(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7470683号
(P7470683)

(45)発行日　令和6年4月18日(2024.4.18)

(24)登録日　令和6年4月10日(2024.4.10)

(51)国際特許分類		FI		
A61K	*31/155 (2006.01)*	A61K	31/155	
A61K	*31/436 (2006.01)*	A61K	31/436	
A61K	*38/13 (2006.01)*	A61K	38/13	
A61P	*37/06 (2006.01)*	A61P	37/06	
A61P	*43/00 (2006.01)*	A61P	43/00	121

請求項の数　15　（全26頁）

(21)出願番号　特願2021-524277(P2021-524277)
(86)(22)出願日　令和1年11月7日(2019.11.7)
(65)公表番号　特表2022-513590(P2022-513590A)
(43)公表日　令和4年2月9日(2022.2.9)
(86)国際出願番号　PCT/KR2019/015055
(87)国際公開番号　WO2020/096371
(87)国際公開日　令和2年5月14日(2020.5.14)
審査請求日　令和4年10月12日(2022.10.12)
(31)優先権主張番号　10-2018-0136107
(32)優先日　平成30年11月7日(2018.11.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関　韓国(KR)

(73)特許権者　510058863
ザ カトリック ユニバーシティ オブ コリア インダストリー－アカデミック コーオペレイション ファウンデーション
大韓民国 ０６５９１ ソウル，ソチョーグ，バンポ－デロ ２２２
(74)代理人　100077012
弁理士　岩谷 龍
(72)発明者　チョ，ミラ
大韓民国 ０４４２７ ソウル，ヨンサンーグ，イチョン－ロ １５６ ＃１１０３
(72)発明者　シン，ドンユン
大韓民国 ０６００９ ソウル，カンナムーグ，アプグジョン－ノ ４０３ ＃８１－９０２

最終頁に続く

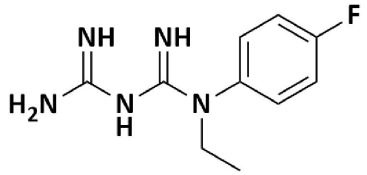
(54)【発明の名称】　新規な化合物およびカルシニューリン阻害剤を含む、移植拒絶反応または移植拒絶疾患を予防および治療するための組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

１）下記化学式１で表される化合物またはその薬学的に許容される塩、および２）ＦＫ５０６（タクロリムス）またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、移植拒絶反応または移植拒絶疾患を予防または治療するための医薬組成物。

＜化学式１＞



【請求項２】

前記移植拒絶反応が、細胞、血液、組織および器官からなる群から選択される１種以上の移植拒絶反応である、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項３】

前記移植拒絶反応が、骨髄移植拒絶反応、心臓移植拒絶反応、角膜移植拒絶反応、腸移植拒絶反応、肝臓移植拒絶反応、肺移植拒絶反応、膵臓移植反応、腎臓移植拒絶反応、および皮膚移植拒絶反応からなる群から選択される１種以上である、請求項２に記載の医薬

組成物。

【請求項４】

前記移植拒絶疾患が、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）である、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項５】

前記組成物が、Ｔ細胞の増殖を阻害する、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項６】

前記組成物が、未分化Ｔ細胞のＴｈ１細胞もしくはＴｈ１７細胞への分化またはＴｈ１細胞もしくはＴｈ１７細胞の活性を減少させる、請求項１に記載の医薬組成物。

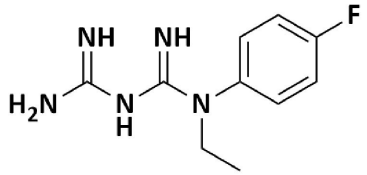
【請求項７】

前記組成物が、未分化Ｔ細胞のＴｒｅｇ細胞への分化およびＴｒｅｇ細胞の活性を増加させる、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項８】

１）下記化学式１で表される化合物またはその薬学的に許容される塩、および２）ＦＫ５０６（タクロリムス）またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、移植後の免疫抑制のための医薬組成物。

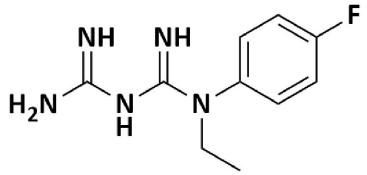
＜化学式１＞



【請求項９】

移植拒絶反応または移植拒絶疾患を予防または治療するための、１）下記化学式１で表される化合物またはその薬学的に許容される塩、および２）ＦＫ５０６（タクロリムス）またはその薬学的に許容される塩の組み合わせ。

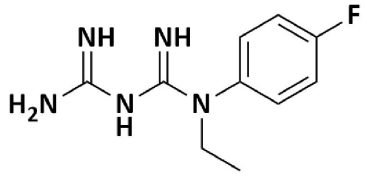
＜化学式１＞



【請求項１０】

移植後の免疫抑制のための、１）下記化学式１で表される化合物またはその薬学的に許容される塩、および２）ＦＫ５０６（タクロリムス）またはその薬学的に許容される塩の組み合わせ。

＜化学式１＞



【請求項１１】

前記移植拒絶反応が、骨髄移植拒絶反応、心臓移植拒絶反応、角膜移植拒絶反応、腸移

植拒絶反応、肝臓移植拒絶反応、肺移植拒絶反応、膵臓移植反応、腎臓移植拒絶反応、および皮膚植拒絶反応からなる群から選択される１種以上である、請求項９に記載の組み合わせ。

【請求項１２】

前記移植拒絶疾患が、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）である、請求項９に記載の組み合わせ。

【請求項１３】

前記組み合わせが、Ｔ細胞の増殖を阻害する、請求項９または１０に記載の組み合わせ。

【請求項１４】

前記組み合わせが、未分化Ｔ細胞のＴｈ１細胞もしくはＴｈ１７細胞への分化またはＴｈ１細胞もしくはＴｈ１７細胞の活性を減少させる、請求項９または１０に記載の組み合わせ。

【請求項１５】

前記 組み合わせが、未分化Ｔ細胞のＴｒｅｇ細胞への分化およびＴｒｅｇ細胞の活性を増加させる、請求項９または１０に記載の組み合わせ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、新規な化合物およびカルシニューリン阻害剤を含む、移植拒絶反応または移植拒絶疾患を予防および治療するための組成物に関する。

【背景技術】

【０００２】

免疫抑制剤は、抗原に対する抗体を産生する体液性または細胞性免疫反応を遮断または低下させる薬剤であり、主に臓器移植後に発生する免疫拒絶反応または骨髄移植後の移植片対宿主病の治療に使用される。また、免疫抑制剤は、ループスや関節リウマチなどの自己免疫疾患；アレルギーやアトピーなどの過剰免疫反応；および炎症性疾患の症状の長期治療にも非常に重要に使用される。

【０００３】

現在使用されている免疫抑制剤は、その作用メカニズムに応じて、コルチコステロイド、代謝拮抗剤、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシンの哺乳類標的（ｍＴＯＲ）阻害剤、および抗体に分類される。これらは、免疫系のＴ細胞の増殖または活性化をさまざまな段階でブロックすることによって免疫抑制効果を示す（Ｄａｌａｌ，Ｐ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｔ．Ｊ．Ｎｅｐｈｒｏｌ．Ｒｅｎｏｖａｓｃ．Ｄｉｓ．３：１０７－１１５（２０１０））。免疫抑制剤の主要な標的であるＴ細胞は、人体の胸腺で生成され、主に細胞性免疫に関与する１型ヘルパー細胞（Ｔｈ１）または体液性免疫に関与する２型ヘルパー細胞（Ｔｈ２）に分化する。２つのＴ細胞群は互いに過活動にならないようにバランスが取られており、バランスが崩れると自己免疫または過敏症などの異常反応が起こることが知られている。さらに、免疫反応を調節できる免疫制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ細胞）またはＴｈ１７細胞などの新しいタイプのＴ細胞が知られている。Ｔｈ１細胞の活性を調節できるＴｒｅｇ細胞は、異常に活性化された免疫細胞の機能を阻害し、炎症反応を調節する。対照的に、Ｔｈ１７細胞はＩＬ－１７を分泌し、炎症反応シグナルを最大化し、それによって疾患の進行を加速化させる。最近、これらのＴｒｅｇ細胞またはＴｈ１７細胞が免疫疾患の新たな標的として浮上しており、免疫調節治療剤に関するさまざまな研究が行われている（Ｗｏｏｄ，Ｋ Ｊ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２（６）：４１７－４３０，２０１２；Ｍｉｏｓｓｅｃ，Ｐ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ．１１（１０）:７６３－７７６，２０１２；Ｎｏａｃｋ，Ｍ ｅｔ ａｌ．，Ａｕｔｏｉｍｍｕｎ．Ｒｅｖ．１３（６）：６６８-６７７，２０１４）。

【０００４】

一方、移植とは、ある個体から細胞、組織、または臓器（すなわち移植片）を採取し、それらを別の個体に移すプロセスを言う。移植片を提供する個体はドナーと呼ばれ、移植

片を受け取る個体はレシピエントまたは宿主と呼ばれる。臓器を移植した場合、移植片の細胞表面にある組織適合抗原（移植された抗原）に対する免疫反応により拒絶反応が起こる。免疫抑制されていないレシピエントにおける移植片の長期生着は、組織適合性が完全にまたはほぼ一致している場合に限定され、したがって、ドナーとレシピエントの間の遺伝的関係は、移植片の生着期間に大きな影響を与える要因である。一般的に、拒絶反応は自家移植および同系移植ではめったに起こらないが、アログラフトでは、ほとんどの場合、拒絶反応が発生する。組織または臓器の移植中、ドナーとレシピエントとの間の遺伝的差異は、宿主免疫系によって容易に検出され、その結果、移植組織に対する宿主の反応（宿主対移植片反応）および／または宿主に対する移植組織の反応（移植片対宿主反応）が生じる。これらの事実は、組織移植および臓器移植でもたらされた拒絶反応によって実証されている（Ｎａｓｈ ｅｔ ａｌ.,Ｂｌｏｏｄ,８０,１８３８-１８４５,１９９２）。また、同種移植組織の拒絶反応は、移植細胞の表面に存在するＭＨＣに対する免疫反応によって活性化されたＴ細胞によって起こることが報告されている（Ｂｅｎｉｃｈｏｕ ｅｔ ａｌ., Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７５, ３０５-３０８, １９９２； Ｂｅｎｉｃｈｏｕ ｅｔ ａｌ., Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６２, ３５２-３５８, １９９８； Ｆａｎｇｍａｎｎ ｅｔ ａｌ., Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７５, １５２１-１５２９, １９９２； Ｌｏｍｂａｒｄｉ ｅｔ ａｌ., Ｐｒｏｃ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ, ８６, ４１９０-４１９４, １９８９）。

【０００５】

これらの移植拒絶反応または移植拒絶疾患を抑制するためにＴ細胞を非特異的に阻害する免疫抑制剤は、一般に、細胞毒性、免疫低下による感染症、糖尿病、振戦、頭痛、下痢、高血圧、悪心、および腎機能障害などの副作用を伴うため、長期間にわたって治療効果を維持することが困難であるという欠点を有する。したがって、重大な副作用を軽減し、免疫抑制治療効果を高めるために、特に臓器移植の分野において、異なる作用メカニズムを有する免疫抑制剤を併用投与する方法や該免疫抑制剤で代替する方法が試みられている。しかし、免疫抑制剤を併用投与するための最適化された組み合わせまたは治療法はまだ明らかになっていない。

【０００６】

したがって、既存の免疫抑制剤の副作用を軽減し、その治療効果を改善することができる新規な免疫抑制治療法または免疫調節治療法を開発する必要性；およびより安全で副作用の少ない新規な免疫抑制剤候補を発見する緊急の必要性がある。

【０００７】

本発明者らは、化合物ＳＤ２８２とカルシニューリン阻害剤の併用処理が、移植拒絶を抑制し；Ｔ細胞の非特異的阻害に由来する副作用を軽減し；また移植後に起こり得る免疫疾患を予防および治療することを見出し、それによって本発明を完成した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

本発明の目的は、１）下記化学式１で表される化合物またはその薬学的に許容される塩、および２）カルシニューリン阻害剤またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、移植拒絶反応または移植拒絶疾患を予防または治療するための医薬組成物を提供することである。

【０００９】

また、本発明の別の目的は、１）下記化学式１で表される化合物またはその薬学的に許容される塩、および２）カルシニューリン阻害剤またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、移植後の免疫抑制のための医薬組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明の上記の目的を達成するために、本発明は、１）下記化学式１で表される化合物またはその薬学的に許容される塩、および２）カルシニューリン阻害剤またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、移植拒絶反応または移植拒絶疾患を予防または治

療するための医薬組成物を提供する。

【００１１】

また、本発明は、１）下記化学式１で表される化合物またはその薬学的に許容される塩、および２）カルシニューリン阻害剤またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、移植後の免疫抑制のための医薬組成物を提供する。

【発明の効果】

【００１２】

本発明による化合物ＳＤ２８２とカルシニューリン阻害剤の併用投与は、生体内または試験管内のアロジェニックモデル、移植拒絶疾患モデル、皮膚移植モデル、および肝臓移植患者において、１）病原性Ｔｈ１細胞またはＴｈ１７細胞の活性を減少させ、２）Ｔｒｅｇ細胞の活性を増加させ、３）その単独投与で生じる組織損傷などの副作用に対する阻害効果を有し、４）さまざまな病原性経路を阻害し、５）炎症細胞の細胞死を阻害し、６）ミトコンドリアの活性を増加させ、したがって、従来の免疫抑制剤単独の投与で発生し得る副作用を軽減するとともに、移植拒絶反応を阻害する。したがって、本発明は、移植拒絶反応または移植後に発生し得る様々な免疫障害に関連する薬学の分野で使用できる。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１】図１は、アロジェニック移植マウスモデルにおいて、ＳＤ２８２＋ＦＫ５０６の併用処理によるＴ細胞増殖反応を３Ｈ－チミジン取り込みアッセイで確認することによって得られた結果である。

【図２】図２（Ａ）は、アロジェニック移植マウスモデルにおいて、ＳＤ２８２＋ＦＫ５０６の併用処理によるＴ細胞増殖反応をフローサイトメトリー分析で確認することによって得られた結果であり；図２（Ｂ）は、そのグラフ結果である。

【図３】図３は、アロジェニック移植マウスモデルにおいて、ＳＤ２８２＋ＦＫ５０６の併用処理による、病原性Ｔｈ１７細胞の活性に対する阻害効果を確認することによって得られた結果である。

【図４】図４は、アロジェニック移植マウスモデルにおいて、ＳＤ２８２＋ＦＫ５０６の併用処理による、Ｔｒｅｇ細胞の活性の増加効果を確認することによって得られた結果である。

【図５】図５は、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）動物モデルにおいて、併用投与の効果を確認するための実験方法である。

【図６】図６は、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）動物モデルにおいて、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による、ＧＶＨＤの治療効果を確認することによって得られた結果である。

【図７】図７は、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）動物モデルにおいて、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による、ＧＶＨＤの治療効果を確認することによって得られた結果である。

【図８】図８は、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）動物モデル（図８ａ：肺、肝臓、皮膚；図８ｂ：大腸、小腸、盲腸）において、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による、臓器損傷に対する阻害効果を確認することによって得られた結果である。

【図９】図９は、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）動物モデルにおいて、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による免疫細胞調節効果を確認することによって得られた結果である。

【図１０】図１０は、皮膚移植動物モデルにおいて、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による効果を確認するための実験の概略図である。

【図１１】図１１は、皮膚移植動物モデルにおいて、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による、移植片の生存率の増加および皮膚移植後の病因に対する阻害効果を確認することによって得られた結果である。

【図１２】図１２は、皮膚移植動物モデルにおいて、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による、皮膚移植後のバイオマーカーの変化を確認することによって得られた結果である。

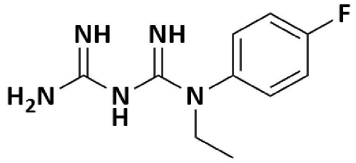
【図１３】図１３は、ヒトアロ反応条件下で、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による免疫調節効果を確認することによって得られた結果である。
【図１４】図１４は、ヒトアロ反応条件下で、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による免疫調節効果を確認することによって得られた結果である。
【図１５】図１５は、ヒトアロ反応条件下で、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による免疫調節効果を確認することによって得られた結果である。
【図１６】図１６は、肝臓移植患者の免疫細胞において、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による、免疫細胞マーカーの発現変化を確認することによって得られた結果である。
【図１７】図１７は、肝臓移植患者において、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理によりＫＥＧＧ経路が阻害された結果を示す図である。
【図１８】図１８は、肝臓移植患者において、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による、病原性細胞の調節および遺伝子調節効果を確認することによって得られた結果である（図１８ａ：ＳＴＡＴ調節効果；図１８ｂ：ミトコンドリア機能回復効果；図１８ｃ：炎症性細胞の細胞死に対する調節効果；図１８ｄ：細胞移動に対する調節効果）。
【図１９】図１９は、肝臓移植患者において、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による、細胞死に対する阻害効果を確認することによって得られた結果である。
【図２０】図２０は、肝臓移植モデル（図２０ａ：マウス；図２０ｂ：ヒト）において、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理による、細胞移動に対する阻害効果を確認することによって得られた結果である。
【図２１】図２１は、肝臓移植患者のアバターモデルにおいて、炎症および線維症のレベルを確認することによって得られた結果である。
【発明を実施するための形態】
【００１４】
本発明は、１）下記化学式１で表される化合物（以下、「化合物ＳＤ２８２」という）またはその薬学的に許容される塩、および２）カルシニューリン阻害剤またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、移植拒絶反応または移植拒絶疾患を予防または治療するための医薬組成物を提供する。
【００１５】
本発明による化合物ＳＤ２８２とカルシニューリン阻害剤の併用投与は、生体内または試験管内のアロジェニックモデル、移植拒絶疾患モデル、皮膚移植モデル、および肝臓移植患者において、１）病原性Ｔｈ１細胞またはＴｈ１７細胞の活性を減少させ、２）Ｔｒｅｇ細胞の活性を増加させ、３）その単独投与で生じる組織損傷などの副作用に対する阻害効果を有し、４）さまざまな病原性経路を阻害し、５）炎症細胞の細胞死を阻害し、６）ミトコンドリアの活性を増加させ、７）細胞移動を減少させ、したがって、従来の免疫抑制剤単独の投与で発生し得る副作用を軽減するとともに、様々なタイプの移植拒絶反応を効果的に阻害する。
【００１６】
本発明による化学式１の化合物とカルシニューリン阻害剤との重量比は、１：１ないし５０００：１、好ましくは１：１ないし２０００：１、１：１ないし１０００：１、１：１ないし５００：１、１：１ないし３００：１、１：１ないし２００：１、１：１ないし１００：１、１：１ないし５０：１、１：１ないし１０：１、１：１ないし５：１の範囲であってもよいが、これらに限定されない。
【００１７】
本明細書で使用される、用語「移植拒絶反応」とは、移植後に移植された組織を非自己として認識し、レシピエントの免疫系が移植された組織または臓器を攻撃して除去する反応を意味する。移植拒絶反応に関与する最も重要な因子は、主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）であり、マイナー組織適合性複合体も関連していることが知られている。細胞性免疫反応と体液性免疫反応の両方が拒絶反応に関与する。細胞性反応は、レシピエントのリンパ球とドナーのＭＨＣとの遭遇によって、ＣＤ４Ｔ細胞タイプＩＩＭＨＣ分子またはＣＤ

８Ｔ細胞タイプＩＭＨＣ分子により引き起こされる。活性化したＴ細胞は、サイトカインを分泌し、血管透過性を増加させ、マクロファージなどの単球の浸潤を引き起こし、それによって微小血管の損傷、組織虚血、および移植された組織と細胞の破壊をもたらす。

【００１８】

本明細書で使用される、用語「化合物ＳＤ２８２」とは、韓国特許第１０－１６１３３７１号で知られており、下記の化学式１で表される化合物を意味し、その薬学的に許容される塩を含んでもよい。

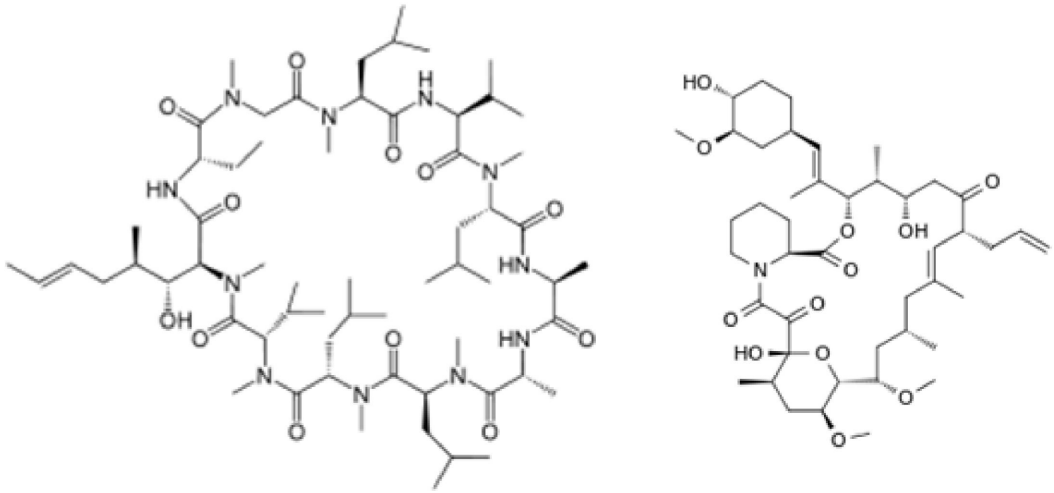
＜化学式１＞



【００１９】

本明細書で使用される、用語「カルシニューリン阻害剤」とは、Ｔリンパ球においてｍＲＮＡの形成を干渉することによってＩＬ－２の生成を阻害する一種の免疫抑制剤を意味し、代表的にシクロスポリン（化学式２の左の化合物）およびＦＫ－５０６（タクロリムス；化学式２の右の化合物）を含む。

＜化学式２＞



【００２０】

本明細書で使用される、用語「ＦＫ－５０６」とは、ストレプトマイセス・ツクバエンシスから単離された化合物を意味する。ＦＫ－５０６は、シクロスポリンとは構造的に異なるが、シクロスポリンの作用メカニズムと同様にＴリンパ球を抑制し、免疫抑制機能を示す。ＦＫ－５０６は、シクロスポリンの１０倍ないし１００倍の効能を有することが知られている。

【００２１】

カルシニューリンは、免疫系のＴ細胞だけでなく他の細胞および組織でも発現するため、シクロスポリンまたはタクロリムスのカルシニューリンに対する阻害作用は、免疫抑制以外にもさまざまな副作用を引き起こす（Ｌｉｕ、ＥＨ ｅｔ ａｌ、Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ８（１）：２５－３０、 ２００７）。免疫抑制剤の副作用は、長期間安定的で、成功的な臓器移植、および移植を受けた患者の生存率に深刻な影響を与える。さらに、上記の副作用は、免疫抑制を必要とする、臓器移植以外の疾患の治療においても大きな問題となる。カルシニューリン免疫抑制剤の副作用の中でも、急性および慢性の腎毒性が特に重要である（Ｎａｅｓｅｎｓ、Ｍ ｅｔ ａｌ、Ｃｌｉｎ Ｊ Ａｍ Ｓｏｃ Ｎｅｐｈｒｏｌ ４（

２）：４８１-５０８,２００９）。カルシニューリン免疫抑制剤によって誘発される腎毒性は、尿細管の空胞化、間質性線維症、および細動脈の硝子化などの腎臓組織の組織学的変化を示し；有効な腎血流量および糸球体濾過量の低下などの腎機能の低下を示す。

【００２２】

本発明の実施形態において、上記カルシニューリン免疫抑制剤の副作用、すなわち、Ｔｒｅｇ細胞を阻害し、病原性Ｔｈ１７細胞を増加させる副作用を低減するために、化合物ＳＤ２８２をカルシニューリン免疫抑制剤ＦＫ－５０６と組み合わせて併用処理した。その結果、前記併用処理が、生体内および試験管内でＴｒｅｇ細胞を増加させ、病原性Ｔｈ１７細胞を減少させることによって、カルシニューリン免疫抑制剤の副作用を軽減することが確認された。

【００２３】

移植拒絶反応は、細胞、血液、組織、および臓器からなる群から選択される１種以上の移植拒絶反応である。好ましくは、前記移植拒絶反応は、骨髄移植拒絶反応、心臓移植拒絶反応、角膜移植拒絶反応、腸移植拒絶反応、肝臓移植拒絶反応、肺移植拒絶反応、膵臓移植反応、腎臓移植拒絶反応、および皮膚移植拒絶反応からなる群から選択される１種以上であるが、これに限定はされない。

【００２４】

本発明において、移植拒絶疾患は、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を含むが、移植拒絶反応に関連する疾患で、ＳＤ２８２単独、ＦＫ－５０６単独またはこれらの組み合わせで治療される疾患であれば、これに限定はされない。

【００２５】

さらに、本発明は、移植後の免疫疾患を治療するために使用されてもよい。前記免疫疾患は、自己免疫疾患または炎症性疾患を含んでもよい。

【００２６】

自己抗原に対する生体の無反応は、免疫学的無反応または免疫寛容と呼ばれる。本明細書で使用される、用語「自己免疫疾患」とは、自己免疫寛容の誘導または維持に問題があるために、自己抗原に対する免疫反応によって自分の組織を攻撃する現象により引き起こされる疾患を意味する。

【００２７】

本明細書で使用される、用語「炎症性疾患」とは、炎症誘導因子や放射線照射などの有害な刺激に起因して免疫システムの過剰な亢進が起こった結果、免疫細胞（例えばマクロファージ）から炎症性物質（炎症性サイトカイン）が分泌され、その炎症性物質によって引き起こされる疾患を意味し、炎症性物質（炎症性サイトカイン）としては、ＴＮＦ－α（腫瘍壊死因子－α）、ＩＬ－１（インターロイキン－１）、ＩＬ－６、プロスタグランジン、ロイコトリエン、一酸化窒素（ＮＯ）などが挙げられる。

【００２８】

前記免疫疾患は、関節リウマチ、ベーチェット病、多発性筋炎または皮膚筋炎、自己免疫性血球減少症、自己免疫性心筋炎、アトピー性皮膚炎、喘息、原発性肝硬変、皮膚筋炎、グッドパスチャー症候群、自己免疫性髄膜炎、シェーグレン症候群、ループス、アジソン病、円形脱毛症、強直性脊髄炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、クローン病、インスリン依存性糖尿病、栄養障害型表皮水疱症、副睾丸炎、糸球体腎炎、バセドウ病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、類肉腫症、強皮症、脊椎関節症、甲状腺炎、血管炎、白斑症、粘液水腫、悪性貧血、ミトコンドリア関連疾患および潰瘍性大腸炎が挙げられるが、これらに限定されない。

【００２９】

前記組成物は、Ｔ細胞の増殖を阻害することができる。また、前記組成物は、未分化Ｔ細胞のＴｈ１細胞もしくはＴｈ１７細胞への分化またはＴｈ１細胞もしくはＴｈ１７細胞の活性を減少させることができる。

【００３０】

また、前記組成物は、未分化Ｔ細胞のＴｒｅｇ細胞への分化およびＴｒｅｇ細胞の活性を増加させるが、これらに限定されない。

【００３１】

Ｔｈ１細胞への分化に関する最近の研究によれば、新しい集団、すなわち、Ｔｈ１細胞の活性を調節する制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ細胞）の存在が見出されており、これに伴って、Ｔｒｅｇを用いた免疫疾患の治療に関する研究が実施され始めている。Ｔｒｅｇ細胞は、異常に活性化された免疫細胞の機能を抑制して炎症反応を調節するという特性を有するため、Ｔｒｅｇ細胞の活性を増強することによって免疫疾患を治療することができる。

【００３２】

Ｔｒｅｇ細胞に加えて、分化過程においてＴｈ１７細胞が別のグループとして形成される。Ｔｈ１７細胞は、Ｔｒｅｇ細胞と類似した分化プロセスによって、未分化Ｔ細胞からの分化過程において形成されることが知られている。すなわち、Ｔｒｅｇ細胞およびＴｈ１７細胞への分化はいずれもＴＧＦ－βの存在下で行われる。しかし、Ｔｒｅｇ細胞への分化にはＩＬ－６は必要とされないが、Ｔｈ１７細胞への分化はＴＧＦ－βおよびＩＬ－６の両方の存在下で行われる。分化したＴｈ１７細胞はＩＬ－１７の分泌を特徴とする。

【００３３】

Ｔｈ１７細胞は、Ｔｒｅｇ細胞とは異なり、免疫疾患に見られる炎症反応の最前線に関与して、炎症反応のシグナルを最大化させ、その結果、免疫疾患の進行を加速させることが明らかとなっている。したがって、Ｔｒｅｇ細胞の制御を受けない自己免疫疾患の場合、Ｔｈ１７細胞活性の抑制を標的とする免疫疾患の治療剤の開発が大いに注目を集めている。

【００３４】

本明細書で使用される、免疫反応に関与する細胞である用語「Ｔ細胞」とは、特定の細胞表面マーカーを発現するＴ細胞集団を言う。

【００３５】

ヒトは様々な組織適合抗原を有し、例えば、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃなどのクラス Ⅰ抗原；およびＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＰ、ＨＬＡ－ＤＱなどのクラスII抗原を有する。これらの抗原は、Ｔリンパ球に抗原を伝達することを生物学的機能とする。クラスⅠ抗原は有核細胞の大部分で発現されており、クラスⅠ抗原によって伝達された抗原は、ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球によって認識される。クラスII抗原は、抗原提示細胞として知られている樹状細胞、Ｂリンパ球、活性化されたＴリンパ球、マクロファージなどに発現されており、ＣＤ４＋Ｔリンパ球に抗原を伝達する。Ｔリンパ球は、Ｔリンパ球に伝達された抗原に受容体を介して結合することによって該抗原を認識する。移植の過程では、Ｔリンパ球は、自分自身の組織適合抗原よりも他者に由来する組織適合抗原を高頻度に認識する。ドナーまたは患者の全Ｔリンパ球中１％～１０％のＴリンパ球が、患者またはドナー由来の組織適合抗原を認識し、これに応答して増殖し、一連の免疫応答を引き起こす。これを「アロ反応」と呼ぶ。

【００３６】

本発明の医薬組成物は、アジュバントをさらに含んでもよい。当技術分野で知られているアジュバントのいずれも、制限なしに使用してもよい。例えば、フロイントの完全アジュバントまたは不完全アジュバントが、免疫効果を高めるためにさらに含まれていてもよい。

【００３７】

本発明による医薬組成物は、活性成分が薬学的に許容可能な担体に組み込まれた形態で製造されてもよい。薬学的に許容可能な担体には、薬学分野で通常使用されている担体、賦形剤、および希釈剤が含まれる。本発明の医薬組成物に使用できる薬学的に許容可能な担体としては、乳糖、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、デンプン、アカシアゴム、アルギン酸塩、ゼラチン、リン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、水、ヒドロキシ安息香酸メチル、ヒドロキシ安息香酸プロピル、タルク

、ステアリン酸マグネシウムおよび鉱油が挙げられるが、これらに限定されない。

【００３８】

本発明の医薬組成物は、通常の方法にしたがって、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エアロゾル剤などの経口剤形、外用製剤、坐剤、または無菌注射剤の形態に製剤化して使用してもよい。

【００３９】

本発明の組成物を製剤化する場合、充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、および界面活性剤などの通常使用される希釈剤または賦形剤を使用して調製してもよい。経口投与用の固形製剤には、錠剤、丸薬、散剤、顆粒剤、カプセル剤などが含まれ、これらは、有効成分をデンプン、炭酸カルシウム、スクロース、ラクトース、ゼラチンなどの少なくとも１種の賦形剤と混合することによって調製してもよい。賦形剤に加えて、ステアリン酸マグネシウムおよびタルクなどの潤滑剤を使用してもよい。経口投与用の液体製剤には、懸濁剤、液剤、乳剤、シロップ剤などが含まれ、これらは、湿潤剤、甘味料、香料、防腐剤などの様々な賦形剤、ならびに水および液体パラフィンなどの通常使用される希釈剤を含んでもよい。非経口投与用の製剤には、滅菌水性液剤、非水性液剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤、および坐剤が含まれる。非水性溶媒または懸濁化剤として、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能なエステルを使用してもよい。坐剤のベースとして、ウィテプソル、ツイーン６１、カカオバター、ラウリンバター、グリセロゼラチンなどを使用してもよい。

【００４０】

本発明による医薬組成物は、様々な経路を介して対象に投与してもよい。任意の投与様式が期待できるため、前記組成物は、経口投与、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、および腹腔内注射によって投与してもよい。

【００４１】

本発明による医薬組成物の投与量は、対象の年齢、体重、性別、および身体状態を考慮して選択される。医薬組成物中の有効成分の濃度は、対象に応じて様々な方法で選択できることは明らかである。好ましくは、有効成分は、医薬組成物中、０．０１ないし５，０００μｇ／ｍｌの範囲の濃度で存在してもよい。濃度が０.０１μｇ／ｍｌ未満の場合、薬理活性が現れない場合があり；濃度が５,０００μｇ／ｍｌを超える場合、人体への毒性が生じる可能性がある。

【００４２】

本発明の医薬組成物において、有効成分として含まれるカルシニューリン阻害剤の薬学的に有効な量は、シクロスポリンの場合は１ないし５ｍｇ／日／ｋｇ体重、タクロリムスの場合は０．０１ないし０．１ｍｇ／日／ｋｇ体重、メトホルミンの場合は５ないし３５ｍｇ／日／ｋｇ体重である。しかし、薬学的に有効な量は、疾患およびその重症度、患者の年齢、体重、健康状態、性別、投与経路、および治療期間などの様々な要因に応じて適切に変更してもよい。

【００４３】

また、本発明は、１）化学式１で表される化合物（以下、「化合物ＳＤ２８２」という）またはその薬学的に許容される塩、および２）カルシニューリン阻害剤またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、移植後の免疫抑制のための組成物を提供する。

【００４４】

また、本発明は、試験管内で未分化Ｔ細胞を１）化学式１で表される化合物またはその薬学的に許容される塩、および２）カルシニューリン阻害剤またはその薬学的に許容される塩で処理することにより、未分化Ｔ細胞のＴｈ１細胞もしくはＴｈ１７細胞への分化またはＴｈ１細胞もしくはＴｈ１７細胞の活性を減少させる方法を提供する。

【００４５】

また、本発明は、試験管内で未分化Ｔ細胞を１）化学式１で表される化合物またはその薬学的に許容される塩、および２）カルシニューリン阻害剤またはその薬学的に許容される塩で処理することにより、未分化Ｔ細胞のＴｒｅｇ細胞への分化およびＴｒｅｇ細胞の

活性を増加させる方法を提供する。

【００４６】

また、本発明は、移植拒絶反応または移植拒絶疾患の予防または治療を必要とする対象に、有効成分として薬学的に有効な量の１）化学式１で表される化合物またはその薬学的に許容される塩、および２）カルシニューリン阻害剤またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、移植拒絶反応または移植拒絶疾患を予防または治療するための方法を提供する。さらに、本発明は、移植後の免疫抑制を必要とする対象に、有効成分として薬学的に有効な量の１）化学式１で表される化合物またはその薬学的に許容される塩、および２）カルシニューリン阻害剤またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、移植後の免疫抑制のための方法を提供する。

【００４７】

本発明の医薬組成物は、治療的に有効な量または薬学的に有効な量で投与される。用語「薬学的に有効な量」とは、医学的治療に適用可能な合理的な利益／リスク比で疾患を治療するのに十分な量を言う。有効量レベルは、個体の種別と重症度、年齢、性別、薬物の活性、薬物に対する感受性、投与時間、投与経路と排泄率、治療期間、併用薬、および医療分野でよく知られている他の要因を含む、さまざまな要因に従って決定してもよい。

【００４８】

以下、実施例により本発明についてさらに詳細に説明する。しかし、これらの実施例は、本発明を例示的に説明するためのものに過ぎず、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。

【実施例】

【００４９】

実施例１：試験方法

<u>１－１：試験管内のシンジェニック移植モデルまたはアロジェニック移植モデル</u>

Ｉｎ ｖｉｔｒｏ実験として、正常なレシピエント（Ｂａｌｂ／ｃ、レスポンダー）由来のＣＤ４＋Ｔ細胞（２×１０^{5}個）を、９６ウェル丸底プレートの各ウェルに注入した。その後、シンジェニック移植のために、放射線を照射した正常なレシピエント由来のＴ細胞除去の脾細胞（２×１０^{5}個）を各ウェルに加え、混合培養した。アロジェニック移植のために、ドナー（Ｃ５７ＢＬ／６、スティミュレーター）由来のＴ細胞除去の脾細胞を各ウェルに加え、混合培養した。

【００５０】

<u>１－２：急性移植片対宿主病（ａＧＶＨＤ）動物モデル</u>

ａＧＶＨＤモデルを作製するために、レシピエントマウスＢａｌｂ／ｃ（Ｈ－２ｋ／ｄ）に８００ｃＧｙで全身照射（ＴＢＩ）を行った。ドナーマウスＣ５７ＢＬ／６（Ｈ－２ｋ／ｂ）の大腿骨と脛骨から造血幹細胞と脾細胞を採取した。造血幹細胞（５×１０^{6}）と脾細胞（１×１０^{7}）をレシピエントマウスＢａｌｂ／ｃ（Ｈ－２ｋ／ｄ）に移植した。ａＧＶＨＤの発症後、各薬物を経口投与して、疾患に対する調節効果を分析した。

【００５１】

<u>１－３：皮膚移植動物モデル</u>

皮膚移植動物モデルを作製するために、レシピエントマウスＢａｌｂ／ｃ（Ｈ－２ｋ／ｄ）に、皮膚移植の３日前から、薬物を注射した。ドナーマウスＣ５７ＢＬ／６（Ｈ－２ｋ／ｂ）の皮膚から１ｃｍ以下の皮膚片を切り取り、皮膚片の端が丸まらないように真っ直ぐにして、ＢＡＬＢ／Ｃマウスに移植した。移植後の経過を観察して、拒絶反応の有無を確認した。各薬物の注射濃度は、ＳＤ２８２は５０ｍｇ／ｋｇ、ＦＫ５０６は１０ｍｇ／ｋｇであった。

【００５２】

実施例２：マウス細胞における、ＳＤ２８２単独、ＦＫ５０６単独、またはこれらの組み合わせの処理によるＴ細胞増殖の評価

ＳＤ２８２単独、ＦＫ５０６単独またはこれらの組み合わせの処理によるＴ細胞増殖を評価するために、実施例１－１の未処理のシンジェニック群および未処理のアロジェニッ

ク群を対照として使用した。アロジェニックモデルを、５０μＭ、２５０μＭ、および５００μＭのＳＤ２８２単独、または１ｎＭおよび５ｎＭのＦＫ５０６単独で処理した。また、ＦＫ５０６（１ｎＭおよび５ｎＭ）とＳＤ２８２（２５０μＭ）をそれぞれ組み合わせて処理した。処理後、各群を４日間培養した後、３Ｈ－チミジン取り込み法、ＣＦＳＥアッセイ法、またはフローサイトメトリー法に従って、培養細胞中のＴ細胞増殖を観察することによってアロ反応を評価した。

【００５３】

図１ａに示すように、未処理のアロジェニック群ではＴ細胞増殖は阻害されなかったが、２５０μＭ以上のＳＤ２８２単独で処理した場合、Ｔ細胞増殖が有意に阻害されることが確認された。また、図１ｂに示すように、ＦＫ５０６単独で処理した群での阻害は効果がなく、未処理群と同様であることが確認された。しかし、ＳＤ２８２とＦＫ５０６を組み合わせて処理すると、アロジェニックＴ細胞の増殖が有意に抑制されることが確認された。

【００５４】

また、図２ａおよび図２ｂに示すように、未処理のアロジェニック群ではＴ細胞増殖は抑制されなかったが、ＳＤ２８２単独処理群またはＦＫ５０６単独処理群ではＴ細胞増殖が抑制され、ＳＤ２８２とＦＫ５０６を組み合わせて処理した群ではＴ細胞増殖がより効果的に阻害されることが確認された。

【００５５】

さらに、ＳＤ２８２とＦＫ５０６の併用処理による相乗効果を評価するために、組み合わせ指数（ＣＩ）値（薬物処理）を計算した。ＣＩ値は下記式で求めた。１以下の値は２つの薬物の組み合わせの間に相乗効果があることを意味し、１以上の値は２つの薬物の組み合わせの間に拮抗効果があることを意味する。

【００５６】

その結果、本発明のＳＤ２８２とＦＫ５０６の併用処理によるＣＩ値は、０．６（すなわち、１未満）であり、優れた相乗効果を示すことが確認された。

[式１]

ＣＩ=（Ｄ併用）１／（Ｄ単独）１ +（Ｄ併用）２／（Ｄ単独）２

【００５７】

実施例３：マウス細胞における、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の組み合わせの処理によるＴｈ１７細胞またはＴｒｅｇ細胞の活性の評価

<u>３－１：病原性Ｔｈ１７細胞に対する抑制効果の評価</u>

Ｔ細胞反応はＴｈ１７（Ｔヘルパー１７細胞）／ＩＬ－１７（インターロイキン１７）の活性を調節し、ＩＬ－１７は炎症性サイトカインとして分類される。実施例２では、Ｔ細胞は、ＳＤ２８２とＦＫ５０６の単独または組み合わせの処理によって効果的に阻害されることが確認された。ここでは、ＳＤ２８２とＦＫ５０６の単独処理または併用処理による、炎症性サイトカインに対する阻害活性を評価した。実施例１－１の未処理のシンジェニック群および未処理のアロジェニック群を対照として使用した。アロジェニックモデルを、５０μＭ、２５０μＭ、および５００μＭのＳＤ２８２単独、または１ｎＭおよび５ｎＭのＦＫ５０６単独で処理した。また、ＦＫ５０６（１ｎＭおよび５ｎＭ）とＳＤ２８２（２５０μＭ）をそれぞれ組み合わせて処理した。処理後、各群を４日間培養した後、抗ＣＤ３（０.１μｇ／ｍｌ）で刺激した。ＩＬ－１７＋ＣＤ４＋Ｔ細胞およびＩＬ－１７に対する阻害効果は、ＥＬＩＳＡ法に従って培養Ｔｈ１７細胞を分析することにより評価した。Ｆｏｘ３＋Ｔｒｅｇ細胞の増殖は、Ｔｒｅｇ細胞の分析により評価した。

【００５８】

図３に示すように、ＦＫ５０６単独で処理した群では、対照群、すなわち、抗ＣＤ３処理群と同様に、病原性Ｔｈ１７細胞の増殖に対する効果的な阻害は確認されなかった。これはＦＫ５０６単独の処理が炎症性サイトカインＩＬ－１７の活性を効果的に阻害しなかったことを意味する。一方、ＩＬ－１７＋ＣＤ４＋Ｔ細胞（％）およびＩＬ－１７の活性は、ＳＤ２８２単独およびＦＫ５０６単独で処理することにより阻害され、これらを併用

して処理することによりさらに有意に阻害されることが確認された。

【００５９】

３－２：Ｔｒｅｇ活性増加の評価

実施例１－１のアロジェニックモデルを、２０μＭおよび５００μＭのＳＤ２８２単独、または１ｎＭおよび５ｎＭのＦＫ５０６単独で処理した。また、ＦＫ５０６（１ｎＭおよび５ｎＭ）とＳＤ２８２（２５０μＭ）をそれぞれ組み合わせて処理した。Ｔｈ１７細胞への分化を誘導するために、単離したＴ細胞を、Ｔｈ１７細胞分化の条件下で４日間培養した。その後、Ｔｈ１７細胞分化の条件下でも、各処理群においてＴｒｅｇ細胞活性が誘導されるかどうかを評価するために、Ｆｏｘｐ３ Ｔｒｅｇ細胞をフローサイトメトリーによって分析し、そのアロジェニック反応を評価した。

【００６０】

図４に示すように、ＦＫ５０６単独で処理した群では、対照群、すなわち、抗ＣＤ３処理群と同様に、Ｔｒｅｇ細胞の増殖の増加は確認されなかった。一方、ＳＤ２８２単独、ＦＫ５０６単独、ＳＤ２８２とＦＫ５０６の併用で処理した群ではＴｒｅｇ細胞が有意に増加していることが確認された。

【００６１】

したがって、前記の併用投与は、病原性Ｔｈ１７細胞の活性を低下させる効果だけでなく、Ｔｒｅｇ細胞の活性を増加させる効果も有することが確認された。

【００６２】

実施例４：急性移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）動物モデルにおける、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の組み合わせの処理による治療効果の評価

４－１：ＳＤ２８２とＦＫ５０６の併用処理によるＧＶＨＤマウスモデルの変化

図５に示すような実験を、実施例１－２のＧＶＨＤ動物モデルで実施した。ＧＶＨＤの発症後、５０ｍｇ／ｋｇもしくは１００ｍｇ／ｋｇのＳＤ２８２を単独で、または１０ｍｇ／ｋｇのＦＫ５０６を単独で投与した。また、１０ｍｇ／ｋｇのＦＫ５０６と５０ｍｇ／ｋｇまたは１００ｍｇ／ｋｇのＳＤ２８２をそれぞれ経口で併用投与した。その後、ＧＶＨＤマウスモデルにおいて、体重（ｇ）、体重の変化率（％）、および体重の変化率のスコア（％）を評価した。

【００６３】

図６に示すように、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６を組み合わせて処置したＧＶＨＤマウスモデル群においては、正常な体重が維持された。また、アロジェニック移植による移植拒絶反応の誘発に伴う体重減少率（％）は、ＳＤ２８２単独投与群またはＦＫ５０６単独投与群と比較して、著しく低いことが確認された。体重の変化率とそのスコア（％）は、シンジェニック群と同様であった。したがって、ＧＶＨＤマウスモデルにおいて、前記薬物がＧＶＨＤ治療効果を示すことが確認された。

【００６４】

さらに、２０ｍｇ／ｋｇ、５０ｍｇ／ｋｇ、または１００ｍｇ／ｋｇのＳＤ２８２を単独で投与した群、２ｍｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇのＦＫ５０６を単独で投与した群、および５０ｍｇ／ｋｇのＳＤ２８２+２ｍｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇのＦＫ５０６を組み合わせて投与した群の疾患スコアを、ＧＶＨＤマウスモデルで評価した。

【００６５】

図７ａに示すように、組み合わせて投与した群の疾患スコアは、ＳＤ２８２を単独で投与した群の疾患スコアと比較して低いことが確認された。また、図７ｂに示すように、組み合わせて投与した群の疾患スコアは、ＦＫ５０６を単独で投与した群の疾患スコアと比較して低いことが確認された。

【００６６】

また、式１に従ってＣＩ値を算出した結果、ＳＤ２８２とＦＫ５０６を組み合わせた場合のＣＩ値は０.７であり、相乗効果を示すことが確認された。

【００６７】

４－２：ＳＤ２８２とＦＫ５０６の併用処理による組織細胞浸潤と組織損傷の抑制に関す

る評価

図５に示すような実験を、実施例１－２のＧＶＨＤ動物モデルで実施した。ＧＶＨＤの発症後、５０ｍｇ／ｋｇのＳＤ２８２単独、または１０ｍｇ／ｋｇのＦＫ５０６単独で処理した。また、１０ｍｇ／ｋｇのＦＫ５０６と５０ｍｇ／ｋｇのＳＤ２８２をそれぞれ経口で併用投与した。その後、ＧＶＨＤの治療効果を、皮膚、肺、肝臓、大腸、小腸、盲腸において疾患の重症度を示す組織学的スコアにより評価した。

【００６８】

図８ａに示すように、皮膚、肺および肝臓の組織学的スコアは、ＦＫ５０６単独で処理した群と比較して、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６を組み合わせて処理した群では低いことが確認された。また、図８ｂに示すように、小腸、大腸、盲腸の組織学的スコアも低いことが確認された。

【００６９】

したがって、ＳＤ２８２とＦＫ５０６を併用して処理した群では、炎症細胞の組織への侵入とＧＶＨＤによる組織損傷が抑制されていることが観察された。

【００７０】

４－３：ＳＤ２８２単独、ＦＫ５０６単独、またはこれらの組み合わせの処理によるＴｈ１７細胞およびＴｈ１細胞の活性の評価

サイトカインＩＦＮ－γ（インターフェロン-γ）を分泌するＴｈ１細胞（Ｔヘルパー１細胞）、サイトカインＩＬ－４（インターロイキン４）を分泌するＴｈ２細胞（Ｔヘルパー２細胞）、サイトカインＩＬ－１７（インターロイキン１７）を分泌するＴｈ１７細胞（Ｔヘルパー１７細胞）、およびＦｏｘｐ３転写因子を発現するＴｒｅｇ細胞の活性を評価した。具体的には、図５に示すように、実施例１－２のＧＶＨＤ動物を、ＧＶＨＤの発症後に、５０ｍｇ／ｋｇのＳＤ２８２単独または１０ｍｇ／ｋｇのＦＫ５０６単独で処理した。また、１０ｍｇ／ｋｇのＦＫ５０６と５０ｍｇ／ｋｇのＳＤ２８２をそれぞれ経口で併用投与した。その後、それぞれの細胞およびサイトカインの活性を評価した。

【００７１】

図９ａに示すように、組み合わせて処理した群では、ＩＦＮ－γ陽性ＣＤ４＋Ｔ細胞（％）およびＩＬ－１７陽性ＣＤ４＋Ｔ細胞（％）が有意に減少し、Ｔｈ１細胞およびＴｈ１７細胞の発現が抑制されていることが確認された。また、組み合わせて処理した群では、ＩＬ－４陽性ＣＤ４＋Ｔ細胞（％）およびＦｏｘｐ３+Ｔｒｅｇ細胞（％）が有意に増加し、Ｔｈ２細胞およびＴｒｅｇ細胞の発現が増加していることが確認された。

【００７２】

図９ｂ～図９ｄに示すように、組み合わせて処理した群では、ＳＴＡＴ３細胞、ＩＬ－１７陽性細胞、およびＩＦＮ－γ陽性細胞の数が減少し、炎症性サイトカインに対して優れた抑制効果を示すことが確認された。また、Ｆｏｘｐ３+Ｔｒｅｇ細胞が著しく増加していることがわかる。

【００７３】

したがって、本発明によるＳＤ２８２とＦＫ５０６の併用処理は、生体内で優れた免疫調節能を有し、したがってＧＶＨＤに対する治療効果を有することが確認された。

【００７４】

実施例５：皮膚移植動物モデルにおける、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６の組み合わせの処理による移植拒絶反応の評価

５－１：ＳＤ２８２単独、ＦＫ５０６単独、またはこれらの組み合わせの処理による皮膚移植拒絶反応の抑制に関する評価

皮膚移植後の拒絶反応を評価するために、実施例１－３の皮膚移植動物モデルを使用して、図１０aおよび図１０ｂに示す手順に従って、実験を実施した。皮膚移植後、５０ｍｇ／ｋｇのＳＤ２８２を単独で、または１０ｍｇ／ｋｇのＦＫ５０６を単独で投与した。また、１０ｍｇ／ｋｇのＦＫ５０６と５０ｍｇ／ｋｇのＳＤ２８２をそれぞれ経口で併用投与した。その後、表皮の厚さを測定して、移植された皮膚組織の生着レベルを評価し、続いてＨ＆Ｅ（ヘマトキシリンおよびエオシン）染色で分析した。

【００７５】
図１１に示すように、ＳＤ２８２とＦＫ５０６を組み合わせて処理した群の移植片の表皮の厚さは、対照群より薄く、優れた皮膚組織生着および移植された皮膚組織への低い損傷を示した。したがって、移植片の生存率が増加し、炎症性細胞浸潤が減少し、それにより病因が阻害されることが確認された。
【００７６】
５－２：ＳＤ２８２単独、ＦＫ５０６単独、またはこれらの併用処理による免疫活性の調節能の評価
Ｔｈ１７細胞のサイトカインＩＬ－１７分泌、Ｆｏｘｐ３転写因子を発現するＴｒｅｇ細胞の活性、およびＳＴＡＴ３を調節する能力を評価するために、上記実施例と同じ条件で、皮膚動物モデルでの皮膚移植後２１日目に移植部位を摘出して、組織中のＳＴＡＴ３、リン酸化ＳＴＡＴ３（ｐＳＴＡＴ３（Ｔｙｒ７０５）およびｐＳＴＡＴ３（Ｓｅｒ７２７））、ＩＬ－１７およびＦｏｘｐ３の活性レベルを評価した。
【００７７】
図１２ａおよび図１２ｂに示すように、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６を組み合わせて処理した群において、ＳＴＡＴ３、リン酸化ＳＴＡＴ３（ｐＳＴＡＴ３（Ｔｙｒ７０５）およびｐＳＴＡＴ３（Ｓｅｒ７２７））、およびＩＬ－１７の発現が、ＳＤ２８２を単独で、またはＦＫ５０６を単独で投与した群と比較して有意に低いことが確認された。また、Ｆｏｘｐ３の発現が増加していることも確認され、ＳＤ２８２とＦＫ５０６の併用処理が免疫活性を調節する優れた能力を持っていることが示唆された。
【００７８】
したがって、本発明によるＳＤ２８２およびＦＫ５０６の併用処理は、生体内で移植動物モデルの移植拒絶を阻害することが確認された。
【００７９】
実施例６：正常なヒト細胞における、ＳＤ２８２単独、ＦＫ５０６単独、またはこれらの併用処理によるＴ細胞増殖の評価
正常なヒトＰＢＭＣ（末梢血単核細胞、ＰＢＭＣ）において、ＳＤ２８２単独処理、ＦＫ５０６単独処理、またはこれらの併用処理によるＴ細胞増殖を評価するために、混合白血球反応（ＭＬＲ）およびＣＦＳＥ（カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル）染色を行った。未処理のシンジェニック群および未処理のアロジェニック群を対照として使用した。アロジェニックモデルを、５０μＭ、２５０μＭ、および５００μＭのＳＤ２８２単独、または１ｎＭおよび５ｎＭのＦＫ５０６単独で処理した。また、ＦＫ５０６（１ｎＭおよび５ｎＭ）とＳＤ２８２（２５０μＭ）をそれぞれ組み合わせて処理した。処理後、各群を４日間培養した後、３Ｈ－チミジン取り込み法またはフローサイトメトリー法に従って、培養細胞中のＴ細胞増殖を観察することによってアロ反応を評価した。
【００８０】
図１３ａに示すように、未処理のアロジェニック群ではＴ細胞増殖は阻害されなかったが、５０ｎＭ以上のＳＤ２８２単独で処理した場合、対照群と比較して、Ｔ細胞増殖が抑制されることが確認された。また、図１３ｂに示すように、ＦＫ５０６単独で処理した群での阻害は効果がなく、未処理群と同様であることが確認された。しかし、ＳＤ２８２単独の処理およびＳＤ２８２とＦＫ５０６の組み合わせの処理は、アロジェニックＴ細胞の増殖を有意に阻害することが確認された。
【００８１】
実施例７：正常なヒト血液細胞における、ＳＤ２８２単独、ＦＫ５０６単独、またはこれらの組み合わせによる処理による、炎症性サイトカインの活性に対する阻害に関する評価
正常なヒト末梢血細胞（ＰＢＭＣ）において、ＳＤ２８２単独、ＦＫ５０６単独、またはこれらの組み合わせによる処理による、炎症性サイトカインの活性に対する阻害を評価するために、未処理のシンジェニック群および未処理のアロジェニック群を対照として使用した。アロジェニックモデルを、５０μＭ、２５０μＭ、および５００μＭのＳＤ２８２単独、または１ｎＭおよび５ｎＭのＦＫ５０６単独で処理した。また、ＦＫ５０６（１

および５ｎＭ）とＳＤ２８２（２５０μＭ）をそれぞれ組み合わせて処理した。処理後、各群を４日間培養した後、ＥＬＩＳＡ法に従って、培養細胞中のＩＬ－１７、ＩＦＮ－γおよびＴＮＦ－αに対する阻害効果を評価してアロ反応を評価した。

【００８２】

図１４および図１５に示すように、ＩＬ－１７、ＩＦＮ－γ、およびＴＮＦ－αの活性は、ＦＫ５０６単独で処理した群に比べて、ＳＤ２８２単独で処理した群およびＳＤ２８２とＦＫ５０６を組み合わせて処理した群で、より有意に阻害されることが確認された。

【００８３】

実施例８：肝臓移植患者における併用投与による効果の評価

８－１：併用投与による免疫細胞マーカーの変化の評価

肝臓移植患者の血液からフィコールを用いて、末梢血細胞（ＰＢＭＣ）を分離した。ＰＢＭＣを、ＴＣＲ刺激の条件下で（ＣＤ３刺激下で）、２５０μＭのＳＤ２８２単独、５ｎＭのＦＫ５０６単独、およびこれらを組み合わせて処理した。４日間培養した後、免疫細胞のサブタイプをフローサイトメトリーで分析して、Ｔｒｅｇ細胞の活性がそれぞれの薬物処理によって誘導されたかどうかを評価した。

【００８４】

図１６ａおよび図１６ｂに示すように、ＳＤ２８２およびＦＫ５０６を組み合わせて処理した群では、免疫制御性サブタイプ細胞（ＣＤ４＋Ｔｒｅｇ細胞、ＣＤ８＋Ｔｒｅｇ細胞、形質細胞様樹状細胞）の増加が確認され、また移植拒絶反応に関連する免疫細胞サブタイプ（セントラルメモリーＴｈ１７細胞、移行期Ｂ細胞、血漿Ｂ細胞）の減少が確認された。

【００８５】

８－２：併用投与によるＫＥＧＧ経路と遺伝子調節の分析

肝臓移植患者の末梢血細胞（ＰＢＭＣ）において、薬物処理による免疫細胞調節に関連するシグナル因子の変化を調査するために、ＰＢＭＣを、ＴＣＲ刺激の条件下（ＣＤ３刺激下）で、２５０μＭのＳＤ２８２単独、５ｎＭのＦＫ５０６単独、およびこれらを組み合わせて処理した。４８時間培養した後、Ｍａｃｒｏｇｅｎ、Ｉｎｃ．でマイクロアレイ解析を行った。

【００８６】

図１７に示すように、肝臓移植患者で亢進する様々な経路が、ＳＤ２８２の処理によって阻害されることが確認された。また、ＳＤ２８２とＦＫ５０６の併用により、ケモカインシグナル伝達経路やＩＬ－１７シグナル伝達経路などの病因関連シグナルが有意に低下することが確認された。

【００８７】

上記の条件下でどのような遺伝子が実際に増加または減少したかを分析した結果、併用投与は、ＳＤ２８２単独投与と比較して、ＳＴＡＴ３経路に対してより優れた阻害効果を示すことが図１８ａから確認された。図１８ｂに示すように、併用投与は、ＳＤ２８２単独投与と比較して、ミトコンドリア機能のより優れた回復効果を示すことが確認された。図１８ｃに示すように、併用投与は、ＳＤ２８２単独投与と比較して、炎症性細胞の細胞死に対してより優れた阻害効果を示すことが確認された。また、図１８ｄに示すように、併用投与は、ＳＤ２８２単独投与と比較して、細胞移動に対してより優れた阻害効果を示すことが確認された。

【００８８】

さらに、図１９に示すように、併用投与は、ＳＤ２８２単独投与と比較して、免疫細胞の細胞死に対してより優れた阻害効果を示すことが確認された。

【００８９】

８－３：肝臓移植患者における、病原性細胞移動の調節効果に関する評価

マウスおよび肝臓移植患者の免疫細胞を各薬剤で４８時間処理した後、細胞を回収して移動アッセイを行った。2×10^{5}個の細胞を上部トランスウエルにロードし、下部チャンバーでｓＤＦ－１で処理または処理せずに、２時間インキュベートした。２時間後、移

動した細胞の数を数えた。

【００９０】

図２０ａおよび図２０ｂに示すように、併用処理群は、ＳＤ２８２単独で処理した群と比較して、細胞移動に対してより優れた阻害効果を示すことが確認された。

【００９１】

実施例９：肝臓移植患者のアバターモデルにおける有効性の評価

９－１：肝障害を有するヒト化マウスモデルの作製

肝障害を有するヒト免疫系を備えたヒト化マウスモデル（アバターモデル）を構築するために、ヒト由来のＰＢＭＣ（末梢血単核細胞）をＮＳＧマウスに静脈内注射した後、肝星細胞株を静脈内注射した。ＣＣｌ$_4$を注入して、肝障害（肝線維症）を誘発した。具体的には、正常な被験者に由来するＰＢＭＣまたは肝疾患を有する患者（ＨＢＶ誘発性肝硬変患者またはアルコール性肝硬変患者）に由来するＰＢＭＣをＮＳＧマウスに静脈内注射した。１日後、肝星細胞株およびＣＣｌ$_4$を静脈内注射した。２０日後にヒト細胞の生着を確認し、３９日後にマウスを犠牲にして組織分析を行った。

【００９２】

９－２：肝障害を有するマウスモデルにおける炎症または線維症の評価

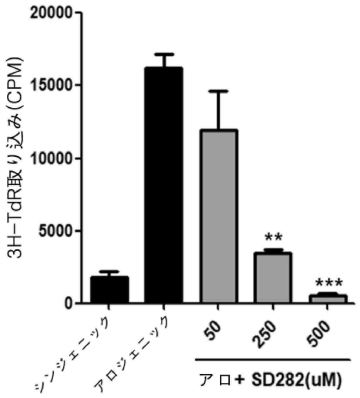
正常な被験者または肝臓移植患者に由来する血液の注射と共にＣＣｌ$_4$注射によって肝障害を誘発させたモデル（９－１で作製）では、正常な被験者に比べて、移植患者に由来する血液によって炎症および線維症がより誘発される。単独の処理または組み合わせの処理における炎症および線維症のレベルを評価した。

【００９３】

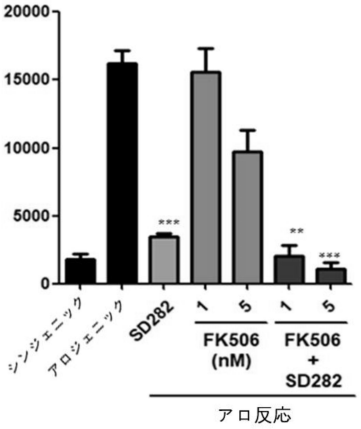
図２１ａおよび図２１ｂに示すように、前記の組み合わせの処理は、ＳＤ２８２単独の処理と比較して、炎症および線維症が有意に減少していることが確認された。

【図面】

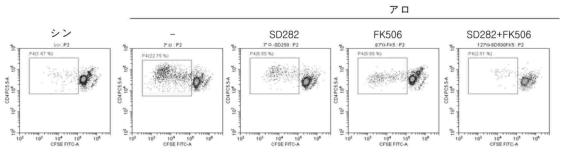
【図１ａ】



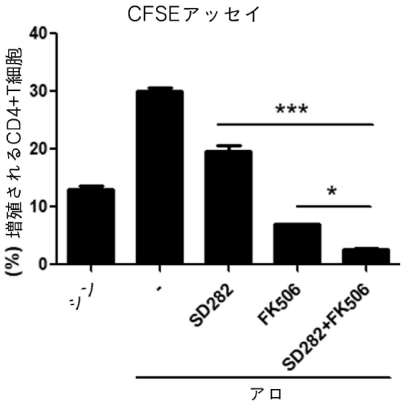
【図１ｂ】



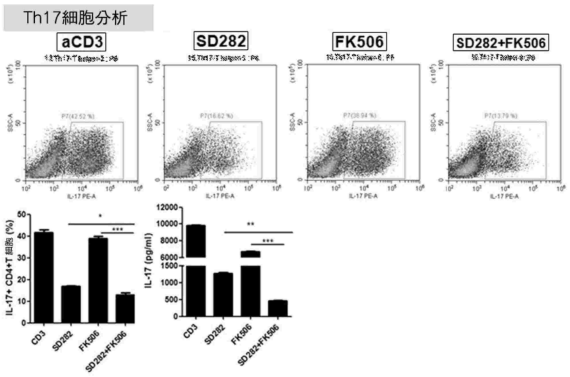
【図２ａ】



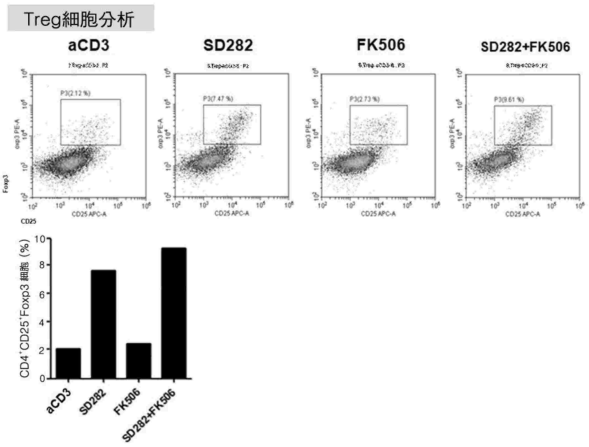
【図２ｂ】



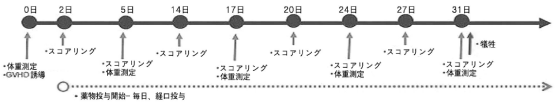
【図３】



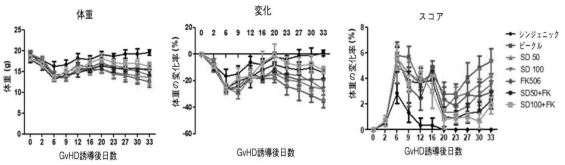
【図４】



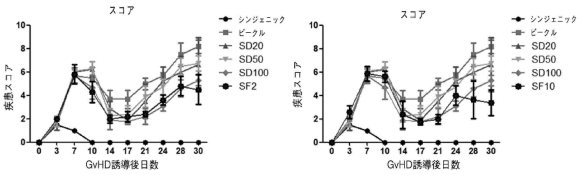
【図５】



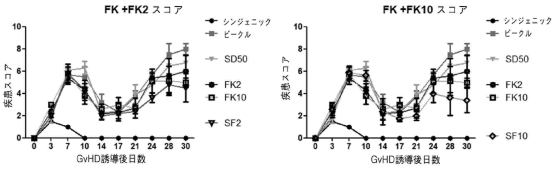
【図６】



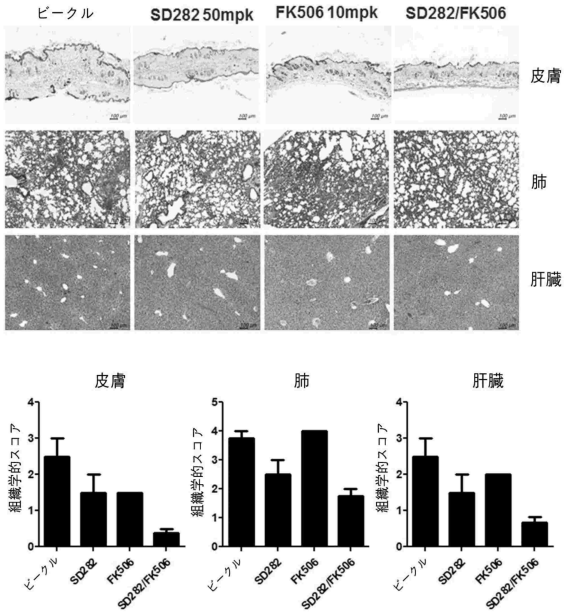
【図７ａ】



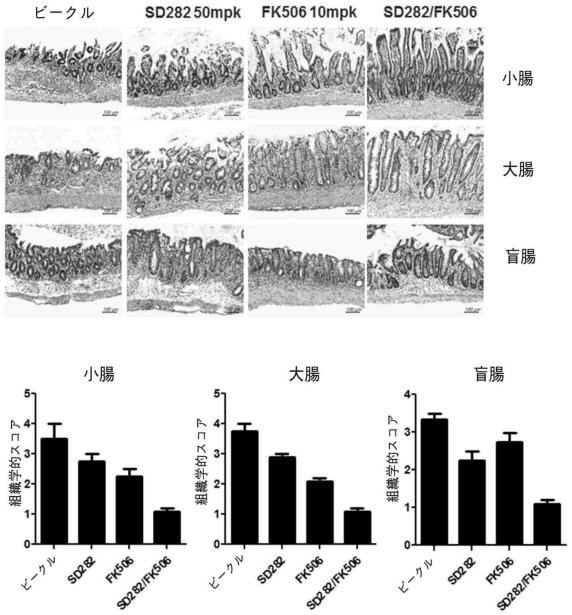
【図７ｂ】



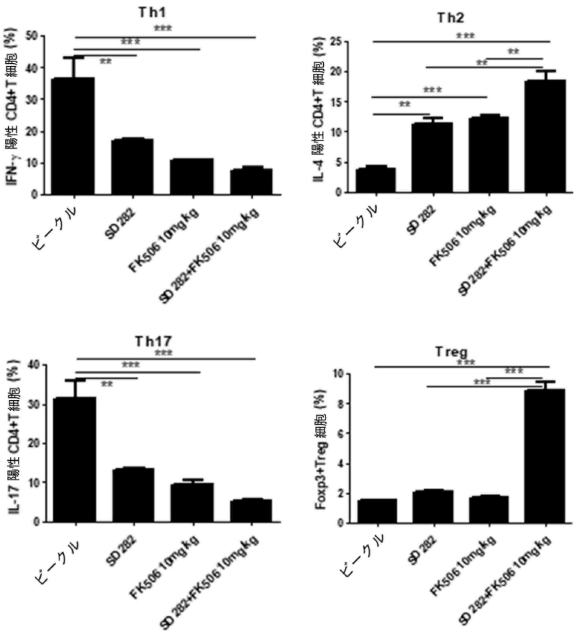
【図８ａ】



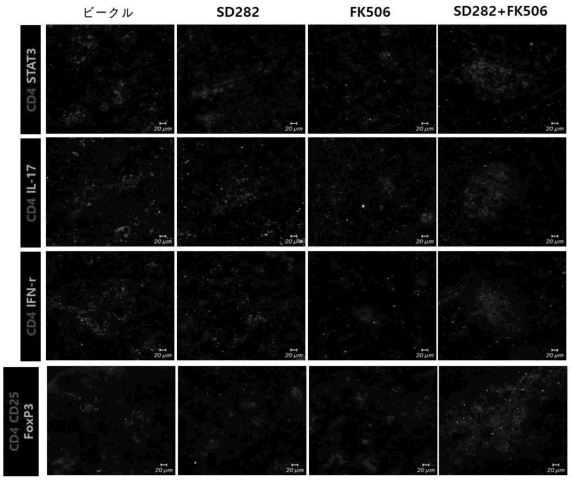
【図８ｂ】



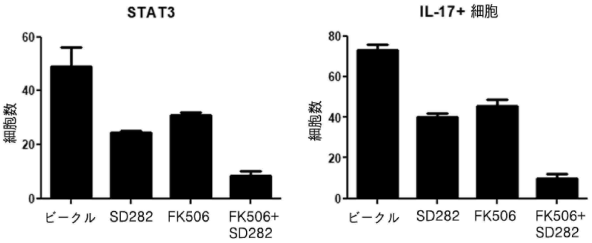
【図９ａ】



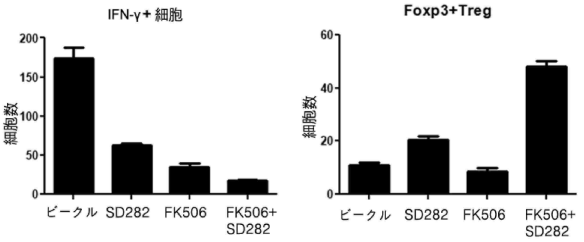
【図９ｂ】



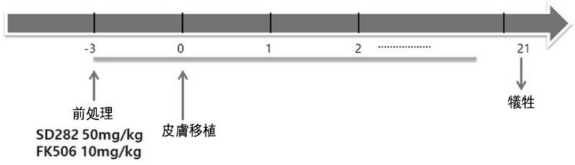
【図９ｃ】



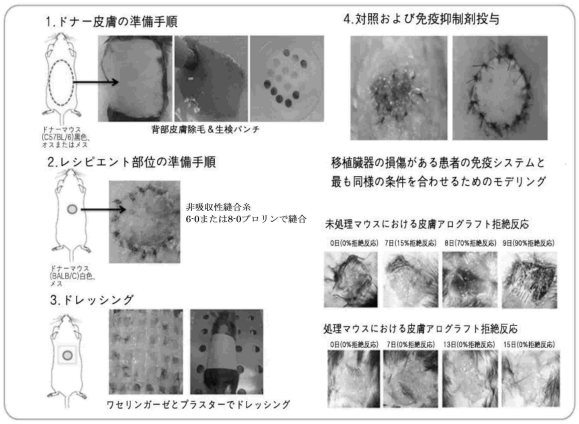
【図９ｄ】



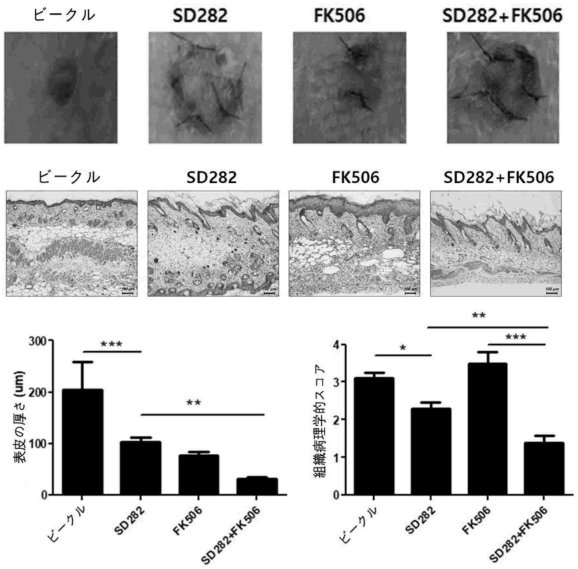
【図１０ａ】



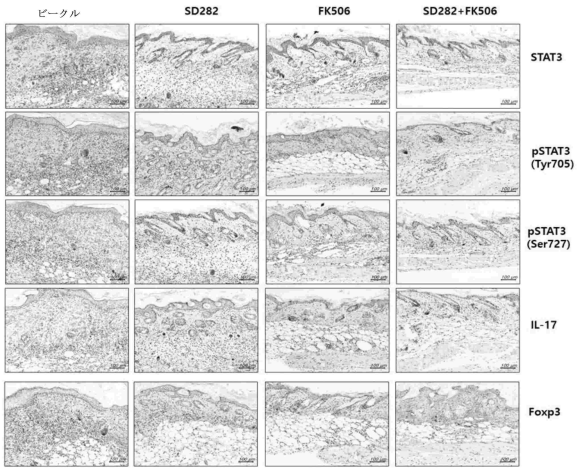
【図１０ｂ】



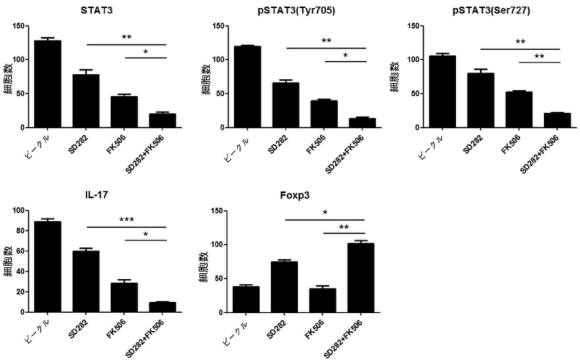
【図１１】



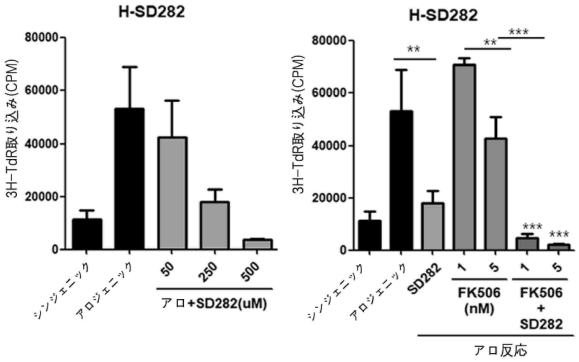
【図１２ａ】



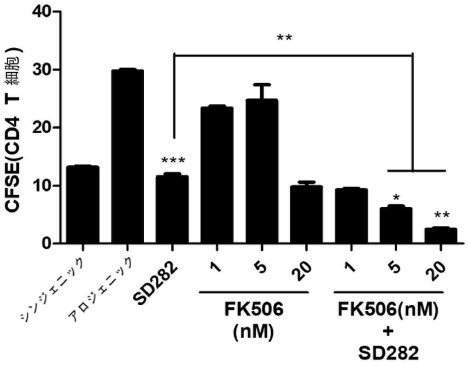
【図１２ｂ】



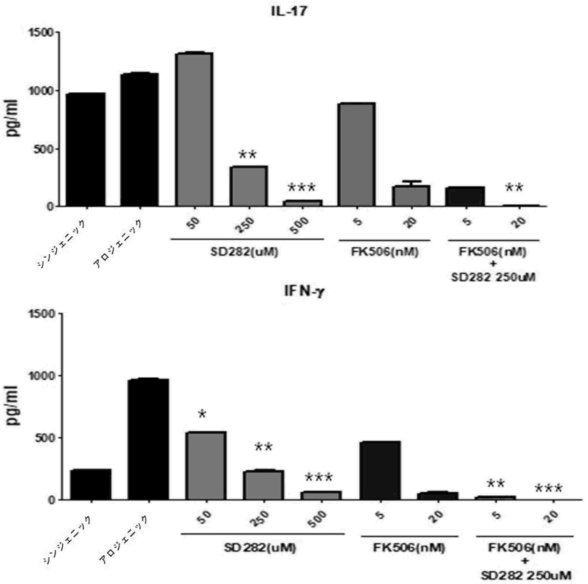
【図１３ａ】



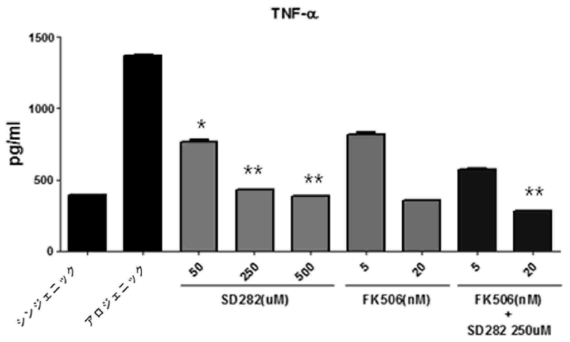
【図１３ｂ】



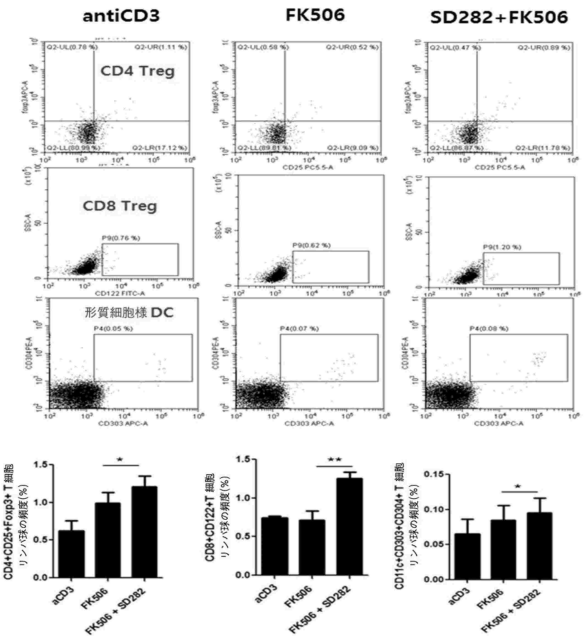
【図１４】



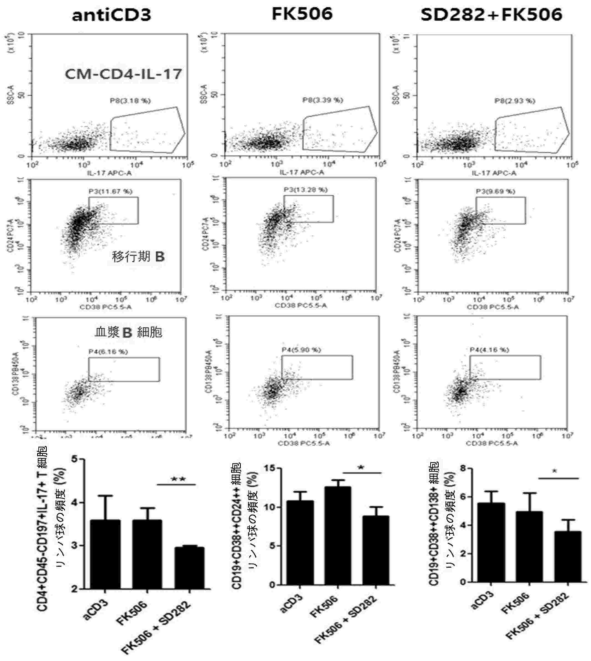
【図１５】



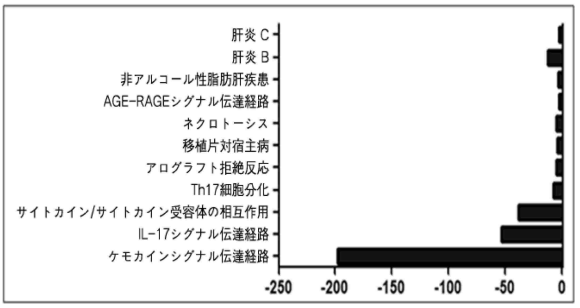
【図１６ａ】



【図１６ｂ】

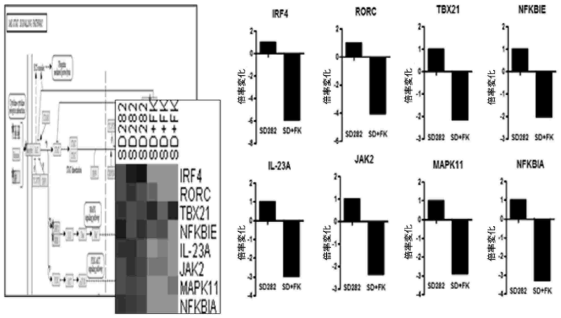


【図１７】



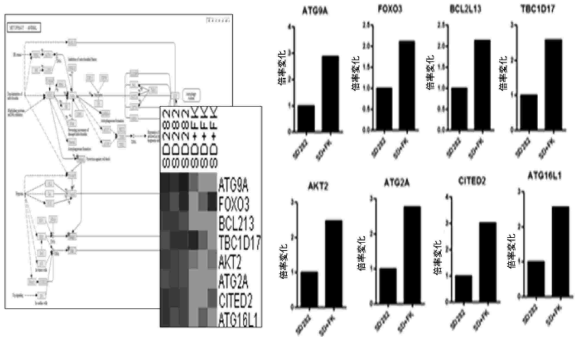
【図１８ａ】

SD282/FK506によるSTAT3シグナル分子の制御



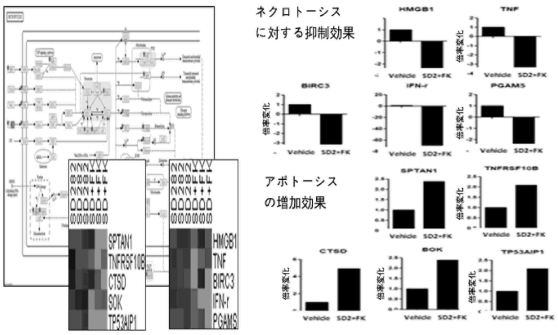
【図１８ｂ】

SD282/FK506によるミトコンドリア機能の回復および調節



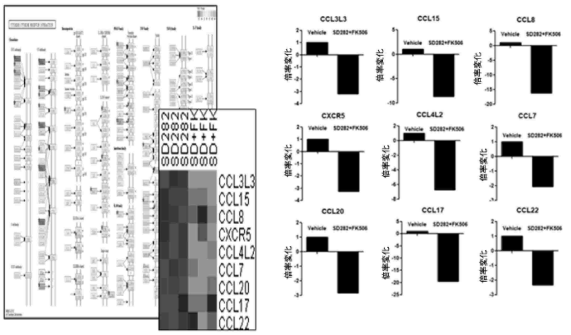
【図１８ｃ】

SD282/FK506による炎症性細胞死分子の制御

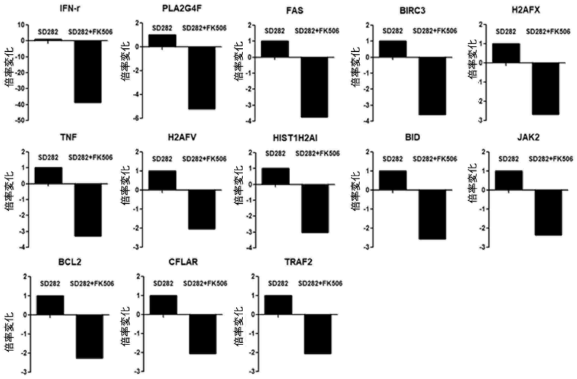


【図１８ｄ】

SD282/FK506のアロ反応および細胞移動制御

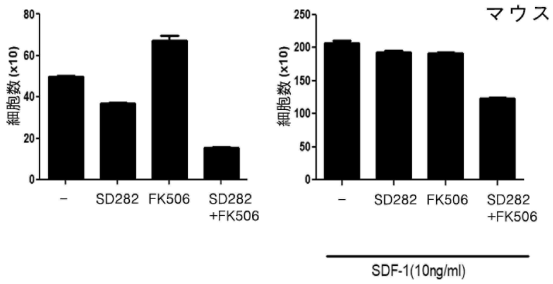


【図１９】

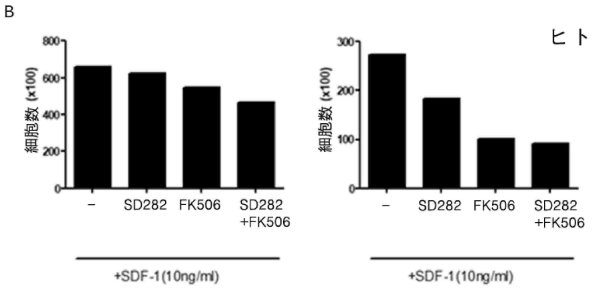


【図２０ａ】

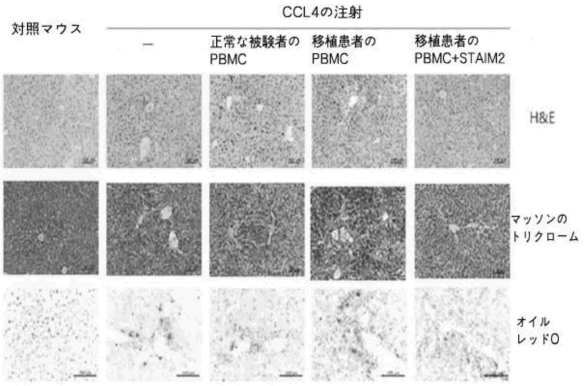
A



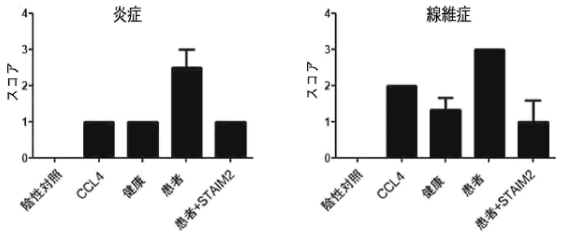
【図２０ｂ】



【図２１ａ】



【図２１ｂ】



フロントページの続き

(72)発明者　チェ，ジョンヨン
大韓民国　０６６０８　ソウル，ソチョーグ，ソウンーロ　２２１　＃１０３－９０４
(72)発明者　ヤン，チョルウ
大韓民国　０６５４７　ソウル，ソチョーグ，バンポーデロ　２７５　＃１１８－６０３
(72)発明者　パク，ソンファン
大韓民国　０６６０１　ソウル，ソチョーグ，ソチョチュンアンーロ　２００　＃２４－９０２
(72)発明者　イ，ソンヨン
大韓民国　０７７６６　ソウル，カンソーグ，コムダルレーロ　１５ガーギル　８　＃２０２
(72)発明者　パク，ミンジョン
大韓民国　０８３４３　ソウル，クローグ，オリューロ　６２－１５　＃１２－３０２
(72)発明者　チョン，ジュヨン
大韓民国　０７９９３　ソウル，ヤンチョンーグ，モクトンーノ　２１２　＃７１３－５０８
(72)発明者　キム，セヨン
大韓民国０２７５５ソウル，ソンブクーク，チャンウィーロ２１ーギル１７－１６＃Ｂ－２０３
(72)発明者　ソ，ヒョンボム
大韓民国　０３３３９　ソウル，ウンピョンーグ，ヨンソーロ　３７ガーギル　８－５　＃Ａ－２０２
(72)発明者　リュ，ジェユン
大韓民国　０３４２８　ソウル，ウンピョンーグ，カルヒョンーロ　１１ーギル　４６　＃１０２－１８０２
(72)発明者　チョ，クンヒョン
大韓民国　０２１９２　ソウル，チュンナンーグ，ヨンマサンーロ　８６ーギル　９－２７　＃１０１－１１０２

審査官　井上 政志
(56)参考文献　特表２０１７－５１９７２３（ＪＰ，Ａ）
特表２０１４－５１０７８９（ＪＰ，Ａ）
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ３１／００－３１／３２７
Ａ６１Ｋ３１／３３－３１／８０
Ａ６１Ｋ３３／００－３３／４４
Ａ６１Ｋ　４７／００－４７／６９
Ａ６１Ｋ　９／００－　９／７２
Ａ６１Ｐ　１／００－４３／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）