

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101031307 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 05

(21) 申请号 200580033099. 4

(22) 申请日 2005. 11. 02

(30) 优先权数据

60/624, 568 2004. 11. 02 US

60/706, 548 2005. 08. 08 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 03. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/040182 2005. 11. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02006/060117 EN 2006. 06. 08

(73) 专利权人 小利兰斯坦福大学托管委员会

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 S·斯特罗伯 E·H·迈耶

D·T·乌梅特苏

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 孟凡宏

(51) Int. Cl.

A61K 31/70(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20020165170 A, 2002. 11. 07, 摘要, 说明书第 24 段, 54 段, 70 段.

dale t. umetsu et al. regulatory t cells control the development of allergic disease and asthma. j. allergy clin. immunol. 2003, 112(3), 480-487.

审查员 张婷

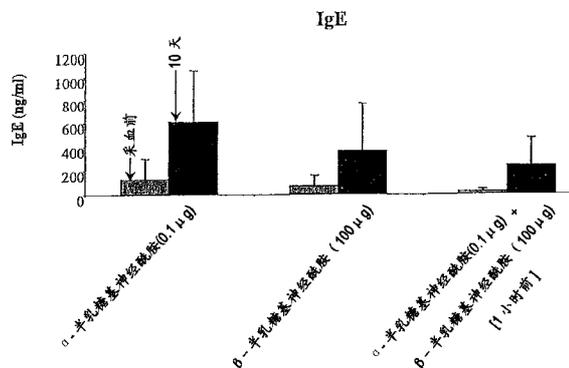
权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 8 页

(54) 发明名称

抑制 NKT 细胞的制药用途

(57) 摘要

向患者施用与 NKT 细胞抗原受体及其对应的抗原递呈分子相互作用, 但抑制 NKT 细胞免疫功能的分子。特别有意义的情况包括治疗系统性红斑狼疮 (SLE)、癌症、动脉粥样硬化及变应性疾病。在本发明的某些实施方案中, 抑制剂是一种无应答的糖脂, 例如 β -半乳糖基神经酰胺。提供了这种糖脂的药物组合物, 其用于治疗涉及不希望的 NKT 细胞激活的疾病。



1. 有效剂量的 β -半乳糖基神经酰胺或抗 CD1d 抗体在制备用于用于阻断或降低气道高反应性的药物中的应用。
2. 根据权利要求 1 的应用,其中所述药物用于局部给药或全身给药。
3. 根据权利要求 2 的应用,其中局部给药包括吸入或吹入。
4. 根据权利要求 3 的应用,其中局部给药是吸入。
5. 根据权利要求 2 的应用,其中全身给药包括肌肉、静脉、皮下、腹膜或局部注射,口服,透粘膜、透皮或鼻内给药。
6. 根据权利要求 1 的应用,其中所述 β -半乳糖基神经酰胺或抗 CD1d 抗体预防性给药。
7. 根据权利要求 1 的应用,其中所述 β -半乳糖基神经酰胺或抗 CD1d 抗体在抗原致敏前给药。
8. 根据权利要求 1 的应用,其中所述 β -半乳糖基神经酰胺或抗 CD1d 抗体在抗原致敏后给药。
9. 根据权利要求 1 的应用,其中所述 β -糖脂包含 C8 至 C 30 脂肪酸、长链仲醇、长链氨基醇、脂肪酸与长链二羟基或三羟基碱的酰胺,它们之中的任何一种任选地被磷酸化或硫酸化。
10. 根据权利要求 1 的应用,其中所述 β -半乳糖基神经酰胺或抗 CD1d 抗体占组合物总重量的 0.5-95wt%。
11. 根据权利要求 1 的应用,其中所述 β -半乳糖基神经酰胺或抗 CD1d 抗体的日剂量为大约 0.1-100mg/kg 体重。
12. 根据权利要求 1 的应用,其中所述 β -半乳糖基神经酰胺或抗 CD1d 抗体包括用于体内给药的每单位 0.1mg-500mg 的剂量形式。
13. 根据权利要求 1 的应用,其中所述药物包括水溶液、水悬液、脂质体制剂或粉末形式。

抑制 NKT 细胞的制药用途

[0001] 本发明受国立卫生院 NIH-A1-0093 号政府资助。政府在本发明中享有一定的权利。

[0002] NKT 细胞组成 T 淋巴细胞的一个独特的亚群,在人和鼠类中极其保守。NKT 细胞表达一些 NK 特异的表面标志物,如 C 型凝集素 NKRP-1A,因此具有传统 NK 细胞的一些特性。NKT 细胞还表达一种半不变的 T 细胞受体,在人类中由优先与可变 V β 11 链配对的不变 V α 24J α Q 重排组成。在小鼠中, NKT 细胞表达一种不变 V α 14J α 281 重排,该重排与可变 V β 8、V β 7 或 V β 2 配对。根据共同受体表达,不变的 NKT 细胞或者属于淋巴细胞的单阳性 CD4⁺ 亚型,或者属于双阴性 CD4-CD8-TCR α/β + 亚型。

[0003] 尽管尚未鉴定 NKT 细胞的天然配体,但当这些细胞的 TCR 识别由 CD1d 递呈的来源于海绵 (marine sponge) 的糖基神经酰胺时,这些细胞被激活。尽管这一组 α 糖基化的神经酰胺在哺乳动物中检测不到,但它们同天然的 CD1d 配体可能有共同的关键的结构特征,说明 NKT 细胞识别含有疏水 (脂质) 和亲水部分的抗原。

[0004] NKT 细胞的生物学作用并没有完全确定。响应通过其 T 细胞受体的激活,NKT 细胞分泌大量 γ 干扰素 (IFN- γ) 和白介素 -4 (IL-4) (例如,参见 Hong 等人 . (1999) Immunol. Rev. 169 :131,以及 Singh 等人 . (1999) J Immunol. 163 :2373)。在重复激活后,NKT 细胞成为极化的细胞,主要产生 IL-4。

[0005] 还提示,NKT 细胞在控制一些自身免疫性疾病的易感性方面具有免疫调节功能。例如,在一些疾病模型中,将 NKT 细胞转入疾病易感者体内,预防了自身免疫性疾病的发展,提示 NKT 细胞的激活对自身免疫性疾病的免疫调节具有治疗性干预的作用 (Sharif 等人 (2002) J Mol. Med. 80 :290-300),这通过将普通 T 细胞极化为产生 IL-4 而实现。还有人报告,NKT 细胞和 IL-13 (可能由 NKT 细胞产生) 可以下调细胞毒性 T 淋巴细胞介导的肿瘤免疫监视 (Terabe 等人 . (2000) Nat Immunol. 1 (6) :515-20)。

[0006] 但是,还有人报告,NKT 细胞的激活增强了 Th1 型免疫反应及自身抗体的分泌,有助于成年 NZB/W 小鼠狼疮的发展 (Zeng 等人 . (2003) J Clin Invest 112 :1211)。

[0007] NKT 细胞在人类临床状况中的作用让人非常感兴趣。NKT 细胞系统在物种之间具有高水平的保守性。 α -半乳糖基神经酰胺可以刺激鼠和人的 NKT 细胞,而且小鼠和人的 CD1d 分子都能将 α -半乳糖基神经酰胺递呈给任一个种的 NKT 细胞,说明动物实验与人的临床试验具有相关性。本发明提供关于操作 NKT 细胞反应的方法。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供用于抑制 (“无应答化 (anergizing)”) NKT 细胞功能,从而抑制合成的或天然的激动剂所导致的 NK T 细胞激活的方法和组合物。向患者施用与 NKT 细胞抗原受体及其递呈分子例如 CD1 相互作用从而使 NKT 细胞的免疫学功能被抑制的分子,用来抑制患者体内 NKT 细胞的激活。特别有意义的情况包括治疗系统性红斑狼疮 (SLE) 以及包括哮喘在内的变应性疾病。在发明的某些实施方案中,抑制剂是一种具有无应答化作用的糖脂,其下调 NKT 细胞的抗原受体。这种糖脂可以在糖和脂质部分之间有一个 β 连接,例如 β -半乳糖基神经酰胺。提供了这种糖脂的药物制剂,其用于治疗与不希望的 NKT 细胞激活

相关的疾病。

[0010] 附图简述

[0011] 图 1A-1D。用 β -半乳糖基神经酰胺体内治疗降低了 NKT 细胞激活的效果,包括 IFN- γ 和 IL-4 的表达以及 IgE 的合成。不影响 IgG2c 的合成。

[0012] 图 2A-B。用 C12- β -半乳糖基神经酰胺治疗阻断了 α -半乳糖基神经酰胺引起的 AHR。

[0013] 图 3A-C。用 C12- β -半乳糖基神经酰胺治疗降低了卵清蛋白 / 明矾引起的 AHR。

[0014] 图 4A-B。用抗-CD1d 抗体 (HB323) 治疗阻断了卵清蛋白 / 明矾引起的气道高反应性 (AHR)。

[0015] 图 5。 β -半乳糖基神经酰胺的口服。

[0016] 发明详述

[0017] 本发明提供了用于抑制 NKT 细胞免疫功能,特别用于治疗变应性疾病或系统性红斑狼疮的方法和组合物。向患者施用与 NKT 细胞抗原受体及其递呈分子例如 CD1 特异性相互作用从而使 NKT 细胞的免疫学功能被抑制的分子,用来抑制激动剂引起的 NKT 细胞的激活反应。在发明的某些实施方案中,阻断剂是一种具有无应答化作用的糖脂,其下调 NKT 细胞的抗原受体。这种糖脂可以在糖和脂质部分之间有一个 β 连接,例如 β -半乳糖基神经酰胺。

[0018] 术语“治疗”是指对哺乳动物中的疾病的任何治疗,该疾病包括但不限于,人和动物模中的变应性疾病,例如哮喘,系统性红斑狼疮等。治疗包括防止疾病,即在引发疾病之前,通过施用保护性组合物导致疾病的临床症状不会发展;包括抑制疾病,即在引发事件之后但在临床上表现或重新表现疾病之前,通过施用保护性组合物导致疾病的临床症状不会发展;包括阻止疾病,即在初期表现之后通过施用保护性组合物阻止临床症状的发展;和/或缓解疾病,即在初期表现之后通过施用保护性组合物使临床症状消退。

[0019] 应当明白,在人用医药中,不总是能够区分“防止”和“抑制”的差别,因为在事件发生之前,最终引发的事件未知、潜伏或者患者不确定。因此,常常利用与“治疗”明显不同的术语“预防”来包括本文定义的“防止”和“抑制”。在本文中使用的术语“治疗”意思是包括“预防”。

[0020] 术语“有效量”是指足以为所治疗的疾病状态提供治疗的剂量。这根据患者、疾病及所进行的治疗而变化。NKT 细胞抑制剂用于治疗疾病,可在作为例如降类固醇剂的共同制剂中使用,以利于使用较低的泼尼松或氢化可的松剂量。

[0021] 用于治疗疾病的体内活性可以如下证明:通过在动物模型中,例如在诱发的动物哮喘模型中检测抑制剂;或者具有遗传狼疮样疾病的几个近交小鼠系之一,在对照组及治疗组中观察 ANA 产生、病原性抗双链 DNA 抗体、免疫复合物肾小球肾炎、淋巴结病、以及模拟人体状况的 B 细胞及 T 细胞功能异常的出现。利用本领域技术人员所了解的方法,通过临床试验确定人的临床功效。

[0022] 定义

[0023] 应当明白,本发明不限于特定的方法、方案、细胞系、动物种或属、构建体及所描述的试剂,因为这些可能会发生变化。还应当明白,这里所用的术语只是为了描述特定的实施方案,并非限制本发明的范围,本发明的范围仅受权利要求书的限制。

[0024] 这里所用的单数形式“一个”、“一种”包括复数形式，除非本文中另有明确的说明。因此，例如，如果提到“一种构建体”则包括多个这样的构建体，如果提到“该细胞”，则包括了一个或多个细胞以及本领域技术人员所了解的等同物，等等。本文所使用的所有技术和科学术语都与本发明所属领域技术人员所了解的含意相同，除非另有明确的说明。

[0025] 变态反应是指基于 IgE 的敏感性增加的一种倾向，导致抗免疫原的特定 IgE 抗体产生，该免疫原包括昆虫毒液、尘螨、花粉、霉、动物皮屑、食物抗原或乳胶。变应性反应是抗原特异性的，特征在于产生 Th2 型细胞因子，如 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 等。对特定变应原的致敏发生于有遗传倾向的人在接触抗原之后，吸烟及病毒性感染可能有助于这种致敏过程。

[0026] 在该组中包含了与变态反应相关的哮喘患者，这些人所表现出的临床疾病范围从轻微的鼻炎到威胁生命的哮喘。在致敏之后，继续暴露于变应原会导致哮喘倾向的明显增强。一旦出现了致敏，重新暴露于变应原是哮喘恶化的危险因素。对变应性哮喘的有效控制常常需要药物治疗及远离变应原。与变态反应相关的哮喘的具体生理学效应包括气道炎症、嗜酸粒细胞增多及粘液产生，以及 IL-4 和抗原特异性 IgE 的产生。

[0027] 肥大细胞，由在其所处的外周组织中经历分化 / 成熟末期的造血前体细胞产生，表达细胞表面受体 (FcRI)，FcRI 使得它们可以高亲和性地结合于 IgE 的 Fc 部分。这种 IgE 致敏的肥大细胞，在遇到可被其 FcRI 结合的 IgE 识别的特异的抗原时，分泌一些生物活性介质，包括：预先形成的贮存于细胞质颗粒中的介质，例如，组胺、肝素及中性蛋白酶，新合成的脂类产物，例如前列腺素 D₂、白细胞三烯 C₄ 以及多种细胞因子等。许多这种可能由肥大细胞产生的介质可以促进可逆转的气管阻塞、支气管高反应性、和 / 或气管炎症。

[0028] 但是，其他细胞类型，包括均能较好地说明哮喘患者气管中慢性炎症浸润的嗜酸粒细胞和 Th2 淋巴细胞，也能够产生会导致疾病的许多特征的细胞因子或其他介质。FcRI 曾经被认为仅限于组织肥大细胞和嗜碱粒细胞，但它也在单核细胞、循环的树突状细胞、朗格汉斯细胞以及嗜酸粒细胞表面表达，因此说明这些细胞有可能在各种 IgE 依赖的炎症反应过程中作为其他潜在的介质来源。（相关综述，参见 Galli (1997) J. E. M. 186 :343-347，其公开内容和引用的参考文献在此引入作为参考）。

[0029] 变应原是具有免疫原性的化合物，在敏感个体中可以引起 Th2 型 T 细胞反应及 IgE B 细胞反应。具体的变应原可以是任何类型的化学化合物，例如多糖、脂肪酸部分、蛋白质等。变应原包括在诸如水果（例如，瓜、草莓、菠萝及其他热带水果）、花生、花生油、其他坚果、牛奶蛋白质、蛋白、贝类、西红柿等食品中发现的抗原；空气传播的抗原，例如草的花粉、动物皮屑、室内螨的排泄物等；药物抗原，例如青霉素及相关的抗生素、磺胺类药物、巴比妥类、抗惊厥药、胰岛素制剂（特别是动物源的胰岛素）、局部麻醉剂（例如奴佛卡因）、以及碘（在许多 X 射线对比染料中存在）；昆虫毒液及引起由吸血性节肢动物导致的变应性皮炎的物质，该节肢动物包括蚊类（疟蚊属、伊蚊属、脉毛蚊属、库蚊属）、蝇类（白蛉属、库蠓属）特别是黑蝇、斑虻和蠓、蜉蝣类 (Dermmacenter 属、钝缘蜉属、耳蜉属)、蚤类（例如，蚤目，包括客蚤属、蚤属、猫栉头蚤）；以及乳胶。

[0030] 过敏性变应原是在高敏感个体中导致过敏反应的风险的抗原。过敏是在个体对抗原敏感化之后发生的一种急性、全身的变态反应。过敏与产生高水平的 IgE 抗体有关，并且同组胺的释放有关，引起肌肉挛缩、气管收缩、血管扩张。过敏反应的症状包括荨麻疹、全

身瘙痒、鼻充血、哮喘、呼吸困难、咳嗽、发绀、头晕、眩晕、意识错乱、言语不清、脉搏加速、心悸、恶心呕吐、腹部疼痛或绞痛、皮肤发红或炎症、鼻渐张、肋间回缩等等。

[0031] 如本文定义的哮喘是一种综合征,典型地具有三个基本特征:间断性及可逆性气管阻塞、气管高反应性及气管炎症,这可能是多种遗传因素及环境因素相互作用的结果。哮喘以在气管壁上出现如下几种细胞为特征:嗜酸粒细胞、肥大细胞、嗜碱粒细胞、及 CD25⁺T 淋巴细胞。由于细胞因子的活性,这些细胞之间有密切的相互作用,这些细胞因子具有交流及生物效应物等多种特性。趋化因子将细胞吸引到炎症部位,细胞因子激活它们,导致炎症及粘膜损害。在慢性过程中,会出现继发的变化,如基膜增厚及纤维化。疾病以气管对各种刺激物的高反应性增加以及气管炎症为特征。被诊断为哮喘的患者通常随时间会具有多种指征,包括哮喘、哮喘发作、及对乙酰甲胆碱刺激的阳性反应,即,对少于约 4mg/ml 的乙酰甲胆碱刺激的 PC20。诊断指南可见,例如, National Asthma Education Program Expert Panel Guidelines for Diagnosis and Management of Asthma(《国家哮喘教育计划专家委员会控制及诊断指南》), National Institutes of Health, 1991, Pub. No. 91-3042。

[0032] SLE。系统性红斑狼疮 (SLE) 是一种自身免疫性疾病,其特征为多克隆 B 细胞激活,产生多种抗蛋白质及非蛋白质的自身抗体(关于该病的综述,参见 Kotzin 等人. (1996) Cell 85 :303-306)。这些自身抗体形成免疫复合物,贮存于多种器官系统中,引起组织损害。SLE 是一种难以研究的疾病,具有以恶化和减轻为特征的可变的疾病过程。例如,有些患者可能主要表现为皮肤潮红及关节疼痛,表现为自发性减轻,不太需要药物治疗。但其他一些患者则表现为严重的进展性的肾受累(肾小球肾炎),需要用高剂量的类固醇及诸如环磷酰胺的细胞毒性药物治疗。

[0033] 多种因素可能与 SLE 的发展有关。有几个基因座可能导致易感性,包括组织相容性抗原 HLA-DR2 和 HLA-DR3。两者相同的中等一致率介于 25%至 60%之间,提示该遗传倾向的多基因性质,以及环境因素的作用。

[0034] 关于自身抗体产生的来源已经提出很多原因。提出的 T 细胞帮助抗双链 DNA 抗体分泌的机制包括 T 细胞识别诸如组蛋白等 DNA 相关的蛋白质抗原,以及识别在 II 类 MHC 中的抗 DNA 抗体来源的肽。抗体的类别也可能是一种因素。在 NZB/NZW 遗传性狼疮小鼠中,阳离子的 IgG2a 抗双链 (ds)DNA 抗体是病原性的。大约在六个月大时,这些动物体内的自身抗体分泌由 IgM 向 IgG 转化, T 细胞可能在调节 IgG 产生中起重要作用。

[0035] 因免疫复合物沉积、白细胞凝血或血栓形成所造成的复发的血管损伤,导致疾病的表现。另外,细胞毒性抗体可以介导自身免疫性溶血性贫血和血小板减少,针对特定细胞抗原的抗体可以破坏细胞功能。后面的一个例子是抗神经元抗体和神经精神性 SLE 之间的相关性。

[0036] NKT 细胞组成一个淋巴细胞亚群,在胸腺、脾、肝和骨髓中含量丰富,在肺中也有。它们在胸腺中由 CD4⁺ 和 CD8⁺ 祖细胞发育而来,在血液中循环,具有独特的细胞质颗粒,可以通过它们在体外不需要提前免疫或激活即可杀死特定淋巴瘤细胞系的能力进行功能鉴定。NKT 细胞的杀伤机制同在获得性免疫应答中产生的细胞毒性 T 细胞所利用的机制相同;细胞毒性颗粒被释放到结合的靶细胞的表面,它们所含的效应蛋白质穿透细胞膜引起程序性细胞死亡。

[0037] NKT 细胞所表达的表面标志物同时具有自然杀伤细胞(如 NK1.1 和 CD161)及普通

T 细胞 (如 TCR) 两种特征。一些 NKT 细胞识别由非多态性主要组织相容性复合物 (MHC) I 类样蛋白 CD1d 递呈的糖脂抗原,并在小鼠中表达不变的 TCR。

[0038] NKT 细胞抗原受体。NKT 细胞抗原的受体是一种 $\alpha : \beta$ T 细胞受体,由 T 细胞受体 α 和 T 细胞受体 β 两条蛋白质链组成。同普通 T 细胞上的受体一样,相信 NKT 细胞受体不能识别原始状态下的抗原。普通 T 细胞识别结合于 MHC 分子上的肽抗原的复合配体。认为 NKT 细胞抗原受体的递呈分子是 CD1d, CD1d 常常与糖脂结合,而不是与肽片段结合。据信与其他 MHC I 类分子类似,结合的抗原是被夹在 CD1d 的两个 α 螺旋片段之间。T 细胞受体与其化合物配体相互作用,使其既同 CD1d 接触又同抗原接触。

[0039] T 细胞受体的氨基酸序列显示,两条链都有一个与免疫球蛋白 V 域具有同源性的氨基末端可变 (V) 区,一个与免疫球蛋白 C 域具有同源性的恒定 (C) 区,以及一个短的铰链区,其含有形成链间二硫键的半胱氨酸残基。每一条链通过一疏水的跨膜域跨越脂双层,并且以一短的细胞质尾结束。

[0040] TCR α 基因座含有 V 和 J 基因区段 (V α 和 J α)。TCR β 基因座除 V β 和 J β 基因区段之外还含有一个 D 基因区段。T 细胞受体 α 和 β 链的第三个高变环 (CDR3) 由 D 和 J 基因区段所形成,组成了 T 细胞受体的抗原结合位点的中心;该位点的外周由 CDR1 和 CDR2 环的等同物组成,其在种系 V α 和 V β 基因区段内编码。

[0041] 在人类中 NKT 细胞的 T 细胞受体由优先与可变 V β 11 链配对的不变的 V α 24J α Q 重排组成。在小鼠中,NKT 细胞表达与可变 V β 8、V β 7 或 V β 2 配对的不变的 V α 14J α 281 重排。

[0042] CD1 :CD1 是一种非多态性的、MHC I 类分子类似的、非 MHC 编码的分子,可以非共价地与 β_2 微球蛋白 (β_2m) 结合。在人类中,鉴定了 CD1 的 5 种同种型 (CD1a, b, c, d 和 e),已知人类 B 细胞表达 CD1c 和 CD1d。在小鼠中,只鉴定了 CD1d 这一种同种型。已证实 CD1 分子是糖脂和疏水性肽的抗原递呈分子。在本发明的一些实施方案中,CD1 的同种型是 CD1d,它与 NKT 细胞抗原受体相互作用。

[0043] 已经克隆了人和小鼠的 CD1 同种型,并对它们的序列进行了表征。可以从 Genbank 数据库中找到人的 CD1a 的序列,登录号是 M28825。CD1b 序列可以在 2000 年 3 月 31 日 64.00 版的蛋白质序列数据库中的 P1R1 部分找到,登录号是 B39957、B45801 和 179470 (Martin 等人。(1987)Proc Natl Acad Sci U. S. A 84(24) :9189-93)。CD1c 序列可以在 P1R1 中找到,登录号是 C45801、C39957 和 179472 (Aruffo 和 Seed (1989) J. Immunol. 143 :1723-1730)。可以从 Genbank 数据库中找到人的 CD1d,登录号是 J04142 (Baik 等人。(1989)Proc Natl Acad Sci U. S. A 86(1), 252-256)。可以从 Genbank 数据库中找到人的 CD1e 序列,登录号是 X14975、X15110 (Calabi 等人。(1989)Eur. J. Immunol. 19(2), 285-292)。

[0044] 为实现本发明的目的,无应答化剂将结合于受治疗的患者的抗原递呈细胞上的 CD1 蛋白。也就是说,为用于对人的治疗,无应答化剂将结合于人的 CD1 等之上。因为 CD1 不是高度多态性的,一名患者一般表达上述野生型蛋白质,尽管也可能存在一名患者表达变异形式的蛋白质的例外。

[0045] 制剂可以特异地结合于一种或多种人 CD1 同种型之上,特别是那些在抗原递呈细胞上表达的同种型,例如 CD1d。在一个替代实施方案中,交叉反应性无应答化剂识别所有 CD1 同种型上的共同表位;或者同种型特异性抗原的一种混合体;通常用于结合所有在患

者体内存在的同种型。

[0046] NKT 细胞抑制剂：是一种通过其抗原受体干扰 NKT 细胞的激活的分子，例如，通过竞争性或非竞争性地结合于 CD1 胞外域、或结合于 T 细胞抗原受体、或阻断已激活抗原的递呈。通常，抑制剂的结合亲和力至少在约 100 μ M。抑制剂可以是肽、脂质例如糖脂、磷脂等，可以单独存在或与某种肽联合；有机小分子、拟肽、可溶性 T 细胞受体，等等。糖脂是一种优选的阻断剂。

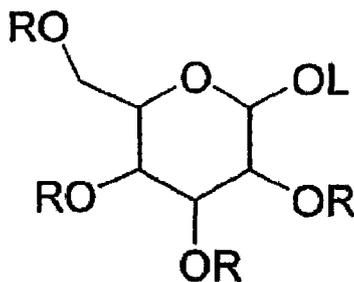
[0047] 在本发明的一个实施方案中，NKT 细胞抑制剂是一种导致无应答化的糖脂。目标糖脂具有如下通式结构：

[0048] G-L

[0049] 其中 L 是一种脂质，G 是一种糖，该糖可以是己糖或戊糖，并且可以是单糖、双糖、三糖、寡糖或多糖，或者是其衍生物。目标糖包括阿洛糖、阿卓糖、葡萄糖、甘露糖、古洛糖、艾杜糖、半乳糖、塔罗糖、果糖、麦芽糖、乳糖和蔗糖。糖和脂质之间的连接可以在任何 O 原子处，通常在 1、2、3 或 4 位，更常见的是在 1 位。该连接可以是 α 构型也可以是 β 构型，在一些特定的实施方案中，该连接是 β 构型。目标脂质包括神经酰胺，具有一个酰基链和一个鞘氨醇链。

[0050] 例如，NKT 细胞抑制剂可具有如下结构：

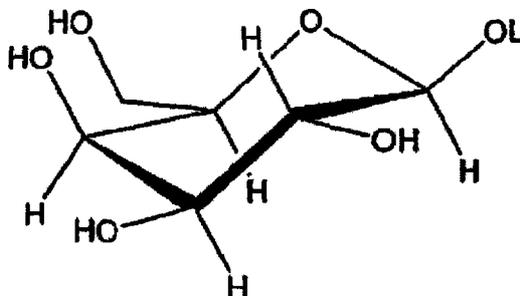
[0051]



[0052] 其中 L 是脂质，R 选自 H、戊糖、己糖、寡糖或多糖；或烷基、芳基或烯基，例如 C1 到 C6 的低级烷基，该烷基任选地被取代，取代基可以包括但并不限于烷基、芳基、烯基、芳烷基、芳烯基、环烷基、环烷基烷基或环烷基烯基；并且可以包含一个或多个 N、S 或 O 杂原子。每一个 O 原子的方向可以是 α 或 β ，例如葡萄糖、半乳糖、甘露糖等等。

[0053] 在本发明的一个实施方案中，G 具有如下结构：

[0054]



[0055] 其中 G 是半乳糖，并且与 L 的连接在 1 位（如图所示），为 α 构型或 β 构型。

[0056] 一些脂质可以很好地用作 L，包括 C8 至 C30 脂肪酸、长链仲醇、长链氨基醇、脂肪酸与长链二羟基或三羟基碱的酰胺；等等。例如，糖基部分（一个或多个单位）可以与脂肪醇或羟基脂肪醇的一个羟基相连，或者与脂肪酸的羰基相连。适合的脂质的例子包括神经酰

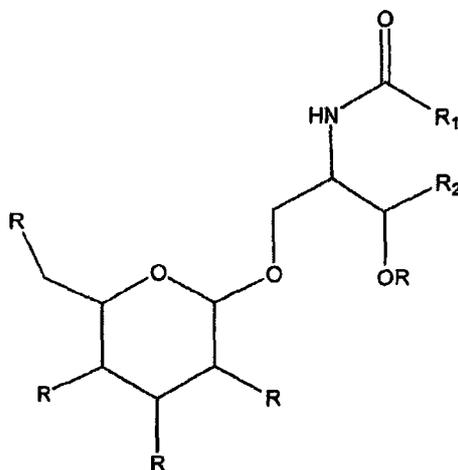
胺、神经鞘磷脂、脑苷脂等,包括神经鞘氨醇、二氢神经鞘氨醇、C20-二氢神经鞘氨醇、植物鞘氨醇、C20-植物鞘氨醇、脱氢植物鞘氨醇、神经鞘氨二烯醇(sphingadienine)等。

[0057] 支链鞘氨基醇碱在一些海洋无脊椎动物中有描述。因此,一种具有支链C19烷基链和三个双键的碱,2-氨基-9-甲基-4,8,10-十八烷基三烯-1,2-二醇,显示存在于来自海星的葡萄糖苷鞘氨醇(Irie A等人.,J Biochem 1990,107,578)以及来自乌贼神经的鞘磷脂(Ohashi等人.J Lipid Res 2000,41,1118)中。具有两个双键的支链碱已经在来自海葵的脑苷脂类中(Karlsson等人.Biochim Biophys Acta1979,574,79)以及来自真菌的菌丝体中(Kawai等人.J Lipid Res1985,26,338)发现。

[0058] 神经酰胺是脂肪酸同长链的二羟基或三羟基碱形成的酰胺,在动物中最常见的就是鞘氨醇,而在植物中则是植物鞘氨醇。神经酰胺的酰基通常是长链的饱和或单不饱和脂肪酸。在动物神经酰胺中所发现的最常见的脂肪酸是18:0、24:0和24:1(n-9),也发现了长链羟基脂肪酸。

[0059] 在一个实施方案中,NKT细胞抑制剂具有下述结构:

[0060]

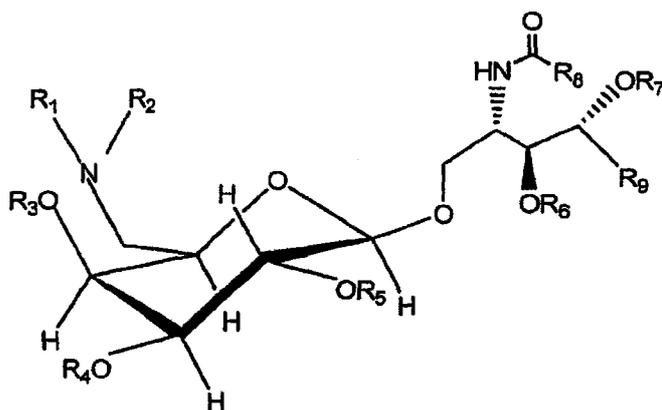


[0061] 其中R₁和R₂可以相同或不同,独立地选自约8到30个碳原子的烷基或烯基,可以是直链的也可以是支链的,通常是直链的,通常不超过0、1、2或3个不饱和键,该链任选地可以被取代或磷酸化或硫酸化;或者是其衍生物,包括酯类等;并且

[0062] 每一个R可以相同或不同,独立地选自H、OH、低级烷基、芳基或烯基的醚,该烷基任选地被取代,取代基包括但不限于烷基、芳基、烯基、芳烷基、芳烯基、环烷基、环烷基烷基或环烷基烯基;并且可以包含一个或多个N、S或O杂原子、O连接的戊糖、O连接的己糖、O连接的寡糖或多糖;或者烷基、芳基、烯基,例如C1到C6低级烷基,该烷基可以任选地被取代,取代基包括但不限于烷基、芳基、烯基、芳烷基、芳烯基、环烷基、环烷基烷基或环烷基烯基;并且可以包含一个或多个N、S或O杂原子。每一个R原子的方向可以是α或β,例如葡萄糖、半乳糖、甘露糖等等。

[0063] 在一个实施方案中,NKT细胞抑制剂具有下述结构:

[0064]



[0065] 其中, R_1 是: (i) 氢; 或 (ii) $-SO_2R_{10}$, 其中 R_{10} 是: 卤素; 羟基; OR_{11} ; OR_{12} ; 氨基; NHR_{11} ; $N(R_{11})_2$; NHR_{12} ; $N(R_{12})_2$; 芳烷基氨基; 或任选地被以下基团取代的 C_1 - C_{12} 烷基: 卤素、羟基、氧、硝基、 OR_{11} 、 OR_{12} 、酰氧基、氨基、 NHR_{11} 、 $N(R_{11})_2$ 、 NHR_{12} 、 $N(R_{12})_2$ 、芳烷基氨基、巯基、硫代烷氧基、 $S(O)R_{11}$ 、 $S(O)R_{12}$ 、 SO_2R_{11} 、 SO_2R_{12} 、 $NHSO_2R_{11}$ 、 $NHSO_2R_{12}$ 、硫酸根、磷酸根、氰基、羧基、 $C(O)R_{11}$ 、 $C(O)R_{12}$ 、 $C(O)OR_{11}$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $C(O)NHR_{11}$ 、 $C(O)N(R_{11})_2$ 、含有 0-3 个 R_{13} 的 C_3 - C_{10} 环烷基、含有 0-3 个 R_{13} 的 C_3 - C_{10} 杂环基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_5 - C_{10} 环烯基、 C_5 - C_{10} 杂环烯基、含有 0-3 个 R_{14} 的 C_6 - C_{20} 芳基、或含有 0-3 个 R_{14} 的 C_6 - C_{20} 杂芳基; 或者

[0066] C_3 - C_{10} 环烷基、 C_3 - C_{10} 杂环基、 C_5 - C_{10} 环烯基、或 C_5 - C_{10} 杂环烯基, 其任选被一个或多个下述基团取代: 卤素、羟基、氧、 OR_{11} 、 OR_{12} 、酰氧基、硝基、氨基、 NHR_{11} 、 $N(R_{11})_2$ 、 NHR_{12} 、 $N(R_{12})_2$ 、芳烷基氨基、巯基、硫代烷氧基、 $S(O)R_{11}$ 、 $S(O)R_{12}$ 、 SO_2R_{11} 、 SO_2R_{12} 、 $NHSO_2R_{11}$ 、 $NHSO_2R_{12}$ 、硫酸根、磷酸根、氰基、羧基、 $C(O)R_{11}$ 、 $C(O)R_{12}$ 、 $C(O)OR_{11}$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $C(O)NHR_{11}$ 、 $C(O)N(R_{11})_2$ 、烷基、卤烷基、含有 0-3 个 R_{13} 的 C_3 - C_{10} 环烷基、含有 0-3 个 R_{13} 的 C_3 - C_{10} 杂环基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_5 - C_{10} 环烯基、 C_5 - C_{10} 杂环烯基、含有 0-3 个 R_{14} 的 C_6 - C_{20} 芳基、或含有 0-3 个 R_{14} 的 C_6 - C_{20} 杂芳基; 或者

[0067] C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、芳基或杂芳基, 其任选地被一个或多个下述基团取代: 卤素、羟基、 OR_{11} 、 OR_{12} 、酰氧基、硝基、氨基、 NHR_{11} 、 $N(R_{11})_2$ 、 NHR_{12} 、 $N(R_{12})_2$ 、芳烷基氨基、巯基、硫代烷氧基、 $S(O)R_{11}$ 、 $S(O)R_{12}$ 、 SO_2R_{11} 、 SO_2R_{12} 、 $NHSO_2R_{11}$ 、 $NHSO_2R_{12}$ 、硫酸根、磷酸根、氰基、羧基、 $C(O)R_{11}$ 、 $C(O)R_{12}$ 、 $C(O)OR_{11}$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $C(O)NHR_{11}$ 、 $C(O)N(R_{11})_2$ 、烷基、卤烷基、含有 0-3 个 R_{13} 的 C_3 - C_{10} 环烷基、含有 0-3 个 R_{13} 的 C_3 - C_{10} 杂环基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_5 - C_{10} 环烯基、 C_5 - C_{10} 杂环烯基、含有 0-3 个 R_{14} 的 C_6 - C_{20} 芳基、或含有 0-3 个 R_{14} 的 C_6 - C_{20} 杂芳基; 或者

[0068] (iii) $-C(O)R_{10}$, 其中 R_{10} 的定义同上; 或 (iv) $-C(R_{10})_2(R_{15})$, 其中 R_{10} 的定义同上; R_{15} 是氢、 R_{10} 、或 R_{15} 和 R_2 一起在与之相连的碳和氮原子之间形成双键; 或 (v) R_1 和 R_2 一起形成任选被 R_{10} 取代的 3-10 个环原子的杂环基; R_2 是氢, 或者 R_2 和 R_{15} 一起在与之相连的碳和氮原子之间形成双键, 或者 R_2 和 R_1 一起形成任选被 R_{10} 取代的 3-10 个环原子的杂环基。

[0069] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 是相互独立的氢、 C_1 - C_6 烷基、 C_6 - C_{12} 芳烷基或 C_1 - C_6 酰基; R_8 是 $-(CH_2)_xCH_3$; R_9 是直链或支链 C_3 - C_{100} 烷基; R_{11} 是 C_1 - C_{20} 烷基, 任选地被以下基团取代: 卤素、羟基、烷氧基、氨基、烷氨基、二烷基氨基、硫酸根或磷酸根; R_{12} 是芳基, 任选地被以下基团取代: 卤素、卤代烷基、羟基、烷氧基、硝基、氨基、烷氨基、二烷基氨基、硫酸根或磷酸根; 每一个 R_{13} 是独立的卤素、卤代烷基、羟基、烷氧基、氧、氨基、烷氨基、二烷基氨基、硫酸根或磷酸根; 每一个 R_{14} 是独立的卤素、卤代烷基、羟基、烷氧基、硝基、氨基、烷氨基、二烷基氨基

基、硫酸根或磷酸根；X 为 1-100。

[0070] 参考上述通式，上面描述的化合物的亚组是 X 为 24、R₉ 为 n- 十四烷基的那些化合物。

[0071] 其他合适的取代基在 PCT/US2003/008530 中有描述，在此引入作为参考。PCT/US2003/008530 涉及化合物的 α 形式，但这里可对 β 形式进行同样种类的取代。

[0072] 筛选试验：可以筛选候选制剂抑制 NKT 细胞激活的能力。确定结合亲和力和特异性的试验在本领域中公知，包括竞争和非竞争性试验。有用的试验包括 ELISA、RIA 和流式细胞术等。结合试验可以将 CD1 结合于固体基质上，然后将候选配体（制剂）加至结合的 CD1 上。可以通过等离子激元共振光谱法（Biacore 试验）测定结合亲和力。另外，在诸如糖脂等竞争物的存在下，候选阻断剂可以同已结合的 CD1 结合。

[0073] 结合试验还可用于确定候选制剂是否干预分子与 CD1 的结合；或者是否干预 NKT 细胞受体与 CD1/ 糖脂复合物之间的相互作用。一种确定候选制剂是否同 NKT 细胞受体 (NKTCR) 结合的试验可以利用 CD1 二聚体或四聚体（参见 Kronenberg 等人 . (2001) P. N. A. S. 98 :2950-2952）。例如，一个 CD1 四聚体可以负载一个候选制剂；然后使产生的复合物与 NKTCR 接触，通常与 NKT 细胞接触，并且通过如流式细胞术定量测定结合水平。作为阳性对照，可以定量测定 CD1 四聚体与 α -半乳糖基神经酰胺的结合；或者在竞争结合试验中使用。在一些实施方案中，目标制剂在这些条件下将结合 NKTCR。

[0074] 在另外一些实施方案中，目标制剂干扰结合于 CD1 及 TCR 的激动剂。这种阻断可以如下测定：首先将阳性对照（激动剂，例如 α -半乳糖基神经酰胺）加至 CD1 二聚体或四聚体上，该四聚体可以被可检测地标记。用得到的试剂结合 NKT 细胞群体，例如通过流式细胞术定量测定其结合。为了显示候选制剂阻断了结合，四聚体同候选拮抗剂一同温育，然后加入激动剂；并且比较得到的复合物与激动剂复合物结合 NKT 细胞的能力。在一些实施方案中，目标制剂将干预激动剂与 CD1 的结合之间的相互作用。

[0075] 通常在不同试剂浓度下平行进行多个试验混合物，以获得针对不同浓度的不同反应。一般这些浓度中有一个是阴性对照，即浓度为零或低于能检测出的水平。

[0076] 目标试验直接针对能够抑制 NKT 细胞免疫功能的制剂。目标试验可以针对 NKT 细胞受体、和 / 或 CD1 的结合试验；或者也可以利用针对评价 NKT 细胞激活的功能试验、和 / 或用于 NKT 细胞激活的动物模型。

[0077] 可以用于筛选抑制性化合物的体外功能试验基于 α -半乳糖基神经酰胺在免疫细胞混合物中激活 NKT 细胞的能力，例如小鼠脾细胞，其包括 NKT 细胞和抗原递呈细胞。一般将 α -半乳糖基神经酰胺加入到细胞培养物中 24 小时，然后通过细胞增殖及分泌 IL-4 和 IFN- γ 至培养上清液中的情况来测定激活。

[0078] 可以通过下述方法筛选抑制性化合物，即将细胞混合物与候选抑制分子（拮抗剂）进行预温育，然后加入 α -半乳糖基神经酰胺激活分子（激动剂），并测定细胞增殖。24 小时后检测上清液中细胞因子分泌的情况。通过增殖及细胞因子分泌的减少确定抑制能力。或者，细胞培养物可以包括纯化的 NKT 细胞和纯化的抗原递呈细胞，特别是树突状细胞。

[0079] 候选制剂的来源非常广泛，包括从合成的及天然的化合物文库中获取。例如，可以通过多种手段随机及定向地合成多种有机化合物及生物分子。此外，细菌、真菌、植物及动

物提取物形式的天然化合物文库也可以获得或者很容易产生。另外,天然的或合成产生的文库及化合物很容易通过常规的化学、物理及生物化学手段进行修饰。已知的药制剂可进行定向或随机的化学修饰,例如酰基化、烷基化、酯化、酰胺化(amidification),以产生结构类似物。

[0080] 为了治疗哮喘,CD1 特异性抗体可用于抑制或阻断 NKT 激活。可以通过用含有整个 CD1 蛋白或其一部分的肽免疫宿主动物来获取合适的抗体。合适的宿主动物包括小鼠、大鼠、绵羊、山羊、仓鼠、兔等。蛋白质免疫原的来源可以是小鼠、人、大鼠、猴等。一般宿主动物是不同于免疫原的种,例如,小鼠 CD1 用于免疫仓鼠,人 CD1 用于免疫小鼠等。来源于高保守区的肽可用作免疫原产生交叉特异性抗体。免疫原可包含全蛋白质或其片段或衍生物。优选的免疫原包含人 CD1 的全部或部分胞外域,这些残基可能包含在天然 CD1 中发现的翻译后修饰,例如糖基化。包含胞外域的免疫原采用本领域公知的技术获得,例如,利用常规重组方法表达克隆的基因,从 T 细胞中分离,分选高水平表达 CD1 的细胞群体,等等。利用常规技术生产单克隆抗体。一般是,将被免疫的宿主动物的脾和 / 或淋巴结作为浆细胞来源。将浆细胞同骨髓瘤细胞融合实现无限增殖化,产生杂交瘤细胞。利用标准技术筛选来自各个杂交瘤的培养上清液,鉴定出那些产生具有期望的特异性的抗体的杂交瘤。用于生产人蛋白质的单克隆抗体的合适的动物包括小鼠、大鼠和仓鼠等。为了产生抗鼠蛋白质的抗体,一般动物为仓鼠、豚鼠或兔等。通过常规技术从杂交瘤细胞的上清液或腹水中纯化抗体,例如,利用结合于不溶性支持物、蛋白 Asepharose 等的 CD1 进行亲和层析。为了体内使用,特别是向人体内注射,期望降低阻断剂的抗原性。受体针对阻断剂的免疫应答将有可能缩短治疗有效的时间范围。有几种方法可用于提供人或人源化的抗体,包括利用转基因动物宿主生产人抗体、对动物抗体修饰使其“人源化”或“表面重建(resurface)”;或者是利用噬菌体展示筛选技术选择人的抗体片段。在 Vaughn 等人.(1998)Nat. Biotech. 16 : 535 中可以发现关于人及人源化抗体的综述。将抗体人源化的方法是本领域公知的。可以通过重组 DNA 技术用相应的人序列替换其 CH1、CH2、CH3、铰链区、和 / 或框架区,从而对目标抗体进行工程化(参见 WO 92/02190 ;Roguska 等人.(1994)P. N. A. S. 91 :969-973 ;Jones 等人.(1986)Nature 321 :522-525 ;Padlan(1991)Mol. Immunol. 28 :489-498)。

[0081] 在筛选试验中可用到各种其他的试剂。这些试剂包括盐、诸如白蛋白等天然蛋白质、去污剂等,它们可用于促进最佳的蛋白质与 DNA 的结合和 / 或减少非特异性或背景干扰。也可能用到改善试验效果的试剂,例如蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂、抗微生物剂等。

[0082] 功能性试验包括在体外及体内条件下对 NKT 细胞的功能性激活进行评价。可以通过如下指标测定激活 :NKT 细胞的增殖、诸如 IFN- γ 和 IL-4 等细胞因子的释放、对靶细胞的杀伤等。激活的阳性对照可以包括利用由表达 CD1 的抗原递呈细胞递呈的 α -半乳糖基神经酰胺,或其无细胞类似物,如 CD1 四聚体。

[0083] 可以利用多种亲和方法从患者外周血中分离 NKT 细胞,例如流式细胞技术、免疫磁珠等。可以对 NKT 细胞克隆或 NKT 细胞杂交瘤进行激活试验,例如利用人细胞、啮齿动物细胞等。监测 NKT 细胞激活的试验是本领域技术人员公知的,包括增殖试验及细胞因子释放试验,包括 ELISA 斑点试验。

[0084] 增殖试验测定 NKT 细胞响应特定抗原的增殖水平。在一个示例性的试验中,制备小鼠脾细胞、纯化的 NKT 细胞与树突状细胞等的混合物,并洗涤,然后在诸如 α -半乳糖基

神经酰胺等激活剂的存在下培养。细胞的培养时间通常为 24 小时至几天。通过监测培养物的 DNA 合成,例如在培养的最后 18 小时加入 ^3H - 胸苷,评估糖脂引起的增殖。

[0085] NKT 细胞毒性试验测定具有杀伤活性的细胞毒性 NKT 细胞的数目。测定 NKT 细胞杀伤其靶细胞的能力。在一个示例性的试验中,用 $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ 标记靶细胞。然后将靶细胞加入到有可能激活的 NKT 细胞的悬液中。通过定量测定裂解细胞的 $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ 释放来测定细胞毒性。在试验中一般要包括自发释放及总释放的对照。比 ^{51}Cr 释放百分比可以根据自发释放的百分比来计算。

[0086] 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和其他免疫特异性的试验可用于测定被激活的 NKT 细胞的细胞因子谱,并且可用于监测诸如 $\text{IFN-}\gamma$ 、 IL-4 等细胞因子的表达。捕获抗体可以是任何对目标细胞因子具有特异性的抗体,如上所述,NKT 细胞培养物的上清液很方便地用作抗原的来源。在阻断及洗涤之后,加入被标记的检测抗体,作为结合的标记的函数确定存在的蛋白质的浓度。

[0087] 制剂

[0088] NKT 细胞抑制剂可以在溶液中或以任何其他在药学上适合于给药的形式提供。配制该制剂用于以施用这些物质的常用方式给药。典型的制剂是 Remington's Pharmaceutical Sciences,最新版, MackPublishing Company, Easton, PA 中所给出的那些。给药途径的选择基于施用的化合物、患者的状态及被治疗的疾病。一种化合物可以通过不同的途径给药,取决于疾病的严重程度,例如,急症的情况可能需要静脉给药,急性但还不至于威胁生命的情况可以口服治疗,慢性治疗可以通过气雾剂给药。

[0089] 对于治疗用途,特别是气管疾病,优选局部给药。与全身吸收的浓度相比,通过吸入或吹入气雾剂给药可以提供高水平的药物浓度。另外,也可以通过注射给药,包括肌肉、静脉 (IV)、皮下或腹膜注射,最优选 IV 和局部注射。但是,也可以使用其他给药方式,使药物进入系统循环,例如口服、透粘膜或透皮制剂,它们可作为栓剂、皮肤贴剂或鼻内应用。任何使药物进入血流或局部进入肺的适合的制剂都可能适用。

[0090] 对于注射,合适的制剂一般包括利用生理盐水、Hank 溶液或其他缓冲液制成的水溶液或悬液,任选地包括稳定剂或其他少量成分。也可以使用脂质体制剂和其他形式的微乳剂。也可以将药物以冻干的形式提供,并重新配制进行给药。透粘膜和透皮给药一般包括促进通过粘膜或皮肤障碍的制剂,例如胆汁、盐、夫西地酸及其类似物、各种去污剂等。也可以进行口服给药 (例如,参见 Miyamoto 等人, 2001Nature. 413(6855) 531-4)。

[0091] 制剂的性质一定程度上取决于所选择的药物的性质。利用已知技术及本领域技术人员公知的配制原则制备合适的制剂。在特定药物组合物中所含的药物的百分比也取决于制剂的性质;该百分比可以在一个很宽的范围内变化,从大约 1 重量%至大约 85 重量%。

[0092] 可以借助于用于吸入途径的药物递送系统向患者给药。化合物可以一种适合吸入给药的方式配制。药物递送系统是适合通过将药物局部施用至支气管粘膜层而进行呼吸治疗的系统。本发明可以利用依靠压缩气体的力量从容器中排出药物的系统。气溶胶或加压包装可以用于此目的。

[0093] 这里所用的术语“气溶胶”指其传统用意,即在压力下由喷射气体带至治疗应用部位的极细的液体或固体颗粒。当本发明中用到药物气溶胶时,气溶胶中含有治疗性的活性化合物,该活性化合物可以在流载体和喷射剂的混合物中溶解、悬浮或乳化。气溶胶可以

是溶液、悬浮液、乳液、粉末或半固体制剂的形式。在本发明中用气溶胶的目的是作为细的固体颗粒或流体雾经患者的呼吸道给药。可以使用本领域技术人员熟知的各种类型的喷射剂。适合的喷射剂的例子包括但并不限于碳氢化合物或其他合适的气体。在加压的气溶胶的情况下,可以通过提供一个递送计量的量的值来确定剂量单位。

[0094] 本发明也可以利用喷雾器实现,喷雾器是一种能够产生非常细的在气体中大小基本均一的流体粒子的装置。优选地,含有药物的流体以液滴的方式分散。小的液滴可以被气流携带通过喷雾器的出管带出。产生的雾可以渗透至患者的呼吸道。

[0095] 含有药物,含有或不含润滑剂、载体或喷射剂的粉末组合物,可以向需要治疗的哺乳动物施用。本发明的实施方案可以利用传统的通过吸入施用粉末状药物组合物的装置来实施。例如,化合物同诸如乳糖或淀粉等适合的粉末基质的粉末混合物可以在如胶囊或药筒如明胶或泡罩包装中以单位剂量形式存在,可以借助吸入器由其施用粉末。

[0096] 含有药物的小颗粒可以干粉的形式保存于容器中。在贮存或配制期间,它们可以同任何适合的药制剂、载体、填充剂等混合,它们可以通过产生具有用于最终治疗用途的性质的产品所需的任何技术加工。特别是,可以递送入肺的制剂颗粒的配制,例如利用可计量的剂量或干粉吸入装置,属于本领域技术人员的公知技术。

[0097] 这里可以使用“药学可接受的赋形剂”,该术语指的是用于制备药物组合物的化合物,它通常是安全的,无毒的,且既不是生物学上不期望的也不是在其他方面不期望的,包括药学用途可接受的赋形剂。在说明书及权利要求书中使用的药学可接受的赋形剂包括一种或一种以上的这样的赋形剂。合适的赋形剂的一些例子包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、黄蓍胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、磷脂酰胆碱、纤维素、无菌水、糖浆及甲基纤维素。

[0098] 制剂中还可以包括:诸如滑石粉、硬脂酸镁及矿物油等润滑剂,湿润剂,乳化剂及悬浮剂,及诸如甲基和丙基羟基-苯甲酸酯和苯甲醇等防腐剂。

[0099] 含有本发明的活性制剂的制剂可以用各种赋形剂配制。药学可接受的赋形剂有可能是挥发性的或非挥发性的。挥发性赋形剂,在加热时,同时挥发、雾化并同抗组胺剂一同吸入。本领域公知这类赋形剂,包括但不限于气体、超临界流体、液态及固态溶剂。下面列出这一类中典型的载体:水;萜,例如薄荷醇;醇,例如乙醇、丙二醇、甘油及其他类似的醇;二甲基酰胺;二甲基乙酰胺;蜡;超临界的二氧化碳;干冰;及其混合物。其他赋形剂的例子包括,仅作为例子,表面活性剂,是具有亲脂性及亲水性部分的双亲性分子,在这两种特性之间具有不同的平衡。如果分子是亲脂的,则该物质在水中的低溶解性可能会限制其应用。然而,如果亲水部分占绝对优势,则分子的表面活性特性可能较小。因此,为使其有效,表面活性剂必须要打破充足的可溶性及充足的表面活性之间的平衡。所有的胆汁酸盐及其衍生物(乌索脱氧胆酸盐、牛磺胆酸盐、甘氨酸胆酸盐、及牛磺二氢夫西地酸的钠盐)可以有效地增强在肺中的吸收。

[0100] 磷脂、糖苷、辛基吡喃葡萄糖苷、诸如硫代吡喃葡萄糖苷和吡喃麦芽糖苷等烷基糖苷、环糊精及其衍生物可以有效地增强鼻吸收,并且在肺中也可能发挥相似的作用。其他可能有效的表面活性剂是水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸钠和诸如甘草酸盐、植物皂甙和酰基肉毒碱等天然存在的表面活性剂。

[0101] 本发明制剂中可以使用脂质,仅作为例子,例如是合成的、半合成的或天然存在的

脂质,包括磷脂、生育酚、类固醇、脂肪酸、诸如白蛋白等糖蛋白、带负电荷的脂质及阳离子脂质。关于磷脂,可能包括下述脂质:卵磷脂酰胆碱(EPC)、卵磷脂酰甘油(EPG)、卵磷脂酰肌醇(EPI)、卵磷脂酰丝氨酸(EPS)、磷脂酰乙醇胺(EPE)和磷脂酸(EPA);大豆相应物、大豆磷脂酰胆碱(SPC);SPG、SPS、SPI、SPE和SPA,氢化的卵及大豆相应物(例如HEPC、HSPC)、由含有12至26个碳原子链的脂肪酸在甘油2和3位和不同的首基(包括胆碱、甘油、肌醇、丝氨酸、乙醇胺)在甘油的1位通过酯键连接组成的其他磷脂,以及相应的磷脂酸。这些脂肪酸的链可以是饱和的也可以是不饱和的,磷酯可以由不同链长度及不同不饱和度的脂肪酸所组成。特别是,制剂的组成可以包括DPPC,这是天然存在的肺表面活性剂的主要成份。其他例子包括二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)和二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)和二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE),和混合的磷酯,如棕榈酰硬脂酰磷脂酰胆碱(PSPC)和棕榈酰硬脂酰磷脂酰甘油(PSPG),及单酰化的磷酯,如单油酰磷脂酰乙醇胺(MOPE)。甾醇可以包括胆固醇、包括胆固醇半琥珀酸酯在内的胆固醇酯类、包括胆固醇硫酸氢盐和胆固醇硫酸盐在内的胆固醇盐、麦角固醇、麦角固醇酯类包括麦角固醇半琥珀酸酯、麦角固醇盐类包括麦角固醇硫酸氢盐和麦角固醇硫酸盐、羊毛脂醇、羊毛脂醇酯类包括羊毛脂醇半琥珀酸酯、羊毛脂醇盐类包括羊毛脂醇硫酸氢盐和羊毛脂醇硫酸盐。生育酚类可以包括生育酚、包括生育酚半琥珀酸酯在内的生育酚酯类、包括生育酚硫酸氢盐和生育酚硫酸盐在内的生育酚盐。术语“甾醇化合物”包括甾醇、生育酚等等。

[0102] 利用的阳离子脂质可以包括脂肪酸的铵盐、磷脂和甘油酯。脂肪酸包括碳链长为12至26个碳原子的脂肪酸,可以是饱和的也可以是不饱和的。一些具体的例子包括:十四胺、十六胺、月桂胺和硬脂酰胺、二月桂酰乙基磷酸胆碱(DLEP)、二肉豆蔻酰乙基磷酸胆碱(DMEP)、二棕榈酰乙基磷酸胆碱(DPEP)和二硬脂酰乙基磷酸胆碱(DSEP)、N-(2,3-二-(9-(Z)-十八碳烯氧基)-丙-1-基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)和1,2-二(油酰氧基)-3-(三甲基铵基)丙烷(DOTAP)。可以利用的带负电荷的脂质包括磷脂酰甘油(PG)、磷脂酸(PA)、磷脂酰肌醇(PI)和磷脂酰丝氨酸(PS)。例子包括DMPG、DPPG、DSPG、DMPA、DPPA、DSPA、DMPI、DPPI、DSPPI、DMPS、DPPS和DSPS。

[0103] 对于离子增强剂(例如上面描述的阴离子表面活性剂),抗衡离子的性质可能比较重要。选择特定的抗衡离子可能会影响该增强剂或任何含有该增强剂的制剂的粉末性质、溶解性、稳定性、吸水性及强化剂和局部/系统毒性。还可能影响与它结合的活性剂的稳定性和/或溶解性。通常,单价金属离子例如钠、钾、锂、铷、和铯、氨和有机胺。这些有机胺的例子包括乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、2-氨基-2-甲基乙胺、甜菜碱、乙二胺、N,N-二苄基亚乙基四胺、精氨酸、六亚甲基四胺、组氨酸、N-甲基哌啶、赖氨酸、哌嗪、亚精胺、精胺和三(羟甲基)氨基甲烷。

[0104] 在NKT细胞抑制剂制剂中可用的其他赋形剂可以是,仅作为举例,淀粉微球和螯合剂,例如乙二胺四乙酸(EDTA)的钠盐。

[0105] NKT细胞抑制剂/赋形剂(或NKT细胞抑制剂/赋形剂/稀释剂)组合的优选比例可以由药学领域普通技术人员根据标准方法很容易地确定,基于如下标准:有效、一致地施用最佳剂量、副作用最小及吸收率可以接受。

[0106] 有几种不同类型的吸入方法可以用于本发明。本发明的拮抗剂可以配制为如下

三种不同的吸入制剂类型。第一,可以用低沸点的喷射剂配制本发明的抑制剂。这种制剂通常通过传统的计量剂量吸入器(MDI's)给药。但是,可以改进传统的MDI's以提高获得可重复剂量的能力,这是通过测定患者的吸入量和流速的方法,如美国专利5,404,871和5,542,410所述。另外,本发明的抑制剂可以配制成水溶液或乙醇溶液,并通过传统的喷雾器进行施用。但是,更优选的是将这些溶液制剂雾化,这使用如美国专利5,497,763、5,544,646、5,718,222和5,660,166所公开的设备 and 系统来实现。最后,本发明的抑制剂化合物可以配制成干粉制剂。这种制剂可以通过在产生干粉的气溶胶雾后简单地吸入干粉制剂的方式给药。其实现技术在1998年7月7日颁发的美国专利5,775,320及1998年4月21日颁发的美国专利5,740,794中有描述。

[0107] 对于口服制剂,药物可以单独使用或者同合适的添加剂组合制成药片、粉剂、颗粒或胶囊,例如,使用诸如乳糖、甘露糖、玉米淀粉、或马铃薯淀粉等传统的添加剂,使用诸如结晶纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶等粘合剂,使用诸如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠等崩解剂,使用诸如滑石粉或硬脂酸镁等润滑剂,以及在一些实施方案中,使用稀释剂、缓冲剂、湿润剂、防腐剂及调味剂。

[0108] 在本发明的一个实施方案中,口服制剂包含肠衣,所以活性制剂可以到达肠道。肠溶制剂通常用于保护活性成份不受胃内强酸的作用。这种制剂是利用在酸性环境中不溶而在碱性环境中可溶的聚合物膜将固态的剂量形式包裹而产生的。膜的例子是醋酸邻苯二甲酸纤维素、聚乙烯醋酸邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯和羟丙基甲基纤维素醋酸琥珀酸酯、异丁烯酸共聚物和醋酸邻苯二甲酸纤维素。

[0109] 其他肠溶制剂包括由生物可腐蚀性的聚合物制成的工程化的聚合物微球,其显示出同胃肠粘膜和细胞层具有非常强的粘附作用,可以穿透粘膜吸收上皮及覆盖派尔淋巴集结淋巴组织的滤泡相关上皮。聚合物保持同肠道上皮接触较长的一段时间,并实际上通过细胞以及在细胞之间穿透。例如,参见Mathiowitz等人.(1997)Nature386(6623):410-414。药物递送系统也可以利用超多孔水凝胶(SPH)及SPH复合物(SPHC)的核,正如Dorkoosh等人.(2001)J ControlRelease 71(3):307-18中所描述的。

[0110] 制剂通常以单位剂量形式提供,术语“单位剂量形式”指的是适合作为单一剂量用于人的物理上分离的单位,每一个单位包含一个预先确定的量,该量与药学可接受的稀释剂、运载体或载体联合足以产生预想的效果。关于本发明的单位剂量形式的描述取决于所用的具体的药物和将要达到的效果,以及在宿主中与每种复合物有关的药效学。

[0111] 共同制剂:

[0112] 所述NKT细胞抑制剂可以同其他用来缓解SLE、哮喘等症状的药物配制在一起或联合给药。这些药物包括非类固醇抗炎药(NSAID),例如乙酰水杨酸、布洛芬、甲氧萘丙酸、吲哚美辛、萘普酮、托美汀等。皮质激素用于减轻炎症并抑制免疫系统的活性。这类药物中最常开具的是强的松。氯喹(Aralen)或羟氯喹(Plaquenil)对一些狼疮患者也可能非常有效。它们最常用于狼疮的皮肤及关节症状:硫唑嘌呤(依木兰)和环磷酰胺(Cytoxan)抑制炎症并且有可能抑制免疫系统。这些药物的副作用包括贫血、白细胞计数低、及增加感染的危险。其他的药物,例如,甲氨喋呤和环孢霉素,用于控制狼疮的症状。这两种药都是免疫调节药,有其自身的副作用。抗凝剂用于防止血液快速凝结。它们的范围从防止血小板粘连的非常低剂量的阿斯匹林到肝素/香豆素。

[0113] 可以与本发明的 NKT 细胞抑制剂联合给药的药物包括任何可通过吸入施用的药物,例如,诸如可待因、双氢吗啡、麦角胺、芬太尼或吗啡等镇痛药,诸如地尔硫卓等抗咽痛药,诸如色甘酸盐、酮替芬或萘多罗米等抗变应性药,诸如先锋霉素类、青霉素类、链霉素、磺胺类、四环素类或喷他咪等抗感染药,诸如美沙吡林等抗组胺剂,诸如倍氯米松、氟尼缩松、布地奈德、替泼尼旦、曲安奈德或氟替卡松等消炎药,诸如那可丁等镇咳药,诸如麻黄素、肾上腺素、非诺特罗、福莫特罗及异丙肾上腺素、间羟异丙肾上腺素、苯肾上腺素、苯丙醇胺、吡布特罗、瑞普特罗、利米特罗、沙丁胺醇、沙美特罗、特布他林、乙基异丙肾上腺素、妥洛特罗、奥西那林或(-)-4-氨基-3,5-二氯- α -[[[6-[2-(2-吡啶基)乙氧基]己基]-氨基]甲基]苯甲醇等支气管扩张剂,诸如阿米洛利等利尿药,诸如异丙托铵、阿托品或氧托溴铵 (oxitropium) 等抗胆碱能类药,诸如可的松、氢化可的松或泼尼松龙等激素,诸如氨茶碱、胆茶碱、赖氨酸茶碱或茶碱等黄嘌呤类,以及诸如胰岛素或高血糖素等治疗性蛋白质或多肽。本领域技术人员应当清楚,适当时,为了优化药物的活性和/或稳定性,药物可以是盐的形式(例如碱金属或者胺盐或者酸加成盐)或酯的形式(例如低级烷基酯)或溶剂化物的形式(例如水合物)。

[0114] 将 NKT 细胞抑制剂施用于出现不希望的 NKT 细胞激活的患者,这些患者可能包括患有哮喘等变应性疾病、SLE 等的个体。SLE 患者的疾病指征可能累及皮肤、关节、肾和/或中枢神经系统。在其他的实施方案中,癌症患者也可能因抑制 NKT 细胞的方法而受益,目的是减轻免疫监视的下调。动脉粥样硬化患者也可能因本发明的方法而受益。

[0115] 剂量

[0116] 可以使用各种给药方法。制剂可以是吸入、血管内注射、皮下注射、腹膜内注射等。治疗性制剂的剂量可以在较大范围内变化,取决于疾病的性质、给药频率、给药方式、给药目的、药物从宿主体内的清除率等等。给药剂量取决于已知因素而变化,例如特定药剂的药效学特性,给药的方式及途径,受体的年龄、健康状况及体重,症状的性质及程度,同时的治疗,治疗的频率及期望的效果。剂量可以一周或两周一次不频繁地给药,或者将其分成较小的剂量并每日、每半周一次等给药,以维持有效剂量水平。通常,活性成分的每日剂量可以是约 0.1 至 100mg/kg 体重。适合体内给药的剂量形式通常是每单位含有约 0.1mg 至 500mg 活性成分。以组合物的总重量计,活性成分可以在 0.5 至 95 重量%之间变化。

[0117] 以组合物的总重量计,活性成分可以在 0.5 至 95 重量%之间变化。

[0118] 在一些实施方案中,以组合物的总重量计,活性成分的剂量可以少于 20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或 0.0001%重量。

[0119] 在一些实施方案中,以组合物的总重量计,活性成分的剂量可以大于 20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、

9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、1.25%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001%重量。

[0120] 在一些实施方案中,以组合物的总重量计,活性成分的剂量为:大约0.0001%至大约50%、大约0.001%至大约40%、大约0.01%至大约30%、大约0.02%至大约29%、大约0.03%至大约28%、大约0.04%至大约27%、大约0.05%至大约26%、大约0.06%至大约25%、大约0.07%至大约24%、大约0.08%至大约23%、大约0.09%至大约22%、大约0.1%至大约21%、大约0.2%至大约20%、大约0.3%至大约19%、大约0.4%至大约18%、大约0.5%至大约17%、大约0.6%至大约16%、大约0.7%至大约15%、大约0.8%至大约14%、大约0.9%至大约12%、大约1%至大约10%重量。

[0121] 在一些实施方案中,活性成分的剂量等于或少于每千克体重10g、9.5g、9.0g、8.5g、8.0g、7.5g、7.0g、6.5g、6.0g、5.5g、5.0g、4.5g、4.0g、3.5g、3.0g、2.5g、2.0g、1.5g、1.0g、0.95g、0.9g、0.85g、0.8g、0.75g、0.7g、0.65g、0.6g、0.55g、0.5g、0.45g、0.4g、0.35g、0.3g、0.25g、0.2g、0.15g、0.1g、0.09g、0.08g、0.07g、0.06g、0.05g、0.04g、0.03g、0.02g、0.01g、0.009g、0.008g、0.007g、0.006g、0.005g、0.004g、0.003g、0.002g、0.001g、0.0009g、0.0008g、0.0007g、0.0006g、0.0005g、0.0004g、0.0003g、0.0002g或0.0001g。

[0122] 在一些实施方案中,活性成分的剂量多于每千克体重0.0001g、0.0002g、0.0003g、0.0004g、0.0005g、0.0006g、0.0007g、0.0008g、0.0009g、0.001g、0.0015g、0.002g、0.0025g、0.003g、0.0035g、0.004g、0.0045g、0.005g、0.0055g、0.006g、0.0065g、0.007g、0.0075g、0.008g、0.0085g、0.009g、0.0095g、0.01g、0.015g、0.02g、0.025g、0.03g、0.035g、0.04g、0.045g、0.05g、0.055g、0.06g、0.065g、0.07g、0.075g、0.08g、0.085g、0.09g、0.095g、0.1g、0.15g、0.2g、0.25g、0.3g、0.35g、0.4g、0.45g、0.5g、0.55g、0.6g、0.65g、0.7g、0.75g、0.8g、0.85g、0.9g、0.95g、1g、1.5g、2g、2.5g、3g、3.5g、4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g或10g。

[0123] 在一些实施方案中,活性成分的剂量是每千克体重0.0001-10g、0.0005-9g、0.001-8g、0.005-7g、0.01-6g、0.05-5g、0.1-4g、0.5-4g或1-3g。

[0124] 通常,活性成分的每日剂量可以是约0.1至100mg/kg体重。适合于内部给药的剂量形式通常每单位包含约0.1mg至500mg活性成分。在本发明的一些实施方案中,活性成分的剂量可以是0.1-10mg/kg体重。在本发明的一些实施方案中,活性成分的剂量可以是0.1-5mg/kg体重。在本发明的一些实施方案中,活性成分的剂量可以是0.1-2mg/kg体重。在本发明的一些实施方案中,活性成分的剂量可以是0.5-10mg/kg体重。在本发明的一些实施方案中,活性成分的剂量可以是0.5-2mg/kg体重。

[0125] 在本发明的一些方面,提供单位剂量制剂用于将NKT细胞抑制剂制剂施用于患者。例如,这种单位剂量可以具有少于50mL、40mL、30mL、20mL、10mL、9mL、8mL、7mL、6mL、5mL、4mL、3mL、2mL、1mL、0.9mL、0.8mL、0.7mL、0.6mL、0.5mL、0.4mL、0.3mL、0.2mL、0.1mL、0.09mL、

0.08mL、0.07mL、0.06mL、0.05mL、0.04mL、0.03mL、0.02mL、0.01mL、0.009mL、0.008mL、0.007mL、0.006mL、0.005mL、0.004mL、0.003mL、0.002mL、0.001mL、0.0009mL、0.0008mL、0.0007mL、0.0006mL、0.0005mL、0.0004mL、0.0003mL、0.0002mL 或 0.0001mL 的总体积。在一些实施方案中,这种单位剂量可以具有超过 0.2mL 但少于 500mL 的总体积。在一些实施方案中,这种单位剂量可以具有少于 0.1mL 的总体积。在一些实施方案中,这种单位剂量可以具有 0.1-0.2mL (包括 0.1mL 和 0.2mL) 的总体积。在一些实施方案中,这种单位剂量可以具有少于 0.1 和大于 0.2 的总体积。

[0126] 在一些实施方案中,一个单位剂量具有每个靶部位 0.0001-500mL、0.0005-400mL、0.001-300mL、0.005-200mL、0.01-100mL、0.05-90mL、0.06-80mL、0.07-70mL、0.08-60mL、0.09-50mL、0.1-40mL、0.2-30mL、0.3-29mL、0.4-28mL、0.5-27mL、0.6-26mL、0.7-25mL、0.8-24mL、0.9-23mL、10-22mL、11-21mL、12-20mL、13-19mL、14-18mL 或 15-17mL 的总体积。

[0127] 装置

[0128] 为了在相对较短的给药时间内递送相对较少体积的本发明制剂供吸入,可以利用具有相对较高的气溶胶输出率的吸入装置施用该制剂。有用的装置还可以显示高释放剂量效能(即,在装置中的低残留量)。为了增加系统的总效能,释放可能限制在患者实际吸入的时间范围内(即,呼吸致动)。因此,传统的空气喷射喷雾器可能显示 $3 \mu\text{L}/\text{sec}$ 、大约 $4 \mu\text{L}/\text{sec}$ 、大约 $5 \mu\text{L}/\text{sec}$ 或不少于大约 $8 \mu\text{L}/\text{sec}$ 的气溶胶输出率。本发明实践中可用的吸入装置可以释放装载剂量的至少大约 55%、至少大约 65%、至少大约 75%、更优选至少大约 80%、最优选至少大约 85% 作为气溶胶供患者吸入。在一些实施方案中,本发明所用的吸入装置可以是呼吸致动的,并将释放含有 NKT 细胞抑制剂的制剂的气溶胶颗粒限制在患者实际吸入的时间范围内。吸入器可以是手持的、独立的 (self-contained) 及易携带的吸入器。在本发明另外一些实施方案中,可用于输送浓缩的本发明 NKT 细胞抑制剂制剂的装置,包括与压缩机连接的传统空气喷射喷雾器,该压缩机能产生比传统更高的输出压力。

[0129] 下述实施例仅作说明,不起限制的作用。

[0130] 实施例

[0131] 实施例 1

[0132] 将 α 半乳糖基神经酰胺(来源于 Brigham Young 大学,Provo,UT) 腹膜内注射至 C57BL/6 小鼠内通过选择性激活 NKT 细胞增加了 IL-4 和 IFN- γ 的血清水平。腹膜内注射 C12 β 半乳糖基神经酰胺(AvantiLipids Inc.) 拮抗 α 半乳糖基神经酰胺增加这些小鼠血清中 IL-4、IFN- γ 和 IgE 水平的能力。

[0133] 年龄在 8 周左右的雄性 C57BL/6 小鼠,或者腹膜内注射 $100 \mu\text{g}$ β 半乳糖基神经酰胺、腹膜内注射 $0.1 \mu\text{g}$ α 半乳糖基神经酰胺、或者 在腹膜内注射 $0.1 \mu\text{g}$ α 半乳糖基神经酰胺前一小时或同时腹膜内注射 $100 \mu\text{g}$ β 半乳糖基神经酰胺,或者不进行治疗。 β 半乳糖基神经酰胺从 Avanti Lipids Inc. 获得。糖脂在含有 PBS 的水溶液中。细胞因子的水平通过先前 Zeng 等 (2003) (同上) 所描述的 ELISA 方法测定。6 小时后处死所有的小鼠,测定血清中 IFN- γ 和 IL-4 的水平,结果如图 1A 和 1B 所示。

[0134] IFN- γ 的试验结果显示,正常(未处理的)小鼠的水平大约为 $50\text{pg}/\text{ml}$ 。注射上述 β 半乳糖基神经酰胺并没有提高该水平,但仅注射 α 半乳糖基神经酰胺使该水平增加超过两倍。但是,当在注射 α 半乳糖基神经酰胺前一小时或同时注射 β 半乳糖基神经酰

胺时,水平低于 40pg/ml。这些结果说明 β 半乳糖基神经酰胺阻断了由 α 半乳糖基神经酰胺引起的增加。

[0135] 在对血清 IL-4 水平的测定中也观察到了类似的现象。未处理的小鼠含有大约 100pg/ml 的 IL-4, 仅用 100 μ g β 半乳糖基神经酰胺没有提高该水平。但是, 0.1 μ g α 半乳糖基神经酰胺却使水平增加了大约 10 倍达到了 1000pg/ml。当在注射 0.1 μ g α 半乳糖基神经酰胺前一小时注射 100 μ g β 半乳糖基神经酰胺时, 这种增加完全被阻断, 而当同时给予这两种糖脂时, IL-4 的水平大约是 250pg/ml。这些结果说明, β 半乳糖基神经酰胺不仅能抑制 α 半乳糖基神经酰胺引起的血清 IFN- γ 水平的增加, 还可以抑制 IL-4 水平的增加。我们的结论是, 通过细胞因子向血清中的分泌来判断, β 半乳糖基神经酰胺可以阻断 α 半乳糖基神经酰胺引起的体内 NKT 细胞的激活。

[0136] 在一个独立的实验中, 对三只 C57BL/6 小鼠组一次腹膜内注射单独的 0.1 μ g α 半乳糖基神经酰胺、单独的 100 μ g β 半乳糖基神经酰胺、或者在注射 0.1 μ g α 半乳糖基神经酰胺前一小时注射 100 μ g β 半乳糖基神经酰胺, 在注射前或 10 天后测定平均血清 IgE 水平。结果显示于图 1C 和 1D 中, 证明单独 α 半乳糖基神经酰胺能够增加 IgE 水平约 3 倍达约 500ng/ml, β 半乳糖基神经酰胺引起较小的增加, 至大约 400 μ g/ml, 而糖脂组合导致大约 250 μ g/ml 的水平。条棒显示三份测定的平均值, 线段显示了标准差。通过对独立均值的 studentt 检验判断, 只有单独的 α 半乳糖基神经酰胺组观察到了之前与之后血清水平的显著性差异 ($p < 0.05$)。我们的结论是, β 半乳糖基神经酰胺阻断了 α 半乳糖基神经酰胺引起的血清 IgE 水平的增加。对照 IgG2c 表达未见明显变化。

[0137] 实施例 2

[0138] β 半乳糖基神经酰胺对于哮喘的效果

[0139] 在鼠哮喘模型中, 将 β 半乳糖基神经酰胺施用于 OVA 免疫的 BALB/c 小鼠, 或具有 α 半乳糖基神经酰胺所引起的气道高反应性 (AHR) 的小鼠。

[0140] 材料和方法

[0141] 动物: 从 Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME 获得 BALB/cByJ 小鼠。斯坦福大学动物福利委员会批准了本研究中使用的动物方案。

[0142] 单克隆抗体: 通过硫酸铵沉淀和离子交换层析从腹水中纯化单克隆抗体。使用下述杂交瘤: R46A2 (抗 -IFN- γ mAb), 来自于 ATCC (美国典型培养物保藏中心, Rockville, MD), XMG 1.2 (抗 -IFN- γ 抗体), BVD4-1D11、BVD6-24G2 (抗 -IL-4mAb)。抗 -38C13 独特型 mAb 4G10 (大鼠 IgG2a) 用作同种型对照。

[0143] 免疫。用吸附于 200 μ g 明矾 ($Al[OH]_3$) 上的 OVA (100 μ g/小鼠) 对 BALB/c 小鼠的足垫预处理。7、8、9 天后, 用在 50 μ l NaCl 0.9% 中的 50 μ g OVA 鼻内激发小鼠。最后一次鼻内 OVA 激发后一天, 在吸入增加浓度的乙酰甲胆碱后, 用全身体积描记器测定清醒小鼠的气道高反应性。如上所述进行 α 半乳糖基神经酰胺的免疫。

[0144] 为了在鼻内施用抗原的过程中促进肺吸入, 用生理盐水中的 0.25ml 氯胺酮 (0.44mg/ml) / 甲苯噻嗪 (6.3mg/ml) 对小鼠进行腹膜内 (i.p.) 轻度麻醉。随后, 在肺内可检测到 75% 的鼻内施用的抗原 (Tsuyuki 等人, (1997) J. Exp. Med. 185:1671-9)。

[0145] 细胞因子 ELISA。按此前 Macaulay 等人, (1998) J. Immunol. 160:1694-1700 中描述的方法进行 ELISA。利用的抗体对如下, 按捕获 / 生物素化检测列出: IL-4, BVD4-1D11/

BVD6-24G2 ;IFN- γ ,R4-6A2/XMG1.2。重组细胞因子用作标准物,对于 IL-4 从 500 到 39pg/ml,对于 IFN- γ 从 20 到 2156ng/ml,以 1 : 2 稀释制作曲线。

[0146] 抗 OVA 抗体同种型的测定。在杀死小鼠时取血,利用改进的抗原特异性 ELISA 测定 OVA 特异性抗体。为了测定 OVA 特异性 IgG,用 5 μ g/ml OVA 包被平板,过夜。在洗涤和封闭后,将连续稀释的血清加入平板中。经过一夜温育后,将 HRPO 结合的山羊抗 IgG 亚类特异性抗体 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, ALA) 加至平板。再次洗涤后,加入 OPD 底物,使平板显色并在 492nm 下测定 OD。利用抗 OVA IgG1 mAb 6C1 和抗 OVA IgG2a mAb 3A11 作为标准物定量测定每一种 IgG 亚类。通过 ELISA 测定 OVA 特异性 IgE,利用大鼠抗小鼠 IgE mAb EM95 (5.0 μ g/ml) 包被平板。在加入样品并温育过夜后,洗涤平板并加入生物素化的 OVA (10 μ g/ml)。两小时后,洗涤平板,并加入 HRPO 结合的链霉抗生物素蛋白 (Southern Biotechnology Associates)。用 OPD 底物使平板显色并在 492nm 下测定 OD。利用 ELISA 定量测定用明矾中的 OVA 超免疫的小鼠血清中的 IgE,用 OVA 特异的 IgE 作为标准。

[0147] 气道反应性的测定。根据乙酰甲胆碱诱发的气流阻塞,评估置于全身体积描记器 (型号 PLY 3211, Buxco Electronics Inc., Troy, NY) 中的清醒小鼠的气道反应性。利用下述公式根据 Penh 对肺气流阻塞进行测定: $Penh = \left(\frac{T_e}{RT} - 1 \right) \times \left(\frac{PEF}{PIF} \right)$ 其中, Penh = 增强的中止

(无因次的), T_e = 呼气时间, RT = 放松时间, PEF = 呼气流峰值 (ml/s), PIF = 吸气流峰值 (ml/s) (Hamelmann 等人. (1997) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156 :766-75。由室压获得增强的中止 (Penh)、分钟量、潮气量和呼吸频率,室压用连接前置放大器模块 (型号 MAX2270) 的换能器 (型号 TRD5100) 进行测量,并利用 XA 软件系统 (型号 SFT 1810) 进行分析。通过将小鼠暴露于 0.9% NaCl 中 2 分钟测定乙酰甲胆碱反应性。

[0148] BAL 液的收集和肺组织学。给动物腹膜内注射致死剂量的苯巴比妥 (450mg/kg)。将导管插入气管,然后用 0.8ml PBS 灌洗肺三次,收集液体。利用血细胞计数器计数灌洗液中的细胞,在用 Hansel 染液 (Lide Laboratories, Florissant, MO) 染色的载玻片上确定 BAL 细胞的区别。基于传统的形态学标准通过光学显微镜检查至少可以区分 200 种细胞。在一些动物中,不进行 BAL,而是取出肺,用 PBS 冲洗,用 10% 福尔马林固定,然后用苏木精和伊红染色。

[0149] 结果

[0150] 用 C12- β -半乳糖基神经酰胺处理阻断了 α 半乳糖基神经酰胺引起的 AHR。如图 2 所示,在鼻内施用 1.5 μ g α 半乳糖基神经酰胺 2 小时前静脉内施用 100 μ g C12- β -半乳糖基神经酰胺静脉,极大地减小了 24 小时的 AHR。静脉注射单独的 C12- β -半乳糖基神经酰胺并不诱导任何 AHR。(b) 在鼻内施用 0.5 μ g α -半乳糖基神经酰胺之前 2 小时鼻内及静脉施用 50 μ g C12- β -半乳糖基神经酰胺,大大减小了 24 小时的 AHR,但鼻内施用的 C12- β -半乳糖基神经酰胺引起轻微的 AHR。每一组最少要用 4 只小鼠。

[0151] 用 C12- β -半乳糖基神经酰胺处理减少了 OVA/明矾引起的 AHR。如图 3 所示,通过腹膜内注射 100 μ g OVA 及 200 μ g 氢氧化铝 (明矾) 使小鼠致敏,然后用 50 μ g OVA 在 7、8、9 天后鼻内激发。(a) 在第 10 天测定 AHR。在 OVA/明矾致敏前 1 天及在每次鼻内激发前 6 小时静脉注射 C12- β -半乳糖基神经酰胺 (100 μ g)。这种处理显示可以减小 AHR。

(b) 在 C12- β -半乳糖基神经酰胺处理组,血清 OVA 特异性 IgE 减少。(c) 在用 62.5 μ g/ml OVA (每个孔中 5.0×10^6 个细胞) 培养 4 天后, C12- β -半乳糖基神经酰胺处理组的淋巴结细胞产生的 IFN- γ 稍多、IL-4 较少。每一组测定 4 只小鼠。

[0152] 用抗 CD1d 抗体 (HB323) 处理阻断了 OVA/明矾引起的 AHR。如图 4 所示, (a) 通过腹膜内注射 100 μ g OVA 及 200 μ g 氢氧化铝 (明矾) 使小鼠致敏,然后用 50 μ g OVA 在 7、8、9 天后鼻内激发。在第 10 天测定 AHR。在 OVA/明矾致敏 (500 μ g) 前 1 天及恰好在鼻内激发 (500 μ g) 前腹膜内注射抗 CD1d 抗体。这种处理显示可以降低 AHR。(b) 用抗 CD1d 抗体 (HB323) 处理减小了淋巴结细胞因子的产生。在 OVA/明矾致敏及气道激发后的第 11 天,每个孔中建立了 5.0×10^5 个细胞的淋巴结培养物。用 125 μ g/ml 的 OVA 处理培养物,用 ELISA 方法测定上清液中的细胞因子。每一组最少要用 4 只小鼠,数据代表 2 次实验。

[0153] 在 α -半乳糖基神经酰胺引起 AHR 后, C12- β -半乳糖基神经酰胺引起更多的血清 IFN- γ 产生。组织学显示, C12- β -半乳糖基神经酰胺治疗可以减少细支气管周嗜酸性细胞的炎症。重要的是,静脉注射 C12- β -半乳糖基神经酰胺本身并不导致任何肺部炎症。C12- β -半乳糖基神经酰胺处理组具有大的支气管及纵膈淋巴结。这些小鼠在组织学上显示减少但仍存在的肺嗜酸性细胞浸润,伴随可能比 OVA/明矾阳性对照更多的中性白细胞增多。组织学还证明,在用抗 CD1d 处理的小鼠的肺中嗜酸性细胞炎症减少 (但仍然存在)。HB323 阻断提供了最佳结果,利用 1B1 抗 CD1d 抗体也可以引起 AHR 的降低。

[0154] 这些数据证实, NKT 细胞参与了 AHR 和哮喘的发展,并进一步证实了阻断剂 β -半乳糖基神经酰胺和抗 CD1d 在治疗这些疾病中的有效性。

[0155] 实施例 3

[0156] 抑制剂的口服

[0157] 口服剂量为 100-800 μ g/小鼠的 β -半乳糖基神经酰胺。利用此前 Zeng 等人 (2003) (同上) 所描述的 ELISA 测定 IFN- γ 和 IL-4 细胞因子的水平。

[0158] IFN- γ 实验显示,给药后 24 小时,任何剂量都不导致血清水平的增加。测定血清 IL-4 水平也观察到类似的结果。

[0159] 如图 5 所示, β -半乳糖基神经酰胺口服给药导致在肝中 NKT 细胞标志物的染色减少。

[0160] 100-800 μ g/小鼠的剂量相当于剂量为 4-32mg/kg。利用 FDA 关于人类等量的指南,人类的相当剂量为 0.32-2.6mg/kg。

[0161] 实施例 4

[0162] 狼疮的治疗

[0163] 在系统性红斑狼疮的鼠模型, NZBxNZW 小鼠中,这些动物每周两次注射 PBS、50 μ g/小鼠的 β -半乳糖基神经酰胺、或 100 μ g/小鼠的 β -半乳糖基神经酰胺之一。分析动物的蛋白尿情况,蛋白尿是狼疮发展的指征。在 15 只小鼠的对照组中,在 38 周时,约 30% 的小鼠未出现蛋白尿,而用高剂量 β -半乳糖基神经酰胺治疗的小鼠约有 80% 未出现蛋白尿。这些数据说明, β -半乳糖基神经酰胺可以抑制该模型中狼疮的进展。

[0164] 在本说明书中引用的所有出版物及专利申请均引入本文作为参考,如同每一单独的出版物或专利申请都明确地并个别地引用作为参考。

[0165] 尽管为了清楚理解的目的通过举例说明和实施例对上述发明进行了较详细的描

述,但本领域技术人员根据本发明的教导显然应当知道,可以对其进行一定的改变和调整,而不会偏离权利要求书的精神或范围。

Exp# 05.29.04(Revised)
C57BL/6, F, 4-6 周龄

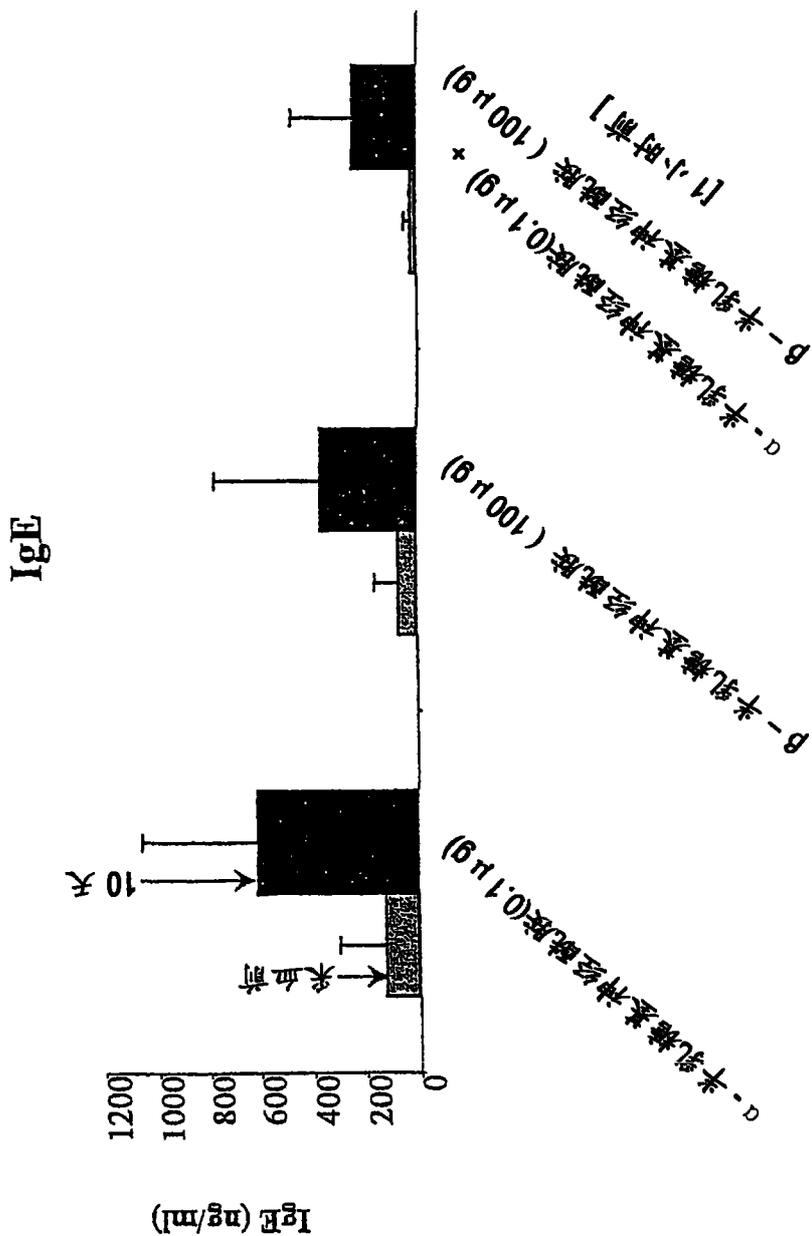


图 1A

Exp# 05.29.04
C57BL/6, F, 4-6 周龄

IgG2c

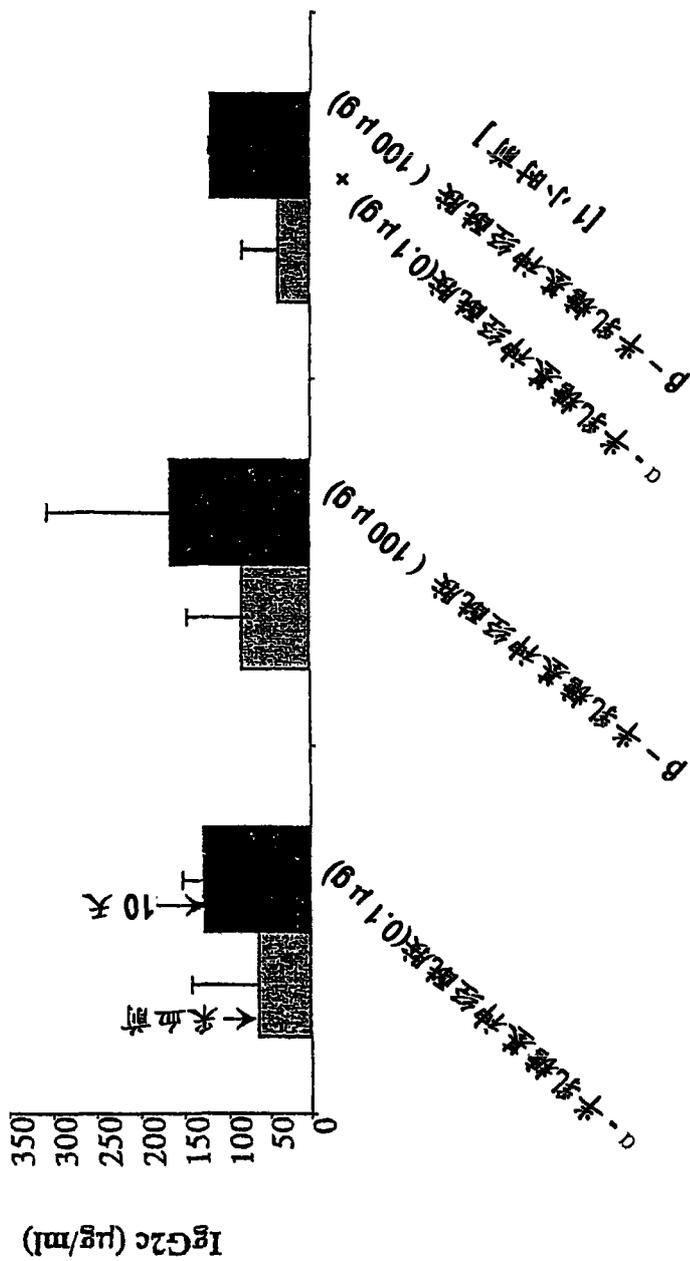


图 1B

Exp# 5/14/04 (Revised)
C57BL/小鼠注射 α -半乳糖基神经酰胺和 β -半乳糖基神经酰胺
6 小时后处死小鼠

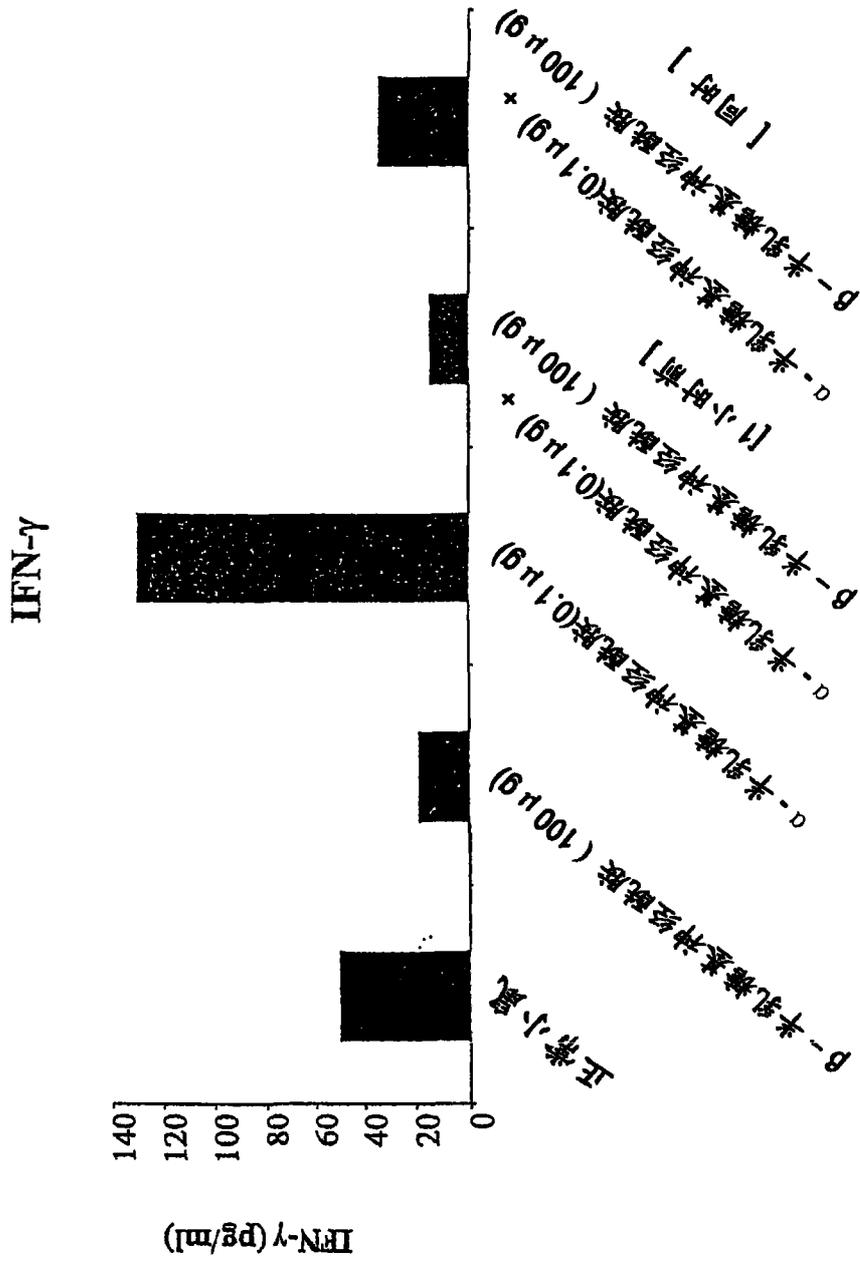


图 1C

Exp# 5/14/04
C57BL/小鼠注射 α -半乳糖基神经酰胺和 β -半乳糖基神经酰胺
6 小时后处死小鼠

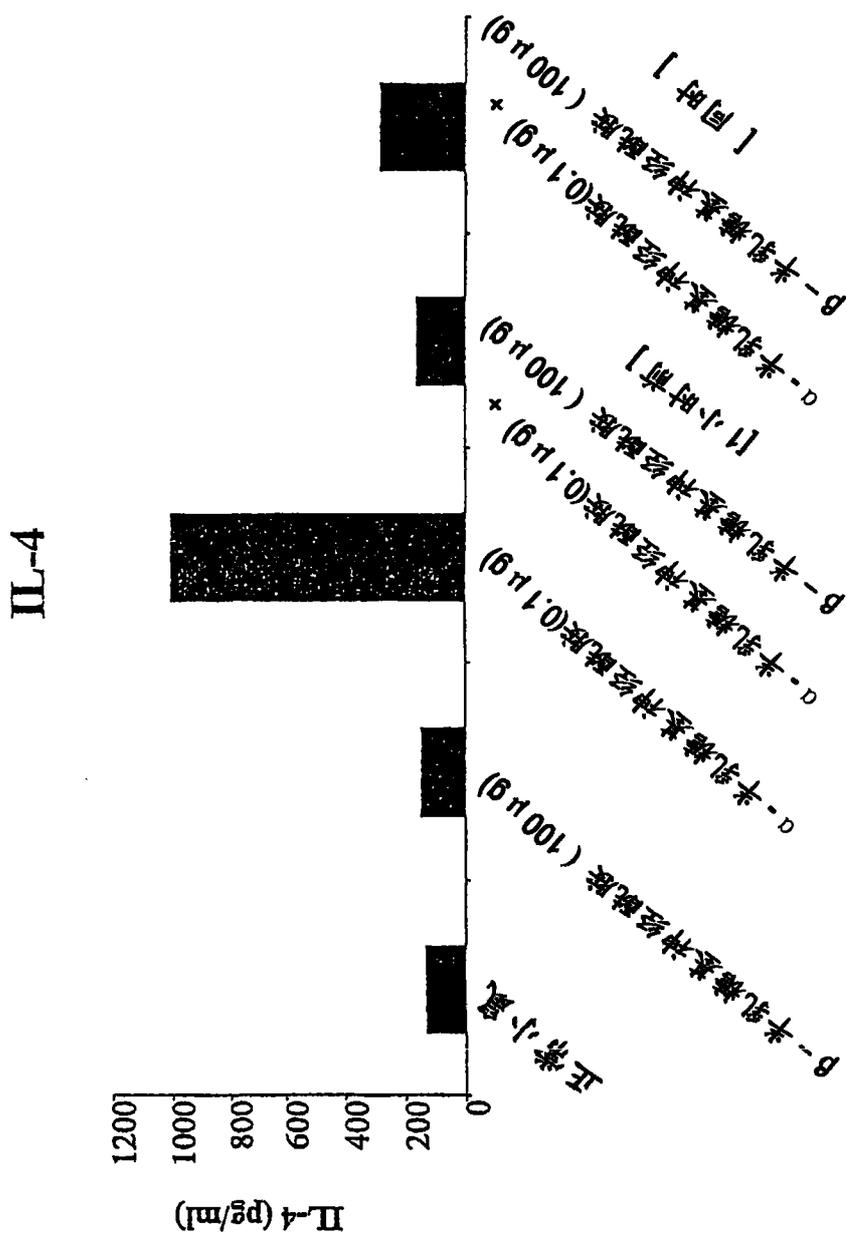


图 1D

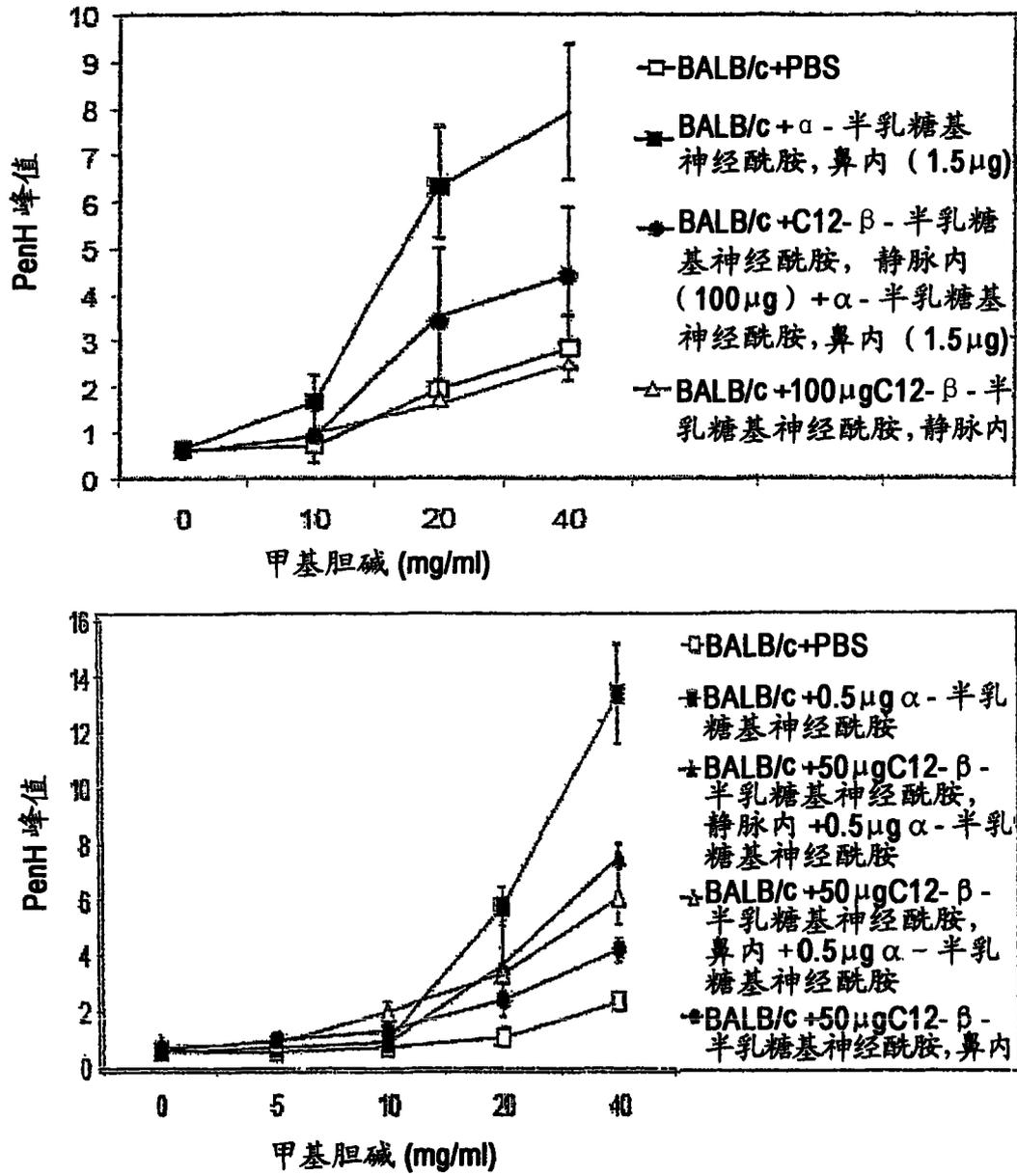


图 2

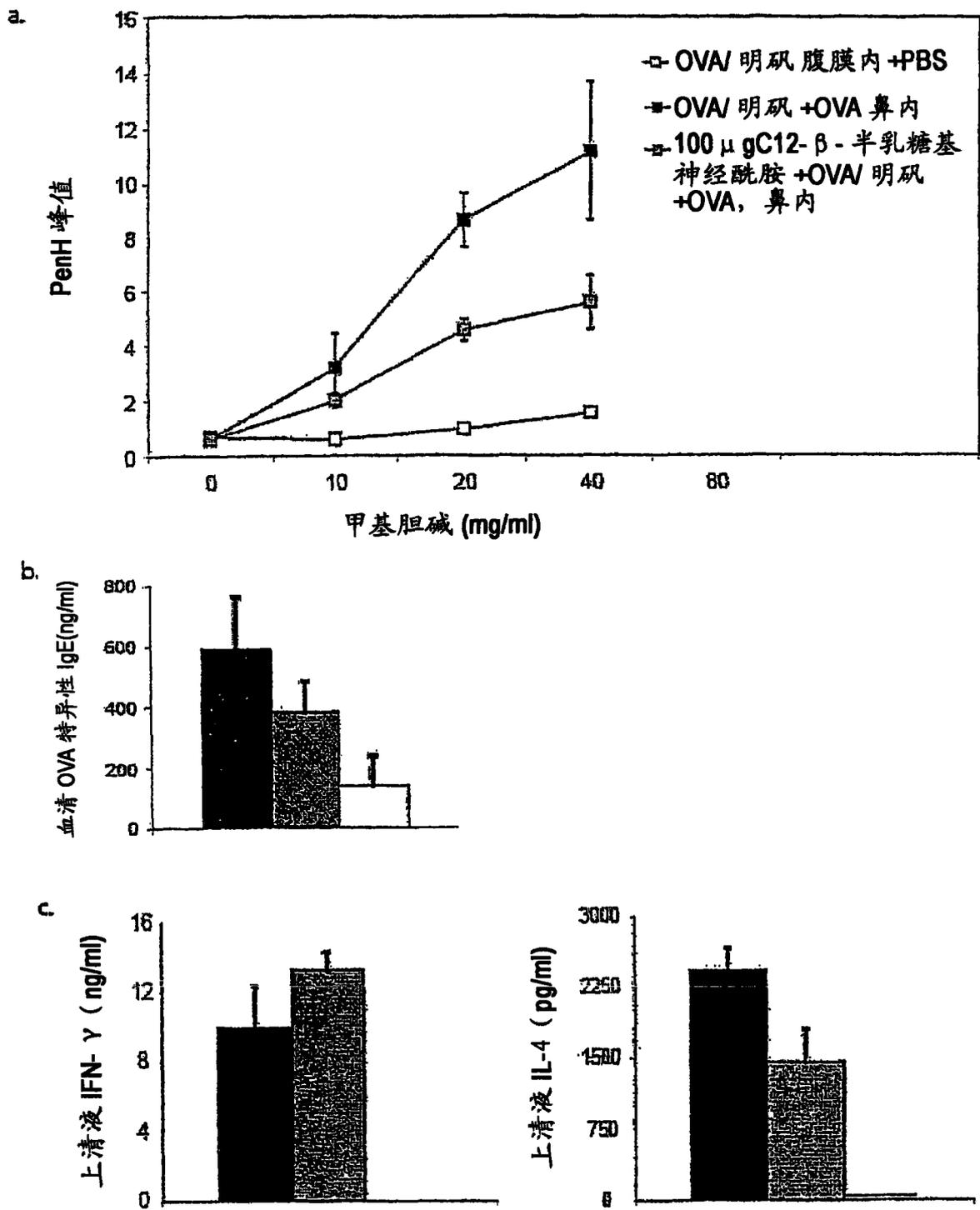


图 3

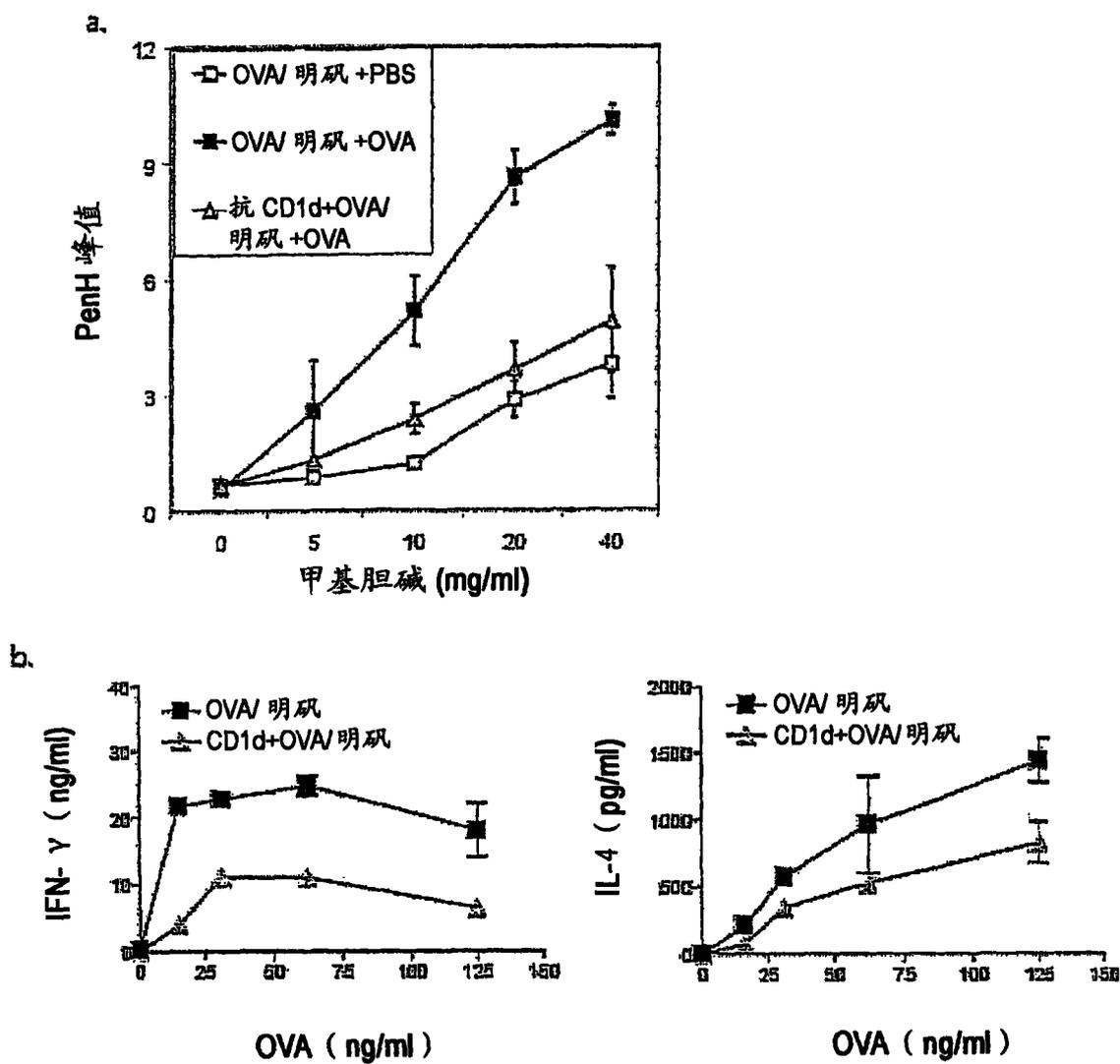


图 4

C57BL/6 小鼠口服 β -半乳糖基神经酰胺
24 小时后 NKT 细胞的分布
N=2, 年龄=12 周

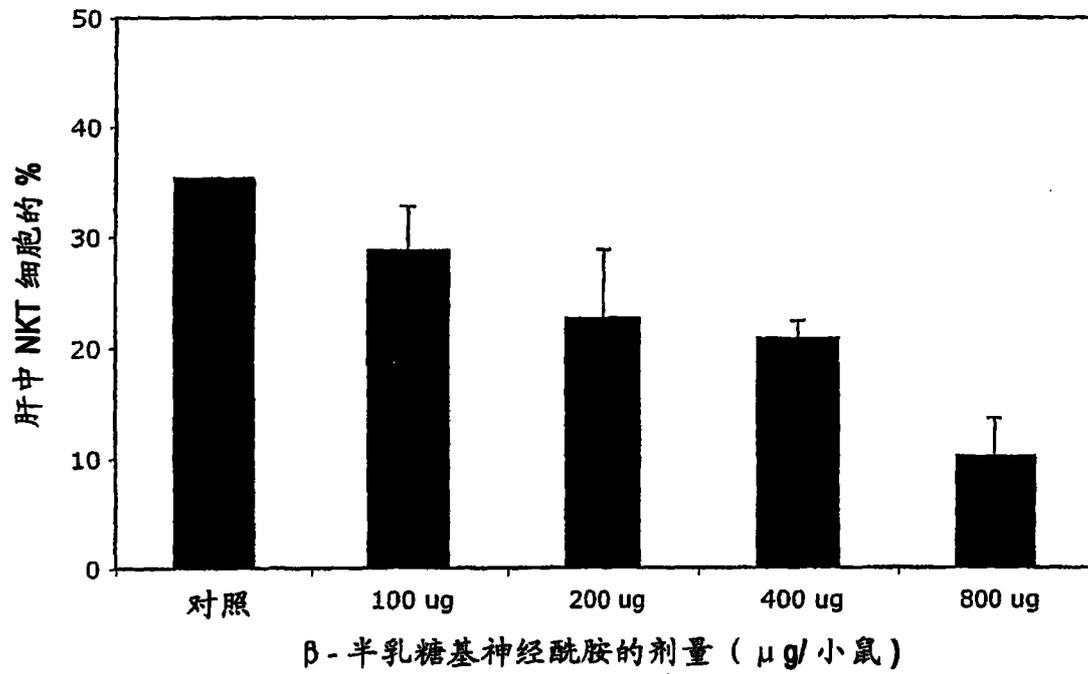


图 5