

(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
2018年4月26日(26.04.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/074610 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/038091

(22) 国際出願日: 2017年10月20日(20.10.2017)

(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 2016-207046 2016年10月21日(21.10.2016) JP

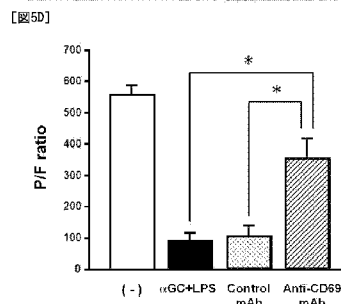
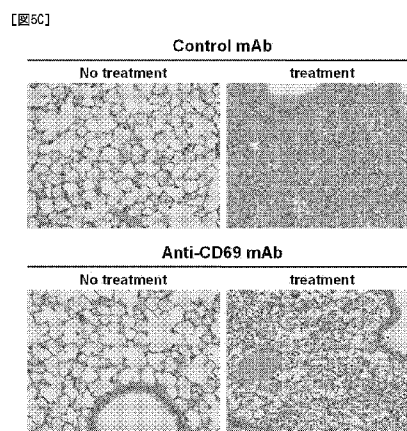
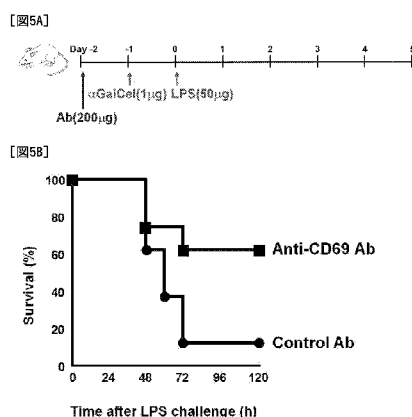
(71) 出願人: 国立大学法人山口大学(YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田1677-1 Yamaguchi

(JP). 国立大学法人千葉大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 Chiba (JP).

(72) 発明者: 長谷川 明洋(HASEGAWA, Akihiro); 〒7558505 山口県宇部市南小串1丁目1-1 国立大学法人山口大学大学院医学系研究科内 Yamaguchi (JP). 荻野 英賢(OGINO, Hidetaka); 〒7558505 山口県宇部市南小串1丁目1-1 国立大学法人山口大学大学院医学系研究科内 Yamaguchi (JP). 中山 俊憲(NAKAYAMA, Toshinori); 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究科内 Chiba (JP).

(54) Title: COMPOSITION FOR TREATING FULMINANT ACUTE PNEUMONIA INCLUDING CD69 ANTAGONIST

(54) 発明の名称: CD69アンタゴニストを含む劇症型急性肺炎治療用組成物



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing an effective means for preventing and/or treating fulminant acute pneumonia. Provided are: a drug or pharmaceutical composition to be used to prevent and/or treat fulminant acute pneumonia, the drug or pharmaceutical composition including a CD69 antagonist, e.g., an antibody (anti-CD69 antibody) that specifically recognizes CD69; an intra-alveolar neutrophil aggregation inhibitor that includes a CD69 antagonist, e.g., an antibody (anti-CD69 antibody) that specifically recognizes CD69; a pulmonary neutrophil migration





(74) 代理人: 庄 司 隆, 外 (SHOJI, Takashi et al.);
〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目 6
番 1 3 号 御幸ビル 3 0 7 号 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

規則4.17に規定する申立て:

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

inhibitor that includes a CD69 antagonist, e.g., an antibody (anti-CD69 antibody) that specifically recognizes CD69; and a method for preventing and/or treating fulminant acute pneumonia, the method including the administration of a CD69 antagonist, for example, an antibody (anti-CD69 antibody) that specifically recognizes CD69.

(57) 要約: 劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療に有効な手段を提供することを課題とする。CD69 アンタゴニスト、例えばCD69を特異的に認識する抗体 (抗CD69抗体) を含む、劇症型急性肺炎を予防及び／又は治療するために使用される薬剤又は医薬組成物、CD69 アンタゴニスト、例えばCD69を特異的に認識する抗体 (抗CD69抗体) を含む、肺胞内の好中球凝集抑制剤、CD69 アンタゴニスト、例えばCD69を特異的に認識する抗体 (抗CD69抗体) を含む、肺の好中球浸潤抑制剤、並びに、CD69 アンタゴニスト、例えばCD69を特異的に認識する抗体 (抗CD69抗体) を投与することを含む、劇症型急性肺炎を予防及び／又は治療する方法を提供する。

明 細 書

発明の名称：

CD69アンタゴニストを含む劇症型急性肺炎治療用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、CD69アンタゴニストを含む組成物であって、劇症型急性肺炎を予防及び／又は治療するために使用される薬剤又は医薬組成物に関する。また、本発明は、CD69アンタゴニストを含む肺胞内の好中球凝集抑制剤に関する。さらに、本発明は、CD69アンタゴニストを含む肺の好中球浸潤抑制剤に関する。加えて、本発明は、CD69アンタゴニストを含む劇症型急性肺炎の予防剤及び／又は治療剤に関する。また、本発明は、CD69アンタゴニストを投与することを含む劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療方法に関する。

本出願は、参照によりここに援用されるところの日本特願2016-207046号の優先権を請求する。

背景技術

[0002] 劇症型急性肺炎は、急性呼吸促拍症候群（acute respiratory distress syndrome；以下、ARDSと略称することがある）と比較してより重篤な症状を示す呼吸促拍症候群をいう。急性肺炎は、一般的に、急激に症状が発生し、そして、症状が急速に悪化し、短い症状改善期間の後、急速に治癒するが、劇症型急性肺炎は、急激に症状が発生し、肺炎の進行が急激であり予後が不良、すなわち重症化しやすく死亡リスクも高い。

[0003] ARDSは、体内への何らかの侵襲が引き金となって発症する肺胞領域の非特異的炎症による非心原性肺水腫で、重篤な低酸素血症と肺コンプライアンスの低下が特徴である。また、激しい好中球浸潤と肺胞の広範な傷害（diffuse alveolar damage；DAD）を呈する病理像が特徴である。侵襲から発症までの期間は通常数日以内で、発症後の死亡率

は40%を越えている。集中治療室等で人工呼吸を受けている患者の約20%に発症する等、臨床現場で大きな問題となっている疾患である。ARDSの発症にともない肺の毛細血管の内皮細胞や肺胞上皮細胞が傷害され、肺の浮腫や繊維化が誘導されて呼吸困難により死に至る。現在その治療は機械的人工換気その他、ステロイド剤や好中球エステラーゼ阻害薬等の薬物療法が試みられているが、有効な治療法となり得ていない。また、これまでの研究からARDSの発症には浸潤した活性化好中球が産生する脂質メディエーターやインターフェロン γ (IFN γ)等のサイトカインが関与していること等が報告されているが、その詳細な発症メカニズムは明らかになっていない。

[0004] 最近、鳥インフルエンザ(H7N9、H5N1等)のヒトへの感染と世界的な流行の兆候がみられ、30~60%に達する高い感染致死率を示しているが、主な死因はウイルスの増殖による直接的な影響よりも宿主側の過剰な免疫応答の結果として起こる劇症型のARDS(Fulminant ARDS; 以下、FARDSと略称する)、すなわち劇症型急性肺炎であることがわかってきた。そのため、将来的なパンデミックに備えた治療法の確立が急務の課題となっている。

[0005] ARDS及びFARDSの識別は、吸入酸素濃度に対する動脈血中の酸素分圧の比率(P/F比)に基づいて行われる。健常人のP/F比は400~500程度である。P/F比が300以下である場合は急性肺損傷(acute lung injury; ALI)、200以下の場合はARDS、100以下である場合はFARDSと判定される。ALIは、敗血症、肺炎、外傷、誤嚥等の原因により引き起こされる急性・進行性の呼吸疾患であり、重症化するとARDSやFARDSに至る。

[0006] CD69分子(以下、単にCD69と称することがある)はc型レクチンファミリー(c-type lectin family)に属するII型の膜分子であり、早期活性化マーカー分子としてリンパ球の活性化の指標に広く用いられている。T細胞及びB細胞の両方が刺激後数時間以内にCD6

9を発現する。また、活性化された好中球、好酸球、NK細胞、及びマクロファージはその細胞表面上にCD69を発現する。一方、血小板、単球、ランゲルハンス細胞では、CD69の構成的発現が認められている。CD69の機能としては、コレセプター分子としての役割の他、細胞間接着分子として細胞の集積や浸潤に関与している可能性があるが、詳細はよくわかっていない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2007-022993号公報

特許文献2：国際公開第2013/161814号パンフレット

特許文献3：米国特許出願公開第2012/0121503号明細書

特許文献4：米国特許第US 8,440,195号明細書

特許文献5：米国特許出願公開第2013/0224111号明細書

特許文献6：特開2012-102100号公報

特許文献7：特許第5938876号明細書

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Murata, K., et al.: CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *Int. Immunol.* 15: 987-992 (2003).

非特許文献2：Hasegawa, A., et al.: CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 183:8203-8215 (2009).

非特許文献3：Hasegawa, A., et al.: Crucial role for CD69 in the pathogenesis of dextran sulphate sodium-induced colitis. *PLoS ONE* 8(6):e65494 (2013).

非特許文献4：Yamauchi, K., et al.: Attenuation of lung inflammation and fibrosis in CD69-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Respiratory Research* 12:131 (2011).

非特許文献5：Kohler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fuse

d cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(5517):495-497 (1975).

非特許文献6: Eppstein, D. A., et al.: Biological activity of liposome-encapsulated murine interferon gamma is mediated by a cell membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82(11):3688-3692 (1985).

非特許文献7: Hwang, K. J., et al.: Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes: a kinetic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(7):4030-4034 (1980).

非特許文献8: Martin, F. J., et al.: Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting. *J. Biol. Chem.* 257(1):286-288 (1982).

非特許文献9: Gabizon, A., et al.: Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Doxorubicin Encapsulated in Stable Liposomes With Long Circulation Times. *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484-1488 (1989).

非特許文献10: Hermann, T. and Patel, D. J.: Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science* 287(5454):820-825 (2000).

非特許文献11: Burgstaller, P. et al.: Aptamers and aptazymes: accelerating small molecule drug discovery. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5(5):690-700 (2002).

非特許文献12: Hoppe-Seyler, F., et al.: Peptide Aptamers: Specific Inhibitors of Protein Function. *Curr. Mol. Med.* 4(5):529-538 (2004).

非特許文献13: Aagaard, L., et al.: A facile lentiviral vector system for expression of doxycycline-inducible shRNAs: knockdown of the pre-miRNA processing enzyme Drosha. *Mol. Ther.* 15(5):938-45 (2007).

非特許文献14: Aoyagi, T., et al.: Activation of pulmonary invariant NKT cells leads to exacerbation of acute lung injury caused by LPS through local production of IFN-gamma and TNF-alpha by Gr-1+ monocytes. *Int. Immunol.* 23(2):97-108 (2010).

非特許文献15: Landgraf M.A. et al.: Leptin Downregulates LPS-Induced Lung Injury: Role of Corticosterone and Insulin. *Cell. Physiol. Biochem.* 33:835-846 (2014).

非特許文献16: Huo M., et al.: Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. *J. Surg. Res.* 180(1):e47-54 (2013)

非特許文献17: Weiser J. N., et al.: Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Detrimental in Pneumococcal Pneumonia and a Target for Therapeutic Immunomodulation. *J. Infect. Dis.* 212:1677-1682 (2015).

非特許文献18: Wilson, R., et al.: Protection against *Streptococcus pneumoniae* lung infection after nasopharyngeal colonization requires both humoral and cellular immune responses. *Mucosal Immunol.* 8(3):627-623 (2015).

非特許文献19: Kamata, T., et al.: src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 111(1):109-119 (2003).

非特許文献20: Vintersten, K., et al.: Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals. *Genesis* 40(4):241-256 (2004).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明者らはこれまでにCD69ノックアウトマウスを作製し、その解析を行って好中球上のCD69分子が関節炎の発症に重要であること（非特許文献1）、CD69ノックアウトマウスではアレルギー性喘息や腸炎が起きないこと（非特許文献2、3）等を明らかにしてきた。そして、CD69分子をターゲットとするアレルギー性喘息治療薬（特許文献1、2）、腸炎治療薬（特許文献3、4）、及び肝炎治療薬（特許文献3、5-7）を開示してきた。また、CD69ノックアウトマウスでは、ブレオマイシン気管内投

与により誘導された肺の炎症及び線維化が野生マウスと比較して軽減されたことが報告されている（非特許文献４）。しかしながら、ブレオマイシン気管内投与により誘導された肺炎モデルは上皮細胞自体が繊維化したモデルであり、劇症型急性肺炎とは異なる肺炎のモデルである。これまで、劇症型急性肺炎の発症や増悪におけるＣＤ６９の役割は知られていない。

そこで、本発明の目的は、劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療に有効な手段を提供することである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは上記目的を達成すべく、ＦＡＲＤＳの発症及び劇症化メカニズムの解析を行い、新規治療法を開発することを目的に治療ターゲット分子の探索を鋭意行ってきた。そして、マウスＦＡＲＤＳモデルにおけるＦＡＲＤＳの症状、例えば高い死亡率や肺への好中球の著しい浸潤が、ＣＤ６９を特異的に認識する抗体（以下、抗ＣＤ６９抗体と称する）を投与することにより軽減されること、及び、マウスＦＡＲＤＳモデルにおいてＣＤ６９ノックアウトマウス由来の好中球の肺への浸潤が少ないことを見出した。そして、ＣＤ６９分子がＦＡＲＤＳに対する新規治療法のターゲット分子になり得ることを明らかにし、本発明を完成した。

[0011] すなわち、本発明は、ＣＤ６９アンタゴニストを含む劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療用医薬組成物に関する。

[0012] また、本発明は、ＣＤ６９アンタゴニストが抗ＣＤ６９抗体である上記医薬組成物に関する。

[0013] 加えて、本発明は、ＣＤ６９アンタゴニストを含む劇症型急性肺炎の予防剤及び／又は治療剤に関する。

[0014] また、本発明は、ＣＤ６９を特異的に認識する抗体を含む劇症型急性肺炎の予防剤及び／又は治療剤に関する。

[0015] さらに、本発明は、ＣＤ６９アンタゴニストを、劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療が必要であると診断されている被験体に、該肺炎を予防及び／又は治療するのに効果的な量で投与することを含む、劇症型急性肺炎の予防

及び／又は治療方法に関する。

[0016] 加えて、本発明は、CD69アンタゴニストが抗CD69抗体である上記方法に関する。

発明の効果

[0017] 本発明により、CD69アンタゴニスト、例えば抗CD69抗体を含む、劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療用医薬組成物、並びにCD69アンタゴニストを含む劇症型急性肺炎の予防剤及び／又は治療剤を提供することができる。

[0018] また、本発明により、CD69アンタゴニスト、例えば抗CD69抗体を投与することを含む、劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療方法を提供することができる。

[0019] 集中治療室等で人工呼吸を受けている患者や高病原性鳥インフルエンザが感染した際に発症する劇症型急性肺炎は、急激な発症とそれに続く急激な病状の進行を特徴とし、予後が不良で死亡リスクも極めて高い。有効な治療方法が現在のところ開発されていない劇症型急性肺炎の治療において、本発明は新規で画期的な治療を提供し得る。

[0020] 本発明に係る医薬組成物は、劇症型急性肺炎の発症前投与及び発症後投与のいずれにおいても有効な治療効果を示したことから、劇症型急性肺炎の予防及び治療の両方の用途に使用することができ、鳥インフルエンザ等の将来的なパンデミックに備えた治療法として医薬分野に高く貢献するものである。

図面の簡単な説明

[0021] [図1A]マウスFARDSモデルの作製方法を説明する図である。マウスFARDSモデルは、野生型マウス（以下、WT）に α -ガラクトシルセラミド（以下、 α GalCerと略称する）を経鼻投与し（Day -1）、その24時間後にリポポリサッカライド（以下、LPSと略称する）を経鼻投与する（Day 0）ことにより作製した。（実施例1）

[図1B]マウスFARDSモデル（図1A参照）のLPS投与後の生存率を経

時的に検討した結果を示す図である。図の縦軸は生存率（Survival (%)）を、横軸は、LPS投与後の時間（Time after LPS challenge (h)）を示す。（実施例1）

[図1C]マウスFARDSモデルでは、リン酸緩衝生理食塩水（以下、PBSと略称する）のみ投与のFARDSを発症しないマウスと比較して、肺への著しい好中球浸潤が認められたことを説明する図である。図中、No treatmentはPBSのみ投与のFARDSを発症しないマウスを示し、treatmentはマウスFARDSモデルを示す。（実施例1）

[図1D]マウスFARDSモデルでは、PBSのみ投与のFARDSを発症しないマウスと比較して、P/F比（P/F ratio）が有意に低かったことを説明する図である。図中、No treatmentはPBSのみ投与のFARDSを発症しないマウスを示し、treatmentはマウスFARDSモデルを示す。（実施例1）

[図2A]マウスFARDSモデルにおける肺への好中球浸潤を検討するために使用したイメージング技術を説明する図である。緑色蛍光タンパク遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス（以下、GFP Tgと称する）をドナーとして使用し、好中球（Neutrophils）及びCD4 T細胞（CD4 T cells）を採取した。そして、野生型マウスをレシピエント（recipient）として使用し、前記好中球及びCD4 T細胞を静脈経由で移入した（iv）。その48時間後、 α GalCelを投与し、さらにその24時間後にLPSを投与した。LPS投与6時間、12時間、24時間、及び48時間後に、肺（Lung）への好中球浸潤を観察した。（実施例2）

[図2B]マウスFARDSモデルにおいて、LPS投与48時間後に肺への好中球浸潤を測定した結果を示す図である。 α GalCel及びLPSを投与したマウスでは、PBSのみ投与したマウス、 α GalCel及びPBSを投与したマウス、並びにPBS及びLPSを投与したマウスと比較して、肺への著しいGFP陽性好中球（GFP⁺ neutrophils）の浸潤が

認められた。（実施例2）

[図2C]マウスFARDSモデルにおいて、肺への好中球浸潤を経時的に測定した結果を示す図である。LPS投与後、6時間程度でGFP陽性好中球（GFP⁺ neutrophils）の肺への著しい浸潤が認められた。（実施例2）

[図2D]マウスFARDSモデルにおいて、肺へのCD4⁺ T細胞浸潤を経時的に測定した結果を示す図である。LPS投与後、24時間程度でGFP陽性CD4⁺ T細胞（GFP⁺ CD4⁺ T cells）の肺への浸潤が認められた。（実施例2）

[図3A]マウスFARDSモデルにおいて、肺胞洗浄液中の免疫炎症細胞の種類及び数を測定した結果を示す図である。マウスFARDSモデル（黒色バー）では、PBSのみ投与のFARDSを発症しないマウス（白色バー）と比較して、肺への免疫炎症細胞浸潤の増加が認められた。図の縦軸は肺当たりの各細胞の数（Cell number（ $\times 10^7$ ）/lung）を示す。図中、T lympho. はTリンパ球、B lympho. はBリンパ球、Mac. はマクロファージ、Neutor. は好中球、totalは全ての細胞を意味する。（実施例3）

[図3B]マウスFARDSモデルにおいて肺に浸潤した細胞のCD69分子発現を検討した結果を示す図である。肺に浸潤したTリンパ球（T lymphocytes）、Bリンパ球（B lymphocytes）、マクロファージ（Macrophages）、及び好中球（Neutrophils）のいずれにおいても、CD69発現の著しい上昇が認められた。図の縦軸は細胞数（Counts）、横軸はCD69分子の発現程度を示す。（実施例3）

[図4]マウスFARDSモデルにおいてFARDS誘導後に認められた肺へのGFP陽性好中球（GFP⁺ neutrophils）の著しい浸潤が、抗CD69抗体（Anti-CD69 mAb）を前投与することにより抑制されたことを示す図である。図中、PBS/PBSはFARDSを誘導して

いないマウスを示し、 α GalCer/LPSはFARDSを誘導したマウスを示し、Anti-CD69 mAbは抗CD69抗体投与後にFARDSを誘導したマウスを示す。（実施例4）

[図5A]マウスFARDSモデルにおける抗CD69抗体前投与の効果を検討するための薬剤投与手順を説明する図である。野生型マウスに抗CD69抗体を投与し（Day -2）、その24時間後に α GalCerを経鼻投与し（Day -1）、さらにその24時間後にLPSを経鼻投与した（Day 0）。図中、Abは抗体を意味する。（実施例5）

[図5B]マウスFARDSモデルのLPS投与後の生存率に及ぼす抗CD69抗体前投与の効果を経時的に検討した結果を示す図である。抗CD69抗体（Anti-CD69 Ab）を α GalCerの投与前に投与した結果、コントロール抗体（Control Ab）を投与した時と比較して、著しく生存率が増加した。図の縦軸は生存率（Survival（%））を、横軸は、LPS投与後の時間（Time after LPS challenge（h））を示す。（実施例5）

[図5C]マウスFARDSモデルで認められた肺への著しい好中球浸潤が、抗CD69抗体（Anti-CD69 mAb）を α GalCerの投与前に投与することにより低下したことを示す図である。図中、No treatmentはPBSのみ投与のFARDSを発症しないマウスを示し、treatmentはマウスFARDSモデルを示す。また、Control mAbはコントロール抗体を示す。（実施例5）

[図5D]マウスFARDSモデルで認められた低いP/F比（P/F ratio）が、抗CD69抗体（Anti-CD69 mAb）を α GalCerの投与前に投与することにより有意に改善されたことを示す図である。図中、（-）はPBSのみ投与の野生型マウスを示し、 α GC+LPSは α -GalCer及びLPSを投与することによりFARDSを発症したマウスを示し、Control mAbはコントロール抗体を投与したマウスを示す。（実施例5）

[図6A]マウスFARDSモデルにおけるFARDS誘導後の抗CD69抗体投与の効果を検討するための薬剤投与手順を説明する図である。野生型マウスに α GalCelを経鼻投与し(Day -1)、その24時間後にLPSを経鼻投与して(Day 0)FARDSを誘導し、LPS投与24時間後に抗CD69抗体を投与した(Day 1)。図中、Abは抗体を意味する。(実施例6)

[図6B]マウスFARDSモデルの生存率に及ぼすLPSの投与後の抗CD69抗体投与の効果を経時的に検討した結果を示す図である。抗CD69抗体(Anti-CD69 Ab)をLPSの投与後に投与した結果、コントロール抗体(Control Ab)を投与した時と比較して、著しく生存率が増加した。図の縦軸は生存率(Survival (%))を、横軸は、LPS投与後の時間(Time after LPS challenge (h))を示す。(実施例6)

[図6C]マウスFARDSモデルで認められた肺への著しい好中球浸潤が、抗CD69抗体(Anti-CD69 mAb)をLPSの投与後に投与することにより低下したことを示す図である。図中、No treatmentはPBSのみ投与のFARDSを発症しないマウスの肺組織像を示し、Anti-CD69 mAbはマウスFARDSモデルにLPSの投与後に抗CD69抗体を投与したときの肺組織像を示す。また、Control mAbはマウスFARDSモデルにLPSの投与後にコントロール抗体を投与したときの肺組織像を示す。(実施例6)

[図7]CD69欠損マウス由来の好中球は、マウスFARDSモデルにおける肺への浸潤程度が低かったことを示す図である。図中、WT neutrophilは野生型マウス由来の好中球の肺へ浸潤を示す画像である。CD69KO neutrophilはCD69ノックアウトマウス好中球の肺へ浸潤を示す画像である。Mergedは前記2つの画像を重ねた画像を示す。また、 α GalCel/LPSは、 α GalCel及びLPSを投与したこと示し、PBS/PBSは α GalCel/LPSの代わりにPBSを投

与したことを示す。（実施例 7）

発明を実施するための形態

[0022] 本発明は、CD69 アntagオニストを含む劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療用医薬組成物に関する。また、本発明は、CD69 アntagオニストを含む肺胞内の好中球凝集抑制剤に関する。さらに本発明は、肺の好中球浸潤抑制剤に関する。加えて本発明は、CD69 アntagオニストを含む劇症型急性肺炎の予防剤及び／又は治療剤に関する。

[0023] また、本発明は、CD69 アntagオニストを、劇症型急性肺炎を発症する可能性があるとして診断されている対象及び劇症型急性肺炎であると診断されている対象に、劇症型急性肺炎を予防する及び／又は治療するのに効果的な量で投与することを含む劇症型急性肺炎を予防する及び／又は治療する方法に関する。

[0024] さらに、本発明は、CD69 アntagオニストを、肺胞内の好中球凝集抑制が必要であると診断されている被験体に、該抑制に効果的な量で投与することを含む、劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療方法に関する。

[0025] 加えて、本発明は、CD69 アntagオニストを、肺の好中球浸潤抑制が必要であると診断されている被験体に、該抑制に効果的な量で投与することを含む、劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療方法に関する。

[0026] 本明細書において、用語「劇症型急性肺炎」は用語「劇症型急性呼吸促拍症候群（FARDS）」と置換可能に使用される。

[0027] 「劇症型急性呼吸促拍症候群（FARDS）」は、急性呼吸促拍症候群（ARDS）と比較してより重篤な症状を示す呼吸促拍症候群をいう。ARDSは、呼吸による酸素の体内への取り込みの障害に基づく急性呼吸不全を特徴とする病態をいう。呼吸とは、空気中の酸素を体内に取り込み、体内で産生された二酸化炭素を吸気中に排出する作業をいう。酸素の体内への取り込みは、空気を口及び鼻腔から気道を通して肺胞まで届ける工程（工程 1）、肺内におけるガス交換の工程、すなわち、酸素が肺胞内の空気中から肺胞上皮細胞に取り込まれ、続いて組織間質、次いで血管内皮細胞を通して血液中

の赤血球が有するヘモグロビンに結合する工程（工程２）、並びに、血液循環を利用し心臓から全身へと輸送される工程（工程３）により行われる。何らかの理由でこれら工程のいずれかが障害を受け、全身に十分に酸素を運搬できない状態を呼吸不全という。ARDSは、酸素の体内への取り込み過程における主に肺内におけるガス交換の工程（上記工程２）の障害に基づき４８時間以内に生じてきた急性呼吸不全を特徴とする病態をいう。

[0028] ARDSは、米国胸部疾患学会及び欧州集中治療医学会との合同検討会（American-European Consensus Conference：AECC）では、「先行する基礎疾患を持ち、急性に発症した低酸素血症で、胸部エックス線画像上では両側性の肺浸潤影を認め、かつ心原性の肺水腫が否定できるもの」と定義されている。すなわち、ARDSは特定の疾患を指すものではなく、急な発症、明らかな低酸素血症、胸部エックス線画像における全体に渡る異常な影の存在、及び非心原性肺水腫を特徴とする症状を示す症候群をいう。ARDSの病態は、活性化した好中球の肺への集積、好中球等の細胞による活性酸素やタンパク分解酵素の産生、産生された物質による肺胞壁にある毛細血管や肺の上皮細胞の傷害、毛細血管からの液体成分の漏出及びそれによる浮腫の惹起であり、顕微鏡的には広範な肺胞領域の障害の所見が認められる。ARDS発症後の死亡率は４３％を越える。先行する基礎疾患として、重症肺炎や誤嚥性肺炎等の直接障害や、敗血症等の間接障害を挙げることができる。ARDS及びALIの約８０％は敗血症を伴っていると認識されている。

[0029] AECCにより１９９４年に示された定義（AECC定義）では、P／F比が３００以下である場合は急性肺損傷（ALI）、２００以下の場合はARDSと判定された。しかし、２０１２年に示された新しい定義（ベルリン定義）では、P／F比が３００以下である場合は軽度ARDS（mild ARDS）、２００以下である場合はARDS、１００以下である場合は重症ARDS（severe ARDS）と判定される。用語「軽度ARDS」と用語「ALI」は本明細書において置換可能に使用される。また、用語「重

症ARDS」と用語「FARDS」は本明細書において置換可能に使用される。なお、健常人のP/F比は400～500程度である（動脈血酸素分圧（ PaO_2 ）：80～100 Torr（mmHg））。

[0030] FARDSでは、ARDSと比較してより急激に症状が発生し、肺炎の進行が急激であり予後がさらに不良、すなわち重症化しやすく死亡リスクも高い。近年、鳥インフルエンザ（H7N9、H5N1等）等のインフルエンザウイルスの感染によりFARDSが引き起こされ、30～60%に達する高い感染致死率を示していることが報告されている。FARDSにおける病状の劇症化や高い致死率は、ウイルスの増殖による直接的な影響よりもむしろ宿主側のウイルスに対する過剰な免疫応答の結果として起こることがわかってきた。肺炎等の炎症では、生体に作用する各種の傷害因子に対する全体的又は部分的な一連の生体防御反応、例えば、免疫系細胞の数の変化、該細胞の移動速度の変化、及び該細胞の活性の変化により組織的障害又は病理学的状態が生じる。

[0031] 生体防御反応に関わる免疫系細胞としては、例えば、T細胞、B細胞、単球若しくはマクロファージ、抗原提示細胞（APC）、樹状細胞、小膠細胞、NK細胞、NKT細胞、好中球、好酸球、肥満細胞、又は免疫に特異的に関連する他のあらゆる細胞、例えば、サイトカイン産生内皮細胞若しくはサイトカイン産生上皮細胞を挙げることができる。インフルエンザウイルス感染によるFARDSでは、具体的には、感染によって誘発されるサイトカインの過剰産生が好中球や肺泡マクロファージの肺への浸潤をさらに誘発し、その結果、浸潤を受けた肺泡上皮細胞が産生する分子によって組織傷害が引き起こされることが考えられる。

[0032] 本発明に係る医薬組成物、薬剤、及び方法は「劇症型急性肺炎」を適用対象とする。本発明の好ましい一実施態様として、インフルエンザウイルスの感染による劇症型急性肺炎、より好ましくはインフルエンザウイルスの感染によるFARDSを例示できる。当該実施態様において、劇症型急性肺炎を引き起こすインフルエンザウイルスとして、A香港型・Aソ連型・B型等の

、いわゆる季節性インフルエンザや、高病原性であるトリインフルエンザウイルスを挙げることができる。トリインフルエンザウイルスとして、H5N1型及びH1N1型を好ましく例示できる。高病原性のトリインフルエンザウイルスの感染症例や、他の型のウイルスの感染後に重症化した症例では、急性呼吸障害が誘発されて短時間で劇症化することがあり、時には多臓器不全へと移行し、死に至る可能性もあることが報告されている。

[0033] 「劇症型急性肺炎を予防する」とは、劇症型急性肺炎が発生する前に何らかの処置をすることにより、劇症型急性肺炎が発生させないか、及び少なくとも発生後の症状を軽減させることをいう。

[0034] 「劇症型急性肺炎を治療する」とは、何らかの処置をすることにより、劇症型急性肺炎の症状を消失させるか、軽減させるか、あるいはその進行を止めることをいう。

[0035] 「CD69アンタゴニスト」は、CD69分子にCD69のリガンドが結合することによって生じるCD69分子を介した細胞内の情報伝達系の機能を抑制して、該リガンドによる細胞の活性発現を妨げる物質をいう。「アンタゴニスト」は、拮抗薬、拮抗剤、遮断薬とも呼ばれる。

[0036] CD69アンタゴニストは、CD69に結合するが、CD69に結合する生体物質であるリガンドと異なり生体反応を起こさず、またその結合によってリガンドとCD69との結合を阻害して、リガンドによるCD69を介した細胞内の情報伝達系の機能を抑制して該リガンドによる細胞の活性発現を妨げる物質であり得る。このような物質として、抗CD69抗体、CD69アプタマー、及び低分子量医薬品等を挙げることができる。

[0037] CD69アンタゴニストはまた、CD69発現の減少を引き起こすことができる物質であり得る。このような物質は、CD69遺伝子の転写及び／又は翻訳を阻害して、該遺伝子の発現を抑制するものであれば、何れの物質であってもよい。このような物質として、CD69 mRNAアンタゴニスト、CD69アプタマー、低分子二本鎖RNA、及び低分子量医薬品等を挙げることができる。

- [0038] CD69アンタゴニストとして、抗CD69抗体を好ましく例示できる。かかる抗CD69抗体は、CD69を特異的に認識して結合する抗体であることが好ましい。CD69を特異的に認識して結合するとは、CD69を認識して結合するが、CD69以外のタンパクは認識しないか、弱く認識することを意味する。CD69アンタゴニストとして作用する抗CD69抗体は、CD69に結合する生体物質であるリガンドと異なり生体反応を起こさず、またその結合によってリガンドとCD69の結合を阻害して、リガンドによるCD69を介した細胞内の情報伝達系の機能を抑制して該リガンドによる細胞の活性発現を妨げる作用を有する抗体である。
- [0039] 抗CD69抗体は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれであっても良く、また、キメラ抗体、及び／又はヒト化抗体であり得る。非ヒト抗体は、抗体の製造に係る技術分野で自体公知の方法を用いてヒト化することができる。例えば、ヒト化抗体は、免疫系が部分的又は完全にヒト化されたトランスジェニック動物を用いて作製できる。本発明に係る任意の抗体又はその断片は、部分的又は完全にヒト化できる。キメラ抗体は抗体の製造に係る技術分野で自体公知の方法を用いて作製することができる。
- [0040] 抗CD69抗体は、CD69ポリペプチド又はそのエピトープを含む断片ペプチドを抗原として使用し、抗体の製造に係る技術分野で自体公知の方法によって作製することができる。抗CD69抗体の作製において、CD69ポリペプチドのアミノ酸配列の例として、アクセッション番号BAF84558、ABM87473、ABM84101、EAW96123、EAW96122、Q53ZX0、AAO63584、AAH07037、NP__001772、Q07108、CAA83017、CAA80298又はAAB46359を有する配列、その変種（versions）、その一部又はそれらの組み合わせを挙げることができる。
- [0041] 抗CD69抗体の製造において使用する抗原であるCD69ポリペプチド又はそのエピトープを含む断片ペプチドは、抗CD69抗体を投与する対象の種に応じたものであることが好ましい。抗CD69抗体を投与する対象が

ヒトである場合、抗CD69抗体はヒトCD69ポリペプチド又はその抗原結合断片を含有する断片ポリペプチドに対する抗体であることが好ましい。この様な抗体として、特許文献2に開示された抗ヒトCD69抗体を好ましく例示できる。

[0042] 抗体の製造は、具体的には、ポリクローナル抗体の製造の場合は、動物において、フロインドアジュバント（完全又は不完全）等のアジュバントと組み合わせた抗原の頻回皮下（s. c.）又は腹腔内（i. p.）注射によって抗体を生じさせることにより実施できる。免疫原性を向上させるためには、最初に標的アミノ酸配列を含有するポリペプチド又は断片を、免疫化する種において免疫原性のあるタンパク、例えばキーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン又は大豆トリプシン抑制因子と、二官能性薬剤又は誘導体化剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介して複合）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リシン残基を介する）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOCl₂等を用いて複合体とするのが有用である。代替的には、免疫原性複合体は、組み換え技術によって融合タンパクとして作製することができる。

[0043] モノクローナル抗体の製造は、抗体の製造に係る技術分野で自体公知の方法、例えば既報に記載のハイブリドーマ法を用いて実施することができる（非特許文献5）。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を、典型的には免疫剤を用いて免疫化して、特異的に免疫剤に結合する抗体を産生するか又は産生することが可能なリンパ球を誘導する。代替的には、リンパ球をインビトロ（*in vitro*）で免疫化することができる。モノクローナル抗体は、免疫化した動物から脾臓細胞を回収すること、及び細胞を従来方式で、例えば骨髓腫細胞との融合により不死化することによって調製することができる。調製したクローンを次いで所望の抗体を発現するものについてスクリーニングする。モノクローナル抗体はCD69以外のタンパクと交差反応しないものであることが好ましい。所望のハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンを限界希釈手順によってサブクロー

ニングし、標準方法によって増殖させることができる。サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体を、培養培地又は腹水から、従来の免疫グロブリン精製手順、例えばプロテインAーセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又は親和性クロマトグラフィー等によって単離又は精製することができる。

[0044] また、本発明において、抗CD69抗体の断片（以下、抗体断片と称する）であって、抗CD69抗体の抗原結合断片を含有する抗体断片を抗CD69抗体と同様に使用することができる。当該抗体断片は、上記抗CD69抗体の作用と同様の作用を有するものであれば、その構造は特に限定されない。抗体断片は、無傷抗体（*intact antibody*）の一部、例えば無傷抗体の抗原結合領域又は可変領域等を含む。抗体断片の例としては、Fab断片、Fab1断片、F(ab')₂断片及びFv断片；ダイアボディ；線状抗体；一本鎖抗体分子；並びに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。

[0045] 抗体断片は、抗体の製造に係る技術分野で自体公知の方法により作製することができる。例えば、Fab断片は、抗体のパパイン処理により得られ、F(ab')₂断片はペプシン処理により得られる。また、一本鎖Fv又はsFv抗体断片は、抗体のVHドメイン及びVLドメインを含むが、この場合これらのドメインは単一のポリペプチド鎖中に存在する。FvポリペプチドはVHドメインとVLドメインとの間に、sFvが抗原結合のための所望の構造を形成するのを可能にするポリペプチドリッカーをさらに含有することができる。ダイアボディは、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片であり、この断片は同じポリペプチド鎖（VH-VL）で軽鎖可変ドメイン（VL）に連結した重鎖可変ドメイン（VH）を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間での対合を可能にするには短いリンカーを用いることで、ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対合させ、2つの抗原結合部位を生じさせることができる。

[0046] 抗体は、イムノリポソーム（*immunoliposomes*）として処

方することができる。抗体を含有するリポソームは、自体公知の方法により作製することができる（非特許文献6及び7）。特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びポリエチレングリコール誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって生成することができる。本発明に係る抗体のFab断片はリポソームと、ジスルフィド交換反応を介して複合させることができる（非特許文献8）。任意の治療薬をさらにリポソーム内に含有することができる（非特許文献9）。

[0047] CD69アンタゴニストとして、CD69を特異的に認識して結合し、CD69とそのリガンドとの結合を阻害するアプタマーを例示できる。アプタマーは、核酸アプタマー及びペプチドアプタマーのいずれであってもよく、具体的には、RNA、DNA及びアミノ酸の1つ又は複数を含むことができる。かかるアプタマーは、公知の方法を用いて取得できる（非特許文献10-12）。例えば、18ヌクレオチド〜50ヌクレオチドの範囲の長さの可変領域を有するオリゴヌクレオチドライブラリを、RNAアプタマーのランダムプールを生成するランナーオフ転写反応の鋳型として使用する。このアプタマープールを、次いで非特異的相互作用の種を除去するために非複合基質（unconjugated matrix）に曝露する。次いで、残存するプールを固定化した標的と共にインキュベーションする。このプール中のアプタマー種の大部分は標的に対して低親和性である、洗浄により、少量のより特異的な基質に結合したプールが残り得る。このプールを次いで溶出させ、沈殿させ、逆転写し、ランナーオフ転写の鋳型として使用する。このような選択を5回実施後、一定分量を取り出し、クローニング及びシーケンシングする。同様の配列が再現性良く回収されるまで選択を継続することができる。あるいは、アプタマー産生はビーズベースの選択系を用いて行うことができる。このプロセスでは、各々のビーズが天然及び修飾ヌクレオチドから構成された同一の配列を有するアプタマー集団でコーティングされた、ビーズのライブラリが生成される。1×10⁸個を超えるユニーク配列を含むことができる。

のビーズライブラリを、蛍光色素等のタグと複合させた、CD69又はその一部、例えば細胞外ドメインに相当するペプチドと共にインキュベーションする。洗浄後、最も高い結合親和性を示すビーズを単離し、続く合成のためにアプタマー配列を決定し、所望の機能を有するアプタマーを得る。

[0048] CD69アンタゴニストとしてまた、CD69 mRNAアンタゴニストを例示できる。mRNAアンタゴニストの例としては、少なくとも1つの低分子干渉RNA (siRNA) 又は少なくとも1つのリボザイムを挙げることができる。本発明によると、CD69アンタゴニストはsiRNA等の治療用核酸であり、CD69ヌクレオチド配列、その相補体、又はそれらの任意の組み合わせを標的とすることができる。任意の好適なCD69配列を利用することができる。合成siRNAのCD69標的配列は、アクセッション番号NM_001781、NR_026672、NR_026671、AK303383、AK303174、AK291869、DQ896474、DQ893175、CH471094、AY238518、BC007037、AC007068、Z38109、Z30426、Z22576又はL07555を有するヒトCD69ヌクレオチド配列、又はその任意の一部若しくは組み合わせに対して設計されているか、又はCD69転写変異体 (transcript variants) の全部若しくは一部サブセットを認識することができる。

[0049] CD69アンタゴニストは、CD69又はその相補体をコードする標的核酸に特異的に結合し、それに相補的な少なくとも10ヌクレオチドの長さの核酸であり得る。この場合、CD69アンタゴニストの投与は、核酸を対象の細胞に導入することを含む。RNA干渉 (RNAi) を利用することができ、CD69アンタゴニストはsiRNAであってもよい。CD69アンタゴニストの投与は対象の細胞に導入することを含み、この場合、細胞はCD69を、CD69の発現を干渉するのに十分な条件下で、有効量のsiRNA核酸として一時的に発現することが可能である。siRNA核酸は突出を含み得る。すなわち、全てのヌクレオチドが標的配列への結合を必要とする

とは限らない。s i R N A 核酸はR N A を含有し得る。s i R N A 核酸はまた、D N A、すなわちデオキシリボ核酸ヌクレオチドを含有し得る。任意の種類的好適な低分子干渉R N A を利用することができる。内在性マイクロR N A (m i R N A) を利用してもよい。本発明に従って使用することができる他のR N A 干渉剤としては、低分子ヘアピン型R N A (s h R N A)、トランス作動性s i R N A (t a s i R N A)、反復配列関連s i R N A ((r e p e a t - a s s o c i a t e d s i R N A (r a s i R N A))、低分子スキャンR N A (s m a l l - s c a n R N A (s c n R N A)) 及びP i w i 相互作用 (p i) R N A (p i R N A) が挙げられる。利用されるR N A 干渉核酸は、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、16ヌクレオチド、17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、21ヌクレオチド、22ヌクレオチド、23ヌクレオチド、24ヌクレオチド、25ヌクレオチド、26ヌクレオチド、27ヌクレオチド、28ヌクレオチド、29ヌクレオチド、30ヌクレオチド、31ヌクレオチド、32ヌクレオチド、33ヌクレオチド、34ヌクレオチド、少なくとも35、及び／又は40ヌクレオチド～50ヌクレオチドの長さであり得る。R N A i 剤は1つ又は複数のデオキシリボヌクレオチドも含み得る。R N A i 剤、例えばs i R N A 又はs h R N A は、適切なベクター系等のより大きな核酸構築物のカセットとして含まれ得る。かかるベクター系の例としては、レンチウイルスベクター系及びアデノウイルスベクター系が挙げられる。好適な系の一例は、A a g a a r d らの報告に記載されている（非特許文献13）。より大きな核酸構築物の一部として存在する場合、得られる核酸は含まれるR N A i 核酸より長い、例えば50ヌクレオチドを超える長さであり得る。利用されるR N A i 剤は標的m R N A を切断しても、又は切断しなくてもよい。

[0050] R N A 干渉に加えて、又はR N A 干渉の代替として、他の核酸アンタゴニストを利用することができる。C D 6 9 アンタゴニストは、C D 6 9 をコードする遺伝子から転写されたR N A 分子を特異的に切断するリボザイムであ

り得るが、ここでリボザイムは、標的基質結合部位、基質結合部位中の触媒配列（基質結合部位はCD69遺伝子から転写されたRNA分子の一部に相補的である）を含有する。CD69アンタゴニストは、CD69をコードする核酸又はその相補体の少なくとも8ヌクレオチドに相補的であるヌクレオチド配列を含有するアンチセンス核酸であり得る。アンチセンス核酸は、アンチセンス核酸が非CD69ヌクレオチド配列と交差反応しないよう、十分な長さ及び配列含量のCD69配列に相補的であり得る。交差反応が起こっても、実質的な有害な副作用を引き起こさない場合もある。

[0051] CD69アンタゴニストは、低分子医薬品であり得る。例えば、CD69無効化（*disabling*）小ペプチド模倣薬を利用することができる。かかる模倣薬は、標的タンパクCD69の二次構造的特徴に類似するように構成され得る。

[0052] CD69アンタゴニストは、1種類を単独で、あるいは任意の種類を複数組み合わせて使用することができる。また、CD69アンタゴニストは、劇症型急性肺炎を予防する及び／又は治療する他の薬剤と組み合わせて利用することができる。1つ又は複数のCD69アンタゴニストを含む2つ以上の治療薬は、同時に、順次に、又は併用して投与することができる。したがって、2つ以上の治療薬を投与する場合、同時に又は同じ方法で又は同じ用量で投与する必要はない。同時に投与する場合、2つ以上の治療薬は同じ組成物中又は異なる組成物中で投与することができる。2つ以上の治療薬は、同じ投与経路又は異なる投与経路を用いて投与することができる。異なる時間で投与する場合、治療薬は互いに前後して投与され得る。2つ以上の治療薬の投与順序は代替的であり得る。1つ又は複数の治療薬のそれぞれの用量は、時間とともに変化させてもよい。1つ又は複数の治療薬の種類は、時間とともに変化させてもよい。別々の時間で投与する場合、2回以上の投与の間隔は任意の期間であってもよい。複数回投与する場合、期間の長さを変化させることができる。2つ以上の治療薬の投与の間隔は、0秒間、1秒間、5秒間、10秒間、30秒間、1分間、5分間、10分間、15分間、20分

間、30分間、45分間、1時間、1.5時間、2時間、2.5時間、3時間、4時間、5時間、7.5時間、10時間、12時間、15時間、18時間、21時間、24時間、1.5日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、10日間、13日間、15日間、20日間又はそれ以上であり得る。

[0053] 本発明の実施に関してCD69アンタゴニストを全身投与及び局所投与に好適な投与量に処方するための薬学的に許容可能な担体の使用は、本発明の範囲内である。担体の適切な選択及び実際の製造に好適となるように、本発明に関連する組成物、特に溶液として処方される組成物は、非経口的に、例えば静脈内注射によって投与することができる。化合物は、当該技術分野で既知の薬学的に許容可能な担体を用いて、経口投与に好適な投与量に容易に処方することができる。

[0054] 医薬用担体は、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、滑沢剤、希釈剤及び賦形剤を例示できる。これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択して使用される。より具体的には、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトースを例示できる。これらは、目的とする薬剤の剤形に応じて適宜1種類及び2種類以上を組み合わせ使用される。その他、安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、界面活性剤、及びpH調整剤等を適宜使用することもできる。安定化剤は、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体を例示できる。L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸等のいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノ

ース、ガラクトース、果糖等の単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等及びそれらの誘導体等のいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のいずれでもよい。界面活性剤も特に限定はなく、イオン性界面活性剤及び非イオン性界面活性剤のいずれも使用できる。界面活性剤には、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等が包含される。緩衝剤は、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 ϵ -アミノカプロン酸、グルタミン酸及び／及びそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）を例示できる。等張化剤は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリンを例示できる。キレート剤は、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸を例示できる。

[0055] 本発明に係る医薬組成物の用量範囲は特に限定されず、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質（体重、年齢、病状及び他の医薬の使用の有無等）、及び担当医師の判断等に応じて適宜選択される。適当な用量は、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いて決定することができるが、一般的には例えば対象の体重1 kgあたり0.01 μ g乃至1000 mg程度、0.05 μ g乃至500 mg程度、0.07 μ g乃至300 mg程度、又は約0.1 μ g乃至100 mg程度の範囲である。上記投与量は1日1回乃至数回（2、3、4、5、6、7、8、9又は10回）に分けて投与することができる。

[0056] 本発明に係る医薬組成物に含まれるCD69アンタゴニストの用量は、CD69アンタゴニストの種類によって好ましい用量が異なるが、劇症急性肺

炎モデル動物等を使用して簡単な繰り返し実験を実施することにより容易に決定することができる。例えば、抗CD69抗体の好ましい用量は、マウス劇症急性肺炎モデルにおける効果が $200\mu\text{g}/\text{日投与}$ で認められている（後述する実施例4－6参照）ことを基準にし、該抗体の中和抗体価等を考慮すると、1日に $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 乃至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 、好ましくは $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 乃至 $50\text{mg}/\text{kg}$ 、より好ましくは $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 乃至 $20\text{mg}/\text{kg}$ 、さらに好ましくは $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 乃至 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、さらに好ましくは $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 乃至 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、なお好ましくは $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 乃至 $2.5\text{mg}/\text{kg}$ である。

[0057] 本発明に係る医薬組成物に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択される。通常約 $0.00001-70$ 重量%、約 $0.00005-50$ 重量%、約 $0.00007-30$ 重量%、又は $0.0001-5$ 重量%程度の範囲である。

[0058] 投与経路は、全身投与及び局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択する。本発明に係る薬剤は、経口経路及び非経口経路のいずれによっても投与できる。非経口経路としては、通常の静脈内投与、動脈内投与の他、皮下、皮内、筋肉内等への投与を挙げることができる。

[0059] 剤形は、特に限定されず、種々の剤形とすることができる。例えば、溶液製剤として使用できる他に、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後使用することもできる。また持続性剤形及び徐放性剤形であってもよい。

[0060] 具体的には、経口投与のためには、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、丸剤、液剤、乳剤、懸濁液、溶液剤、酒精剤、シロップ剤、エキス剤、エリキシル剤とすることができる。非経口剤としては、例えば、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤等の注射剤、経皮投与及び貼付剤、軟膏及びローション、口腔内投与のための舌下剤、口腔貼付剤、ならびに経

鼻投与のためのエアゾール剤、坐剤とすることができるが、これらには限定されない。これらの製剤は、製剤工程において通常用いられる公知の方法により製造することができる。

[0061] 経口用固形製剤を調製する場合は、上記有効成分に賦形剤、必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤等を加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等を製造することができる。そのような添加剤としては、当該分野で一般的に使用されるものでよく、例えば、賦形剤としては、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、微結晶セルロース、珪酸等を、結合剤としては、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、エチルセルロース、シェラック、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドン等を、崩壊剤としては乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、乳糖等を、滑沢剤としては精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ砂、ポリエチレングリコール等を、矯味剤としては白糖、橙皮、クエン酸、酒石酸等を例示できる。

[0062] 経口用液体製剤を調製する場合は、上記化合物に矯味剤、緩衝剤、安定化剤、矯臭剤等を加えて常法により内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤等を製造することができる。この場合矯味剤としては上記に挙げられたもので良く、緩衝剤としてはクエン酸ナトリウム等が、安定化剤としてはトラガント、アラビアゴム、ゼラチン等を挙げるができる。

[0063] 注射剤を調製する場合は、上記化合物にpH調節剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下、筋肉内及び静脈内用注射剤を製造することができる。この場合のpH調節剤及び緩衝剤としては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を挙げるができる。安定化剤としてはピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸（

EDTA)、チオグリコール酸、チオ乳酸等を挙げることができる。局所麻酔剤としては塩酸プロカイン、塩酸リドカイン等を挙げることができる。等張化剤としては、塩化ナトリウム、ブドウ糖等を例示できる。

[0064] CD69アンタゴニストは、肺胞内の好中球凝集抑制剤又は肺の好中球浸潤抑制剤として提供することができる。

[0065] 「肺胞内の好中球凝集抑制」とは、肺胞内で生じる好中球の凝集や集積、例えば、FARDSなどの疾患において認められる肺胞内の好中球の凝集や集積を低減することをいう。

[0066] 「肺の好中球浸潤抑制」とは、肺への好中球の侵入、例えば、FARDSなどの疾患において認められる肺への好中球の侵入を阻害することをいう。

[0067] CD69アンタゴニストはまた、CD69アンタゴニストを含む劇症型急性肺炎の予防剤及び／又は治療剤として提供することができる。

[0068] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらに限定されない。

実施例 1

[0069] 野生型マウスに劇症型急性肺炎を誘導して（マウスFARDSモデル）、死亡率、肺所見、及びP／F比を検討した。マウスは、野生型のC57BL／6マウスを使用した。全ての動物の飼育は山口大学のガイドラインに従って行った。

[0070] マウスFARDSモデルは、NK細胞の活性化剤である α -ガラクトシルセラミド（ α -Galactosylceramide； α GalCer；KIRIN製）をパイロジェンフリーのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解して調製した溶液を $1\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ PBS／マウスの用量で、野生型マウスに経鼻投与して感作し（Day -1）、その24時間後、リポポリサッカライド（LPS）をパイロジェンフリーのPBSに溶解して調製した溶液を $50\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ PBS／マウスの用量で、経鼻投与して（Day 0）、劇症型急性肺炎を誘導することにより作製した（図1A）。野生型マウスに α GalCerの投与に続いてLPSを投与することにより

、劇症型急性肺炎が誘発されることは既に報告されている（非特許文献 14）

[0071] L P S 投与後、12 時間ごとにマウスの生死を確認し、生存率を算出した。L P S 投与 48 時間後に個々のマウスから動脈血を採取し、動脈血酸素分圧を自動分析器（A B S 5 5 5、R A D I O M E T E R C O P E N H A G E N 社、デンマーク）を用いて測定し、P / F 比を算出した。組織学的分析については、L P S 投与 72 時間後に個々のマウスから得た肺を 4 % パラホルムアルデヒド中で固定し、パラフィン包埋し、切片にし、組織学検査のためにヘマトキシリン・エオジン（H & E）染色した。標本を光学顕微鏡下で検査した。

[0072] 1. マウス F A R D S モデルの死亡率

8 匹のマウス F A R D S モデルを用いて検討を行ったところ、L P S 投与後 2 ~ 3 日で 80 % 以上が死亡した（図 1 B）。

[0073] 2. マウス F A R D S モデルの肺所見

マウス F A R D S モデルでは、L P S 投与 72 時間後に、ヒトでの A R D S / F A R D S の病理組織像と同様に、肺組織における非常に激しい好中球浸潤が認められた（図 1 C）。

[0074] 3. マウス F A R D S モデルの P / F 比

マウス F A R D S モデルの P / F 比は 91.8 ± 34.6 であった。一方、無処理の野生型マウス（以下、定常状態の野生型マウスと称する）の P / F 比は 507.1 ± 31.9 であった。この結果から、定常状態の野生型マウスの P / F 比はヒトと同程度乃至やや高く、一方、マウス F A R D S モデルの P / F 比はヒトの F A R D S に相当する値であることが明らかになった（図 1 D）。

実施例 2

[0075] マウス F A R D S モデルの肺への好中球及び C D 4⁺ T 細胞の浸潤を、イメージング技術を用いて免疫細胞を可視化することにより定量的に測定した。

[0076] マウス F A R D S モデルは、次に示すように作製した（図 2 A）。緑色蛍光タンパク遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス（以下、G F P T g と称する）をドナーとして使用し、その大腿骨髄から A u t o M A C S ソーター（ミルテニーバイオテク（M i l t e n y i B i o t e c）社）を用いて好中球及び C D 4 T 細胞を精製し、それぞれ 9 8 % の純度とした。G F P T g (C 5 7 B L / 6 - T g (C A G - E G F P) C 1 4 - Y 0 1 - F M 1 3 1 O s b m i c e) は理研バイオリソースセンターより購入した。単離した 2 0 0 万個の好中球又は C D 4 T 細胞を野生型 C 5 7 B L / 6 マウス中に静注（i v）投与した（D a y - 3）。そして、同系統の野生型マウスである C 5 7 B L / 6 マウスをレシピエントとして使用し、前記好中球又は C D 4 T 細胞を静脈経由で移入した。細胞移入 4 8 時間後（D a y - 1）に α G a l C e l を $1 \mu\text{g} / 50 \mu\text{l}$ P B S / マウスの用量で野生型マウスに経鼻投与し、その 2 4 時間後（D a y 0）に L P S を $50 \mu\text{g} / 50 \mu\text{l}$ P B S / マウスの用量で経鼻投与して劇症型急性肺炎を誘導した。

[0077] L P S 投与 6 時間、1 2 時間、2 4 時間、及び 4 8 時間後にマウスの肺を取り出し、蛍光顕微鏡（M 2 5 0 F A、ニコン社製）を用いて G F P 陽性の好中球を観察した。

[0078] 1. マウス F A R D S モデルの肺への好中球集積

α G a l C e l 及び L P S を投与したマウスでは、L P S 投与 4 8 時間後に肺組織における非常に激しい G F P 陽性好中球の浸潤が認められた（図 2 B）。L P S のみを投与したマウスでも肺への好中球の浸潤が認められたが、 α G a l C e l 及び L P S を投与したマウスと比較して浸潤した好中球の数は少なかった。この結果から、L P S により誘導される肺への好中球浸潤が、 α G a l C e l の前投与により劇的に増加することが明らかになった。また、浸潤した好中球には、好中球同士が互いに接するほど凝集している状態が認められた。肺に浸潤した好中球による凝集体の形成は、劇症型急性肺炎の特徴の 1 つである。劇症型急性肺炎以外の肺炎、例えば L P S や菌体を

投与することにより実験的に動物で発症させた肺炎の報告例では、肺胞内に好中球が散在する程度にしか含まれていない（非特許文献15－18）。なお、 α GalCel及びLPSを投与したマウスでは、移入したGFP陽性好中球の他にも、レシピエントに本来存在しているGFP非標識好中球が数多く浸潤しており、好中球の集塊を形成している。この結果は、 α GalCel及びLPSの投与により肺への好中球浸潤が劇的に増加し、凝集体を形成することにより、肺炎が劇症化することを示唆する。

[0079] 2. LPS投与後の肺への好中球集積の経時変化

α GalCel及びLPSを投与したマウスでは、LPSの投与後6時間程度でGFP陽性好中球の肺への著しい浸潤が認められた（図2C）。

[0080] 3. LPS投与後の肺へのCD4⁺T細胞集積の経時変化

α GalCel及びLPSを投与したマウスでは、LPSの投与後24時間位からGFP陽性CD4⁺T細胞の肺への集積が認められた（図2D）。CD4⁺T細胞の肺への集積は、好中球の肺への集積よりも遅れて認められることが判明した。

実施例 3

[0081] マウスFARDSモデルの肺への免疫炎症細胞の浸潤、及び浸潤した免疫細胞におけるCD69発現を検討した。実施例1と同じ方法で作製したマウスFARDSモデルを使用した。

[0082] LPS投与3日後に、既報に従い肺胞洗浄（BAL）を行った（非特許文献19）。全ての肺胞洗浄液を採集し、150 μ l分取液中の細胞を計数した。10万個の生存しているBAL細胞について、フローサイトメトリーにより細胞種とCD69発現を確認した。総細胞数とフローサイトメトリーによる各細胞種の百分率からマウス1匹の肺中の各細胞種の数进行計算した。

[0083] マウスFARDSモデルの肺への免疫炎症細胞浸潤は、LPS投与後に劇的に増加した（図3A）。特に、好中球の集積が特徴的に認められた。また、浸潤してきたTリンパ球、Bリンパ球、マクロファージ、及び好中球のいずれにおいても、CD69発現の上昇が認められた（図3B）。

実施例 4

[0084] 実施例3の検討結果から、マウスFARDSモデルの肺では浸潤してきた免疫炎症細胞でCD69発現の上昇が認められた。そこで、マウスFARDSモデルにおける肺への好中球浸潤に対する抗CD69抗体投与の効果を検討した。

[0085] 実施例2と同じ方法で作製したマウスFARDSモデルを使用した。細胞移入24時間後（Day -2）に、抗CD69 mAb（H1.2F3；アルメニアンハムスター IgG；Affymetrix社製）を200μg／マウスの用量で腹腔内（i.p.）注射し、その24時間後（Day -1）にαGalCelを経鼻投与し、さらに24時間後（Day 0）にLPSを経鼻投与して劇症型急性肺炎を誘導した。LPS投与24時間後にマウスの肺を取り出し、蛍光顕微鏡（M205FAA、ニコン社製）を用いてGFP陽性の好中球を観察した。

なお、本実施例で用いた抗CD69抗体H1.2F3は、蛍光標識してマウスの生細胞を直接染色するとフローサイトメーターでCD69の発現が検出できることを確認している。生細胞の直接染色では抗体分子は細胞内には入り込めないため、フローサイトメーターでCD69を検出できることは、用いた抗CD69抗体がCD69分子の細胞外領域を認識して結合することを意味している。

[0086] αGalCel及びLPSを投与したマウスではGFP陽性好中球の肺への著しい浸潤が認められたが、抗CD69抗体の発症前投与により、肺への好中球浸潤が抑制された（図4）。また、肺に浸潤した好中球による凝集体の形成が、抗CD69抗体の発症前投与により抑制された。

[0087] 上記結果から、抗CD69抗体を肺への好中球浸潤及び浸潤した好中球の凝集体形成を抑制する用途に使用できる。

実施例 5

[0088] FARDS発症前の抗CD69抗体投与による劇症型急性肺炎の抑制効果を検討した。実施例1と同じ方法で作製したマウスFARDSモデルを使用

した。 α GalCeI投与の24時間前(Day -2)に、抗CD69 mAb(H1.2F3)を200 μ gの用量で腹腔内(i.p.)投与した(図5A)。陰性対象として、アルメニアンハムスター IgGアイソタイプコントロール抗体(BioLegend社製;以下、コントロール抗体と称する)を用いて同様の処理を行った。

[0089] LPS投与後、12時間ごとにマウスの生死を確認し、生存率を算出した。LPS投与48時間後に個々のマウスから動脈血を採取し、動脈血酸素分圧を自動分析器(ABS555、RADIOMETER COPENHAGEN社、デンマーク)を用いて測定し、P/F比を算出した。組織学的分析については、LPS投与72時間後に個々のマウスから得た肺を4%パラホルムアルデヒド中で固定し、パラフィン包埋し、切片にし、組織学検査のためにH&E染色した。標本を光学顕微鏡下で検査した。

[0090] 1. マウスFARDSモデルの死亡率

8匹のマウスFARDSモデルを用いて検討を行ったところ、FARDS発症前の抗CD69抗体の投与により、死亡率の著しい低下が認められた(図5B)。具体的には、60%以上のマウスの致死が回避され生存した。

[0091] 2. マウスFARDSモデルの肺所見

LPSの投与72時間後の病理組織像では、コントロール抗体を投与したマウスの肺組織には激しい炎症細胞浸潤が観察されたが、抗CD69抗体をFARDS発症前に投与したマウスの肺組織では、炎症細胞の浸潤は抑制され、炎症の程度が軽減されていた(図5C)。

[0092] 3. マウスFARDSモデルのP/F比

マウスFARDSモデルのP/F比は 91.6 ± 24.0 であり、PBSのみ投与の野生型マウス(以下、定常状態の野生型マウスと称する)のP/F比は 559.0 ± 25.5 であった。抗CD69抗体をFARDS発症前に投与したマウスでは、P/F比が 353.9 ± 62.3 に改善された。一方、コントロール抗体をFARDS発症前に投与したマウスでは、P/F比が 105.0 ± 33.7 であり、改善は認められなかった。この結果から、

マウス F A R D S モデルにおいて認められた P / F 比の低下は、抗 C D 6 9 抗体を F A R D S 発症前に投与することにより、著しく改善されることが明らかになった（図 5 D）。

[0093] 抗 C D 6 9 抗体は、F A R D S 誘導前に投与することにより、F A R D S 発症後のマウスの生存率を増加させ、炎症細胞の肺への浸潤を抑制し、P / F 比を著しく改善することが明らかになった。

実施例 6

[0094] F A R D S 発症後の抗 C D 6 9 抗体投与による劇症型急性肺炎の抑制効果を検討した。実施例 1 と同じ方法で作製したマウス F A R D S モデルを使用した。L P S 投与の 2 4 時間後に、抗 C D 6 9 m A b（H 1 . 2 F 3 ; アルメニアンハムスター I g G ; A f f y m e t r i x 社製）を 2 0 0 μ g の用量で腹腔内（i . p . ）投与した（図 6 A）。陰性対象として、コントロール抗体を用いて同様の処理を行った。

[0095] L P S 投与後、1 2 時間ごとにマウスの生死を確認し、生存率を算出した。組織学的分析については、L P S 投与 7 2 時間後に個々のマウスから得た肺を 4 % パラホルムアルデヒド中で固定し、パラフィン包埋し、切片にし、組織学検査のために H & E 染色した。標本を光学顕微鏡下で検査した。

[0096] 1 . マウス F A R D S モデルの死亡率

1 0 匹のマウス F A R D S モデルを用いて検討を行ったところ、F A R D S 発症後の抗 C D 6 9 抗体の投与により、死亡率の著しい低下が認められた（図 6 B）。具体的には、6 0 % 以上のマウスの致死が回避され生存した。

[0097] 2 . マウス F A R D S モデルの肺所見

L P S の投与 7 2 時間後の病理組織像では、コントロール抗体を投与したマウスの肺組織には激しい炎症細胞浸潤が観察されたが、抗 C D 6 9 抗体を F A R D S 発症後に投与したマウスの肺組織では、炎症細胞の浸潤は抑制された（図 6 C）。抗 C D 6 9 抗体を F A R D S 発症前に投与したマウスの肺組織と比較して、細胞浸潤抑制の程度は少ないが、コントロール抗体投与群とは明らかに異なり、肺組織内にガス交換できる空間が残っていた。そのた

め、生存率が上昇した。

[0098] このように、抗CD69抗体は、FARDS誘導後の投与でも誘導前の投与と同程度の生存率を与え、炎症細胞の肺への浸潤を抑制することが明らかになった。

実施例 7

[0099] マウスFARDSモデルの肺への好中球集積への、好中球のCD69発現の関与を検討した。

[0100] CD69欠損マウス（非特許文献1）をC57BL/6マウスに対して15回以上バッククロスしたCD69ノックアウトマウス（CD69KO）とGFPトランスジェニックマウス（C57BL/6 バックグラウンド）を掛け合わせた個体、及び赤色蛍光タンパク（RFP）トランスジェニックマウス（C57BL/6 バックグラウンド）（非特許文献20）を使用した。これらのマウスの大腿骨髄からAutoMACSソーター（ミルテニーバイオテク社）を用いて好中球を精製し、98%の純度とした。単離した2種類の好中球、すなわちCD69KO-GFP陽性好中球及びRFP陽性好中球の各200万個を同一の野生型C57BL/6マウス中に静注投与した（Day -3）。細胞移入48時間後（Day -1）に α GalCelを1 μ g/50 μ l PBS/マウスの用量でC57BL/6マウスに経鼻投与し、その24時間後（Day 0）にLPSを50 μ g/50 μ l PBS/マウスの用量で経鼻投与して劇症型急性肺炎を誘導した。LPS投与24時間後にマウスの肺を取り出し、蛍光顕微鏡（M205FA、ニコン社製）を用いてGFP陽性及びRFP陽性の好中球を観察した。

[0101] FARDS誘導マウスの肺組織では、RFPトランスジェニックマウス由来のRFP陽性好中球（図中、WT neutrophilと表示）の激しい浸潤が認められた（図7）。これに対し、CD69ノックアウトマウス由来のGFP陽性好中球（図中、CD69KO neutrophilと表示）の肺組織への浸潤の程度は著しく低かった。

[0102] このように、CD69を発現していない好中球は肺に浸潤しにくいことが

判明した。この結果から、CD69が好中球の体内動態に関与している可能性が示唆された。

- [0103] 上記実施例の結果から、CD69分子が難治性炎症疾患であるFARDSの良好な治療ターゲット分子になり得ることが示唆された。免疫炎症細胞、例えば好中球におけるCD69の発現や機能を抑制することにより、FARDSの治療が可能になる。

産業上の利用可能性

- [0104] 本発明は、CD69アンタゴニスト、例えば抗CD69抗体を含む、劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療用医薬組成物、並びに劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療方法を提供するものであり、医薬分野における利用が可能である。

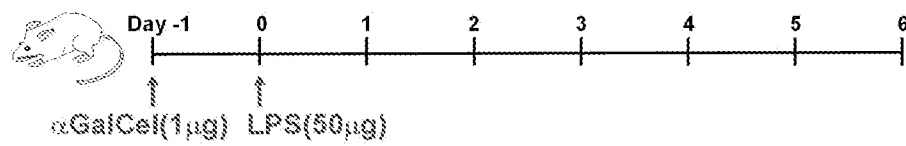
請求の範囲

- [請求項1] CD69 アンタゴニストを含む劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療用医薬組成物。
- [請求項2] CD69 アンタゴニストがCD69 を特異的に認識する抗体である請求項1 に記載の医薬組成物。
- [請求項3] CD69 アンタゴニストを含む、肺胞内の好中球凝集抑制剤。
- [請求項4] CD69 アンタゴニストがCD69 を特異的に認識する抗体である請求項3 に記載の肺胞内の好中球凝集抑制剤。
- [請求項5] CD69 アンタゴニストを含む、肺の好中球浸潤抑制剤。
- [請求項6] CD69 アンタゴニストがCD69 を特異的に認識する抗体である請求項5 に記載の肺の好中球浸潤抑制剤。
- [請求項7] CD69 アンタゴニストを含む劇症型急性肺炎の予防剤及び／又は治療剤。
- [請求項8] CD69 を特異的に認識する抗体を含む劇症型急性肺炎の予防剤及び／又は治療剤。
- [請求項9] CD69 アンタゴニストを、劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療が必要であると診断されている被験体に、該肺炎を予防及び／又は治療するのに効果的な量で投与することを含む、劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療方法。
- [請求項10] CD69 アンタゴニストがCD69 を特異的に認識する抗体である請求項9 に記載の劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療方法。
- [請求項11] CD69 アンタゴニストを、肺胞内の好中球凝集抑制が必要であると診断されている被験体に、該抑制に効果的な量で投与することを含む、劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療方法。
- [請求項12] CD69 アンタゴニストがCD69 を特異的に認識する抗体である請求項11 に記載の劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療方法。
- [請求項13] CD69 アンタゴニストを、肺の好中球浸潤抑制が必要であると診断されている被験体に、該抑制に効果的な量で投与することを含む、

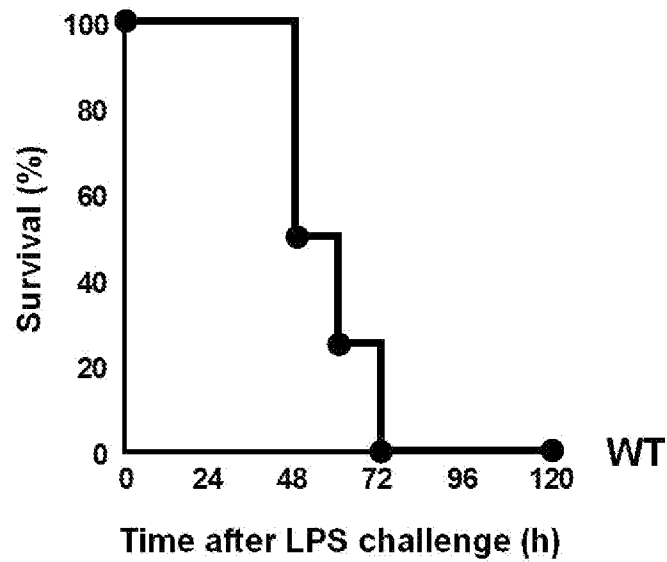
劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療方法。

[請求項14] C D 6 9 アンタゴニストがC D 6 9 を特異的に認識する抗体である
請求項 1 3 に記載の劇症型急性肺炎の予防及び／又は治療方法。

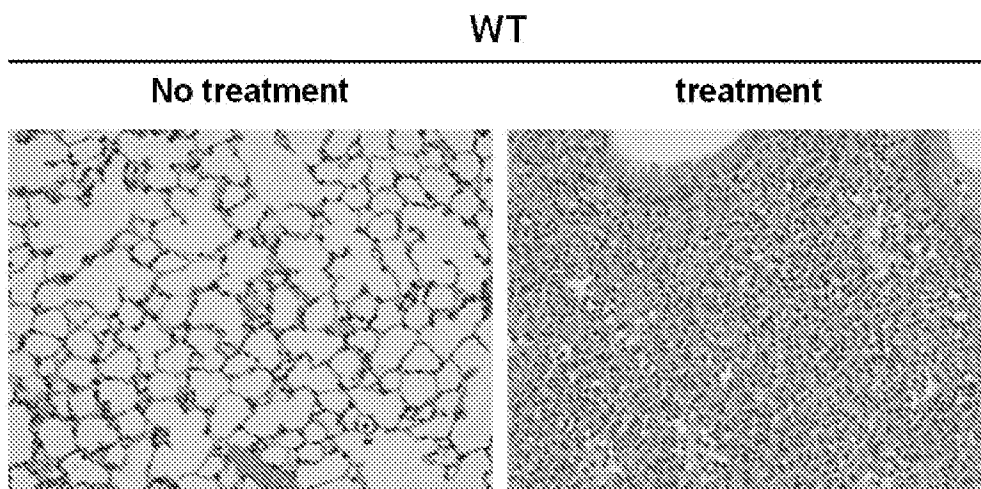
[図1A]



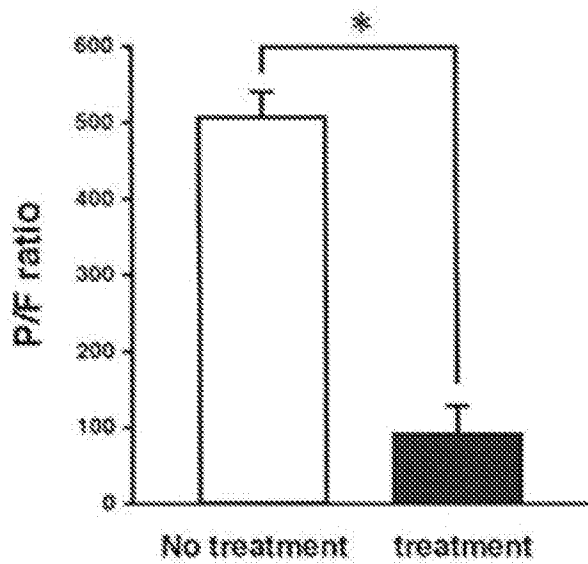
[図1B]



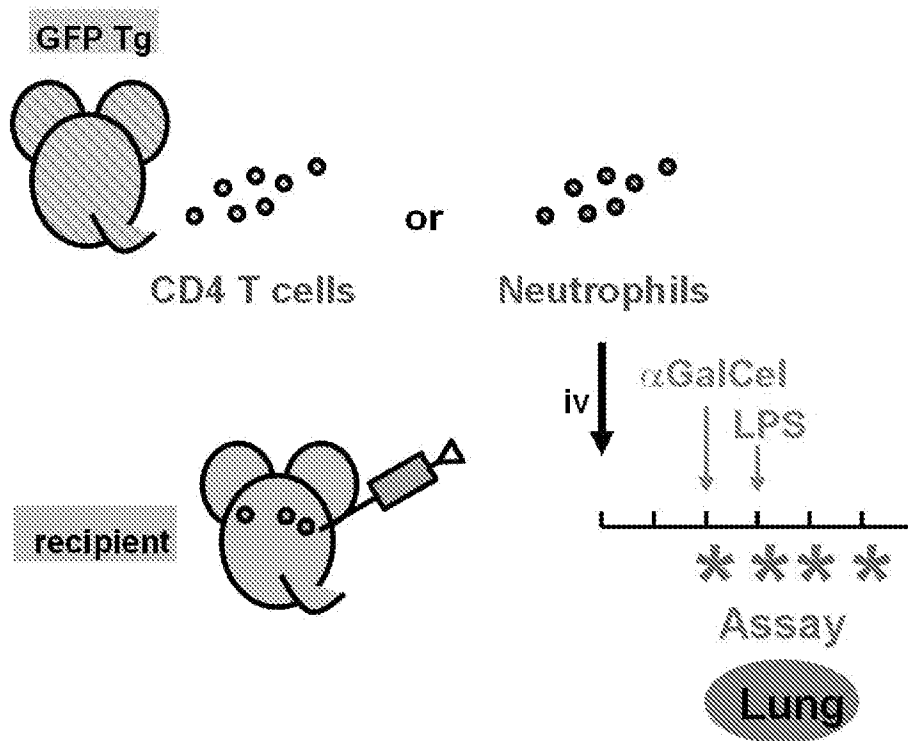
[図1C]



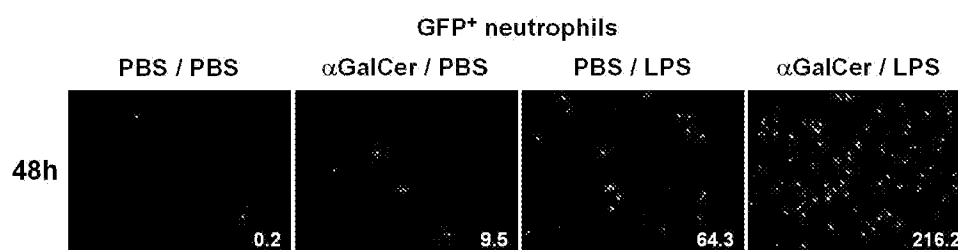
[図1D]



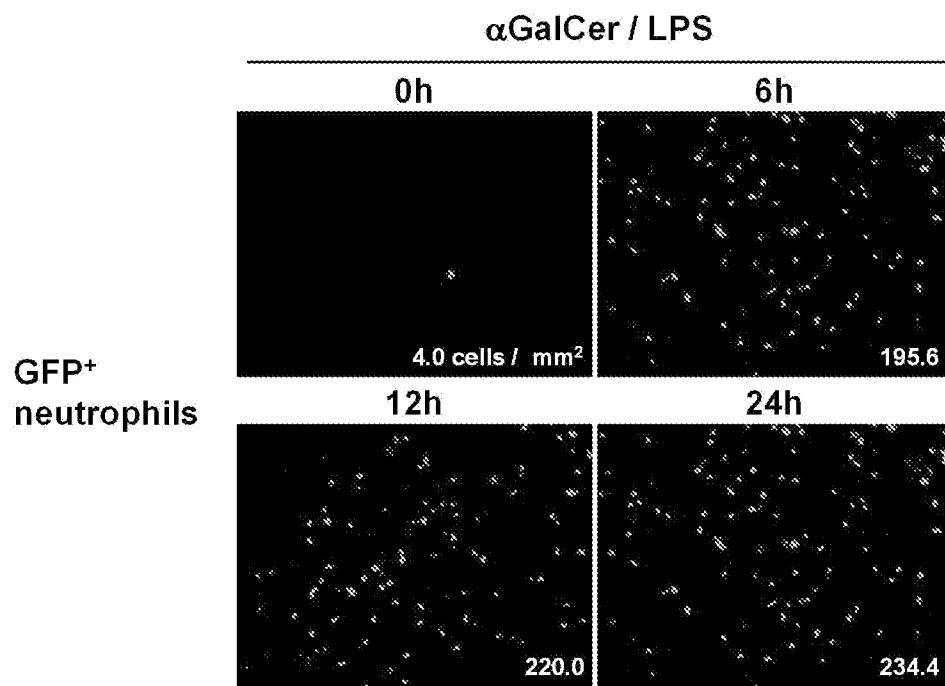
[図2A]



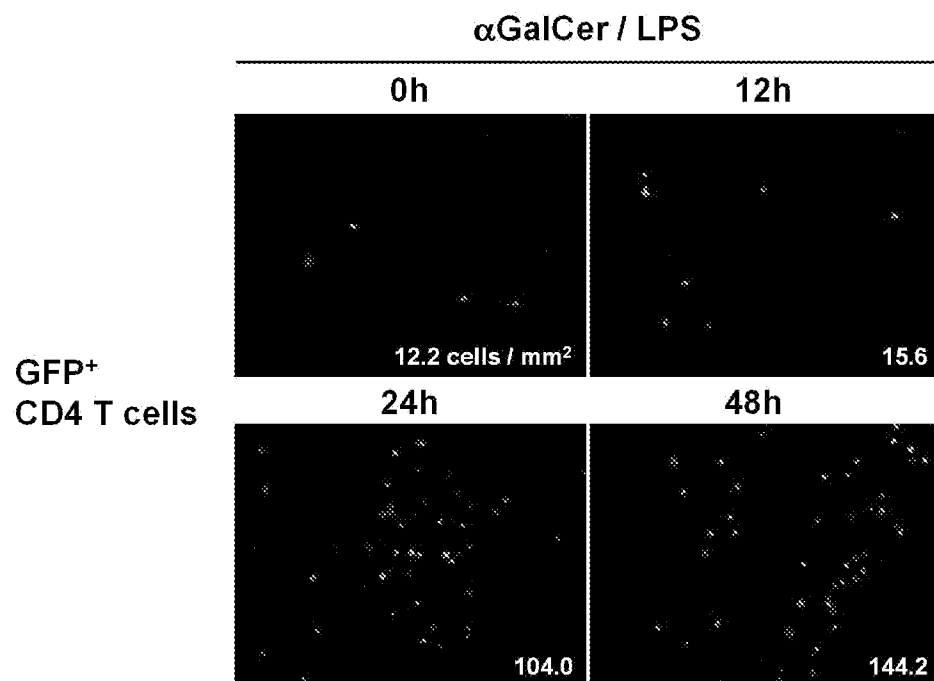
[図2B]



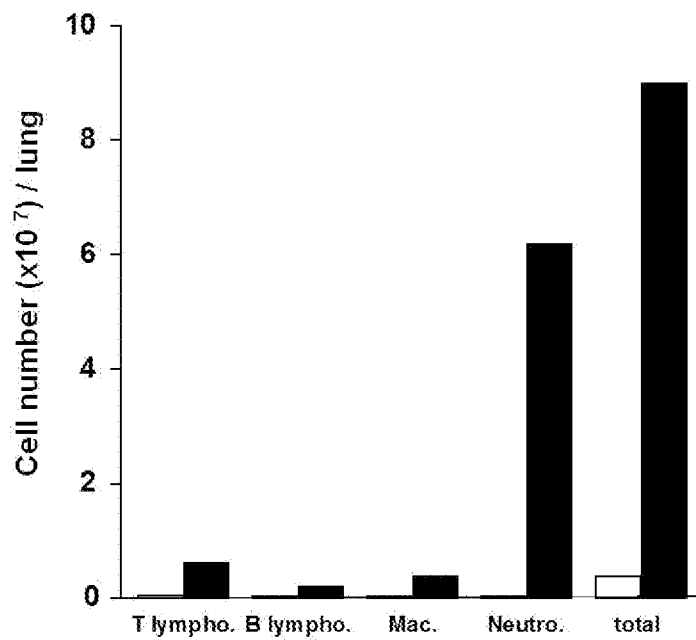
[図2C]



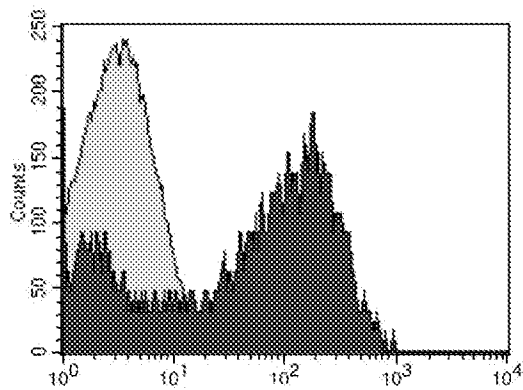
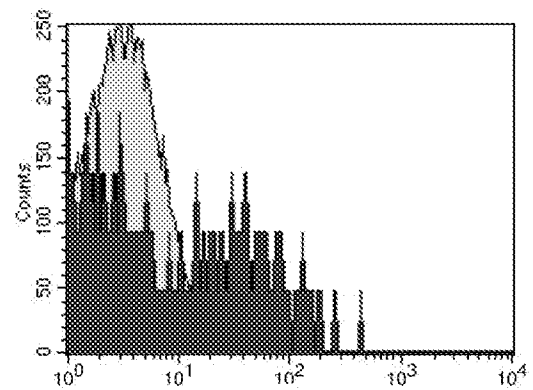
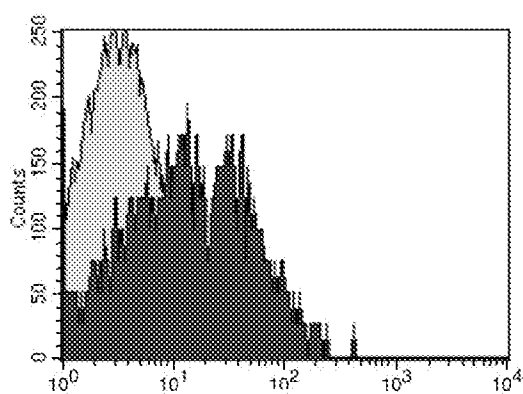
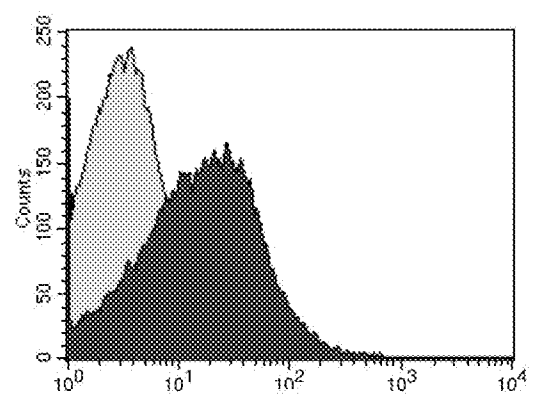
[図2D]



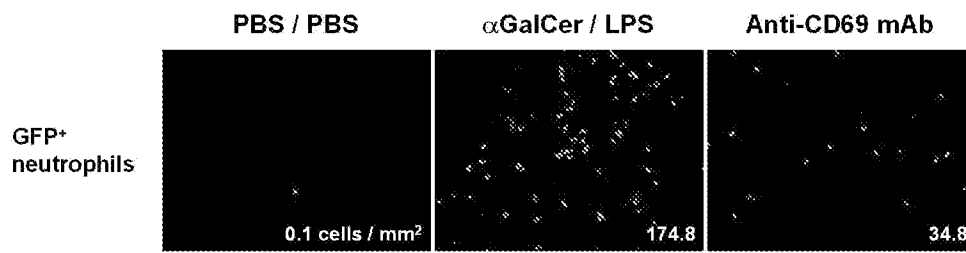
[図3A]



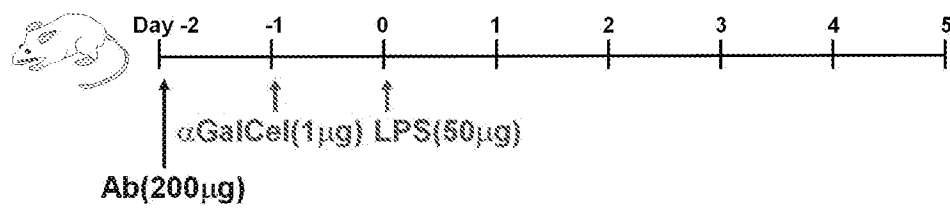
[図3B]

T lymphocytes**B lymphocytes****Macrophages****Neutrophils****CD69**

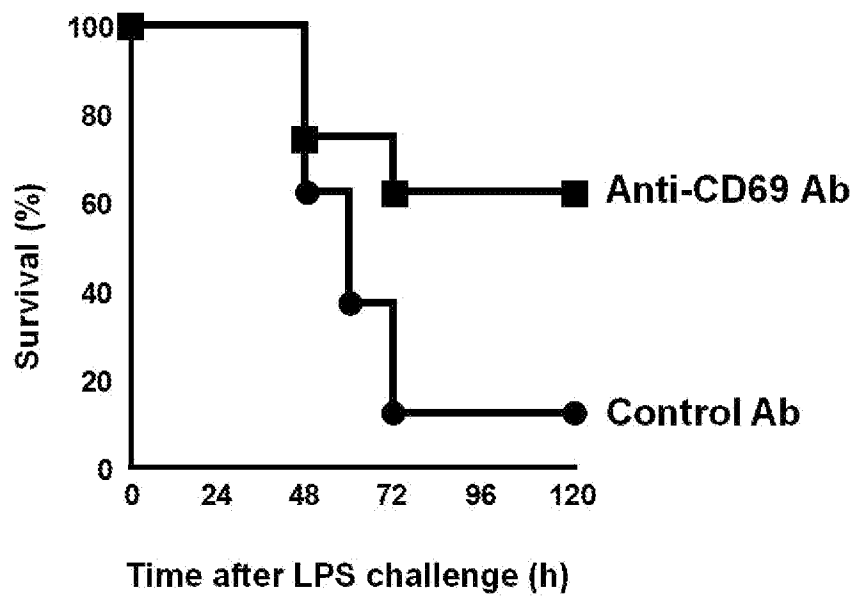
[図4]



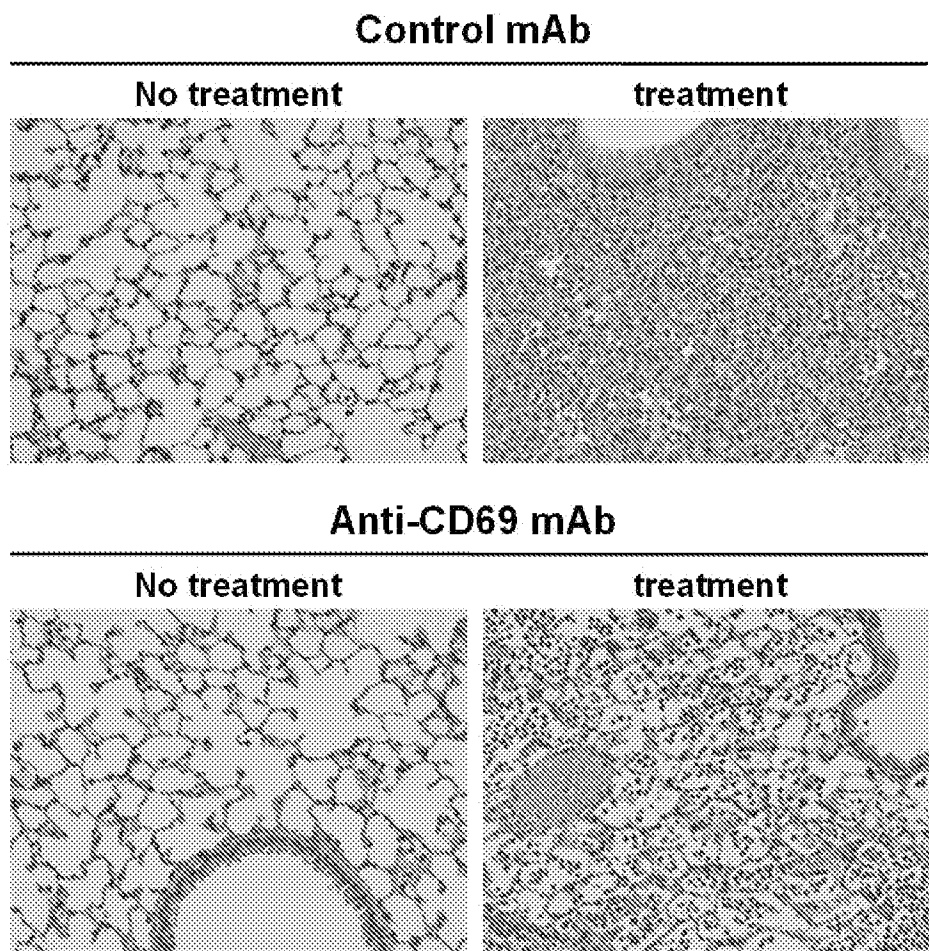
[図5A]



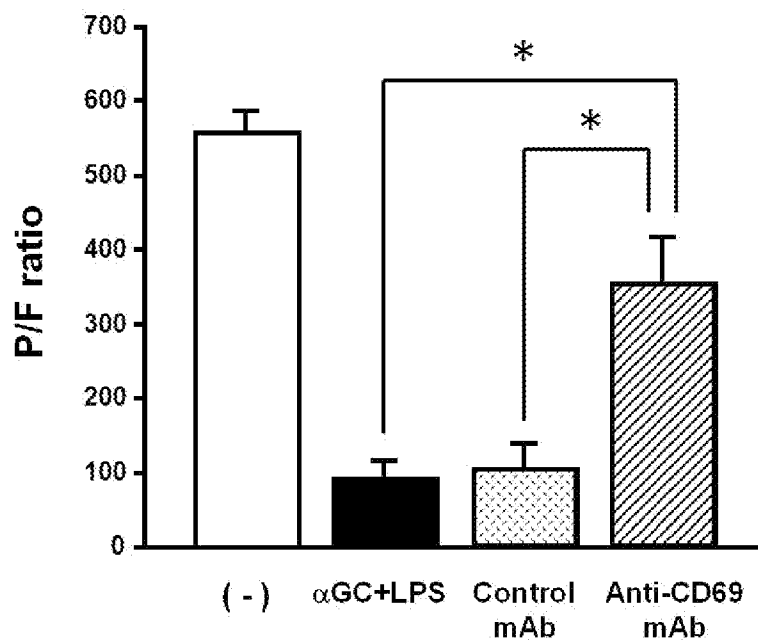
[図5B]



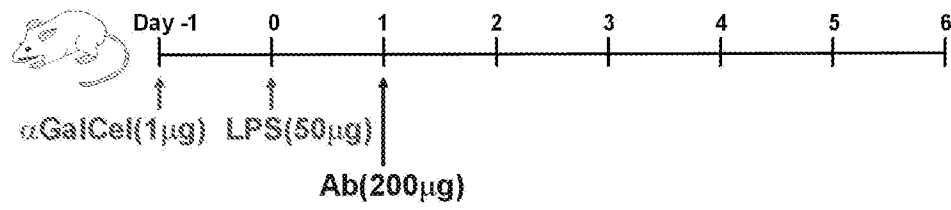
[図5C]



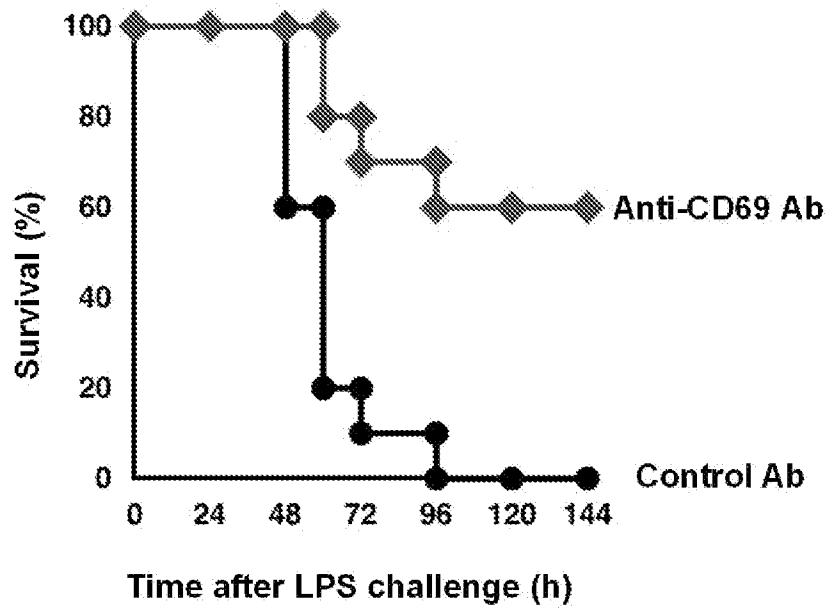
[図5D]



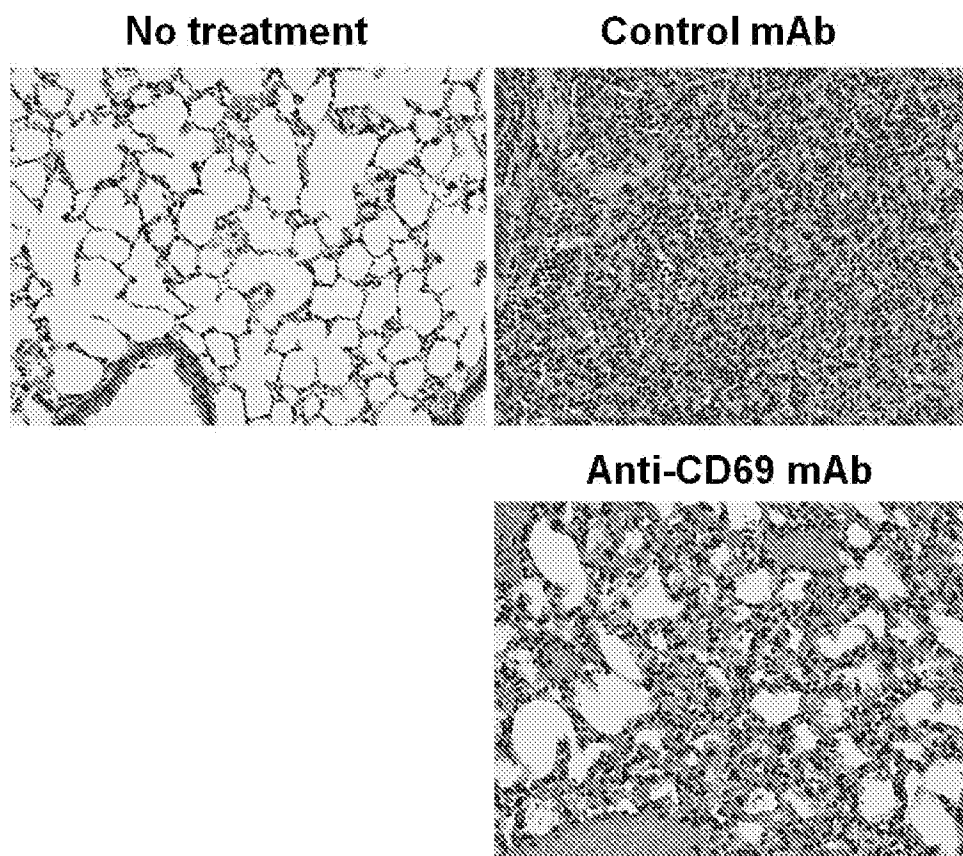
[図6A]



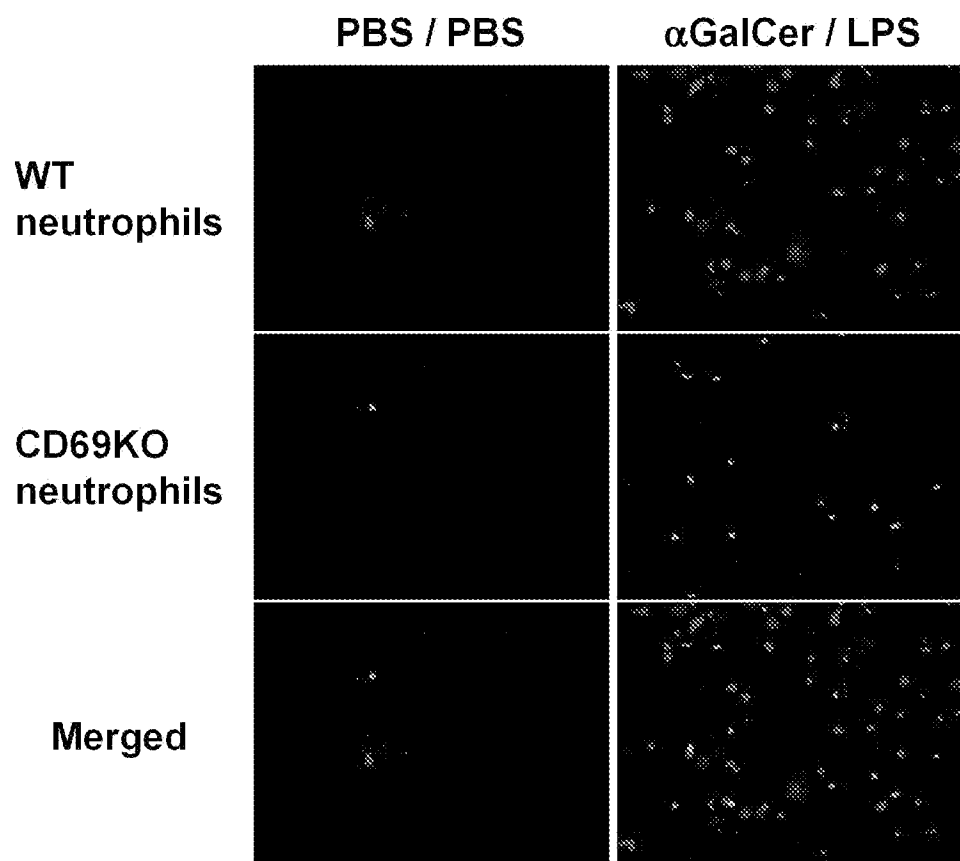
[図6B]



[図6C]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/038091

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A61K45/00 (2006.01) i, A61K39/395 (2006.01) i, A61P11/00 (2006.01) i, A61P37/06 (2006.01) i, A61P43/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. A61K45/00, A61K39/395, A61P11/00, A61P37/06, A61P43/00

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	1971-2017
Registered utility model specifications of Japan	1996-2017
Published registered utility model applications of Japan	1994-2017

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 Y	WO 2013/161814 A1 (GENEFONTIER CORPORATION) 31 October 2013, example 5, claims 1, 11, paragraphs [0017], [0072] & US 2015/0118237 A1, example 5, claims 1, 18, paragraphs [0029], [0090] & EP 2843051 A1 & CN 104379741 A	5, 6 1-4, 7-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 November 2017

Date of mailing of the international search report

12 December 2017

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/038091

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2015-74605 A (AIR WATER INC.) 20 April 2015, example 6 (Family: none)	1-4, 7-14
Y	REID, D. M., et al., Tumor-infiltrating neutrophils in pancreatic neoplasia, Modern Pathology, 2011, vol. 24, pp. 1612-1619, ISSN: 0893-3952, particularly, p. 1613, right column, ll. 1-4	1-4, 7-14
Y	AOYAGI, Tetsuji et al., Activation of pulmonary invariant NKT cells leads to exacerbation of acute lung injury caused by LPS through local production of IFN- γ and TNF- α by Gr-1 ⁺ monocytes, International Immunology, 2010, vol. 23, no. 2, pp. 97-108, ISSN: 0953-8178, particularly, title, abstract, fig. 2, 6-10, p. 103, right column, ll. 22-34	1, 2, 7-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00, A61K39/395, A61P11/00, A61P37/06, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2013/161814 A1 (ジーンフロンティア株式会社) 2013. 10. 31, 実施例 5、請求項 1、11、段落 0017、0072	5, 6
Y	& US 2015/0118237 A1, Example 5, Claims 1, 18, [0029], [0090] & EP 2843051 A1 & CN 104379741 A	1-4, 7-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「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	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日

28. 11. 2017

国際調査報告の発送日

12. 12. 2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

参鍋 祐子

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

4U

6112

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2015-74605 A (エア・ウォーター株式会社) 2015.04.20, 実施例 6 (ファミリーなし)	1-4, 7-14
Y	REID D Michelle, et. al., Tumor-infiltrating neutrophils in pancreatic neoplasia, Modern Pathology, 2011, Vol.24, pp.1612-1619, ISSN:0893-3952, 特に第1613頁右欄第1行～第 4行	1-4, 7-14
Y	AOYAGI Tetsuji et.al., Activation of pulmonary invariant NKT cells leads to exacerbation of acute lung injury caused by LPS through local production of IFN-g and TNF-a by Gr-1+ monocytes, International Immunology, 2010, Vol.23, No.2, pp.97-108, ISSN:0953-8178, 特に「表題」、「アブストラクト」、図2、6～10、 第103頁右欄第22行～第34行	1, 2, 7-14