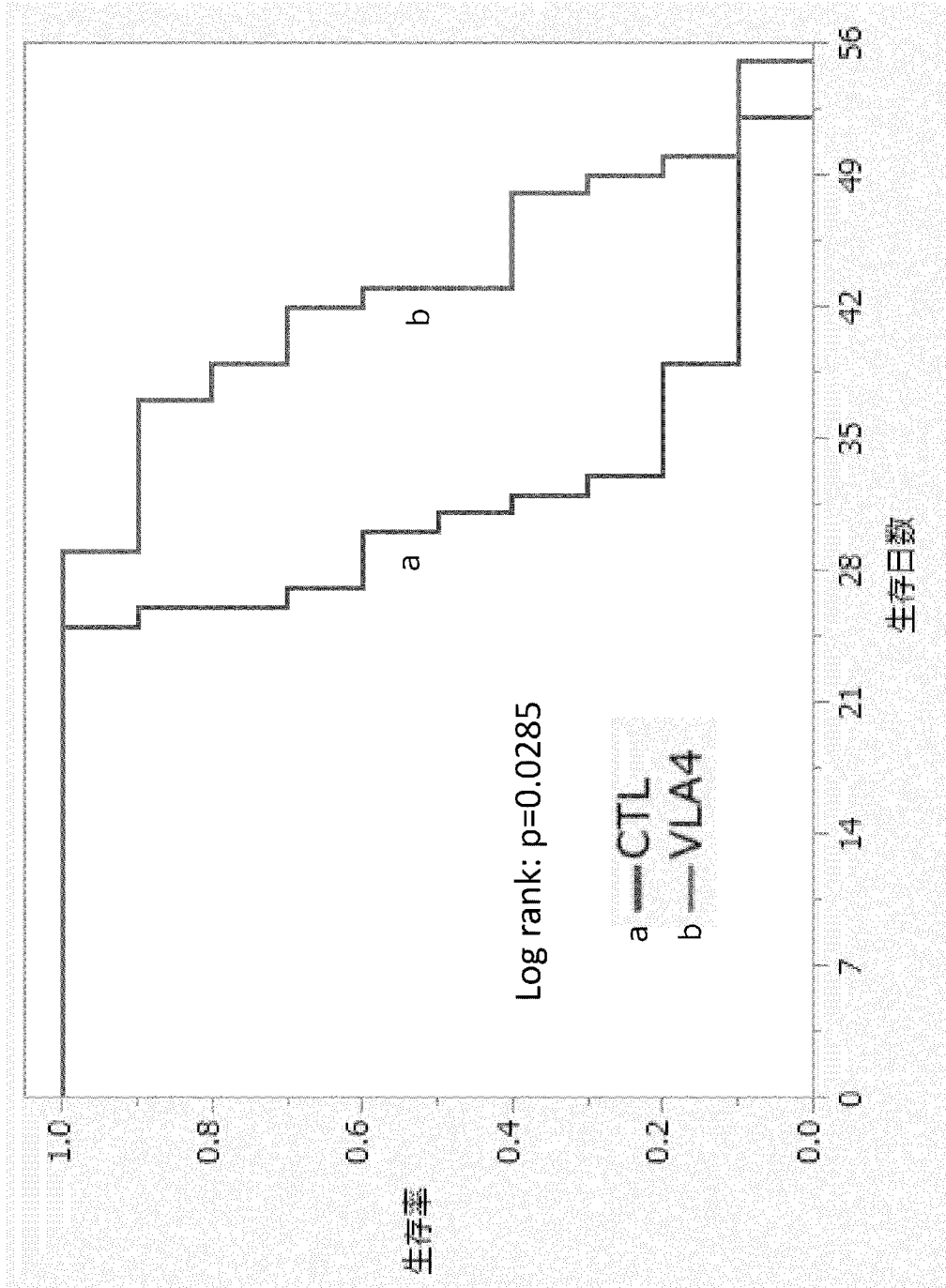


Fig. 10

[図11]

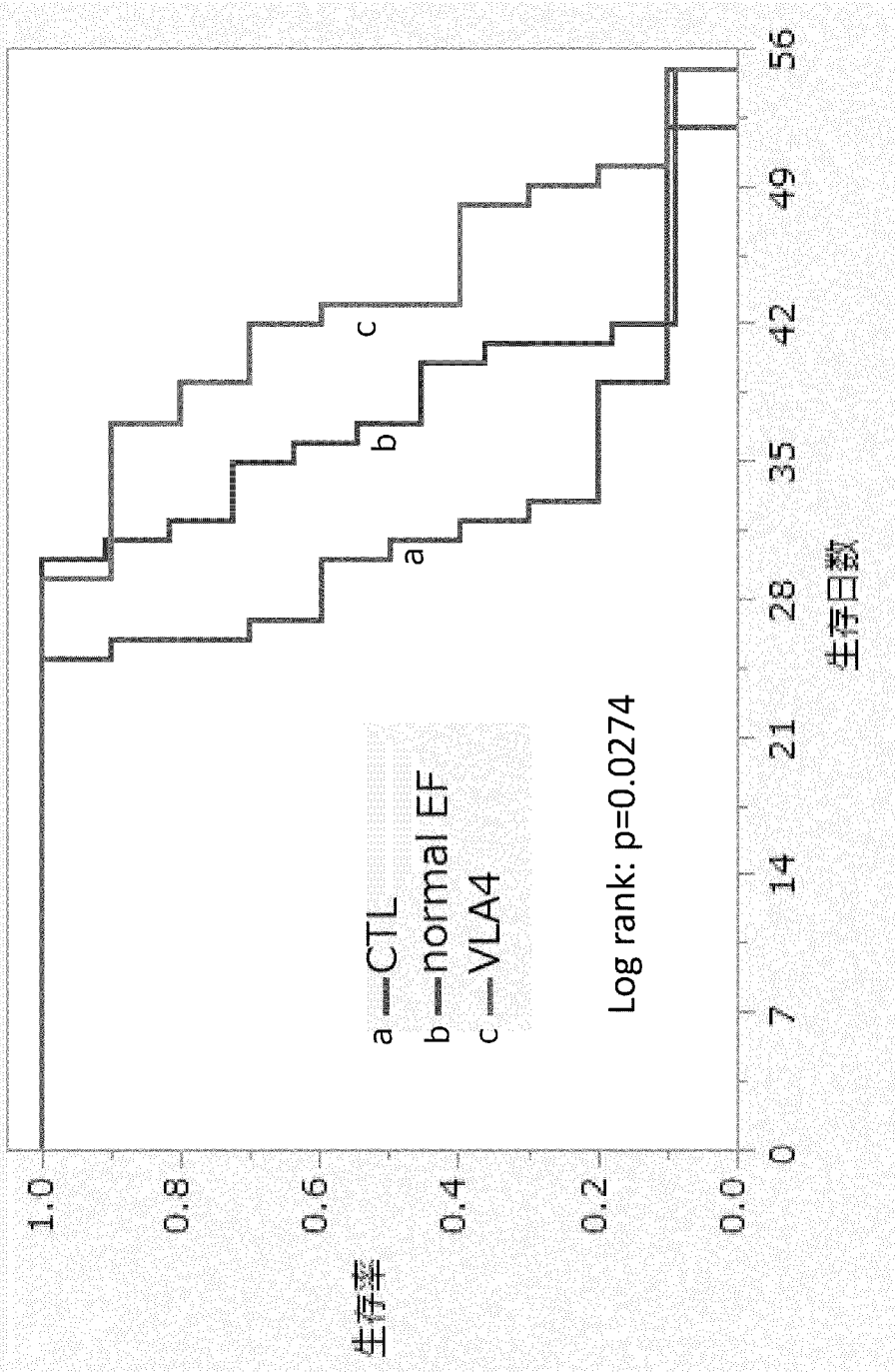


Fig. 11

[図12]

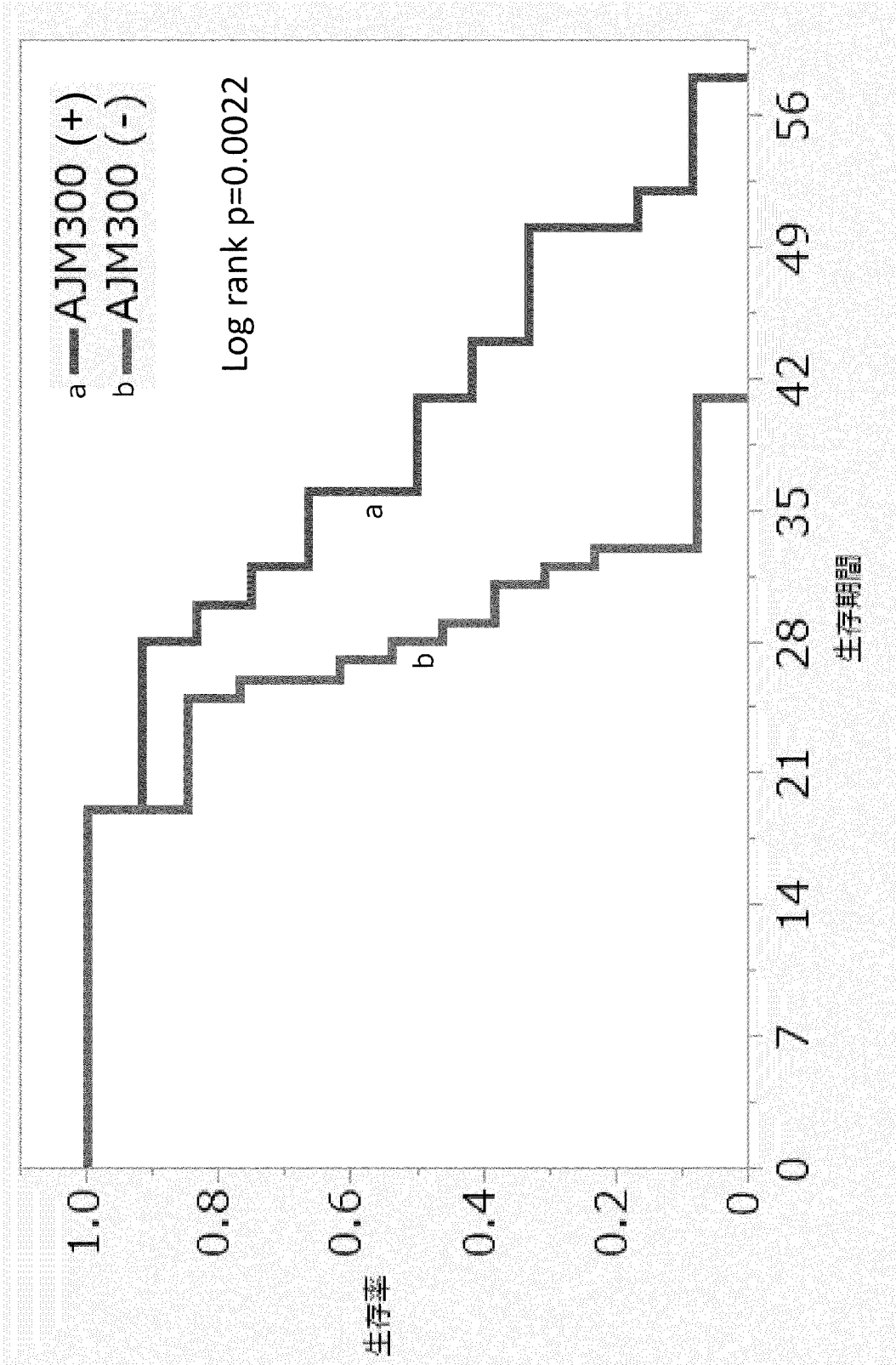
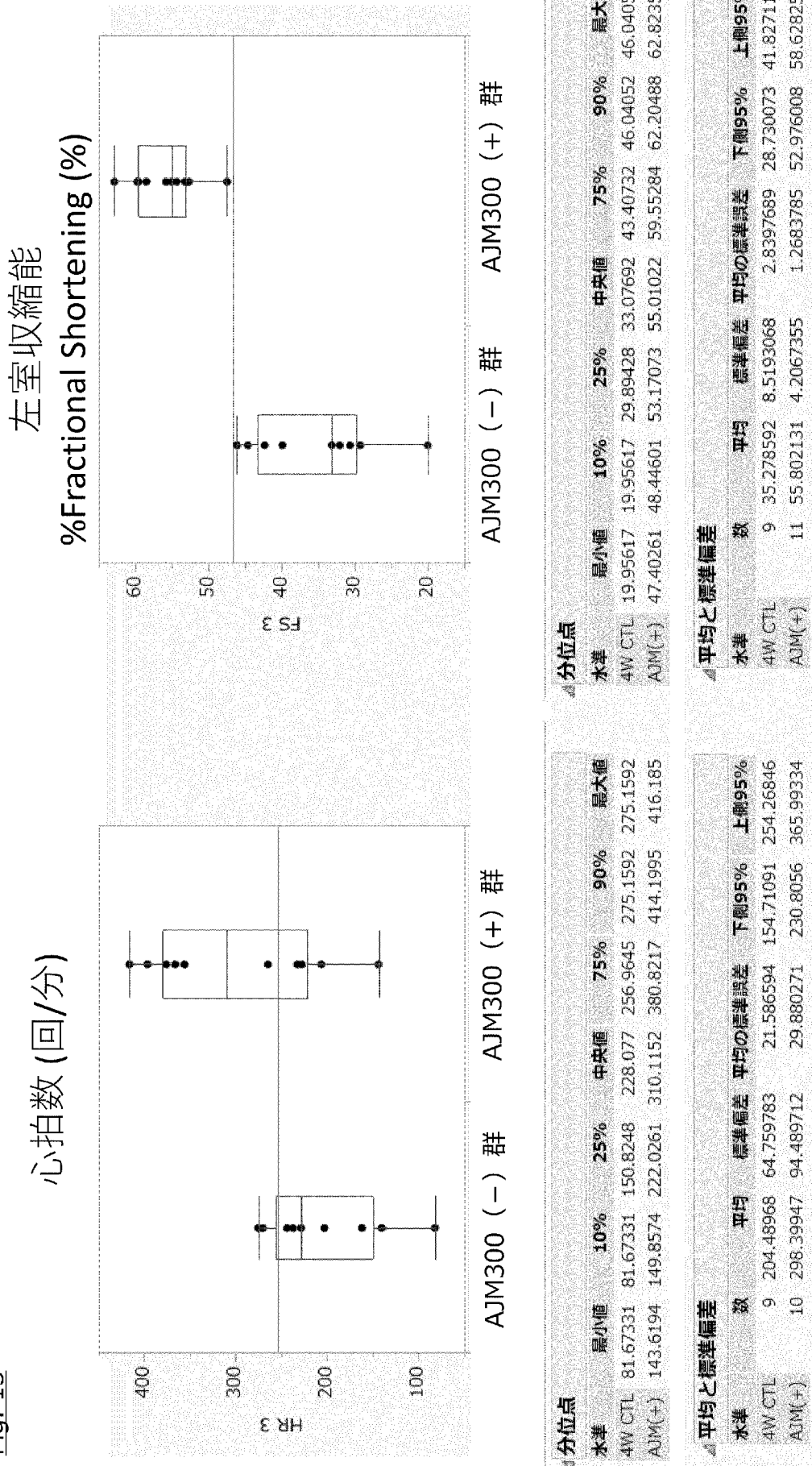


Fig. 12

Fig. 13

[図13]



[図14]

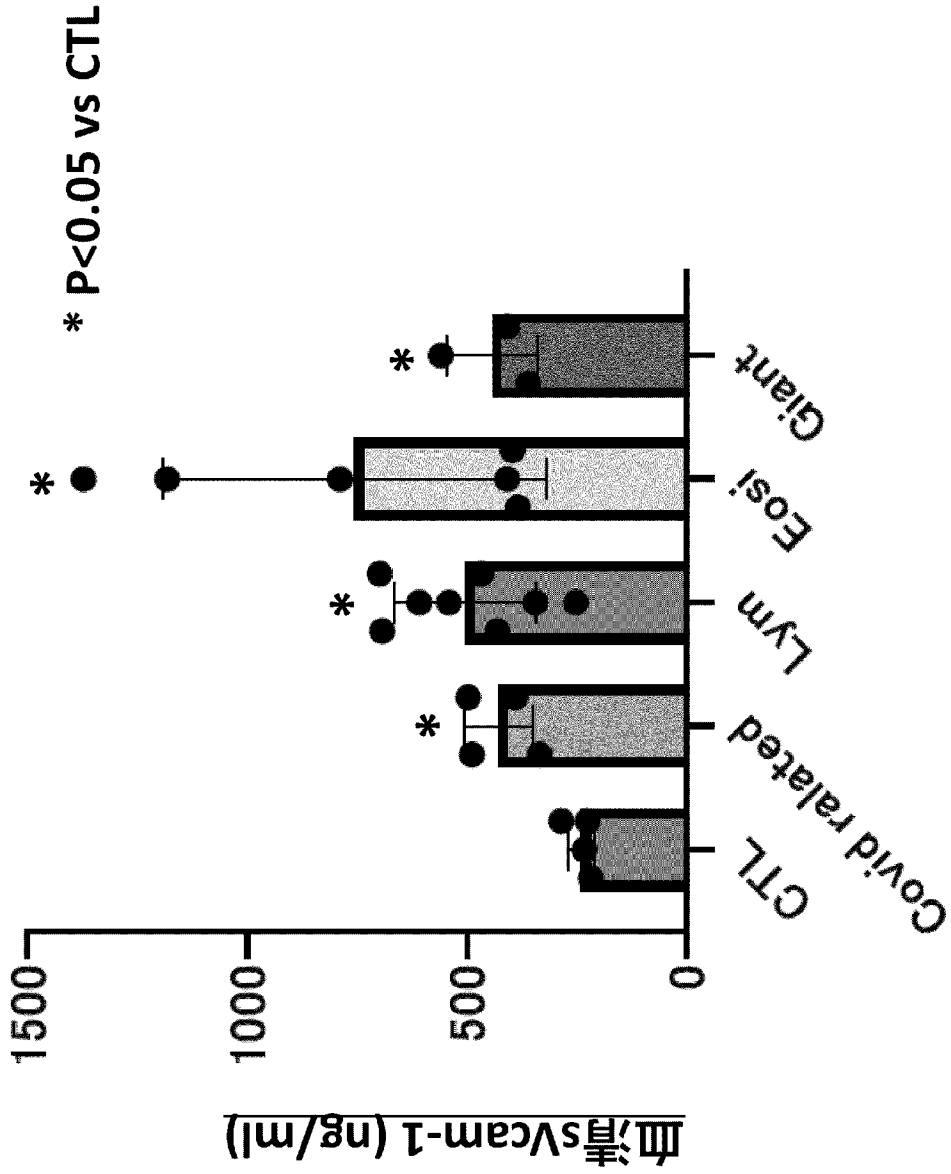


Fig. 14

[図15]

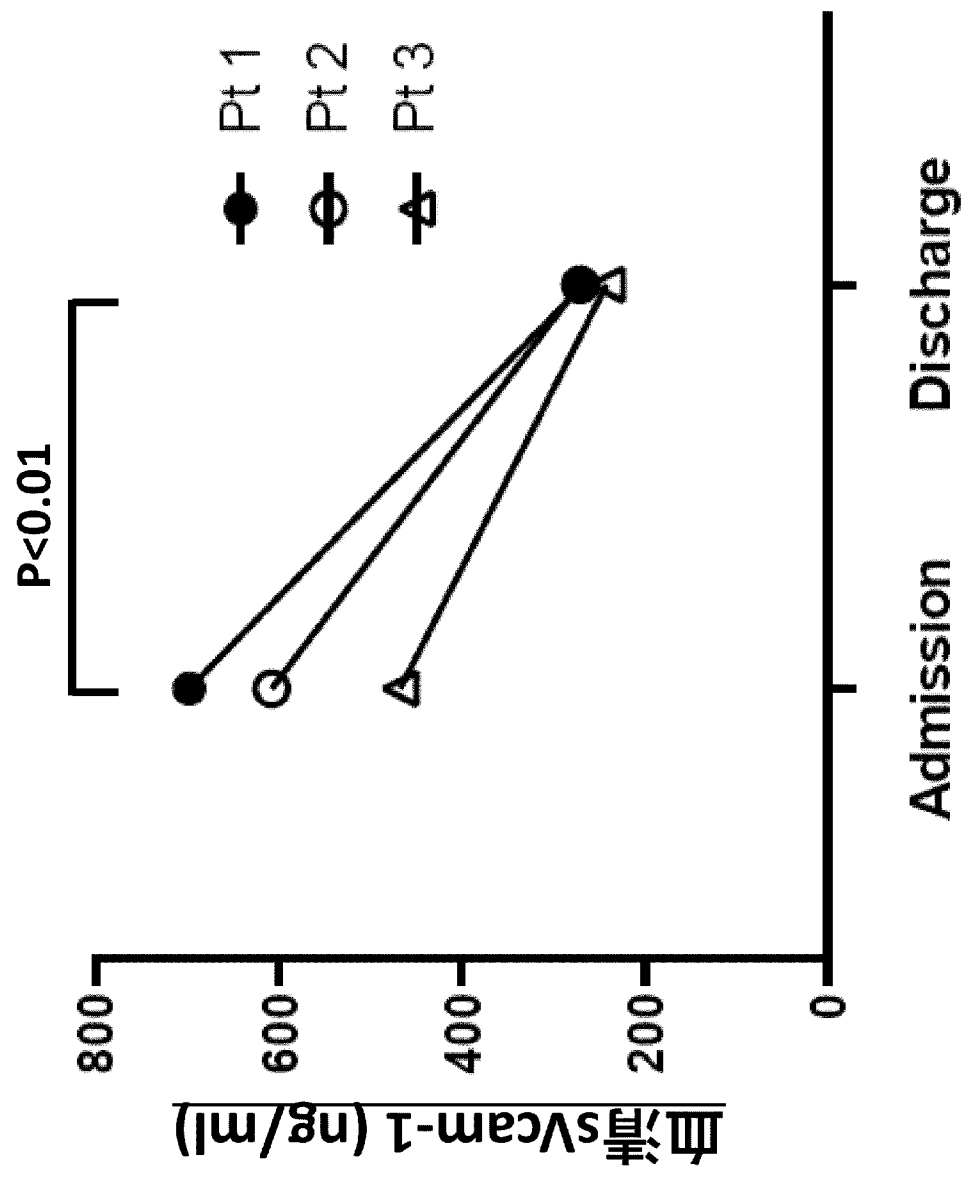


Fig. 15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/009251

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<p><b>A61K 45/00</b>(2006.01)i; <b>A61K 31/517</b>(2006.01)i; <b>A61K 31/7105</b>(2006.01)i; <b>A61K 31/713</b>(2006.01)i; <b>A61K 39/395</b>(2006.01)i; <b>A61K 48/00</b>(2006.01)i; <b>A61P 9/00</b>(2006.01)i; <b>A61P 43/00</b>(2006.01)i</p> <p>FI: A61K45/00; A61K31/517; A61K31/7105; A61K31/713; A61K39/395 D; A61K39/395 N; A61K48/00; A61P9/00; A61P43/00 111</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K45/00; A61K31/517; A61K31/7105; A61K31/713; A61K39/395; A61K48/00; A61P9/00; A61P43/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2023</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2023</p>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2009-510097 A (ELAN PHARMACEUTICALS, INC.) 12 March 2009 (2009-03-12) claims, paragraph [0020]	1-3, 5-7, 9-11
Y		2-4, 8
Y	WO 2011/122619 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 06 October 2011 (2011-10-06) claims, p. 18, 2nd paragraph	4
Y	SEKO, Y. et al. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. J. Pathol. 1996, vol. 180, no. 4, pp. 450-454 abstract, p. 454, left column, 1st paragraph	8
X	GRABMAIER, U. et al. Blocking VCAM-1/VLA-4 Axis Ameliorates Inflammation and Fibrosis in Experimental Autoimmune Myocarditis. Circulation. 2012, vol. 126. no. supplement 21, abstract 14885, <10.1161/circ.126.suppl_21.A14885> abstract	1-3, 5-7, 9-11
Y		2-4, 8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 April 2023		30 May 2023
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
<p>Japan Patent Office (ISA/JP)</p> <p>3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915</p> <p>Japan</p>		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2023/009251**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2009-510097	A	12 March 2009	US 2007/0142416 A1 claims, paragraph [0059]	
				WO 2007/041270 A1	
				EP 1940826 A1	
				KR 10-2008-0059268 A	
				CN 101273034 A	
<hr/>					
WO	2011/122619	A1	06 October 2011	US 2013/0066072 A1 claims, paragraph [0081]	
				EP 2554542 A1	
<hr/>					



<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 45/00(2006.01)i; A61K 31/517(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i;                  A61K 39/395(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i                  FI: A61K45/00; A61K31/517; A61K31/7105; A61K31/713; A61K39/395 D; A61K39/395 N; A61K48/00; A61P9/00;                  A61P43/00 111</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; A61K31/517; A61K31/7105; A61K31/713; A61K39/395; A61K48/00; A61P9/00; A61P43/00</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>JP 2009-510097 A (エラン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 12.03.2009 (2009-03-12) 特許請求の範囲、[0020]段落</td> <td>1-3, 5-7, 9-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>2-4, 8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2011/122619 A1 (味の素株式会社) 06.10.2011 (2011-10-06) 特許請求の範囲、第18頁第2段落</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>SEKO, Y., et al., Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3, J. Pathol., 1996, Vol.180, No.4, p.450-454 Abstract, 第454頁左欄第1段落</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>GRABMAIER, U., et al., Blocking VCAM-1/VLA-4 Axis Ameliorates Inflammation and Fibrosis in Experimental Autoimmune Myocarditis, Circulation, 2012, Vol.126, No. Suppl.21, Abstract.14885, &lt;10.1161/circ.126.suppl_21.A14885&gt; Abstract</td> <td>1-3, 5-7, 9-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>2-4, 8</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <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>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>			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	JP 2009-510097 A (エラン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 12.03.2009 (2009-03-12) 特許請求の範囲、[0020]段落	1-3, 5-7, 9-11	Y		2-4, 8	Y	WO 2011/122619 A1 (味の素株式会社) 06.10.2011 (2011-10-06) 特許請求の範囲、第18頁第2段落	4	Y	SEKO, Y., et al., Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3, J. Pathol., 1996, Vol.180, No.4, p.450-454 Abstract, 第454頁左欄第1段落	8	X	GRABMAIER, U., et al., Blocking VCAM-1/VLA-4 Axis Ameliorates Inflammation and Fibrosis in Experimental Autoimmune Myocarditis, Circulation, 2012, Vol.126, No. Suppl.21, Abstract.14885, <10.1161/circ.126.suppl_21.A14885> Abstract	1-3, 5-7, 9-11	Y		2-4, 8
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	JP 2009-510097 A (エラン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 12.03.2009 (2009-03-12) 特許請求の範囲、[0020]段落	1-3, 5-7, 9-11																					
Y		2-4, 8																					
Y	WO 2011/122619 A1 (味の素株式会社) 06.10.2011 (2011-10-06) 特許請求の範囲、第18頁第2段落	4																					
Y	SEKO, Y., et al., Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3, J. Pathol., 1996, Vol.180, No.4, p.450-454 Abstract, 第454頁左欄第1段落	8																					
X	GRABMAIER, U., et al., Blocking VCAM-1/VLA-4 Axis Ameliorates Inflammation and Fibrosis in Experimental Autoimmune Myocarditis, Circulation, 2012, Vol.126, No. Suppl.21, Abstract.14885, <10.1161/circ.126.suppl_21.A14885> Abstract	1-3, 5-7, 9-11																					
Y		2-4, 8																					
<p>国際調査を完了した日</p> <p>28.04.2023</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>30.05.2023</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>柴原 直司 4U 3534</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>																						

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号  
 PCT/JP2023/009251

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2009-510097	A	12.03.2009	US	2007/0142416	A1	特許請求の範囲、[0059]段落
				WO	2007/041270	A1	
				EP	1940826	A1	
				KR	10-2008-0059268	A	
				CN	101273034	A	
-----							
WO	2011/122619	A1	06.10.2011	US	2013/0066072	A1	特許請求の範囲、[0081]段落
				EP	2554542	A1	
-----							