

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6441073号
(P6441073)

(45) 発行日 平成30年12月19日 (2018. 12. 19)

(24) 登録日 平成30年11月30日 (2018. 11. 30)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/192 (2006. 01)
 A 6 1 K 31/4436 (2006. 01)
 A 6 1 K 31/7028 (2006. 01)
 A 6 1 K 45/00 (2006. 01)
 A 6 1 P 1/04 (2006. 01)

A 6 1 K 31/192
 A 6 1 K 31/4436
 A 6 1 K 31/7028
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 1/04

請求項の数 13 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-517228 (P2014-517228)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月22日 (2012. 6. 22)
 (65) 公表番号 特表2014-517077 (P2014-517077A)
 (43) 公表日 平成26年7月17日 (2014. 7. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/043875
 (87) 国際公開番号 W02012/178108
 (87) 国際公開日 平成24年12月27日 (2012. 12. 27)
 審査請求日 平成27年6月12日 (2015. 6. 12)
 審判番号 不服2017-8319 (P2017-8319/J1)
 審判請求日 平成29年6月7日 (2017. 6. 7)
 (31) 優先権主張番号 61/501, 139
 (32) 優先日 平成23年6月24日 (2011. 6. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 513317471
 ジーアールアイ バイオ, インコーポレイ
 テッド
 G R I B i o, I n c.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2
 0 3 7, ラホヤ, アヴェニューダ デ ラ
 ブラヤ 2 2 2 3
 (74) 代理人 110001302
 特許業務法人北青山インターナショナル
 (72) 発明者
 チャトゥールヴェディ, ヴィピン, クマー
 ル
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2
 0 6 7, ランチョサンタフェ, トップ “オ
 ー” ザモーニングウェイ 8 1 5 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症状態の予防および処置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの I 型NK T細胞媒介炎症状態を処置または予防するための薬剤の製造における $R A R_{\gamma}$ 選択的又は $R A R_{\beta / \gamma}$ 選択的 アゴニストの使用であって、当該薬剤が、I 型NK T細胞の活性化を阻害するのに十分な量の $R A R_{\gamma}$ 選択的又は $R A R_{\beta / \gamma}$ 選択的アゴニストを含み、

前記 I 型NK T細胞媒介炎症状態が、脂肪肝疾患、アルコール誘導性肝炎、非アルコール性脂肪症肝炎、肝硬変、劇症肝硬変、突発性肝炎、ウイルス誘発性肝炎（A型、B型、C型およびその他）、肝胆管癌種と関連する炎症性肝炎、多発性硬化症、1型糖尿病、虚血再灌流傷害、固形臓器移植、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、筋萎縮性側索硬化症、および炎症性腸疾患、インスリン依存性真性糖尿病、自己免疫性肝炎、喘息、およびセリアック病からなる群から選択されることを特徴とする使用。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の使用において、前記 $R A R_{\gamma}$ 選択的 又は $R A R_{\beta / \gamma}$ 選択的アゴニストが、タザロテンを含むことを特徴とする使用。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の使用において、前記 I 型NK T細胞媒介炎症状態が、脂肪肝疾患、アルコール誘導性肝炎、非アルコール性脂肪症肝炎、肝硬変、劇症肝硬変、突発性肝炎、ウイルス誘発性肝炎（A型、B型、C型およびその他）、肝胆管癌種と関連する炎症性肝炎、多発性硬化症、1型糖尿病、虚血再灌流傷害、固形臓器移植、全身性エリテマト

ーデス、関節リウマチ、筋萎縮性側索硬化症、および炎症性腸疾患からなる群から選択されることを特徴とする使用。

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 の何れか一項に記載の使用において、前記薬剤が更に I I 型 N K T 細胞を活性化するのに十分な量のスルファチドを含むことを特徴とする使用。

【請求項 5】

患者における I 型 N K T 細胞媒介組織損傷を阻害するための薬剤の製造における R A R_γ 選択的又は R A R_β / γ 選択的アゴニストの使用において、当該薬剤が、I 型 N K T 細胞の活性化を阻害するのに十分な有効量の R A R_γ 選択的又は R A R_β / γ 選択的アゴニストを含むことを特徴とする使用。

10

【請求項 6】

請求項 5 に記載の使用において、前記 R A R_γ 選択的又は R A R_β / γ 選択的アゴニストがタザロテンを含むことを特徴とする使用。

【請求項 7】

請求項 5 又は 6 に記載の使用において、前記組織が、肝組織を含むことを特徴とする使用。

【請求項 8】

請求項 5 乃至 7 の何れか一項に記載の使用において、前記 I 型 N K T 細胞活性が I L - 4 分泌を含むことを特徴とする使用。

【請求項 9】

20

以下の薬剤：

患者における少なくとも一の I 型 N K T 細胞媒介炎症状態を治療又は予防するための薬剤であって、I 型 N K T 細胞の活性化を阻害するのに十分な有効量の、R A R_γ 選択的又は R A R_β / γ 選択的アゴニストとスルファチドの組み合わせを含む薬剤；又は

I 型 N K T 細胞媒介炎症疾患を有する患者における I 型 N K T 細胞の活性化を阻害するための薬剤であって、I 型 N K T 細胞の活性化を阻害するのに十分な有効量の、R A R_γ 選択的又は R A R_β / γ 選択的アゴニストとスルファチドの組み合わせを含む薬剤；又は

I 型 N K T 細胞媒介肝炎を有する患者の肝臓への骨髓細胞の放出を阻害するための薬剤であって、I 型 N K T 細胞の活性化を阻害するのに十分な有効量の、R A R_γ 選択的又は R A R_β / γ 選択的アゴニストとスルファチドの組み合わせを含む薬剤；

30

の少なくとも一つの製造における、R A R_γ 選択的又は R A R_β / γ 選択的アゴニストとスルファチドの使用。

【請求項 10】

患者における I 型 N K T 細胞媒介組織損傷を阻害するための薬剤の製造におけるスルファチドの使用において、前記薬剤が患者に I I 型 N K T 細胞を活性化するのに十分な量のスルファチドおよび I 型 N K T 細胞の活性化を阻害するのに十分な量の R A R_γ 選択的又は R A R_β / γ 選択的アゴニストを含むことを特徴とする使用。

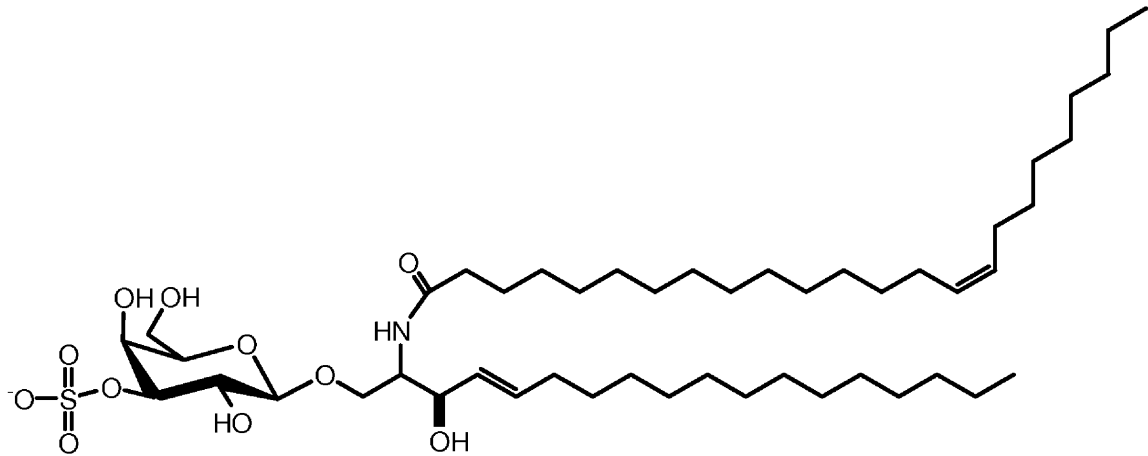
【請求項 11】

請求項 1 乃至 10 の何れか一項に記載の使用において、前記薬剤が更に、処方薬又は乱用薬物からの化学的な肝損傷のリスクのある患者における肝損傷を阻害するためのものであることを特徴とする使用。

40

【請求項 12】

請求項 4、9、又は 10 のいずれか一項に記載の使用において、前記薬剤が：



10

の化学構造を有するスルファチドを含むことを特徴とする使用。

【請求項 13】

請求項 9、11 又は 12 に記載の使用において、前記 RAR_{γ} 選択的又は $RAR_{\beta/\gamma}$ 選択的アゴニストが、タザロテンを含むことを特徴とする使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

20

【0001】

本実施形態は、肝臓の炎症状態の予防および処置においてレチノイン酸レセプター（ RAR ）を調節するための組成物および方法に関する。

【0002】

過度のアルコール使用は、西洋における肝疾患の主な原因である。肝傷害の徴候が、1日に4杯以上のアルコール飲料（12オンスビール4杯、グラスワイン4杯、またはハードリカー4オンス（男性）もしくはその半量（女性））を消費する個体において観察される。どのようにアルコールが肝臓を損傷するかは十分に理解されてはいないが、慢性的なアルコール消費は、炎症促進性サイトカイン（ $TNF-\alpha$ 、 $IL6$ および $IL8$ ）の分泌、酸化ストレス、脂質過酸化反応、およびアセトアルデヒド毒性を結果としてもたらし、その結果として、炎症、アポトーシスおよび最終的には肝細胞の線維化をもたらす。

30

【0003】

アルコール性肝疾患（ ALD ）は、アルコール性脂肪肝疾患、アルコール性肝炎、および肝硬変という3つの主な段階を有する。アルコール性脂肪肝疾患は、肝臓中への脂肪酸の蓄積を特徴とし、通常は無症候性であり、個体が2～3週間断酒すれば元の状態に戻る。重度の場合は、衰弱、悪心、腹痛、食欲減退、および倦怠感が経験され得る。ほとんどの大酒家がいくらかのレベルの脂肪肝疾患を示し、場合によっては、深酒を1週間未満以外の期間にわたって毎日行っただけでよいが、大酒家の5人に1人だけがアルコール性肝炎になり、4人に1人が肝硬変になる。アルコール性肝炎は、肝細胞の炎症を特徴とし、一般的に禁酒により元の状態に戻る。肝硬変は、炎症、線維化（細胞硬化）、および体内の化学物質の無毒化を妨げる損傷膜を特徴とし、癒痕化および壊死をもたらす、一般的に不可逆的である。

40

【0004】

アルコール性肝疾患における肝組織損傷の異なる段階の基礎となる細胞および分子機序は、十分に理解されていない。いくつかの分野で進展が見られたが、この疾患を食い止めるための有効な治療アプローチはまだない。これは、一部には、肝臓が免疫学的にも解剖学的にも独特な臓器であるという事実に起因している。例えば、肝実質細胞が代謝機能を有する一方で、非実質細胞は免疫機能を果たす。肝臓は、肝実質細胞に加えて、 $LSEC$ 、クップファー細胞、樹状細胞、 NK 細胞および NKT 細胞などの、全てが免疫に参与し得る、種々の非実質細胞を含有する。どのように免疫応答が調整されてアルコール誘導性

50

損傷に対する耐性または免疫がもたらされるかはいずれも知られていない。

【発明の概要】

【0005】

本実施形態は、概して、炎症状態と関連する組織損傷を予防および処置するために自然免疫系を調節するための方法および組成物に関する。例えば、本明細書に記載されるいくつかの実施形態は、自然免疫系を調節することによるアルコール性肝疾患（ALD）の予防および処置に関する。

【0006】

本明細書に記載されるいくつかの実施形態は、肝臓への炎症関連傷害を処置、軽減または予防するために、I型NK細胞およびII型NK細胞の活性化、I型NK細胞とII型NK細胞との間の相互作用、ならびに他の肝細胞とのそれらの相互作用を操作するための方法および組成物に関する。一部の実施形態において、炎症関連傷害は、アルコール誘導性肝傷害である。一部の実施形態において、アルコール誘導性肝傷害は、アルコール関連肝疾患、脂肪肝疾患、肝脂肪症、アルコール性肝炎またはアルコール性肝硬変である。

10

【0007】

一部の実施形態は、過度のアルコール消費に続く炎症性誘発性肝損傷を、I型NK細胞活性を阻害することによって予防、緩和または処置する方法に関する。一部の実施形態において、炎症促進性I型NK細胞活性は、ATRA、レチノール、9-cis-RAまたは13-cis-RA、トレチノイン、AM580、AC55649、CD1530およびタザロテンからなる群から選択される1種以上のRARアゴニストにより阻害される。一部の実施形態において、炎症促進性I型NK細胞活性は、1種以上のポリオレフィン性レチノイド（例えば、イソレチノインおよびアシトレチン）によって阻害される。一部の実施形態において、炎症促進性I型NK細胞活性は、エトレチナート、アシトレチンおよびイソトレチノインからなる群から選択される1種以上のRARアゴニストによって阻害される。いくつかの実施形態は、タザロテン、タザロテン酸またはそれらの混合物によって炎症促進性I型NK細胞活性の阻害に関する。一部の実施形態において、炎症促進性I型NK細胞活性は、2型NK細胞を活性化することによって阻害される。一部の実施形態において、炎症性I型NK細胞活性は、1種以上のスルファチドによって阻害される。

20

30

【0008】

本開示の一部の実施形態は、アルコール消費に続く、関連する、または起因する肝傷害に繋がる自然免疫機構に関連する。一部の実施形態は、消化管由来または代謝産物由来の抗原に対する寛容性を元来与えると同時に非自己識別される（non-self identified）病原体に対する免疫も与えるこれらの細胞間の相互作用を操作することに関する。

【0009】

一部の実施形態は、I型およびII型の両方のNK細胞を炎症状態と関連する組織損傷を処置、予防または緩和するための有効な療法の開発の標的とした併用療法アプローチに関する。一部の実施形態において、RARアゴニストが、I型NK細胞活性を直接阻害するために使用され、スルファチドが、II型NK細胞活性を活性化するために使用される。

40

【0010】

一部の実施形態は、全トランス型レチノイン酸（ATRA）の投与を通じての、ALDと関連する組織損傷の予防および処置に関する。いくつかの実施形態は、アルコール誘導性肝傷害、アルコール関連肝疾患、脂肪肝疾患、肝脂肪症、アルコール性肝炎またはアルコール性肝硬変の予防および処置におけるATRAの使用に関する。

【0011】

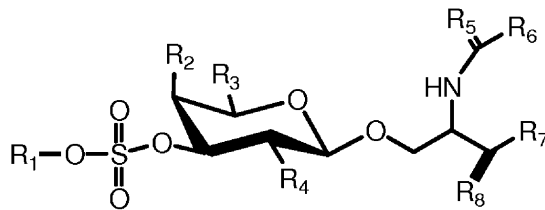
一部の実施形態は、タザロテン、タザロテン酸またはそれらの混合物の投与を通じての、ALDと関連する組織損傷の予防および処置に関する。いくつかの実施形態は、アルコ

50

ール誘導性肝傷害、アルコール関連肝疾患、脂肪肝疾患、肝脂肪症、アルコール性肝炎またはアルコール性肝硬変の予防および処置におけるタザロテン、タザロテン酸またはそれらの混合物の使用に関する。

【0012】

一部の実施形態は、1種以上のスルファチドの投与を通じての、炎症と関連する組織損傷の予防および処置に関する。いくつかの実施形態は、アルコール誘導性肝傷害、アルコール関連肝疾患、脂肪肝疾患、肝脂肪症、アルコール性肝炎またはアルコール性肝硬変の予防および処置におけるスルファチドの使用に関する。一部の実施形態において、スルファチドは、以下の化学構造：



10

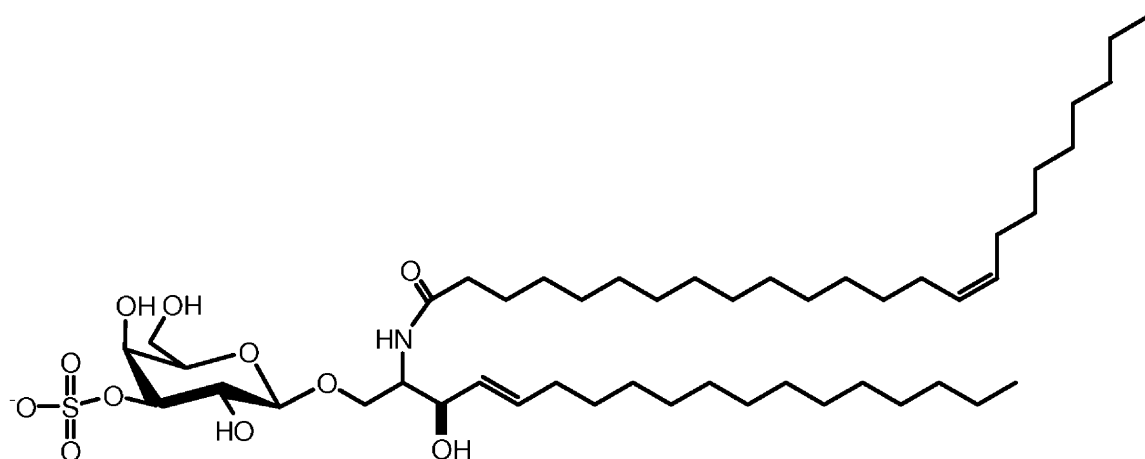
を有する。

【0013】

式中、 R_1 は、結合、水素、 $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{30}$ 置換アルキル、 $C_1 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_1 \sim C_{30}$ 置換アルケニルおよび $C_5 \sim C_{12}$ 糖からなる群から選択され； R_2 は、水素、ヒドロキシ基、メトキシ基、およびアルコキシ基からなる群から選択され； R_3 は、水素、ヒドロキシ基、メトキシ基、エトキシ基、およびアルコキシ基からなる群から選択され； R_4 は、水素、ヒドロキシ基およびアルコキシ基からなる群から選択され； R_5 は、水素、ヒドロキシル、カルボニル、アルコキシおよび結合からなる群から選択され； R_6 は、 $C_1 \sim C_{40}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ アルケニル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルケニルおよび $C_1 \sim C_{40}$ アルキニル (alkynyl) からなる群から選択され； R_7 は、 $C_1 \sim C_{40}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ アルケニル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルケニルおよび $C_1 \sim C_{40}$ アルキニル (alkynyl) からなる群から選択され；そして R_8 は、水素、ヒドロキシル基、カルボニル、アルコキシ基および結合からなる群から選択される。一部の実施形態において、スルファチドは、以下の化学構造：

20

30



40

を有する。

【0014】

一部の実施形態は、活性化されたスルファチド反応性 I I 型 NK T 細胞による I 型 NK T 細胞の調節に関する。いくつかの実施形態は、自己免疫疾患からの保護および抗腫瘍免疫の抑制をもたらすことにおける、活性化されたスルファチド反応性 I I 型 NK T 細胞の

50

、I型NK T細胞に対する調節的役割に関する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1a】図1aは、肝臓におけるI型NK Tに対するスルファチドの効果を決定する方法を描写している。

【図1b】図1bは、10 ng/mlのIL-2の存在下または不在下におけるαGalCerでのインビトロチャレンジに応答した細胞増殖を測定した2つの独立した実験の代表的なデータを示している。

【図1c】図1cは、20 μgのスルファチドの注射に続く、IFN-γ+細胞を特定するための肝臓中のスルファチド/CD1d-テトラマー+およびテトラマー-の個体群の細胞質内染色の結果を示している。ブラケット上の数値は、PBSまたはスルファチドを注射されたマウスにおける%陽性細胞を示している。

10

【図1d】図1dは、Con Aのみ（上段）またはCon A+ウシ脳スルファチドスルファチド（下段）での処置の12～96時間後にマウスから採取された、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）で染色された代表的な肝臓切片の顕微鏡写真（×200）を示している。左下は、スルファチドのみを注射されたコントロールマウスからのH&E染色肝臓切片の代表的な顕微鏡写真を示している。

【図1e】図1eは、Con A（塗りつぶした記号）またはCon A+スルファチド（白抜きの記号）の注射後の異なる時点におけるIL-12p40+/+マウス中のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）レベルおよびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）レベルを描写するグラフを示している。値は、1群5匹のマウスの平均±SDである。P<0.001。

20

【図2a】図2aは、シャム手術（sham surgery）または虚血再灌流傷害（IRI）に供された野生型（WT）マウス、Jα18-/-変異マウスおよびスルファチド処置WTマウスの頭側肝小葉（cephalad liver lobe）から単離された、Gr-1/CD11b発現細胞のフロープロットを示している。囲みは、図2bにおいて分析されたGr-1^{high}個体群およびGr-1^{int}個体群を示している。囲みのすぐそばの数値は、肝臓白血球中のパーセント陽性細胞を示す。

【図2b】図2bは、フローサイトメトリー分析をまとめた棒グラフを示している。左パネルは、%を描写しており、右パネルは、Gr-1^{high}個体群およびGr-1^{int}個体群の絶対数を描写している。値は、平均±SEMである。*p<0.005。

30

【図2c】図2cは、IRIマウス、シャムマウスおよびスルファチド処置IRIマウスの肝臓中の%IFN-γ+αGalCer/CD1d-テトラマー+細胞を描写するグラフを示している。値は、平均±SEMである。p<0.01。

【図3】図3は、I型およびII型NK T細胞活性のスルファチド介入のモデルを描写している。このモデルによれば、スルファチドがII型NK T細胞の活性化を促進し、延いてはこれが、I型NK T細胞を不活性化する。I型NK T細胞の阻害は、IFN-γ分泌の阻害により実証され、骨髓細胞、顆粒球の肝臓動員の減少を結果としてもたらし、その結果として肝細胞および内皮細胞傷害の減少をもたらす。

【図4】図4は、90分間の肝虚血、それに続く24時間の再灌流に供されたマウス（IRI）（上段）およびシャム手術に供されたマウス（シャム）（下段）の頭側肝小葉からのH&E染色組織の100×倍率での代表的な顕微鏡写真を示している。これらのパネルは、左から右に、非処置WTマウス、非処置Jα18-/-マウス、スルファチド処置WTマウス、およびスルファチド処置Jα18-/-マウスからの組織を示している。

40

【図5】図5は、5%エタノールを含有する液体Lieber-DeCarli食餌または同様のカロリー数含有するコントロール食餌の5週間の給餌に続く、雄BL/6WTマウスまたはJα18-/-マウスの群（各4匹）から単離された肝臓MNCのフローサイトメトリー分析をまとめたグラフを示している。P値<0.005。活性化されたI型NK T細胞およびCD11b+Gr-1+骨髓細胞の蓄積は、WTマウスの肝臓においては観察されたが、Jα18-/-マウスの肝臓においては観察されなかった。

50

【図6】図6は、20マイクログラム／マウスのスルファチド（1日目および10日目）（横線で陰影が付けられた棒（スルファチド））、0.3ミリグラム／動物のATRA（6日目～10日目）（縦線で陰影が付けられた棒（atRA））またはビヒクル／DMSO（無地の陰影が付けられた棒（EtOH））を注射（i.p.）され、アルコールを含有するLieber-DeCarli液体食餌を給餌されたWT（B6）マウスおよびJα18-/-マウスにおける血清ALTレベルを描写する棒グラフを示している。コントロール群（陰影が付けられていない棒）には、等カロリーのコントロール食餌が給餌された。P値<0.05。

【図7】図7は、ビヒクル／DMSO、スルファチドおよびATRAで処置されたマウスから、慢性的+過エタノール給餌に続いて採取された肝組織の代表的な顕微鏡写真（×200）を示している。ビヒクル／DMSOマウスからの肝組織は、肝脂肪性肝炎（hepatic steatohepatitis）（脂肪肝疾患）の徴候を示しているが、スルファチドおよびATRAで処置されたマウスから得られた肝組織は、比較的正常であるように見える。

10

【図8a】図8aは、αGalCerのみ、ATRAのみ、または増加していくレベルのATRAを含むαGalCerにおいてインキュベートされた、新たに単離されたI型NKT脾細胞の増殖（ $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込みにより測定された場合）を描写する棒グラフを示している。

【図8b】図8bは、αGalCerのみまたはαGalCerおよび増加していくATRAレベルに応答したI型NKT細胞（Hy1.2）によるIL-2サイトカイン分泌のレベルを描写するグラフを示している。

20

【図8c】図8cは、DMSOまたはATRAを注射されたマウスから採取され、インビトロでαGalCerと共にインキュベートされた肝臓I型NKT細胞によるIFN-γ、IL-4、IL-13、IL-6、IL-10およびIL-12サイトカイン分泌のレベルを描写するグラフを示している。示されたデータは、2つの別個の実験を代表している。

【図9a】図9aは、慢性的給餌（液体Lieber-DeCarli食餌中5%のエタノールを10日）または慢性的+過給餌（10日間の液体食餌の慢性的給餌、それに続く5g/kgのエタノールの単回強制飼養）に続く、雄BL/6およびJα18-/-マウスから採取されたH&E染色肝組織の代表的な顕微鏡写真（×200）を示している。

30

【図9b】図9bは、コントロールまたはエタノール給餌された雄BL/6またはJα18-/-マウスにおける、慢性的給餌または慢性的+過給餌に続く、血清ALTレベルを描写するグラフを示している。

【図10】図10は、ナイーブB10.PL Vβ8.2TCRトランスジェニックマウスから単離された、MBPAc1-9のみまたはMBPAc1-9および段階的濃度のATRA（0.15、1.2、18.8 μg/ml）による刺激に応答した新たに単離されたミエリン塩基性タンパク質MBPAc1-9反応性CD4+T細胞の増殖（ $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込みにより測定された場合）を描写する棒グラフを示している。

【図11】図11は、段階的濃度の脂質抗原αGalCerおよび0、5、または10 μg/mlのATRAと共に、インビトロで24時間にわたり培養されたI型NKT細胞（Hy1.2）により分泌されたIL-2のレベルを描写するグラフを示している。

40

【図12】図12は、αGalCerおよび段階的濃度のATRA、RARαのアゴニスト（AM580）、RARβ2のアゴニスト（AC55649）またはRARγのアゴニスト（CD1530）の存在下において培養された、新たに単離されたI型NKT脾細胞の増殖（ $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込みにより測定された場合）を描写するグラフを示している。

【図13】図13は、αGalCerおよび段階的濃度のPPAR-γのアゴニスト（ロシグリタゾン）またはPPAR-γのアнтаゴニスト（GW9662）の存在下において培養された、新たに単離されたI型NKT脾細胞の増殖（ $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込みにより測定された場合）を描写するグラフを示している。

50

【図14】図14は、 α GalCerおよび段階的濃度のATRA、異なるレチノイン酸アナログ、レチノールまたはビタミンAの存在下において培養された、新たに単離されたI型NK T脾細胞の増殖（ $[^3\text{H}]$ ーチミジン取り込みにより測定された場合）を描写するグラフを示している。

【図15】図15は、最適濃度の α GalCer（10ng/ml）および最適濃度のATRA、トレチノイン、RAR α のアゴニスト（AM580）、RAR β 2のアゴニスト（AC55649）またはRAR γ のアゴニスト（CD1530）の存在下において培養された、新たに単離されたI型NK T脾細胞（左）またはI型NK T細胞ハイブリドーマ（1.2Hyb）の増殖（ $[^3\text{H}]$ ーチミジン取り込みにより測定された場合）を描写する棒グラフを示している。これらのグラフは、3つの独立した実験のデータを代表している。

10

【図16】図16は、増加していく濃度のATRAまたは選択的RAR γ アゴニストタザロテンの存在下において最適濃度の α GalCer（10ng/ml）と共に培養された、新たに単離された脾細胞のインビトロ増殖（上パネル）またはI型NK T細胞ハイブリドーマ（1.2Hyb）のサイトカイン放出アッセイ（下パネル）の結果を描写するグラフを示している。タザロテンは、ATRAよりも優れた、I型NK T細胞の阻害を示す。

【図17】図17は、タザロテン、ATRAまたはDMSO（コントロール）で処置されたマウスから単離され、滴定濃度の α GalCerにより刺激されたI型NK T細胞の増殖アッセイにおけるエキソピボの結果を描写するグラフを示している。

【図18】図18は、ATRA、タザロテンまたはDMSO（コントロール）を注射されたマウスの肝臓から単離され、 α GalCer/CD1d-テトラマーおよび汎抗TCR β 鎖抗体で染色された単核細胞のフローサイトメトリーによる分析結果を示している。I型NK T細胞は、囲みに示されている。ATRAまたはタザロテン投与動物と比較して、コントロールにおけるI型NK T細胞の数（囲みのすぐそばに示されている）に著しい差はなかった。

20

【発明を実施するための形態】

【0016】

肝臓は、自然免疫系の多くの特殊化した細胞（クップファー細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞および樹状細胞を含む）を含んでいる。NK T細胞は、それらはNK細胞の細胞表面レセプター（例えば、NK1.1）を共有し、さらにT細胞レセプター（TCR）を発現して、それらが脂質抗原をCD1d分子に関連して認識し、自然免疫応答を適応免疫に橋渡しすることを可能にしているという点で、独特である。NK T細胞は、組織の炎症および関連する細胞損傷に寄与する他の細胞の活性を調節する能力を有している。NK T細胞は、活性化すると、大量のIFN- γ 、IL-4、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、ならびに複数の他のサイトカインおよびケモカインを迅速に分泌する。NK T細胞はTh1およびTh2サイトカインの両方を分泌することが可能であるので、インビボでのNK T細胞活性化の結果を予測することは困難である。状況に応じて、NK T細胞活性化は、異なる免疫応答を促進または抑制する事象のカスケードの引き金となる。状況により、NK T細胞の活性化は、NK細胞、樹状細胞（DC）およびB細胞の活性化に繋がる。

30

40

【0017】

NK T細胞は、単形性MHCクラスI様分子CD1dと関連して提示される脂質抗原を認識する。CD1d拘束性NK T細胞は、I型およびII型に分類され、これらは、CD1d分子により提示される異なる脂質抗原を認識する。両方のNK T細胞サブセットが、主にNK1.1+（マウス）またはCD161+/CD56+（ヒト）であるが、それらの相対数はマウスおよびヒトにおいて異なる、すなわち、マウスにおいてはI型NK T細胞が圧倒的に多く、ヒトにおいてはII型NK T細胞サブセットが圧倒的に多い。

【0018】

不変NK T細胞としても知られるI型は、マウスにおいてはV α 14-J α 18およびV β 8.2、V β 7、もしくはV β 2、またはヒトにおいてはV α 24-J α QおよびV

50

$\beta 11$ により特徴付けられる、半不変T細胞レセプター (TCR) を発現し、海洋海綿由来の糖脂質 α -ガラクトシルセラミド (α GalCer) と強反応性であり、フローサイトメトリーにおいて α GalCer/CD1d-テトラマーにより特定される。I型NK T細胞はまた、脂質ベースの抗原 (例えば、細菌由来の脂質および自己糖脂質イソグロボトリヘキソシルセラミド ($iGb3$)) も認識する。I型NK T細胞は、記憶マーカーを呈し、そしてサイトカインの予備形成されたmRNAを貯蔵する点で独特である。J $\alpha 18$ 遺伝子のないマウス (J $\alpha 18$ マウス) は、I型NK T細胞のみを欠いている。

【0019】

II型NK T細胞は、I型NK T細胞とは異なり、いくつかの他の細胞サブセット (I型NK T細胞を含む) の活性を調節し得る調節細胞である。II型NK T細胞は、マウスおよびヒトの両方において、自己糖脂質スルファチド (3'-スルホガラクトシルセラミド) を認識する。フローサイトメトリーにおいてスルファチド/CD1d-テトラマーを用いて特定され得るII型NK T細胞の主要なサブセットは、V $\beta 8.1$ /V $\beta 3.1$ -J $\beta 2.7$ およびV $\alpha 1$ /V $\alpha 3$ -J $\alpha 7$ 遺伝子断片を主に利用し、スルファチドと反応性である。II型NK T細胞の活性化は、候補薬剤に対するII型NK T細胞のインビトロ増殖応答を評価することにより、ならびにC069発現を評価することおよびIFN- γ 、IL-4またはIL-13についての細胞内サイトカイン染色またはリアルタイムPCRによりサイトカイン分泌プロファイルを評価することにより評価され得る。さらに、活性化されたII型NK T細胞のI型NK T細胞をアネルギー化する能力は、CF8E希薄化分析および α GalCer/CO1d-テトラマー細胞の細胞内サイトカイン染色を用いて、 α GalCer (I型NK T細胞の強力な活性化剤) に対するI型NK T細胞の増殖応答を評価することにより評価され得る。

【0020】

虚血再灌流傷害およびコンカナバリンA誘導性肝炎に続く肝臓におけるI型およびII型NK T細胞活性

再灌流傷害は、虚血期間後に臓器または組織に対して血液供給が回復される時に生じる。肝再灌流傷害は、一般的に、手術または外傷に関連して生じ、肝臓移植後の移植組織の質および機能において主要な役割を果たす。虚血再灌流傷害 (IRI) の発症は、クップファー細胞活性化、反応性酸素種の放出、CD4⁺細胞動員および炎症促進性サイトカインの分泌により特色付けられる (約1~約6時間の再灌流に続く) 初期期間と、好中球蓄積および壊死の誘導により特徴付けられる (約6~約48時間の再灌流の初期段階に続く) 後期期間との、少なくとも2段階で起こる。図2aに示されるように、野生型 (WT) マウスにおいて、骨髓系前駆細胞および単球を含む骨髓 (CD11b⁺) 細胞サブセットCD11b⁺Gr-1^{int}は、虚血再灌流傷害の初期段階において、再灌流された組織中に動員される。好中球以外の骨髓細胞 (例えば、CD11b⁺Gr-1^{int}サブセット) の動員は、再灌流された組織中への炎症性単球の動員によって傷害が増強されるということを示唆している。

【0021】

I型NK T細胞もまた、虚血再灌流に続いて活性化された状態になり、IFN- γ を分泌する。図2cを参照されたい。IRIにおけるI型NK T細胞の役割を、野生型 (WT) マウスおよびI型NK T細胞はないが通常のレベルのII型NK T細胞を有するJ $\alpha 18^{-/-}$ マウスの肝臓を比較することによって評価した。図4に示されるように、90分間の虚血および24時間の再灌流に続いて、WTマウスの頭側肝小葉には大きな壊死領域があったが、I型NK T細胞欠失マウス (J $\alpha 18^{-/-}$ マウス) における壊死領域は、比較すると著しく減少した。これは、肝臓の虚血再灌流傷害をもたらすことにおいてI型NK T細胞が果たす病原的役割を示している。

【0022】

NK T-1細胞に対するスルファチド活性化NK T-2細胞の作用

参照によりその全体が本明細書に援用される米国特許第8, 044, 029号明細書および米国特許出願第12/938, 315号明細書に記載されているように、自己糖脂質

10

20

30

40

50

リガンドであるスルファチド、および合成スルファチドアナログの投与は、I型およびII型NK細胞の活性を調節する。スルファチドのCD1d依存性認識は、II型NK細胞および主に形質細胞様樹状細胞(pDC)を活性化するが、通常樹状細胞(cDC)個体群(通常はI型NK細胞により活性化される)を活性化せず、IL-12およびIP2依存的な様式での肝臓中へのI型NK細胞の迅速な動員に繋がる。しかしながら、動員されたI型NK細胞は、活性化されず、サイトカインを分泌せず、アネルギーの状態になる。

【0023】

インビボでのスルファチド投与に続く免疫調節機構に関連した細胞事象が、図1に示されている。スルファチドの投与は、a) α GalCerによる刺激に応答したI型NK細胞のインビトロ増殖を抑制し(図1b)、b)細胞質内IFN- γ 染色を伴うスルファチド/CD1d-テトラマー+細胞の割合を増加させる(図1c)。

10

【0024】

虚血再灌流傷害の初期段階の間の肝臓I型NK細胞によるIFN- γ の分泌は、スルファチドを与えられたマウスにおいて、非処置動物に比べて著しく減少する。図2cを参照されたい。さらに、 $J\alpha 18^{-/-}$ マウスにおけるI型NK細胞の不在の場合と同様に、虚血/再灌流に続く肝傷害は、スルファチドで処置されたマウスにおいて著しく減少する。図4を参照されたい。これは、肝臓の虚血再灌流傷害をもたらすことにおいてI型NK細胞が果たす病原的役割を示している。I型NK細胞によるIFN- γ 分泌の役割は、虚血臓器障害の一般的な特徴であり得る、というのは、腎臓の虚血再灌流傷害もまた、I型NK細胞がない $J\alpha 18^{-/-}$ マウスにおいて和らげられるからである。

20

【0025】

IRIと同様に、スルファチド投与は、肝細胞壊死の減少(図1d参照)、ならびに肝細胞損傷のマーカーであるアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)の血清レベルの減少(図1e参照)により示されるように、コンカナバリンA(ConA)誘導性肝炎を防ぐ。これは、ConA誘導性肝炎においてI型NK細胞が果たす病原的役割を示している。

【0026】

まとめると、IRIおよびConA誘導性肝炎の両方の肝損傷モデルからのデータは、様々な原因から生じる肝炎症においてI型NK細胞が有害な役割を果たし、スルファチド反応性II型NK細胞が保護的な役割を果たすところの、免疫調節経路と一致する。そのような保護は、I型NK細胞によるサイトカイン分泌の阻害(表現型阻害)、未熟骨髄細胞(CD11b+Gr-1+)CD11b+Gr-1-およびNK細胞の肝臓動員の著しい減少と関連する。I型NK細胞の阻害はまた、通常樹状細胞(cDC)の寛容化または調節とも関連し、それらは、阻害されたI型NK細胞と相俟って、適応性Th1/Th17CD4+/CD8+T細胞の活性化/拡大を阻害する。これは、スルファチドの投与がII型NK細胞の活性を刺激し、延いてはこれがI型NK細胞活性およびI型NK細胞媒介炎症により引き起こされる肝損傷を阻害する、モデルに繋がる。図3を参照されたい。

30

【0027】

アルコール性肝疾患におけるNK細胞の役割

アルコール性肝疾患(ALD)は、過剰のアルコール消費により引き起こされる肝細胞への損傷の結果として発症する。複数の傷害が、ALDの臨床的発現が観察されるまでに必要とされ得る。しかしながら、本明細書に記載されるように、慢性的アルコール消費に続いて、肝臓において、著しく増加した数のI型NK細胞(α GalCer/CD1d-テトラマー+細胞)、CD4+細胞、およびCD11b+Gr-1+骨髄細胞が観察されるが、そのようなII型NK細胞またはCD11b+Gr-1-細胞は観察されない。実施例6および図5を参照されたい。さらに、CD69マーカーの増強された発現が、I型NK細胞が部分的に活性化されていることを示す。したがって、疾患のあらゆる臨床徴候の不在下(前臨床期)においてでさえ、炎症応答を媒介する細胞が、過剰のアルコ

40

50

ール消費に続いて肝臓中に蓄積する。I型NK T細胞の不在下（J α 18-/-マウス）において、慢性的アルコール消費に続く肝臓へのCD11b+Gr-1+骨髄細胞の蓄積は、著しく減少する。実施例6および図5を参照されたい。これらのデータは、I型NK T細胞が、ALDの前臨床期をもたらすことに関与していることを示唆している。

【0028】

ALDの前臨床期においてI型NK T細胞が果たす役割を示唆するデータと一致して、過度のアルコール消費に続く肝臓の臨床的発現は、例えば組織学および肝臓酵素分析により測定される場合、I型NK T細胞欠失（J α 18-/-）マウスにおいて著しく減少する。実施例6ならびに図6および7を参照されたい。これらのデータは、I型NK T細胞が、肝臓へのアルコール性損傷において重要な役割を果たすということを示唆している。

10

【0029】

NK T細胞は、それが脂質抗原をCD1d分子に関連して認識することを可能にするT細胞レセプターを発現する。特定の理論に拘束されることを望むものではないが、I型NK T細胞は、エタノール消費に続いて、CD1dを発現する抗原提示細胞（APC）による酸化された自己脂質の局所的提示により、肝臓において活性化される。活性化されたI型NK T細胞は、次いで、クップファー細胞活性化、顆粒球の動員／活性化、それに続く肝細胞への炎症性損傷を結果としてもたらす多段階プロセスを開始する。

【0030】

アルコール消費に続くNK T細胞亜型間の相互作用が、肝臓の引き金になり、重度の場合は、アルコール性肝疾患（ALD）の引き金になる。本明細書に記載されるいくつかの実施形態は、アルコール消費に続く肝臓への傷害を処置、軽減または予防するために、I型NK T細胞およびII型NK T細胞の相対する役割ならびに他の肝細胞とのそれらの相互作用を操作するための方法および組成物に関する。

20

【0031】

本明細書に記載されるいくつかの実施形態は、肝臓へのアルコール誘導性傷害を処置、緩和または予防するために、NK T細胞亜型の活性を調節することに関する。本明細書に記載されるように、スルファチドまたはレチノイン酸レセプター（RAR）アゴニストの投与は、アルコール誘導性肝臓を阻害する。例えば、慢性的アルコール消費の間およびエタノール痛飲の前のスルファチドまたはレチノイン酸レセプター（RAR）アゴニストである全トランス型レチノイン酸（ATRA）の注射は、組織学的調査および血清中の肝臓酵素レベルの分析により示されるように、保護効果を有していた。実施例7ならびに図6および7を参照されたい。

30

【0032】

いくつかの実施形態は、スルファチドに反応性のII型NK T細胞の主要なサブセットがアルコール誘導性肝臓において果たす保護的な役割に関する。スルファチドによるこのNK T細胞サブセットの活性化は、過剰のアルコール消費に続くI型NK T細胞媒介傷害を阻害する。スルファチド媒介保護は、II型NK T細胞の活性化ならびに肝臓I型NK T細胞によるIFN- γ 分泌の阻害ならびに肝臓中への骨髄細胞（例えば、CD11b+Gr-1^{int}およびGr-1^{int}サブセット）およびNK細胞のI型NK T細胞媒介動員の抑制と関連する。

40

【0033】

スルファチド処置は、過剰のアルコール消費に続く肝臓からのほぼ完全な保護を結果としてもたらす。図6および7を参照されたい。特定の理論に拘束されることを望むものではないが、スルファチドの保護効果は、I型NK T細胞およびcDCに対する阻害効果を発揮するII型NK T細胞の直接的な活性化を通じて媒介される。

【0034】

2人の健康なドナーの末梢血リンパ球（PBL）からのT細胞株を、 α GalCerまたはスルファチドのいずれかでのインビトロ刺激に続いて生じさせ、フローサイトメトリーにより分析した。この細胞株において、2サイクルの刺激に続いて、約2%のT細胞株

50

が、スルファチド／hCD1d-テトラマーで染まる。マウス系と同様、これらの細胞は、不変Vα24-Vα11 TCRを用いない。これらのデータは、健康な個体におけるスルファチド反応性II型NKT細胞の存在を示しており、アルコール性肝疾患におけるヒトII型NKT細胞の特徴付けにおけるスルファチド／ヒトCD1d-テトラマーの使用の有効性を示している。

【0035】

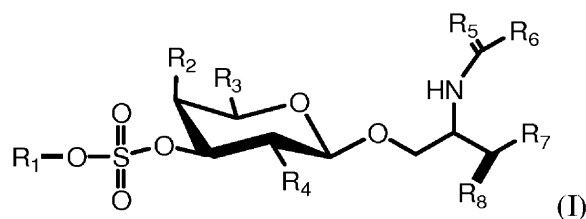
一部の実施形態において、スルファチドは、例えば、Sigma Inc. (Chicago, IL, USA) から入手される約20種の異なる種類の混合物であるウシ脳由来スルファチドであり得る。他の実施形態において、スルファチドは半合成であり、単一種のスルファチド、例えば、Maitreya Inc (Pleasant Gap, PA, USA) から入手されるcis-テトラコセノイルスルファチドまたはリゾスルファチドである。さらに他の実施形態において、スルファチドは、完全に合成のスルファチドであり得る。

【0036】

ウシ脳ミエリン由来のスルファチドは、飽和／不飽和主アシル鎖(C₂₄)の2:1混合物からなり、不飽和はC₁₉にある。いくつかの実施形態は、合成スルファチドアナログ(例えば、飽和アシル鎖(C₂₄)および不飽和鎖(C₂₄:1)を有するアナログ、ならびに脂肪酸またはスフィンゴシン部分において異なる長さのアシル鎖(より短いおよびより長い、例えば、C₁₈、C₃₂)で構成されているアナログ、およびガラクトース部分上に3'か4'-の硫酸化基(3'-803か4'-803)を有する位置異性体の使用に関する。

【0037】

一部の実施形態において、スルファチドは、以下の化学式I:



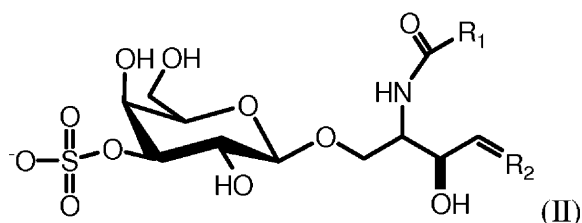
を有する。

【0038】

式中、R₁は、結合、水素、C₁~C₃₀アルキル、C₁~C₃₀置換アルキル、C₁~C₃₀アルケニル、C₁~C₃₀置換アルケニルまたはC₅~C₁₂糖であり得；R₂は、水素、ヒドロキシ基、メトキシ基、またはアルコキシ基であり得；R₃は、水素、ヒドロキシ基、メトキシ基、エトキシ基、またはアルコキシ基であり得；R₄は、水素、ヒドロキシ基またはアルコキシ基であり得；R₅は、水素、ヒドロキシ基、カルボニル、アルコキシ基または結合であり得；R₆は、C₁~C₄₀アルキル、C₁~C₄₀置換アルキル、C₁~C₄₀アルケニル、C₁~C₄₀置換アルケニル、またはC₁~C₄₀アルキニル(alkynyl)であり得；R₇は、C₁~C₄₀アルキル、C₁~C₄₀置換アルキル、C₁~C₄₀アルケニル、C₁~C₄₀置換アルケニル、またはC₁~C₄₀アルキニル(alkynyl)であり得；そしてR₈は、水素、ヒドロキシ基、カルボニル、アルコキシ基または結合であり得る。

【0039】

他の実施形態において、スルファチドは、以下の化学式II:



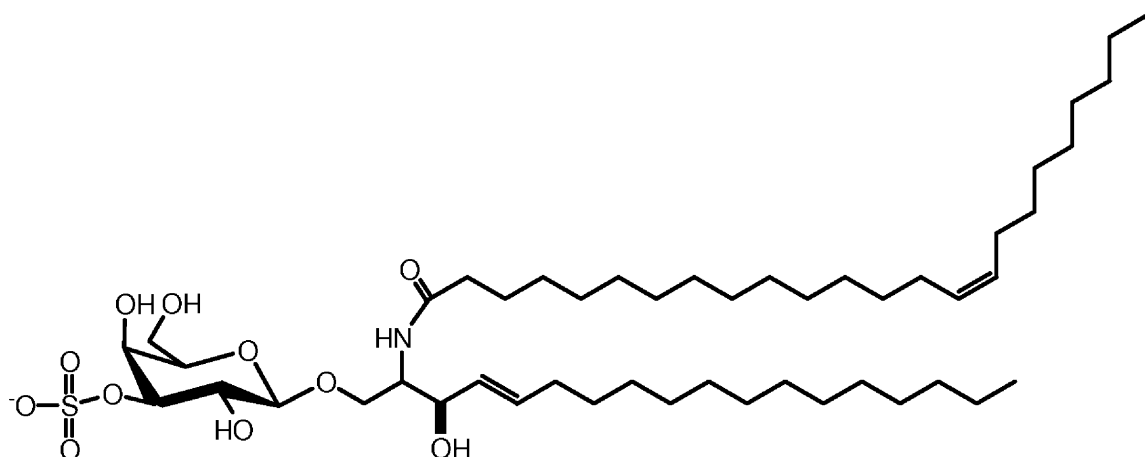
を有する。

【0040】

式中、 R_1 は、 $C_1 \sim C_{40}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ アルケニル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルケニルおよび $C_1 \sim C_{40}$ アルキニル (alkynyl) からなる群から選択され；そして R_2 は、水素、ヒドロキシル基、カルボニル、アルコキシ基および結合からなる群から選択される。

【0041】

別の実施形態において、スルファチドは、以下の化学構造：



を有する。

【0042】

本明細書で使用される場合、用語「アルキル」とは、任意の非分枝または分枝の飽和炭化水素を意味する。用語「置換アルキル」とは、任意の非分枝または分枝の置換飽和炭化水素を意味する。環式化合物、すなわち、環式炭化水素およびヘテロ原子を有する環式化合物の両方は、「アルキル」の意味の範囲内である。

【0043】

本明細書で使用される場合、用語「置換」とは、官能基での水素原子の任意の置換を意味する。

【0044】

本明細書で使用される場合、用語「官能基」は、その一般的な定義を有し、ハロゲン原子、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、過ハロゲン化アルキル、シロアルキル (silyl)、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ベンジル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、シアノ、およびニトロからなる群から好ましくは選択される化学部分をいう。

【0045】

本明細書で使用される場合、用語「ハロゲン」および「ハロゲン原子」は、元素の周期表の第 17 列の放射安定性原子のうちの任意の 1 つ、好ましくはフッ素、塩素、臭素、またはヨウ素をいい、フッ素および塩素が特に好ましい。

【0046】

本明細書で使用される場合、用語「アルケニル」とは、任意の非分枝または分枝の、置換または非置換の、不飽和炭化水素を意味する。用語「置換アルケニル」とは、1 個以上

の官能基で置換されている、任意の非分枝または分枝の、置換不飽和炭化水素を意味し、非分枝 $C_2 \sim C_6$ アルケニル第2級アミン、置換 $C_2 \sim C_6$ 第2級アルケニルアミン、および非分枝 $C_2 \sim C_6$ アルケニル第3級アミンは、「置換アルキル」の定義の範囲内である。環式化合物、すなわち、不飽和環式炭化水素およびヘテロ原子を有する環式化合物の両方は、「アルケニル」の意味の範囲内である。

【0047】

本明細書で使用される場合、用語「アルコキシ」は、任意の非分枝または分枝の、置換または非置換の、飽和または不飽和の、エーテルをいう。

【0048】

本明細書で使用される場合、用語「スルファチド」は、その一般的な慣例の意味を保持し、分子の糖部分中に1個以上のスルフェート基を含有するセレブロシド硫酸エステルをいう。

10

【0049】

本明細書で使用される場合、用語「セレブロシド」は、糖を含有する任意の脂質化合物であって、概して、脳および神経組織において通常見られる種類のものをいう。

【0050】

式(I)、(II)および(III)の化合物は、その薬学的に受容可能な無毒の塩の形態にあり得る。式(I)、(II)および(III)の塩としては、酸付加塩、例えば、無機酸(例えば、塩酸、硫酸、硝酸およびリン酸)または有機酸(例えば、酢酸、プロピオン酸、マレイン酸、オレイン酸、パルミチン酸、クエン酸、コハク酸、酒石酸、フマル酸、グルタミン酸、パントテン酸、ラウリルスルホン酸、メタンスルホン酸およびフタル酸)との塩が挙げられる。

20

【0051】

式(I)、(II)および(III)の化合物は、その溶媒和物(例えば、水和物)の形態にあり得る。

【0052】

式(I)、(II)および(III)の化合物は、スルファチドを合成するための目的にかなう任意の方法により製造され得る。

【0053】

式(I)、(II)および(III)の化合物はまた、天然物(例えば、生物有機体)から単離され、カラムクロマトグラフィーなどにより精製され得る。

30

【0054】

1つの実施形態において、スルファチドは、化学式： $(2S, 3R, 4E) - N$ -ネルボニック(nervonic)-1-[$-D-(3$ -スルフェート)-ガラクトピラノシル]-2-アミノ-オクタデセン-3-オールを有する。この化学式はまた、cis-トラコセノイルスルファチドとも称される。

【0055】

一部の実施形態において、患者に投与されるスルファチドの具体的な量は、処置される疾患または状態、ならびに処置される患者の年齢、体重および性別によって異なる。一般的に、そのような最終濃度を例えば腸または血液において達成するためには、本実施形態の単回投与量組成物中のスルファチド分子の量は、概して、約0.1ミリグラム~約100ミリグラム、好ましくは約2.0ミリグラム~約60ミリグラム、より好ましくは約20ミリグラム~約50ミリグラムである。同様に、本実施形態の単回経口投与量組成物中の第2の治療化合物の量は、概して、約0.01ミリグラム~約1000ミリグラム、より好ましくは約0.1ミリグラム~約100ミリグラムの範囲内である。当然、正確な投与量は、処置される疾患または障害によって異なるが、好ましい範囲は、容易に決定できる。

40

【0056】

1つの実施形態において、0.1~10mg/kg体重のスルファチドが、患者に投与される。より好ましくは、1~10mg/kg体重のスルファチドが投与される。好まし

50

くは、この投薬は、必要に応じて毎日繰り返される。

【0057】

NK T細胞活性に対するレチノイン酸レセプター（RAR）アゴニストの作用

本明細書に記載されるように、レチノイン酸レセプター（RAR）アゴニストである全トランス型レチノイン酸（ATRA）の投与は、アルコール消費により引き起こされる肝損傷を著しく阻害する。エタノール摂取は、肝臓レチニルエステルを枯渇させ、かつ、多くの生物学的機能を支持しかつFoxP3+TregへのナイーブCD4+T細胞分化の発生、安定性および機能をIL-6の存在下においても高め得るビタミンAの生物学的に活性な形態である全トランス型レチノイン酸（ATRA）の生理学的レベルを変化させる。本明細書に記載されるいくつかの実施形態は、ATRAがI型NK T細胞のエフェクター機能を阻害する（これらの細胞によるサイトカイン分泌を抑制することを含む）という発見に関する。実施例8、9および11ならびに図8、10および11を参照されたい。さらに、ATRAは、I型NK T細胞活性に対する直接的な阻害効果を有し、抗原提示細胞の不在下においてその阻害効果を発揮する。実施例11、図11を参照されたい。さらに、ATRAは、タンパク質抗原（例えば、骨髄塩基性タンパク質またはMBPAc1-9）を認識する通常MHC拘束性CD4+T細胞の活性を直接的には阻害しない。特定の理論に拘束されることを望むものではないが、これらのデータは、ATRAが、I型NK T細胞を阻害することによって過度のアルコール消費により引き起こされる肝損傷を防ぐことを示している。

10

【0058】

本明細書に記載されるように、RARアゴニストは、I型NK T細胞における阻害を誘導する。図12、14および15～17を参照されたい。さらに、過剰のアルコール消費の結果としてもたらされるI型NK T細胞媒介炎症により引き起こされる肝損傷が、RARアゴニストの投与により予防、減少または緩和され得る。肝臓は、様々な異なる理由から、炎症を起こした状態になり得る。例えば、肝炎症は、細菌またはウイルス感染、傷害、または自己の免疫系からの攻撃により引き起こされ得る。炎症は、通常は保護的な応答であり、治癒過程の必須段階であるが、長期のまたは慢性的な炎症は、傷害を引き起こし得る。本明細書に記載されるいくつかの実施形態は、炎症に続く、関連する、または起因する肝傷害に繋がる自然免疫機構のRARアゴニスト媒介調節に関する。一部の実施形態は、I型NK T細胞活性のRARアゴニスト媒介阻害のための方法および組成物であって、非自己識別される病原体に対する自然免疫応答に影響を与えることなくまたはほとんど影響を与えずに、消化管由来または代謝産物由来の抗原に対する寛容性を提供するように自然免疫系成分間の相互作用を調節する方法および組成物に関する。

20

30

【0059】

RARアゴニストはI型NK T細胞を直接アネルギー化し得るので、RARアゴニストは、I型NK T細胞が病原的役割を果たすあらゆる適応症を処置するために使用され得る。本開示の実施形態により処置され得る疾患の一部の例としては、アルコール誘導性肝炎、非アルコール性脂肪症肝炎（non-alcoholic steatosis hepatitis）、肝硬変、劇症肝硬変、突発性肝炎、ウイルス誘発性肝炎（A型、B型、C型およびその他）、肝胆管癌種と関連する炎症性肝炎、多発性硬化症、1型糖尿病、虚血再灌流傷害、固形臓器移植、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、筋萎縮性側索硬化症、および炎症性腸疾患（クローン病および大腸炎）が挙げられる。

40

【0060】

一部の実施形態において、自己免疫または免疫関連の疾患または障害の様々な適応症が、I型NK T細胞活性のRARアゴニスト媒介阻害により処置、予防または緩和される。特に、本実施形態の1つの態様は、自己免疫または免疫関連の疾患または障害（例えば、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、AIDS、アルツハイマー病、関節リウマチ、インスリン依存性真性糖尿病、自己免疫性肝炎、喘息、およびセリアック病など）の症状を患っている患者を、有効量のRARアゴニストで処置する方法に関連する。一部の実施形態において、I型NK T細胞活性のRARアゴニスト媒介阻害は、喘息症状を処置、予

50

防または緩和する。

【0061】

一部の実施形態は、虚血再灌流に続く I 型 NK T 細胞媒介炎症を、RAR アゴニストを投与することによって阻害または予防する方法に関する。I 型 NK T 細胞は、虚血および再灌流傷害などの状態において病原的役割を果たす。再灌流傷害は、種々の組織において、虚血期間後に血液供給が回復される時に生じ得る。例としては、圧挫後の骨格筋組織、心筋梗塞もしくは心臓手術または虚血性心疾患に関連した心筋、脳卒中または脳外傷に関連した神経組織、ならびに手術または外傷に関連した肝組織および腎組織が挙げられる。虚血再灌流傷害はまた、臓器移植における移植組織の質および機能において主要な役割を果たす。虚血再灌流傷害は、入院期間の増加および長期移植片生着の減少の主な原因である。一部の実施形態において、I 型 NK T 細胞活性の RAR アゴニスト媒介阻害は、手術または外傷に関連した肝虚血再灌流傷害を阻害または予防する。

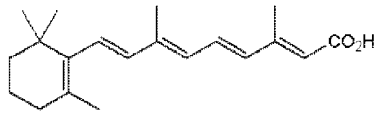
【0062】

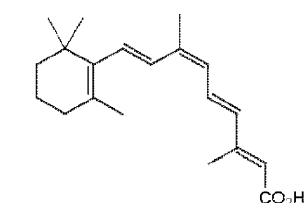
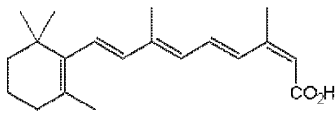
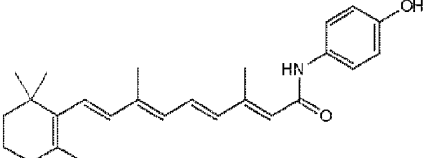
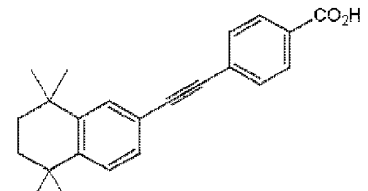
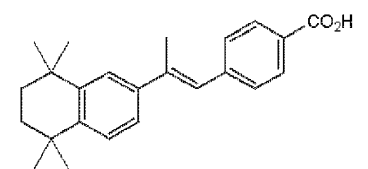
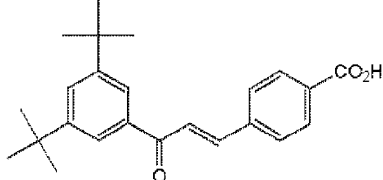
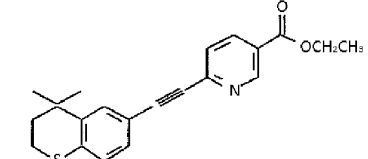
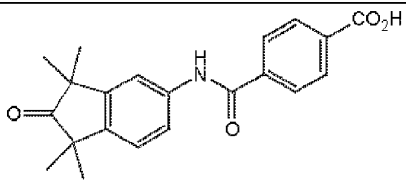
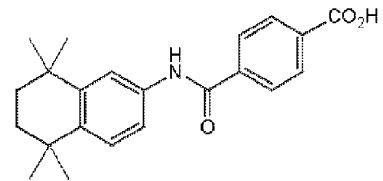
本明細書に記載される実施形態は、1 種以上のレチノイン酸レセプター (RAR) アゴニストによる I 型 NK T 細胞活性の阻害に関する。レチノイン酸レセプターは、RAR α 、RAR β 、および RAR γ という 3 つの主要な亜型を含む。一部の実施形態は、1 種以上の汎活性 RAR アゴニスト、そのような汎活性 RAR アゴニストの前駆体およびそれらの混合物による I 型 NK T 細胞活性の阻害に関する。本明細書で使用される場合、用語「汎活性 (pan-active) RAR アゴニスト」は、RAR α 、RAR β 、および RAR γ に実質的に等しくまたは非選択的に影響を与える (例えば、活性化する) RAR アゴニストをいう。一部の実施形態は、RAR α に比べて RAR β および RAR γ の少なくとも一方、好ましくは両方に、選択的にまたはさらには特異的に影響を与える (例えば、活性化する) のに有効な、1 種以上の活性 RAR アゴニスト、そのような活性 RAR アゴニストの前駆体およびそれらの混合物による I 型 NK T 細胞活性の阻害に関する。この文脈において使用される場合、用語「選択的に」とは、RAR アゴニスト、RAR アゴニストの前駆体およびそれらの混合物が、RAR α に比べて RAR β および RAR γ の少なくとも一方、好ましくは両方に影響を与えるのにより有効、好ましくは少なくとも約 10 倍または約 100 倍～約 1000 倍またはそれ以上有効であることを意味する。一部の実施形態は、1 種以上の亜型選択的 RAR アゴニスト、そのような亜型選択的 RAR アゴニストの前駆体およびそれらの混合物による I 型 NK T 細胞活性の阻害に関する。本明細書で

【0063】

いくつかの実施形態は、1 種以上のレチノイン酸レセプター (RAR) アゴニストを投与することにより炎症促進性 I 型 NK T 細胞活性を阻害する方法に関する。RAR アゴニストの例としては、表 1 に列挙される RAR アゴニストが挙げられるが、これらに限定されない。

表 1: RAR アゴニスト

化合物名	特異性	構造
トレチノイン	汎 RAR アゴニスト	

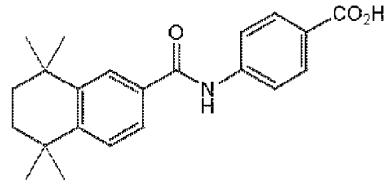
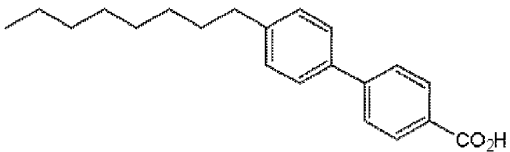
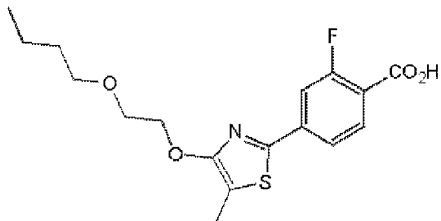
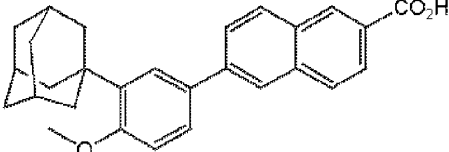
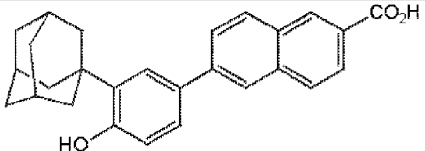
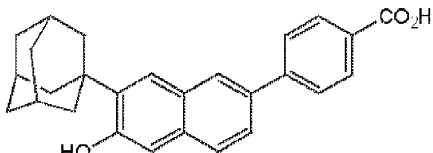
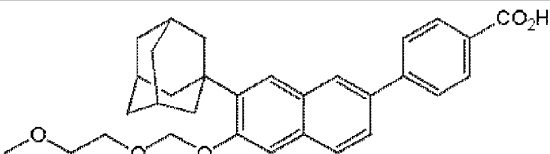
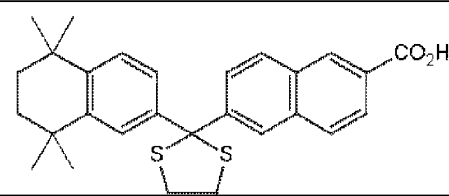
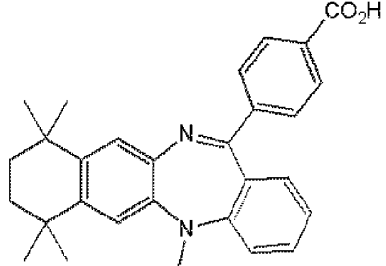
9-cis RA	汎 RAR および RXR アゴニスト	
13-cis-RA	汎 RAR アゴニスト	
フェンレチニド	RAR アゴニスト RAR 非依存性効果	
EC 23	汎 RAR アゴニスト	
TTNPB	汎 RAR アゴニスト	
Ch 55	汎 RAR アゴニスト	
タザロテン	RARβ/γ アゴニスト	
BMS 753	RARα アゴニスト	
AM80	RARα アゴニスト	

10

20

30

40

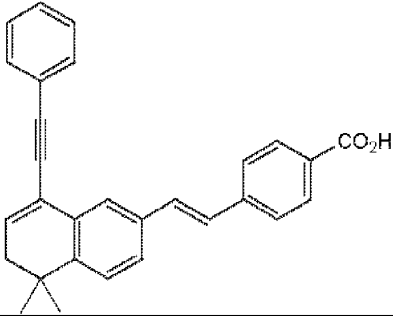
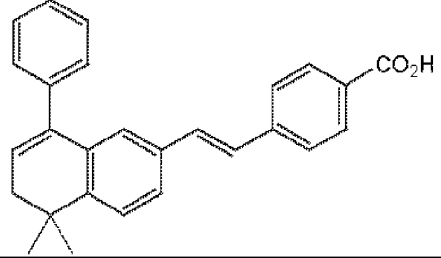
AM580	RAR α アゴニスト	
AC55649	RAR β 2 アゴニスト	
AC261066	RAR β 2 アゴニスト	
アダパレン	RAR β および γ アゴニスト	
CD437	RAR γ アゴニスト	
CD1530	RAR γ アゴニスト	
CD2665	RAR γ アゴニスト	
MM11253	RAR アゴニスト	
LE135	RAR β アゴニスト	

10

20

30

40

BMS493	汎 RAR インバーサゴニスト	
BMS453	RAR β アゴニスト RAR α または RAR γ アンタゴニスト	

10

【0064】

いくつかの実施形態において、炎症促進性 I 型 NK T 細胞活性は、ATRA、レチノール、9-*cis*-RA もしくは 13-*cis*-RA、トレチノイン、AM580、AC55649、CD1530 または タザロテン からなる群から選択される 1 種以上の RAR アゴニストにより阻害される。いくつかの実施形態において、炎症促進性 I 型 NK T 細胞活性は、1 種以上のポリオレフィン性レチノイド（例えば、イソレチノインおよびアシトレチン）により阻害される。一部の実施形態において、炎症促進性 I 型 NK T 細胞活性は、エトレチナート、アシトレチンおよびイソトレチノインからなる群から選択される 1 種以上の RAR アゴニストにより阻害される。

20

【0065】

いくつかの実施形態は、タザロテン、タザロテン酸またはそれらの混合物による炎症促進性 I 型 NK T 細胞活性の阻害に関する。タザロテンは、対応する遊離酸であるタザロテン酸へと代謝されるエチルエステルプロドラッグである。タザロテンは、レチノイン酸レセプター（RAR）の天然リガンドである全トランス型レチノイン酸に比べて限られた構造的柔軟性を提供する、硬い、環固定（ring-locked）構造を有している。こうした構造変化が、RAR に対する特異性ならびに RAR β および RAR γ に対する選択性を有するタザロテン酸をもたらす。

30

【0066】

RAR アゴニストの例としてはさらに、*cis*-および *trans*-レチノイン酸のエステル、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ヘキシル、ヘプチル、エチルヘキシル、オクチル、ノニル、ラウリル、オレイル、ステアリル、ヒドロキシエチル、ヒドロキシプロピル、ベンジル、 α -メチルベンジル、 α -プロピルフェニル、アミル、イソアミル、アニシル、セチル、メンチル、シンナミル、ピナコール、フリル、またはミリスチルを含む（しかしこれらに限定されない）第 1 級、第 2 級または第 3 級アルコールなどのアルキルエステルが挙げられる。

40

【0067】

RAR アゴニストの薬学的に受容可能な塩もまた、I 型 NK T 細胞活性を阻害するために使用され得る。本明細書に開示される化合物は、十分に酸性、十分に塩基性、またはその両方の官能基を有しており、したがって、多くの有機または無機塩基、ならびに無機および有機酸のうちの任意のものと反応して塩を形成し得る。

【0068】

塩基性基を有する RAR アゴニストから酸付加塩を形成するために使用され得る酸の例としては、無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、リン酸など）およ

50

び有機酸（例えば、p-トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、シュウ酸、p-ブロモフェニルースルホン酸、炭酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、酢酸など）が挙げられる。そのような塩の例としては、硫酸塩、ピロ硫酸塩、重硫酸塩、亜硫酸塩、重亜硫酸塩、リン酸塩、一水素リン酸塩、二水素リン酸塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、酢酸塩、プロピオン酸塩、デカン酸塩、カプリル酸塩、アクリル酸塩、ギ酸塩、イソ酪酸塩、カプロン酸塩、ヘプタン酸塩、プロピオール酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、スベリン酸塩、セバシン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、ブチン-1, 4-二酸塩、ヘキシン-1, 6-二酸塩、安息香酸塩、クロロ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、フタル酸塩、スルホン酸塩、キシレンスルホン酸塩、フェニル酢酸塩、フェニルプロピオン酸塩、フェニル酪酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、γ-ヒドロキシ酪酸塩、グリコール酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、プロパンスルホン酸塩、ナフタレン-1-スルホン酸塩、ナフタレン-2-スルホン酸塩、マンデル酸塩などが挙げられる。

10

【0069】

酸性基を有するRARアゴニストからの塩基付加塩を形成するために使用され得る塩基の例としては、アルカリ金属（例えば、ナトリウム、カリウム、およびリチウム）の水酸化物；アルカリ土類金属（例えば、カルシウムおよびマグネシウム）の水酸化物；他の金属（例えば、アルミニウムおよび亜鉛）の水酸化物；アンモニア、および有機アミン（例えば、非置換またはヒドロキシ置換のモノ、ジ、またはトリアルキルアミン；ジシクロヘキシルアミン；トリブチルアミン；ピリジン；N-メチル、N-エチルアミン；ジエチルアミン；トリエチルアミン；モノ-、ビス-、もしくはトリス-（2-ヒドロキシ-低級アルキルアミン）（例えば、モノ-、ビス-、もしくはトリス-（2-ヒドロキシエチル）アミン）、2-ヒドロキシ-tert-ブチルアミン、またはトリス-（ヒドロキシメチル）メチルアミン、N,N-ジ-低級アルキル-N-（ヒドロキシ低級アルキル）-アミン（例えば、N,N-ジメチル-N-（2-ヒドロキシエチル）アミン）、またはトリ-（2-ヒドロキシエチル）アミン；N-メチル-D-グルカミン；ならびにアミノ酸（例えば、アルギニン、リジン））などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0070】

本明細書で使用される場合、用語「患者」は、治療的処置のレシピエントをいい、動物界内の全ての生物体を含む。好ましい実施形態において、動物は、哺乳動物（例えば、ヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、バッファロー、イヌ、ヤギ、ウマ、ロバ、シカおよび霊長類）の科の範囲内にある。最も好ましい動物は、ヒトである。

30

【0071】

本明細書で使用される場合、用語「処置する」、「処置すること」および「処置」は、それぞれ「予防する」、「予防すること」および「予防」を含む。

【0072】

本明細書で使用される場合、薬剤の「有効量」という用語は、炎症促進性I型NK細胞活性の結果としてもたらされる肝損傷を処置、阻害、または予防するのに十分な量である。

【0073】

一部の実施形態は、ALDの臨床的発現に先立つスルファチドおよび／またはRARアゴニストでの患者の前処置に関する。いくつかの実施形態において、患者は、過アルコール消費に先立って有効量のスルファチドおよび／またはRARアゴニストで処置される。一部の他の実施形態において、患者は、過アルコール消費の約0.5時間～約18時間前に、有効量のスルファチドおよび／またはRARアゴニストで処置される。一部の他の実施形態において、患者は、慢性的なアルコール消費の期間の間、有効量のスルファチドおよび／またはRARアゴニストで処置される。

40

【0074】

一部の実施形態において、患者に投与されるRARアゴニストの具体的な量は、処置される疾患または状態、ならびに処置される患者の年齢、体重および性別によって異なる。

50

一般的に、そのような最終濃度を例えば腸または血液において達成するためには、本実施形態の単回投与量組成物中のRARアゴニストの量は、概して、約0.1ミリグラム～約100ミリグラム、好ましくは約2.0ミリグラム～約60ミリグラム、より好ましくは約20ミリグラム～約50ミリグラムである。好適な用量の例としては、約0.1～約10mg/日の間；約0.5～約2mg/日の間；約0.01～100mg/日の間；約1～約50mg/日の間；約0.1mg/日～約1.0mg/日の間；約1.0mg/日～約5.0mg/日の間；約5.0mg/日～約10.0mg/日の間；約10.0mg/日～約15mg/日の間；約15.0mg/日～約20.0mg/日の間；約20.0mg/日～約25.0mg/日の間；約30.0mg/日～約35.0mg/日の間；約35.0mg/日～約40.0mg/日の間；約40.0mg/日～約45.0mg/日の間；約45.0mg/日～約50.0mg/日の間；約50.0mg/日～約55.0mg/日の間；約55.0～約60.0mg/日の間；約60.0mg/日～約65.0mg/日の間；約65.0mg/日～約70.0mg/日の間；約70.0mg/日～約75.0mg/日の間；約75.0mg/日～約80.0mg/日の間；約80.0mg/日～約85.0mg/日の間；約85.0～約90.0mg/日の間；約85.0mg/日～約90.0mg/日の間；約90.0mg/日～約95.0mg/日の間；および約95.0mg/日～約100.0mg/日の間を含む。当然、正確な投与量は、処置される疾患または障害によって異なるが、好ましい範囲は、容易に決定できる。

【0075】

タザロテンがI型NK細胞活性の減少をもたらすために経口投与される場合、タザロテンの1日投与量は、好ましくは約0.3mg/日～約7mg/日または約8mg/日の範囲内、より好ましくは約0.6mg/日～約6.5mg/日または約7mg/日の範囲内にある。一部の実施形態において、経口投与されるタザロテンは、0.4mg/日、0.75mg/日、1.5mg/日、2.8mg/日、3mg/日、4.5mg/日、6mg/日および6.3mg/日を含むタザロテンの1日投与量で投与される。

【0076】

当該実施形態によれば、RARアゴニストは、患者の症状を軽減するために投与され得る、または障害機序自体に対抗するために投与され得る。特定の実施形態において、RARアゴニストは、予防的措置 (prophylactic measure) として投与され得る。一部の実施形態において、複数回用量のRARアゴニストが投与される。これらの処置目的が多くの場合に関連していること、および処置が種々の要素に基づき特定の患者に合わせて調整され得ることを、当業者であれば理解するであろう。これらの要素としては、患者の年齢、性別、または健康状態、および自己免疫または免疫関連の疾患または障害の進行が挙げられ得る。患者のための処置方法は、それに応じて、投与量、投与のタイミング、投与経路について調整され得、他の治療の同時または逐次投与により得る。

【0077】

一部の実施形態において、1種以上のRARアゴニスト化合物は、単独でまたは別の治療化合物と組み合わせて投与され得る。例えば、1種以上のRARアゴニスト化合物は、スルファチドと組み合わせて投与され得る。アルコール性肝疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患または再灌流傷害の処置において使用されている任意の現在公知の治療化合物が使用され得る。一部の実施形態において、RARアゴニストは、硫化水素 (H_2S) と組み合わせて投与され得る。一部の実施形態において、RARアゴニストは、酸化防止剤と組み合わせて投与され得る。一部の実施形態において、RARアゴニストは、例えばコルチコステロイド、生物学的製剤 (例えば、抗TNF- α および抗IL-6)、免疫調節薬 (例えば、RU-486)、疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARD、例えば、レフルノミド)、COX-2インヒビター (セレコキシブ)、非ステロイド抗炎症薬 (NSAID、例えば、ナプロキセン)、経口抗糖尿病薬 (OAD、例えば、メトホルミンまたはシタグリプテン (sitaglipten))、GLP-1アゴニスト、インスリン、PPARアゴニスト/アンタゴニスト、EGFメディエーター (抗癌薬)、肝癌を処置するのに有効な他の薬剤、肝癌のための細胞ベースの治療；C型肝炎、多発性硬化症またはエリテマトー

10

20

30

40

50

デスのためのインターフェロン（IFN）；およびLFA-1アンタゴニストと組み合わせて投与され得る。

【0078】

本明細書に記載されるRARアゴニスト化合物およびスルファチド化合物は、薬学的組成物中に組み込まれる有効成分として使用され得る。一部の実施形態において、当該薬学的組成物は、単一の有効成分を含み得る。一部の実施形態において、当該薬学的組成物は、2種、3種、4種、5種またはそれ以上の有効成分を含み得る。あらゆる投与方法（例えば、経口投与、直腸投与、非経口投与、局所投与、または静脈内、筋肉内、胸骨内もしくは皮下注射による、もしくは吸入による適切な形態での投与）が企図される。製剤は、適切な場合には、別個の投薬単位で好都合に与えられ得、薬学の技術分野において周知の方法の任意のものによって調製され得る。有効成分は、1種以上の薬学的に受容可能な賦形剤と共に、公知の確立されたやり方に従って普通に製剤化される。したがって、当該薬学的組成物は、液体、散剤、エリキシル剤、注射可能溶液、懸濁剤、坐剤などとして製剤化され得る。

【0079】

いくつかの実施形態に従う有効成分は、経口投与の場合は、散剤、賦形剤とのブレンド、液体または溶液、懸濁剤、固溶体の形態で活性物質（active）を含む錠剤、硬ゼラチンカプセル、軟ゼラチンカプセルとして、投与用に製剤化され得る。一部の実施形態に従う有効成分は、口腔内投与（舌下または口腔粘膜）の場合は、迅速に溶解する固体剤形、すなわち沸騰錠、薄膜、パッカルカシュ剤として、または液体もしくは半固体の形態（例えば、ゲル剤、溶液、乳剤、懸濁剤）として、投与用に製剤化され得る。一部の実施形態に従う有効成分は、注射の場合は、水性もしくは非水性の溶液、懸濁剤または乳剤として、投与用に製剤化され得る。油ベースの溶液および懸濁剤は、天然およびまたは合成の油（例えば、ダイズ油、綿実油、鉱油、ゴマ油、ヒマシ油、硬化植物油、蜜蝋）の混合物を含む。一部の実施形態に従う有効成分は、経皮投与の場合は、クリーム剤、ゲル剤、乳剤、水性ベースの溶液、油ベースの溶液、懸濁剤、フィルム剤、貼付剤、泡沫剤として、投与用に製剤化され得る。一部の実施形態に従う有効成分は、経鼻投与の場合は、散剤、懸濁剤、溶液、乳剤として、投与用に製剤化され得る。一部の実施形態に従う有効成分は、肺送達の場合は、微粉化散剤として、投与用に製剤化され得る。経口投与は、初回通過代謝および代謝酵素の誘導と関連する。したがって、経口投与されるレチノイン酸の投薬強度および用法は、最適効果に向けて調整され得る。代替的な送達経路（例えば、舌下、口腔粘膜、注射、肺および経皮）は、経口投与と比較して好ましくあり得る。記載したもののような代替的な投与経路は、初回通過代謝およびGI吸収を回避し、より少ない酵素誘導を示し、かつ安定な反復用量薬物動態をもたらす。

【0080】

本実施形態に従う薬学的製剤は、即時放出性または調節放出性（例えば、持続放出性、拍動放出性、制御放出性、遅延放出性、緩慢放出性）であり得る。薬理学的量の経口投与されるレチノイド異性体は、これは即効性があるので、副作用を有し得る。この副作用が、治療における経口レチノイドの使用の重大な制約であった。局所適用されるレチノイドは催奇形性の傾向をほとんど有さないが、それらの使用を制限する、皮膚刺激をはじめとするこの投与経路と関連する他の毒性がある。経口および局所の両方の毒性の主な理由は、レチノイドは投与時に全て即時に利用可能であることである。インビボでより緩慢にかつより継続的にレチノイドを利用可能にし得るプロセスであれば、レチノイドの利用可能性のピークと谷を回避し、それにより、より長い期間にわたってインビボ有効レベルの化合物を提供し、また、過度の量の物質が突然利用可能になることの結果としてしばしばもたらされる毒性を回避するまたは大幅に低減するであろう。レチノール、レチノールのエステル、特にレチノールの脂肪エステル、レチノイン酸またはレチノイン酸エステルの、油ベースの注射可能製剤であれば、筋肉内に週単位で投与され得、そのような原則に従う緩慢放出性全身送達を提供し得るであろう。

【0081】

一部の実施形態において、全トランス型レチノイン酸 *tert*-ブチルエステルの調製は、次の通りである。無水エーテル中の全トランス型レチノイン酸 (100 mg、0.33 mmol) の溶液に、塩化オキサリル (42.3 mg、0.333 mmol) を 0℃ で添加し、その温度で 30 分間攪拌し、ピリジン (28.7 mg、0.363 mmol)、2-メチルー2-プロパノール (26.8 mg、0.363 mmol) を添加し、暗闇にて室温で攪拌し、この時間の後、TLC によって示されたように反応は完結した。次いで、反応混合物を、水でクエンチし、エーテル (3 回、10 ml)、飽和重炭酸ナトリウム溶液 (3 回、5 ml) および再度水 (3 回、5 ml) で抽出し、乾燥させ (MgSO₄)、エバポレートさせた。濃厚な残渣をヘキサン中に再溶解させ、シリカ Sep-Pak カートリッジ (2 g) 上に適用した。ヘキサン/酢酸エチル (9.7:0.3) での溶出により、レチノイン酸のブチルエステルがもたらされた。最終精製は、ヘキサン/イソプロパノール (90:10) 溶媒系を用いて HPLC (10 mm×25 cm の Zorbax-Sil カラム、4 mL/分) により達成した。純粋な全トランス型レチノイルブチレート 2 (98 mg、82.6%) が、濃厚油状物として溶出された。

【0082】

一部の実施形態は、下記のような注射のためのレチノイン酸ブチルエステル (*butyl-retinoic ester*) の製剤化に関する。10 g のレチノイン酸ブチルエステル溶液を、0.1 g のブチルヒドロキシアニソールを含有する 73 g の綿実油および 10 g のベンジルアルコールの混合物中に、無菌条件下において、やや高温で、高剪断混合によって溶解させる。この混合物を、滅菌濾過し、後の使用のために (筋肉内注射により投与するために) 注射器中に充填する。一部の実施形態は、筋肉内注射のための綿実油中のパルミチン酸レチノールの、上のような製剤化に関する。

【0083】

一部の実施形態は、下記のような本実施形態の 1 種以上の有効成分の経口剤形の製剤化に関する。10 g のレチノイン酸を、蜜蝋、ブチルヒドロキシアニソール、エデト酸二ナトリウム、硬化ダイズ油フレーク、硬化植物油およびダイズ油アルコールの混合物中に、やや高温で、高剪断混合によって溶解させる。この混合物を、経口投与のために、2 mg、5 mg および 10 mg の投薬強度で軟ゼラチンカプセル中に密封する。

【0084】

一部の実施形態は、本実施形態の 1 種以上の有効成分を含有する生体接着性バツカル錠の製剤化に関する。24% の有効成分、21% の HPMC、18% のコーンスターチ、24% のラクトース、1% のシリカ、2.5% のポリカルボフィル (Novelon)、7.5% の Carbone 974 P、1.2% のタルクおよび 0.7% のステアリン酸マグネシウムを含有する賦形剤ブレンドを調製する。このブレンドを、直径約 1 cm の錠剤に圧縮成形した。

【0085】

一部の実施形態は、本実施形態の 1 種以上の有効成分を含有する舌下フィルムの製剤化に関する。以下のものを 50 g の水中に混合する: 3 g の Methocel E5、5 g の Methocel E50、1 g の Klucel、1 g のマルトデキストリン、1 g のクエン酸、3 g のスクラロース、5 g のオレンジ香味料、0.2 g のパラベン、0.1 のエデト酸ナトリウムおよび 5 g のソルビトール。1 g のレチノイン酸を添加し、混合物を攪拌して脱ガスする。この組成物を、ポリエステルフィルム支持体全体に渡って薄く広げ、分解を回避するために直射光の全くない所において、空気中で乾燥させる。次いで、このフィルムを、2~10 mg の用量が得られるように適切な大きさに切断する。

【0086】

一部の実施形態は、1 種以上のスルファチド、RAR アゴニストまたはそれらの任意の組み合わせを、好ましくは薬学的組成物として含み得る、キットに関する。一部の実施形態において、cis-テトラコセノイルが、薬学的に受容可能なキャリア中で提供される。一部の実施形態において、ATRA が、薬学的に受容可能なキャリア中で提供される。一部の実施形態において、タザロテンが、薬学的に受容可能なキャリア中で提供される。

いくつかの実施形態において、硫化水素 (H_2S) が、任意選択で提供され得る。いくつかの実施形態において、1 種以上の酸化防止剤が、任意選択で提供され得る。いくつかの実施形態において、キットは、好適な包装および／または取扱説明書をさらに含み得る。キットはまた、1 種以上のスルファチド、RAR アゴニストまたはそれらの任意の組み合わせの送達のための手段（例えば、吸入器、スプレーディスペンサー（例えば、鼻内スプレー）、注射用注射器、注射針、IV バッグ、またはカプセル剤、錠剤、坐剤のためのプレッシャーパック (pressure pack)）も含み得る。1 種以上のスルファチド、RAR アゴニストまたはそれらの任意の組み合わせは、乾燥もしくは凍結乾燥された形態、または溶液、特に滅菌溶液中にあり得る。乾燥形態にある場合、当該キットは、液体製剤を調製するための薬学的に受容可能な希釈剤を含み得る。当該キットは、投与のためまたは組成物を投薬するためのデバイス（注射器、ピペット、経皮パッチ、または吸入器を含むがこれらに限定されない）を含有し得る。一部の実施形態は、長期（例えば、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、6 週間、または 8 週間以上）にわたって有効な処置を個体に提供するのに十分な投与量の化合物または組成物を含有するキットに関する。

10

【0087】

1 つの例の実施形態において、処方薬物または乱用薬物からの化学的肝損傷の危険がある 70 kg の成人患者に対し、肝損傷を処置するために 1.0 ml のリン酸緩衝生理食塩水中の 7 mg のタザロテンの i.m. 注射が毎日与えられる。この投薬は、処置の結果および主治医の判断に基づき調整され得る。処置は、少なくとも約 1 または 2 週間、好ましくは少なくとも約 1 または 2 ヶ月にわたり継続されることが好ましく、長期的に継続され得る。

20

【0088】

別の例の実施形態において、処方薬物または乱用薬物からの化学的肝損傷の危険がある 70 kg の成人の患者に対し、1 型 NKT 細胞の活性を阻害するのに十分な経口用量の RAR アゴニストが与えられる。肝損傷は、血清肝臓酵素レベル分析によってモニタリングされ得る。RAR アゴニストの投与量は、肝機能試験の結果および主治医の判断に基づき調整され得る。処置は、少なくとも約 1 または 2 週間、好ましくは少なくとも約 1 または 2 ヶ月にわたり継続されることが好ましく、長期的に継続され得る。一部の実施形態において、処置の継続期間は、患者を化学的肝損傷の危険に曝す行為の継続期間と一致する。一部の実施形態において、RAR アゴニストは、ATRA およびタザロテンからなる群から選択される。一部の実施形態において、さらに、II 型 NKT 細胞を活性化するのに十分な用量のスルファチドが、患者に投与される。

30

【0089】

上述の記述説明はその最良の態様であると現在考えられるものを当業者が製造および使用することを可能にするが、当業者であれば、本明細書における特定の実施形態、方法、および実施例の変形例、組み合わせ、および均等物の存在を理解し認識するであろう。したがって、本実施形態は、上記の実施形態、方法、および実施例により限定されるべきものではなく、本実施形態の範囲および精神の範囲内の全ての実施形態および方法により限定されるべきものである。

【0090】

以下の実施例は、例示の目的で示されるものであり、限定として解釈されるべきではない。

40

【実施例】

【0091】

実施例 1

スルファチドはスルファチド / CD1d-テトラマー + 細胞を活性化しつつ I 型 NKT 細胞の阻害を媒介する

20 μg のスルファチドを 1 用量、マウスに腹膜内注射した。スルファチド注射に続いて、肝臓由来の MNC を単離し、CFSE で標識した。この細胞を、10 ng/ml のサイトカイン IL-2 の存在下または不在下において、96 時間にわたり αGalCer (

50

10 ng/ml) と共に培養した。コントロールとして、細胞を、10 ng/ml の IL-12 のみと共に培養した。培養に続いて、細胞を採取し、抗 TCR β mAb および α GalCer/CD1d-テトラマーで染色し、FACS 選別し、 α GalCer/CD1d-テトラマー⁺ (I 型 NK T) 細胞に対して CFSE 希薄化分析を行った。図 1A を参照されたい。図 1B に示されるように、スルファチド投与後は、I 型 NK T 細胞は、 α GalCer でのインビトロチャレンジに応答して増殖しない。

【0092】

PBS または 20 μ g のスルファチドを注射したマウスから単離された肝細胞を、スルファチド/CD1d-テトラマー⁺ 個体群とテトラマー⁻ 個体群とに選別し、細胞質内 IFN- γ について染色した。図 1C に示されるように、スルファチド注射マウスが、最大%の IFN- γ 陽性細胞を有する。

【0093】

スルファチドの投与は、I 型 NK T 細胞増殖の阻害および % IFN- γ 陽性細胞の増加の両方を結果としてもたらす。特定の理論に拘束されるものではないが、スルファチド投与は、サイトカインおよびケモカインを分泌する pDC および I 型 NK T 細胞の両方を活性化し、この相互作用が I 型 NK T 細胞における cDC 媒介阻害誘導を結果としてもたらすということが示唆される。

【0094】

実施例 2

スルファチド投与は ConA 誘導性肝炎を防ぐ

雌 C57BL/6 マウスを、8.5 mg/kg のコンカバリン (Concavalin) A (ConA) (発熱物質を含まないリン酸緩衝生理的食塩水 (PBS) に溶解させたもの) で静脈内 (i.v.) 処置した。これにより、肝炎により引き起こされるものと同様の肝損傷が誘導される。ConA 注射の直後に、マウスに 20 μ g (1 mg/kg/m) のウシ脳スルファチドまたは PBS を腹腔内 (i.p.) 注射した。

【0095】

肝臓への損傷は、肝機能試験により検出可能な (肝疾患を示唆する) 徴候異常 (te l l t a l e a b n o r m a l i t y) を生じさせる。例えば、ウイルス性肝炎により、損傷を受けた肝細胞中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 酵素およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 酵素が血流中に入り込み、それらの血中レベルを上昇させ得る。肝損傷の試験を行うために、ConA または ConA + スルファチド注射の 0、6、12、24、48 および 72 時間後に血清を収集し、血清酵素 ALT および AST のレベルを測定した。血清酵素レベルは、Laboratory Corporation of America, San Diego, CA の助けを借りて測定した。図 1e に示されるように、類似の血清酵素レベルを ConA または ConA + スルファチド注射の 6 時間後に観察したが、12、24、および 48 時間においては、ALT および AST の血清レベルは両方とも、ConA およびスルファチドの両方を注射されたマウスにおいての方が低かった。ConA (●) 注射マウスにおいては、血清 ALT および AST は 12 時間の辺りでピークに達し (ALT 15.8 $\times 10^3$ IU/L および AST 22.7 $\times 10^3$ IU/L)、48 時間までにベースラインに戻った。それに対し、ConA + スルファチドの組み合わせ (○) の注射に続いて、12 時間までに ALT および AST の血清レベルの著しい減少 (ALT 2.5 $\times 10^3$ IU/L および AST 5.4 $\times 10^3$ IU/L) が記録され、24 時間までにベースラインに戻った。値は、1 群 5 匹のマウスの平均 $\pm$ SD である。P < 0.001。

【0096】

マウスを処置の 12、24、48、72、および 96 時間後に犠牲死させ、それらの肝臓を収集した。肝組織を、10%ホルムアルデヒド溶液中で固定し、使用まで室温で保存した。ヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) 染色を用いた組織学的調査は、Pacific Pathology Inc., San Diego, CA で行った。

【0097】

図1dに示されるように、H&E染色は、ConA+ウシ脳スルファチド処置されたマウスにおいてConAのみで処置されたマウスに比べて著しく改善された肝組織構造を明確に示した。組織学的調査は、ConA注射マウスに続く示された時点において、びまん性の広範囲の浸潤および重度の壊死を示した(図1d、上パネル)。それに対して、スルファチド+ConA注射は、12時間~48時間の肝臓切片中のより少ない浸潤およびより少ない壊死の点から見て軽い傷害と関連付けられ、組織構造は72時間までに常態に戻った(図1dの下パネル)。

【0098】

考え合わせると、実施例1および実施例2で得られた結果は、(a)スルファチドが肝臓中のI型NKT細胞の障害を媒介すること、および(b)スルファチド投与がスルファチド/CD1d-テトラマー+細胞を活性化し、ConA誘導性肝炎を防ぐことを示している。これは、寛容化されたcDCおよびアネルギー性のI型NKT細胞が一緒になって、有害な炎症カスケードの著しい障害に繋がることを示している。

【0099】

実施例3

CD11b+Gr-1+細胞個体群の組成に対する肝虚血再灌流傷害への免疫応答の作用の分析

肝虚血再灌流傷害モデルを、Shen XD, Ke B, Zhai Y, et al. に記載されているように確立した。肝虚血/再灌流傷害機序においてはCD154-CD40T細胞の共刺激経路が必要とされ、その遮断は、ヘムオキシゲナーゼ-1媒介細胞保護を促進しかつこれに依存する。Transplantation 2002, 74:315-9が、ほとんど変更することなくその全体が本明細書に援用される。

【0100】

WTマウスおよびI型NKT細胞はないが通常のレベルのII型NKT細胞を有するJ α 18^{-/-}マウス(3~5匹のマウス/群)または20 μ gのスルファチド/マウスで3時間前に処置されたWTマウス(2~3匹のマウス/群)を、60mg/kgのペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射により麻酔した。正中開腹後、非外傷性クリップを、3つの頭側肝小葉の肝三つ組(肝動脈、門脈、胆管)に適用した。尾側小葉(caudal lobe)は、健全な血液循環を保持して腸管静脈のうっ血を防いだ。腹膜を閉じ、マウスを加熱パッド(約37℃)上に置いた。周囲温度は、25~26℃の間の範囲であった。90分間の部分的な肝臓温阻血の後に、クリップを取り外して再灌流を開始し、腹壁を縫合した。マウスを6時間の再灌流後に安楽死させ、血液および頭側肝小葉を収集した。シャムコントロールは、血管閉鎖以外、同じ手順を受けた。

【0101】

細胞調製。Halder RC, Aguilera C, Maricic I, et al., Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT prevents inflammatory liver disease. J Clin Invest 2007, 117:2302-12に記載されているように、機械的粉碎を用い、続いてPercoll勾配分離およびRBC溶解を用いて、白血球をマウスの頭側肝小葉から単離した。

【0102】

フローサイトメトリー。白血球を、FACS緩衝液(0.02%のNaN₃および2%のFCSを含有するPBS)中に懸濁させ、ブロック(抗マウスFcR γ 、BD Pharmingen, San Diego, CA)し、示されているとおりの負荷mCD1d-テトラマー-PEもしくはPE、FITC、またはPE-Cy5で標識された抗マウス抗体(BD Pharmingen, San Diego, CAまたはeBioscience Inc., San Diego, CA)で染色した。肝臓単核細胞(MNC)の細胞内サイトカイン染色(ICCS)を、Halder RC, Aguilera C, Maricic I, et al., Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT preve

10

20

30

40

50

nts inflammatory liver disease. J Clin Invest 2007, 117:2302-12に記載されているように行った。分析は、CellQuestソフトウェア（バージョン4.0.2, BD, Franklin Lakes, NJ）を使用して、FACSCalibur計器を用いて行った。Gr-1^{high} 10
individual cell populations and Gr-1^{int} individual cell populations to gate. Fig 2aを参照されたい。

【0103】

統計。データは、各群についての平均±SEMとして表される。P<0.005。群間の統計的差異は、GraphPad Prismソフトウェア（バージョン5.0a, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA）を用いて、対応のない片側学生t検定により評価した。

【0104】

結果。細胞のGr-1^{int}サブセットは、主に単球および骨髄系前駆細胞からなる。WTマウスの肝臓においては、Gr-1^{int}細胞は、虚血再灌流傷害（IRI）に続いてシャムに比べて約3.5倍増加した（p<0.005）が、Jα18^{-/-}マウスにおいては、虚血再灌流傷害に続いて増加は何ら観察されなかった。図2bの上パネルを参照されたい。したがって、虚血再灌流傷害の間の骨髄細胞サブセットの肝臓動員は、Jα18^{-/-}マウスにはないI型NKT細胞の存在に依存している。

【0105】

スルファチド処置したマウスにおいては、Gr-1^{int}細胞サブセットは、IRIに続いて非処置のマウスに比べて約50%減少した。これは、I型NKT細胞の骨髄細胞動員活性が、スルファチド処置に続いて減少したことを示唆している。

【0106】

主として顆粒球からなるGr-1^{high}細胞サブセットは、シャムコントロールの肝臓と虚血再灌流傷害誘導マウスの肝臓との間で著しく異ならなかった。図2bの下パネル。

【0107】

実施例4

虚血再灌流傷害誘導に先立つスルファチド投与はI型NKT細胞によるIFN-γ分泌を著しく阻害する

1つのWTマウス群（n=3）に、虚血誘導の3時間前にスルファチド（20μg/マウス、i.p.）を注射し（スルファチド、IRI）、他の群（IRI（n=3）、シャム（n=2））には前処置を行わなかった。肝虚血再灌流傷害（90分間の虚血および6時間の再灌流）およびシャム手術を、実施例3に記載したように行った。

【0108】

細胞調製。Halder RC, Aguilera C, Maricic I, et al., Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT prevents inflammatory liver disease. J Clin Invest 2007, 117:2302-12に記載されているように、機械的粉碎を用い、続いてPercoll勾配分離およびRBC溶解を用いて、白血球をマウスの頭側肝小葉から単離した。

【0109】

フローサイトメトリー。白血球を、FACS緩衝液（0.02%のNaN₃および2%のFCSを含有するPBS）中に懸濁させ、ブロック（抗マウスFcR-γ、BD Pharmingen, San Diego, CA）し、αGalCer負荷mCD1d-テトラマー-PE抗マウス抗体（BD Pharmingen, San Diego, CA）またはeBioscience Inc., San Diego, CA）で染色した。分析は、CellQuestソフトウェア（バージョン4.0.2, BD, Franklin Lakes, NJ）を使用して、FACSCalibur計器を用いて行った。

【0110】

統計。データは、各群についての平均±SEMとして表される。P<0.01。群間の

10

20

30

40

50

統計的差異は、GraphPad Prismソフトウェア（バージョン5.0a, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA）を用いて、対応のない片側スチューデントt検定により評価した。

【0111】

結果。虚血再灌流傷害誘導後、I型NK細胞は、シャム手術からのI型NK細胞に比べて増加したIFN- γ 産生を示すが、虚血再灌流傷害の3時間前のスルファチドの投与により、I型NK細胞によるIFN- γ 分泌は有意に減少した。図2cを参照されたい。

【0112】

実施例5

I型NK細胞の抑制はIRIに続く肝臓壊死の減少を結果としてもたらす

Matreya Inc., Pleasant Gap, PAから購入した精製ウシミエリン由来スルファチド(>90%純粋)を、ビヒクル(0.5%ポリソルベート20(Tween-20)および0.9%NaCl溶液)に溶解させ、PBS中で希釈した。BL/6マウス(WTスルファチド)群およびJ α 18^{-/-}マウス(J α 18^{-/-}スルファチド)群を、虚血誘導またはシャム手術の3~48時間前にスルファチド(20 μ g/マウス)で腹腔内処置した。肝虚血再灌流傷害およびシャム手術を、スルファチド処置および非処置のWTおよびJ α 18^{-/-}マウスに対して、実施例3に記載したように実施した。90分間の虚血および24時間の再灌流に続いて、肝組織(頭側小葉)を、10%ホルマリン中で固定し、パラフィン中に包埋し、切片を、組織学的分析のためにヘマトキシリン(hematoxylin)およびエオシンで染色した(IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine)。

【0113】

スルファチドで前処置されたWTマウス(WTスルファチド)およびJ α 18^{-/-}マウスは、IRI後に、肝臓壊死をほんの僅かしかまたは全く発症しなかったが、非処置(WT)マウスの頭側肝小葉においては、大きな壊死領域が見出された。図4の上パネルを参照されたい。シャムコントロールは、壊死を全く示さなかった。図4の下パネルを参照されたい。組織学的分析により、IRIに続く壊死が、I型NK細胞のないマウス(J α 18^{-/-}マウス)およびI型NK細胞の活性がスルファチド処置により抑制されているマウスの肝臓において減少することが示された。

【0114】

実施例6

WTおよびI型NK細胞涸渇(J α 18^{-/-})マウスにおけるアルコール性肝疾患の誘導

1週間の栄養的に十分なLieber-DeCarli液体食餌での順化に続いて、6~8週齢の雄C57BL/6Jマウス(B6)およびI型NK細胞はないが2型NK細胞はあるJ α 18^{-/-}マウスに、5%のエタノールを含有する液体食餌または等カロリーのデキストリンマルトース含有食餌(Bio-Serv, NJ)に自由に接近させた。滅菌した餌箱中にオートクレーブ処理された水を用いて毎日新たに食餌を調製し、餌を毎日取り換えるように注意した。

【0115】

エタノール含有食餌が与えられたB6マウスおよびJ α 18^{-/-}マウスを、慢性的エタノール給餌群と慢性的+過エタノール給餌群との2つの群に分けた。慢性的エタノール給餌群のマウスには、4~5週間までの間、5%のエタノールを含有する液体食餌が給餌された。慢性的+過エタノール給餌群のマウスには、10日間にわたり5%のエタノールを含有する液体食餌が給餌され、続いて(11日目に)単回の高用量の強制飼養エタノール(5g/kg体重)が給餌された。コントロール群のマウスは、等カロリーのデキストリンマルトースで強制飼養された。強制飼養に続いて、マウスを、温度制御された温暖パッド上に維持し、モニタリングした。当初はゆっくりとした動きであったが、高用量の強制飼養エタノールが与えられたほとんどのマウスが、数時間のうちに正常な行動を取り戻

10

20

30

40

50

した。マウスを、強制飼養の8～9時間後に安楽死させた。

【0116】

H&E染色を、エタノール給餌された雄B6およびJα18-/-マウスから、10日間または4～5週間の慢性的エタノール給餌または慢性的+過エタノール給餌のいずれかに続いて得られた肝小葉組織に対して行った。図9a（上パネル）に示されるように、組織病理学的分析は、10日間にわたり慢性的エタノール給餌に供されたB6またはJα18-/-マウスのいずれにおいても肝損傷を示さなかった。さらに、4～5週間にわたり慢性的エタノール給餌に供されたB6およびJα18-/-マウスの肝組織の組織病理学的分析により、肝損傷は何ら観察されなかった（データは示していない）。しかしながら、慢性的+過エタノール給餌に供されたB6マウスからの肝組織の組織病理学的分析では、著しい損傷が示された。図9aの左下パネルを参照されたい。一方、慢性的+過エタノール給餌に供されたJα18-/-マウスからの肝組織は、比較的少ない損傷を示した。図9aの右下パネルを参照されたい。

10

【0117】

血清ALTレベルを、コントロールのB6およびJα18-/-マウスならびにエタノール給餌されたB6およびJα18-/-マウスにおいて、10日間または4～5週間の慢性的エタノール給餌および慢性的+過給餌のいずれかに続いて測定した。図9bの左パネルに示されるように、慢性的エタノールは、血清ALTレベルの著しい上昇に繋がらなかった。血清ALTレベルは、コントロールに比べて、慢性的+過エタノール給餌に供されたB6マウスにおいて著しく高まり、慢性的+過エタノール給餌に供されたJα18-/-マウスにおいてはより小さい程度に高まった。図9bの右パネルを参照されたい。

20

【0118】

組織構造またはALT/AST血清レベルにより実証されるように、（エタノールなしのコントロールに比べて）最大の肝損傷は、高用量エタノール強制飼養の6～8時間後に、B6およびJα18-/-マウスにおいて観察された。慢性的+過エタノール給餌が与えられた群の間では、1型NK細胞のないJα18-/-マウスの方が、少ない肝損傷を示した。

【0119】

組織病理学的分析によりおよび血清ALT/ASTレベルの著しい変化がないことにより実証されるように、10日間または4～5週間にわたる慢性的エタノール給餌は何らの著しい肝損傷にも繋がらなかったもので、これは、前臨床または無症状期のALDと称される。臨床期のALDは、第2の工程の慢性的+過アルコール給餌に続いて誘導された。

30

【0120】

5%のエタノールを含有する液体Lieber-DeCarli食餌（慢性的エタノール給餌）または同様のカロリー数を含有するコントロール食餌のいずれかでの5週間の給餌に続いて、雄B6およびJα18-/-マウスの群（各4匹）から、肝臓単核細胞（MNC）を単離した。単離された肝臓MNCを、種々の細胞表面抗体で染色し、フローサイトメトリーにより分析した。活性化されたI型NK細胞およびCD11b+Gr-1+骨髄細胞の蓄積は、前臨床ALD期にあるB6マウスの肝臓においては観察されたが、Jα18-/-マウスの肝臓においては観察されなかった。図5を参照されたい。

40

【0121】

実施例7

スルファチドまたは全トランス型レチノイン酸（ATRA）によるアルコール誘導性肝損傷の予防

7週齢のB6（WT）およびJα18-/-の雄マウスの群に、1日目および10日目に20マイクログラム/マウスのスルファチド；6～10日目に0.3ミリグラム/マウスのATRA、またはビヒクル/DMSOを注射（i.p.）し、10日間にわたる5%のエタノールを含有する液体食餌、それに続く（11日目における）単回の高用量の強制飼養エタノール（5g/kg体重）（慢性的+過エタノール給餌群）または等カロリーのデキストリンマルトース含有食餌、それに続く等カロリーのデキストリンマルトース強制

50

飼養（コントロール群）のいずれかを給餌した。強制飼養の6～8時間後に、マウスを安楽死させ、血清および肝組織を採取した。

【0122】

血清ALTレベルを、各マウス群について測定した。図6に示されるように、血清ALTレベルは、慢性的+過エタノール給餌に供されたビヒクル/DMSO注射B6マウス（黒い棒）において著しく高まったが、スルファチド（横縞模様の棒）またはATRA（縦縞模様の棒）のいずれかの注射を受けた慢性的+過エタノール給餌B6マウスにおける血清ALTレベルは、コントロール給餌B6マウス（陰影の付いていない棒）のものと同様であった。血清ALTレベルは、慢性的+過エタノール給餌に供されたビヒクル/DMSO注射Jα18-/-マウス（黒い棒）において、コントロール給餌Jα18-/-マウス（陰影の付いていない棒）に比べて高まったが、しかしながら、慢性的+過エタノール給餌に供されたビヒクル/DMSO注射Jα18-/-マウスは、慢性的+過エタノール給餌に供されたビヒクル/DMSO注射B6マウスに比べて減少した血清ALTレベルを有していた。図6を参照されたい。

10

【0123】

肝脂肪性肝炎（脂肪肝疾患）についての組織学的調査を、ビヒクル/DMSO、スルファチドまたはATRAを注射されたB6マウスから、慢性的+過エタノール給餌に続いて採取された肝組織に対して行った。図7に示されるように、ビヒクル/DMSOを注射されたB6マウスからの肝組織は、慢性的+過エタノール給餌に続いて損傷の著しい徴候を示した。しかしながら、スルファチドまたはATRAを注射されたB6マウスから得られた肝組織は、脂肪肝疾患の徴候をほとんど示していない。

20

【0124】

組織学および血清肝臓酵素分析は、スルファチドまたはレチノイン酸レセプター（RAR）アゴニストであるATRAの投与がいずれも過度のアルコール消費によって引き起こされる肝損傷を防ぎ得るということを示唆している。

【0125】

実施例8

ATRAによるI型NK細胞増殖の阻害

I型NK細胞を、ナイーブB6マウスの脾臓から単離し、 $[^3\text{H}]$ ーチミジンおよび最適濃度の αGalCer のみ、最適濃度の $\alpha\text{GalCer} + 0.15\mu\text{g/ml}$ 、 $1.2\mu\text{g/ml}$ 、もしくは $18.8\mu\text{g/ml}$ のATRA、またはATRAのみと共に、インビトロで培養した。I型NK細胞の増殖を、 $[^3\text{H}]$ ーチミジン取り込みにより測定した。図8aに示されるように、細胞増殖は、 $0.15\mu\text{g/ml}$ のATRAおよび αGalCer または αGalCer のみで培養されたI型NK細胞について同様であったが、比較すると、増殖は、 $1.2\mu\text{g/ml}$ または $18.8\mu\text{g/ml}$ のATRAおよび αGalCer で培養されたI型NK細胞については減少した。 αGalCer 誘導I型NK細胞増殖の最も大きな阻害を、 $18.8\mu\text{g/ml}$ のATRAについて観察した。ATRAのみで培養されたI型NK細胞については、増殖は、全くまたはほとんど観察されなかった。

30

【0126】

40

実施例9

ATRAによるI型NK細胞活性の阻害

αGalCer でのインビトロチャレンジに応答したI型NK細胞によるIL-2サイトカイン分泌に対するATRAの作用を、NK細胞（Hy1.2）および放射線照射された抗原提示細胞（APC）を、ATRA（ $0.15\mu\text{g/ml}$ 、 $1.2\mu\text{g/ml}$ 、または $18.8\mu\text{g/ml}$ ）の存在下または不在下において、最適濃度の αGalCer と共に、インビトロで16時間にわたり共培養することによって試験した。上清を収集し、分泌されたIL-2レベルを、IL-2サンドイッチELISAを用いて測定した。

【0127】

IL-2分泌レベルは、 $0.15\mu\text{g/ml}$ のATRAによる著しい影響を受けなかつ

50

たが、しかしながら、IL-2分泌の著しい減少が、 $1.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ または $18.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ のATRAの存在下において培養されたI型NK細胞について観察された。IL-2分泌の最大の減少は、 $18.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ のATRAにより達成された。図8bを参照されたい。

【0128】

ATRA投与に続くI型NK細胞における機能変化をさらに試験した。2つの独立した実験において、Black 6 (WT) マウスの群に、5日間にわたり毎日、 $0.3 \text{mg}/\text{動物}$ (約 $15 \text{mg}/\text{Kg}$ 体重)のATRAまたはビヒクル(DMSO)を腹腔内注射した。I型NK細胞を精製し、増加していく濃度の αGalCer と共にインビトロで培養した。細胞増殖を測定し、上清を収集した。 αGalCer でのインビトロチャレンジ後の単離されたI型NK細胞のサイトカイン応答を、IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、およびIL-13についてサンドイッチELISAにより測定した。ATRA注射マウスから単離されたI型NK細胞は、 αGalCer 刺激に応答して増殖しなかった(データは示していない)。図8cに示されるように、ビヒクル(DMSO)注射マウスから単離されたI型NK細胞は、 αGalCer 刺激に応答してIFN- γ 、IL-4、およびIL-13を分泌するが、IL-6、IL-10、またはIL-12を分泌しない。 αGalCer 刺激に応答したIFN- γ 、IL-6、IL-10、IL-12、またはIL-13の分泌は、ATRA注射マウスから単離されたI型NK細胞からは何ら検出されなかった。IL-4分泌レベルの減少が、ATRA注射マウスから単離された、 αGalCer 刺激に応答したI型NK細胞から観察された。図8cを参照されたい。

【0129】

実施例10

ATRAはクラスII MHC拘束性通常CD4 T細胞を阻害しない

クラスII MHC拘束性通常CD4 T細胞に対するATRAの作用を、ナイーブB10.PLV β 8.2 TCRトランスジェニックマウスからミエリン塩基性タンパク質MBP Ac1-9反応性CD4+T細胞を単離し、段階的濃度のATRA(0.15 、 1.2 、 $18.8 \mu\text{g}/\text{ml}$)の存在下または不在下において、細胞を $[^3\text{H}]$ ーチミジンおよび最適濃度のMBP Ac1-9と共にインビトロで培養することによって試験した。MBP Ac1-9反応性CD4+T細胞の増殖を、 $[^3\text{H}]$ ーチミジン取り込みにより測定した。MBP Ac1-9刺激増殖の阻害は、ATRA処理した培養物においては何ら観察されなかった。図10を参照されたい。これは、ATRAがMHC拘束性CD4+T細胞の活性を直接的に阻害しないということを示唆している。

【0130】

実施例11

抗原提示細胞の不在下におけるATRA処理はI型NK細胞機能を阻害する

抗原提示細胞の不在下におけるI型NK細胞に対するATRA処理の作用もまた測定した。I型NKハイブリドーマ細胞(Hy1.2)を、ATRAなしまたは $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、もしくは $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のATRAと共に、24時間にわたりインビトロで培養した。次いで、細胞を3回洗浄し、段階的濃度の脂質抗原 αGalCer の存在下において、放射線照射された脾細胞(APC)と共に共培養した。16時間後に上清を収集し、IL-2サンドイッチELISAを用いてIL-2レベルを測定した。図11に示されるように、ATRAによるI型NKハイブリドーマ細胞(Hy1.2)の処理は、IL-2分泌を阻害する。これは、抗原提示細胞の不在下におけるATRA処理がI型NK細胞のエフェクター機能を阻害するということを示唆している。

【0131】

実施例12

サブタイプ特異的RARアゴニストによるI型NK細胞活性の阻害

レチノイン酸レセプター(RAR)は、RAR α 、RAR β 、およびRAR γ という3つの主要な亜型を含む。RARアゴニストATRAは、特定の亜型に対する選択性はない

。I型NK T細胞活性の障害へのRAR亜型の寄与を、亜型選択的RARアゴニストを用いて次のように試験した。脾細胞を、ナイーブB6 (WT) マウスから単離し、 $[^3\text{H}]$ ーチミジン、最適濃度の αGalCer 、および段階的濃度の汎RARアゴニストATRA、RAR α アゴニストAM580、RAR β 2アゴニストAC55649またはRAR γ アゴニストCD1530の存在下において、インビトロで培養した。 αGalCer 刺激に応答したI型NK T細胞の増殖を、 $[^3\text{H}]$ ーチミジン取り込みにより測定した。

【0132】

ATRA、AM580、およびCD1530の存在下において培養されたI型NK T細胞は、 $10^{-1} \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度までは同様のレベルの細胞増殖を示した。図12を参照されたい。 $10^{-1} \mu\text{g}/\text{ml}$ のATRAまたはCD1530の存在下において培養された細胞は、低量のまたはほんの僅かな増殖を示したが、 $10^{-1} \mu\text{g}/\text{ml}$ のAM580において培養された細胞については、増殖は維持された。低量またはほんの僅かな増殖がAC55649、ATRAまたはCD1530において培養された細胞について観察された濃度である $10^{-1} \mu\text{g}/\text{ml}$ を除く、試験した全ての濃度において、他のRARアゴニストに比した細胞増殖の減少が、RAR β 2アゴニストAC55649について観察された。

【0133】

これらの結果は、RAR β 2アゴニストAC55649がI型NK T細胞活性の有効なインヒビターであるということ、およびレチノイン酸レセプター- β 2 (RAR- β 2) シグナル伝達経路がI型NK T細胞の障害に関与しているということを示唆している。

【0134】

実施例13

I型NK T細胞に対するPPAR- γ 経路調節の作用

ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター (PPAR) は、甲状腺ホルモン、レチノイド、ステロイドホルモンおよびビタミンDに対するレセプターも含む核内ホルモンレセプタースーパーファミリーに属するリガンド誘導性転写因子である。PPARは、ヘテロ二量体パートナーとしてのレチノイドXレセプター (RXR) と共に、DNAにおける特定のペルオキシソーム増殖因子応答エレメント (PPRE) に結合することによって、遺伝子発現を調節する。PPARは、脂質代謝およびエネルギー代謝、炎症、胚移植、糖尿病および癌においてある役割を果たすと指摘されてきた。

【0135】

I型NK T細胞の障害におけるPPAR- γ 経路の役割を、新たに単離された脾臓I型NK T細胞を、段階的濃度のRAR- γ アゴニストロシグリタゾンまたはPPAR- γ アンタゴニストGW9662の存在下または不在下において、 $[^3\text{H}]$ ーチミジンおよび最適濃度の αGalCer と共に培養することによって試験した。 αGalCer 刺激に応答した脾臓I型NK T細胞の増殖を、 $[^3\text{H}]$ ーチミジン取り込みにより定量化した。同様のレベルの増殖が、PPAR- γ アゴニストロシグリタゾン、またはPPAR- γ アンタゴニストGW9662のいずれかにおいて培養された細胞について、全ての濃度において観察された。図13を参照されたい。これらの結果は、PPAR- γ 経路の特異的な障害または活性化がI型NK T細胞増殖を直接的に障害しないということを示唆している。

【0136】

実施例14

I型NK T細胞活性に対するレチノールアナログの作用の調査

脾細胞を、ナイーブB6マウスから単離し、段階的濃度のATRA、レチノール、9-*cis*-RAまたは13-*cis*-RAの存在下または不在下において、 $[^3\text{H}]$ ーチミジンおよび最適濃度の αGalCer と共に、インビトロで培養した。 αGalCer 刺激に応答した脾臓I型NK T細胞の増殖を、 $[^3\text{H}]$ ーチミジン取り込みにより定量化した。図14に示されるように、 $10^{-1} \mu\text{g}/\text{ml}$ のATRAにおいて培養された細胞については、増殖は、全くまたはほとんど観察されなかったが、I型NK T細胞増殖の同じレベルの障害は、 $10^{-1} \mu\text{g}/\text{ml}$ を超えるレチノール、9-*cis*-RAまたは13-*c*

10

20

30

40

50

i s - R A の濃度でしか観察されなかった。

【0137】

実施例15

I 型NK T細胞活性に対するR A R アゴニストの作用の調査

インビトロ増殖およびサイトカイン放出アッセイを、新たに単離された脾細胞およびI 型NK T細胞ハイブリドーマ(1. 2 H y b)に対して行った。細胞を、[³H]ーチミジンおよび最適濃度のα G a l C e r (10 n g / m l)の存在下において、滴定濃度のA T R A、トレチノイン、R A R α アゴニストA M 5 8 0、R A R β アゴニストA C 5 5 6 4 9またはR A R γ アゴニストC D 1 5 3 0と共に培養した。α G a l C e r刺激に応答したI 型NK T細胞の増殖を、[³H]ーチミジン取り込みにより定量化した。I L - 2レベルを、I L - 2 サンドイッチE L I S Aを用いて測定した。R A R アゴニストの最適濃度を決定した。R A R アゴニストのそれらの最適濃度における作用の比較を、図15に示す。最低レベルの増殖は、A T R A、トレチノイン、R A R γ アゴニストC D 1 5 3 0の存在下において培養された細胞について観察された。R A R γ アゴニストC D 1 5 3 0の存在下において培養された細胞が、最低レベルのI L - 2分泌を示した。これらの結果は、R A R γ アゴニストC D 1 5 3 0が、I 型NK T細胞活性の有効なインヒビターであることを示している。

10

【0138】

実施例16

タザロテンおよびA T R AによるI 型NK T細胞の阻害の比較

20

I 型NK T細胞活性に対する選択的R A R γ アゴニストタザロテンの作用を、インビトロ増殖およびサイトカイン放出アッセイにより調べた。

【0139】

インビトロ増殖およびサイトカイン放出アッセイは、新たに単離された脾細胞およびI 型NK T細胞ハイブリドーマ(1. 2 H y b)に対して行った。細胞を、[³H]ーチミジンおよび最適濃度のα G a l C e r (10 n g / m l)の存在下において、増加していく濃度のA T R Aまたはタザロテンと共に培養した。α G a l C e r刺激に応答したI 型NK T細胞の増殖を、[³H]ーチミジン取り込みにより定量化した。I L - 2レベルを、I L - 2 サンドイッチE L I S Aを用いて測定した。A T R AおよびタザロテンによるI 型NK T細胞阻害の比較を、図16に示す。R A R アゴニストによりI 型NK T細胞増殖およびI L - 2分泌が阻害されるが、タザロテンの方が、より低い濃度においてその阻害効果を達成する。図16を参照されたい。

30

【0140】

実施例17

タザロテンおよびA T R Aのインビボ投与に続くI 型NK T細胞の阻害

タザロテンまたはA T R Aのインビボ投与に続くI 型NK T細胞における機能変化を試験した。マウスの各群に、300 μ gのA T R A (15 m g / k g)、300 μ gのタザロテン(15 m g / k g)またはビヒクル(DMSO)を、5日間にわたり毎日腹腔内注射した。脾臓I 型NK T細胞を精製し、増加していく濃度のα G a l C e rと共にインビトロで培養した。細胞増殖を、[³H]ーチミジン取り込みの定量化により測定した。その結果を図17にて示す。A T R A注射マウス、タザロテン注射マウス、またはビヒクル(DMSO)注射マウスから単離された細胞のα G a l C e r刺激に対する増殖応答の比較は、A T R Aまたはタザロテンのインビボ投与がいずれもI 型NK T細胞活性を阻害することを示している。しかしながら、最低レベルの増殖は、タザロテン注射マウスから単離されたI 型NK T細胞について観察された。図17を参照されたい。

40

【0141】

単核細胞を、A T R A、タザロテンまたはビヒクル(DMSO)のいずれかを注射されたマウスの肝臓から単離し、α G a l C e r / C D 1 d - テトラマーおよび汎抗T C R β抗体で染色した。フローサイトメトリーを行い、α G a l C e r / C D 1 d - テトラマー / T C R β発現細胞(I 型NK T細胞)の個体群を、図18に示されるように定量化した

50

。コントロール対A T R Aまたはタザロテン投与動物の肝臓中のI型N K T細胞の数に著しい差は観察されなかった。図18を参照されたい。これらの結果は、A T R Aまたはタザロテン投与が肝臓I型N K T細胞を潤渇させないことを示している。

【0142】

予備的实施例18

R A R アゴニスト投与によるA L Dの予防

アルコール性肝疾患の予防または緩和におけるR A R アゴニストの有効性を、有効量のA T R A、タザロテン、トレチノイン、R A R α アゴニストA M 5 8 0、R A R β アゴニストA C 5 5 6 4 9、R A R γ アゴニストC D 1 5 3 0、またはビヒクル／D M S Oを、5日間にわたり毎日マウスの各群に注射することにより試験する。この期間中、マウスは、10日間にわたり5%のエタノールを含有する液体食餌、それに続く(11日目における)単回の高用量の強制飼養エタノール(5 g / k g 体重)(慢性的+過エタノール給餌群)または等カロリーのデキストリンマルトース含有食餌、それに続く等カロリーのデキストリンマルトース強制飼養(コントロール群)のいずれかである。マウスを強制飼養の6~8時間後に安楽死させ、血清および肝組織を採取する。

【0143】

血清A L Tレベルを、各マウス群について測定する。血清A L Tレベルは、慢性的+過エタノール給餌に供されたビヒクル／D M S O注射マウスにおいて、コントロール給餌マウスに比べて著しく増加することが予想される。A T R A、タザロテン、トレチノイン、A M 5 8 0、A C 5 5 6 4 9、C D 1 5 3 0の注射を受けた慢性的+過エタノール給餌マウスは、慢性的+過エタノール給餌に供されたビヒクル／D M S O注射マウスに比べて減少した血清A L Tレベルを有することが予想される。慢性的+過エタノール給餌に供された、A T R A、タザロテン、またはトレチノイン注射マウスの血清A L Tレベルは、コントロール給餌マウスにおいて観察される血清A L Tレベルと同様であることが予想される。肝脂肪性肝炎(脂肪肝疾患)についての組織学的調査は、慢性的+過エタノール給餌に続いてビヒクルD M S O注射マウスから採取される肝組織の著しい損傷を示すことが予想されるが、慢性的+過エタノール給餌に続いてA T R A、タザロテン、トレチノイン、A M 5 8 0、A C 5 5 6 4 9、またはC D 1 5 3 0注射マウスから採取される肝組織については、損傷の減少または損傷がないことが予想される。

【0144】

予言的实施例19

A T R A処置されたまたはタザロテン処置されたB L / 6マウスからの α G a l C e r / C D 1 d-テトラマー精製I型N K T細胞を用いる養子移入実験を使用して、段階的な数のこれらの細胞がナイーブB L / 6レシピエントに移入された場合に慢性的+過エタノール給餌に続いて肝傷害を阻害し得るか否かを調べる。

【0145】

精製(選別)されたスルファチド-C D 1 d-テトラマー+T細胞を、それらがC D 1 d+ / +およびC D 1 d- / -マウスへの養子移入によりA L Dを防止し得るか否かを決定するために試験する。サイトカインノックアウトマウスをスルファチド反応性T細胞のドナーとして用いて、A L Dの調節におけるI I型N K T細胞によるI F N- γ 、I L-4およびI L-10分泌の役割を直接決定する。スルファチド反応性T細胞をテトラマーを用いて単離し、段階的な数(50万~100万個)をC D 1 d+ / +およびC D 1 d- / -C 5 7 B L / 6レシピエントに養子移入する。約150万個のスルファチド-C D 1 d-テトラマー+細胞を、18匹のナイーブC 5 7 B L / 6マウスから単離する。1日後に、レシピエントを、慢性的+過エタノール給餌に曝露する。I I型N K T細胞によるサイトカイン分泌の役割を分析するために、B L / 6バックグラウンド(J a c k s o n L a b)のI F N- γ 、I L-4- / -またはI L-10- / -を最初に用いる。B L / 6野生型またはノックアウトマウス群にスルファチド(20 μ g / 動物)を注射し、次いでA L Dを誘導する。これらの2型サイトカインの不在下において、スルファチド投与は、A L Dを妨げることが予想される。養子細胞移入実験をさらに、特定のサイトカインノ

ックアウトマウスからのスルファチド-CD1d-テトラマー+細胞を用いて行い、ここでは、段階的な数（50万～100万個）をCD1d-/-C57BL/6マウスに移入する。1日後、レシピエントマウスに、エタノール摂餌を続けさせる。並行して、ポジティブコントロールとして、スルファチド-CD1d-テトラマー+T細胞を、野生型マウスからCD1d+/+BL/6マウスに移入する。これらの実験は、ALDの制御におけるスルファチド反応性T細胞により分泌されるこれらのサイトカインの役割を直接確認することが予想される。

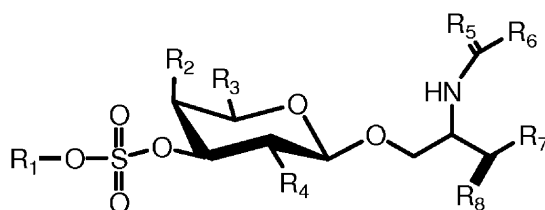
【0146】

均等物

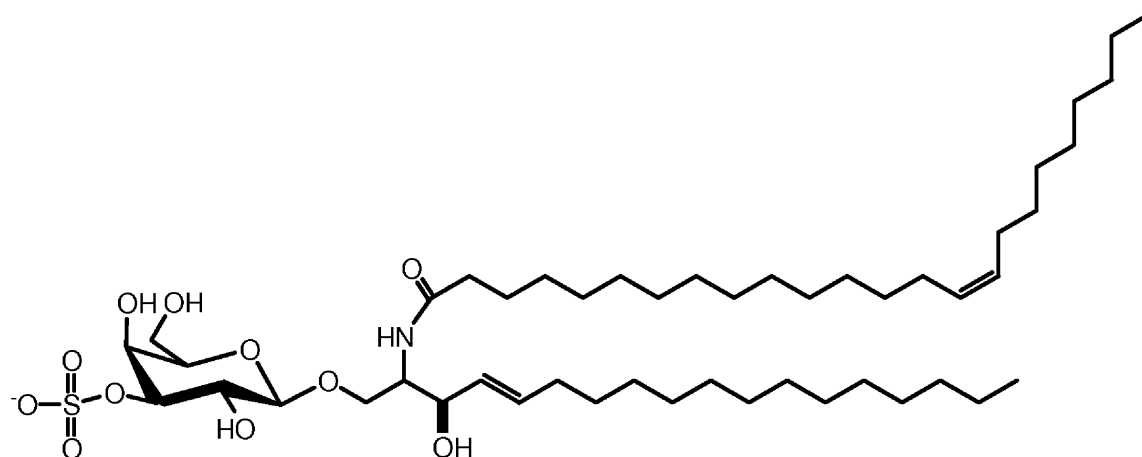
上述の明細書は、当業者が本実施形態を実施することを可能にするのに十分であると考えられる。上述の記載は、特定の好ましい実施形態を詳述し、本発明者らにより企図される最良の態様を記載している。しかしながら、上述のものが本文中でいかに詳細であるように見えようとも、本実施形態は、いろいろなやり方で実施されることができ、添付の特許請求の範囲およびそのあらゆる均等物にしたがって解釈されるべきであることが理解されるであろう。

【0147】

いくつかの実施例によれば、患者における少なくとも一の炎症状態を治療する又は予防する方法が提示されている。この方法は、患者にI型NKT細胞の活性を阻害するのに十分な量のレチノイドを投与するステップを具える。いくつかの実施例では、炎症状態が、脂肪肝疾患、アルコール誘導性肝炎、非アルコール性脂肪症肝炎、肝硬変、劇症肝硬変、突発性肝炎、ウイルス誘発性肝炎（A型、B型、C型およびその他）、肝胆管癌種と関連する炎症性肝炎、多発性硬化症、1型糖尿病、虚血再灌流傷害、固形臓器移植、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、筋萎縮性側索硬化症、および炎症性腸疾患（クローン病および大腸炎）からなる群から選択される。いくつかの実施例では、レチノイドが、ATR A又はイソトレチノインである。いくつかの実施例では、レチノイドが、タザロテンである。いくつかの実施例では、レチノイドが、レチノール又はレチノールのエステルである。いくつかの実施例では、この方法が更に、II型NKT細胞を活性化するのに十分な量のスルファチドを投与するステップを具える。いくつかの実施例では、このスルファチドが以下の化学式：



を有し、式中、 R_1 は、結合、水素、 $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{30}$ 置換アルキル、 $C_1 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_1 \sim C_{30}$ 置換アルケニルおよび $C_5 \sim C_{12}$ 糖からなる群から選択され； R_2 は、水素、ヒドロキシ基、メトキシ基、およびアルコキシ基からなる群から選択され； R_3 は、水素、ヒドロキシ基、メトキシ基、エトキシ基、およびアルコキシ基からなる群から選択され； R_4 は、水素、ヒドロキシ基およびアルコキシ基からなる群から選択され； R_5 は、水素、ヒドロキシル、カルボニル、アルコキシおよび結合からなる群から選択され； R_6 は、 $C_1 \sim C_{40}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ アルケニル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルケニルおよび $C_1 \sim C_{40}$ アルキニル（alkynyl）からなる群から選択され； R_7 は、 $C_1 \sim C_{40}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ アルケニル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルケニルおよび $C_1 \sim C_{40}$ アルキニル（alkynyl）からなる群から選択され；そして R_8 は、水素、ヒドロキシル基、カルボニル、アルコキシ基および結合からなる群から選択される。いくつかの実施例では、スルファチドが以下の化学構造を有する：

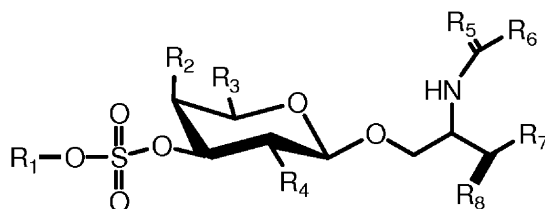


10

【0148】

いくつかの実施例によれば、処方薬又は乱用薬物からの化学的な肝臓ダメージのリスクのある患者における肝臓のダメージを阻害する方法が提供されている。この方法は、有効量の一又はそれ以上のRARアゴニスト、一又はそれ以上のスルファチド、又はこれらの組み合わせを投与するステップを具える。いくつかの実施例では、RARアゴニストが、タザロテン、ATRA、又はイソトレチノインからなる群から選択される。いくつかの実施例では、一又はそれ以上のスルファチドが以下の化学式：

20



を有し、式中、R₁は、結合、水素、C₁～C₃₀アルキル、C₁～C₃₀置換アルキル、C₁～C₃₀アルケニル、C₁～C₃₀置換アルケニルおよびC₅～C₁₂糖からなる群から選択され；R₂は、水素、ヒドロキシ基、メトキシ基、およびアルコキシ基からなる群から選択され；R₃は、水素、ヒドロキシ基、メトキシ基、エトキシ基、およびアルコキシ基からなる群から選択され；R₄は、水素、ヒドロキシ基およびアルコキシ基からなる群から選択され；R₅は、水素、ヒドロキシル、カルボニル、アルコキシおよび結合からなる群から選択され；R₆は、C₁～C₄₀アルキル、C₁～C₄₀置換アルキル、C₁～C₄₀アルケニル、C₁～C₄₀置換アルケニルおよびC₁～C₄₀アルキニル（alkynyl）からなる群から選択され；R₇は、C₁～C₄₀アルキル、C₁～C₄₀置換アルキル、C₁～C₄₀アルケニル、C₁～C₄₀置換アルケニルおよびC₁～C₄₀アルキニル（alkynyl）からなる群から選択され；そしてR₈は、水素、ヒドロキシル基、カルボニル、アルコキシ基および結合からなる群から選択される。

30

【0149】

いくつかの実施例によれば、患者におけるI型NK細胞媒介組織損傷を阻害する方法が提供されている。この方法は、患者に有効量のRARアゴニストを投与するステップを具え、I型NK細胞の活性化が低減される。いくつかの実施例では、この組織が肝臓組織である。いくつかの実施例では、I型NK細胞活性がIL-4分泌である。いくつかの実施例では、RARアゴニストが、タザロテン、ATRA、又はイソトレチノインからなる群から選択される。いくつかの実施例では、RARアゴニストがRAR-β2アゴニストである。

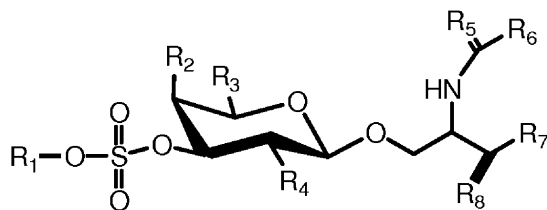
40

【0150】

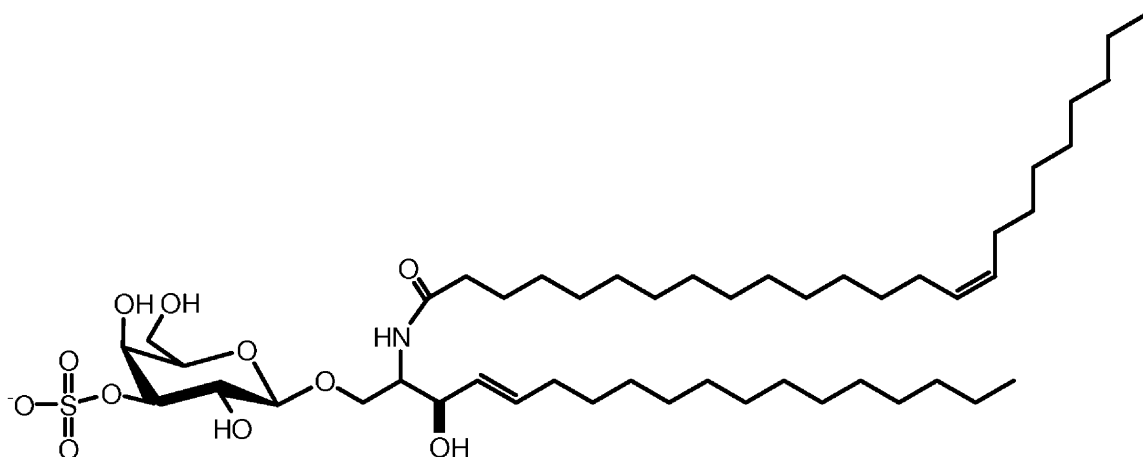
いくつかの実施例によれば、患者におけるI型NK細胞媒介組織損傷を阻害する方法が提供されている。この方法は、I型NK細胞の活性化に十分な量のスルファチドを

50

患者に投与するステップを具え、I型NK細胞の活性が低減される。いくつかの実施例では、このスルファチドが以下の化学式：



を有し、式中、 R_1 は、結合、水素、 $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{30}$ 置換アルキル、 $C_1 \sim C_{30}$ アルケニル、 $C_1 \sim C_{30}$ 置換アルケニルおよび $C_5 \sim C_{12}$ 糖からなる群から選択され； R_2 は、水素、ヒドロキシ基、メトキシ基、およびアルコキシ基からなる群から選択され； R_3 は、水素、ヒドロキシ基、メトキシ基、エトキシ基、およびアルコキシ基からなる群から選択され； R_4 は、水素、ヒドロキシ基およびアルコキシ基からなる群から選択され； R_5 は、水素、ヒドロキシル、カルボニル、アルコキシおよび結合からなる群から選択され； R_6 は、 $C_1 \sim C_{40}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ アルケニル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルケニルおよび $C_1 \sim C_{40}$ アルキニル (alkynyl) からなる群から選択され； R_7 は、 $C_1 \sim C_{40}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルキル、 $C_1 \sim C_{40}$ アルケニル、 $C_1 \sim C_{40}$ 置換アルケニルおよび $C_1 \sim C_{40}$ アルキニル (alkynyl) からなる群から選択され；そして R_8 は、水素、ヒドロキシル基、カルボニル、アルコキシ基および結合からなる群から選択される。いくつかの実施例では、このスルファチドが以下の化学構造を有する：



【0151】

いくつかの実施例では、患者における少なくとも一の炎症状態を治療する又は阻害する方法が提供されている。この方法は、有効量のスルファチドとレチノイドの組み合わせを投与するステップを具える。

【0152】

いくつかの実施例では、I型NK細胞の活性化を阻害する方法が提供されている。この方法は、有効量のレチノイドをI型NK細胞に接触させるステップを具える。

【0153】

いくつかの実施例では、炎症性疾患を持つ患者におけるI型NK細胞の活性化を阻害する方法が提供されている。この方法は、有効量のスルファチドとレチノイドの組み合わせを患者に投与するステップを具える。

【0154】

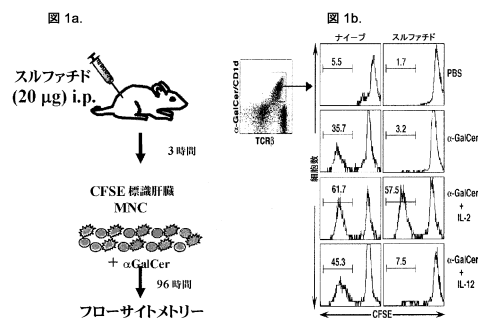
いくつかの実施例では、患者の肝臓への骨髓細胞の放出を阻害する方法が提供されてい

る。この方法は、有効量のレチノイドを患者に投与するステップを具える。

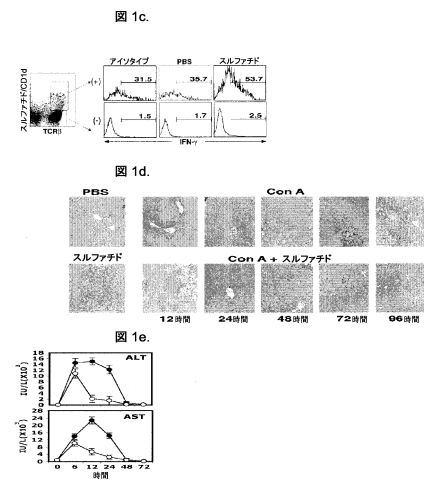
【0155】

いくつかの実施例では、患者の肝臓への骨髄細胞の放出を阻害する方法が提供されている。この方法は、有効量のスルファチドとレチノイドの組み合わせを患者に投与するステップを具える。

【図1-1】



【図1-2】



【図 2 - 1】

図 2a.

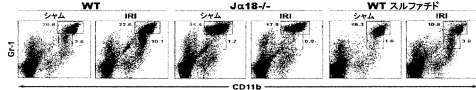
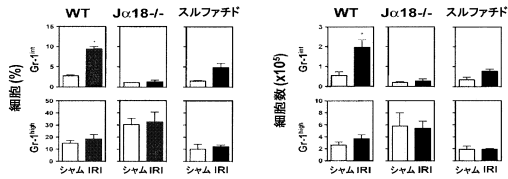
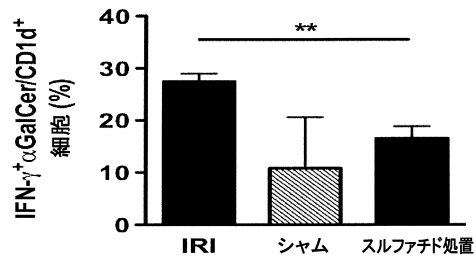


図 2b.



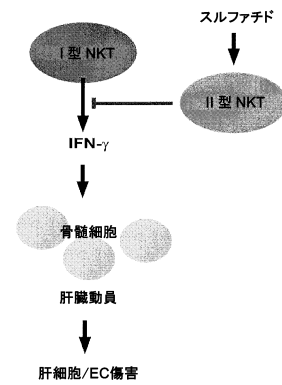
【図 2 - 2】

図 2c.



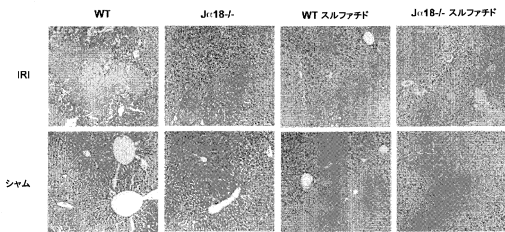
【図 3】

図 3



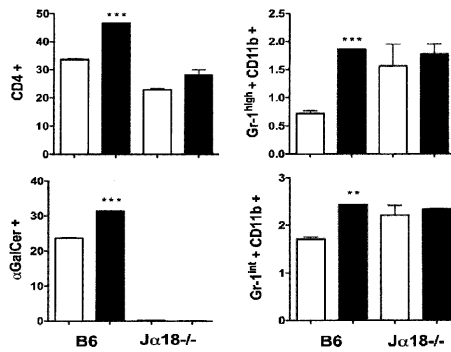
【図 4】

図 4



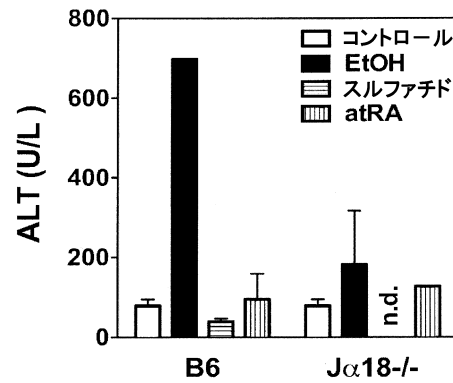
【図 5】

Figure 5



【図 6】

図 6

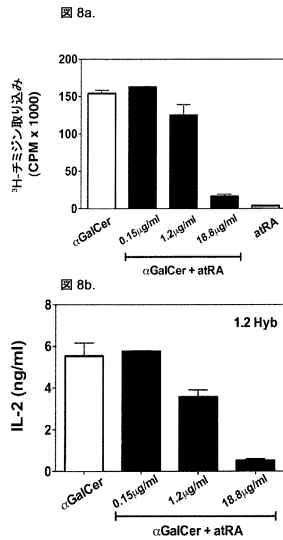


【図 7】

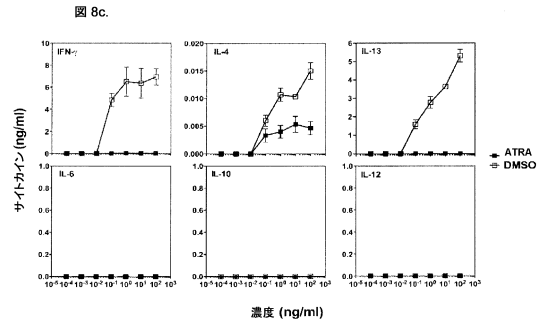
図 7



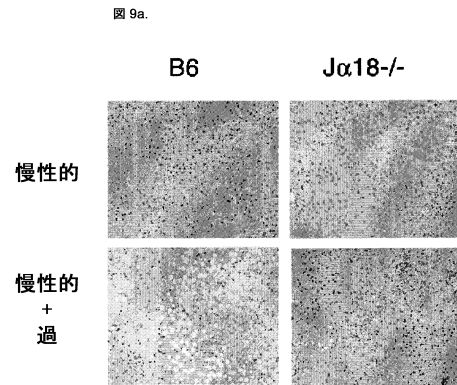
【図 8 - 1】



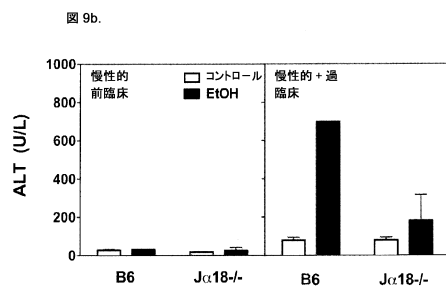
【図 8 - 2】



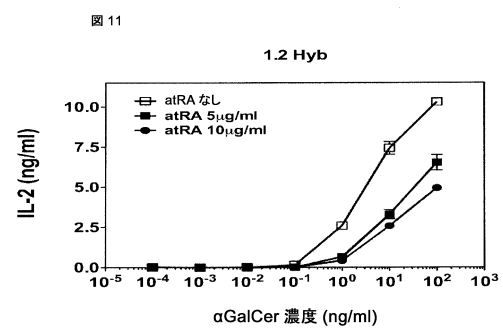
【図 9 - 1】



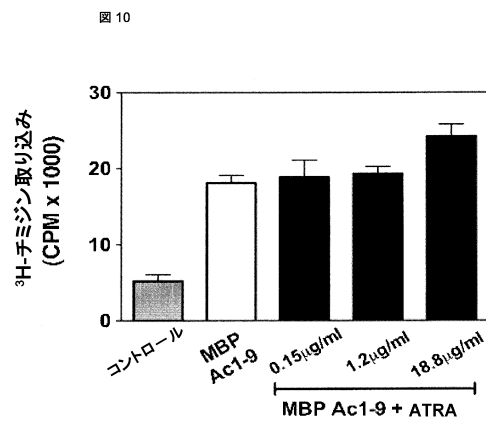
【図 9 - 2】



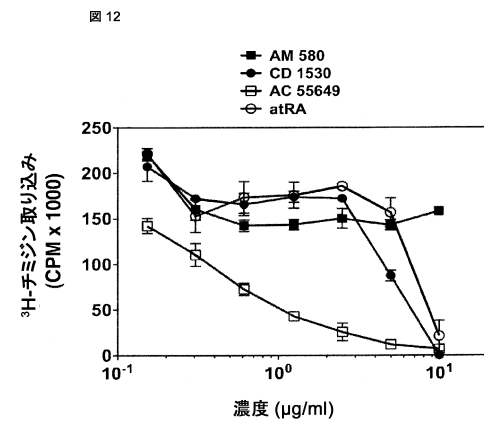
【図 1 1】



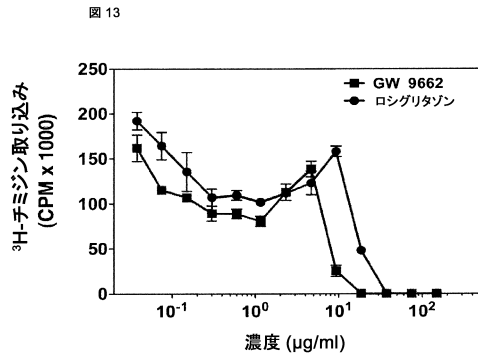
【図 1 0】



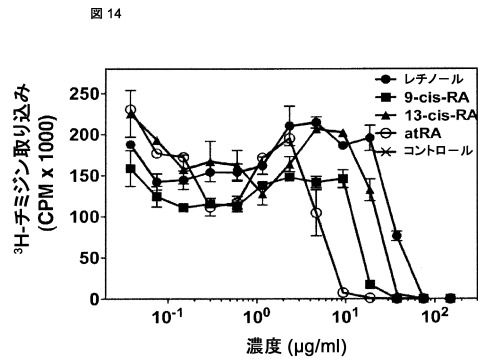
【図 1 2】



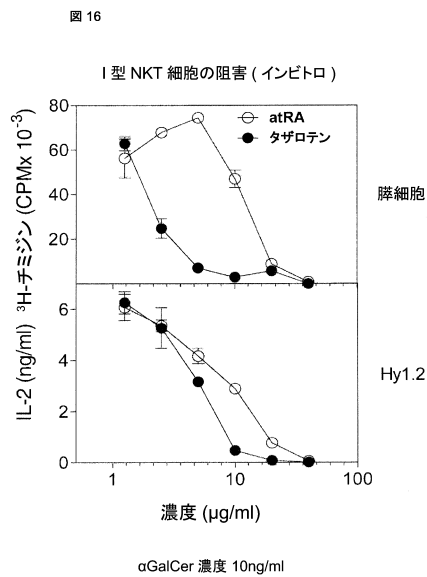
【図 13】



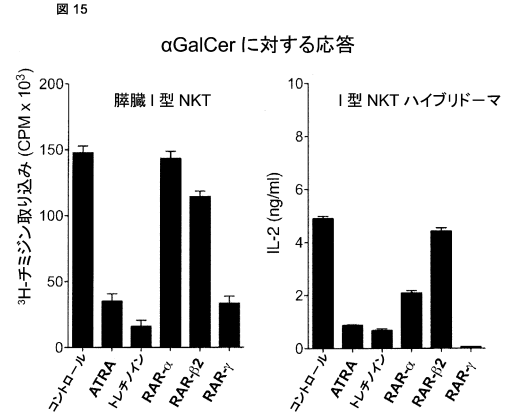
【図 14】



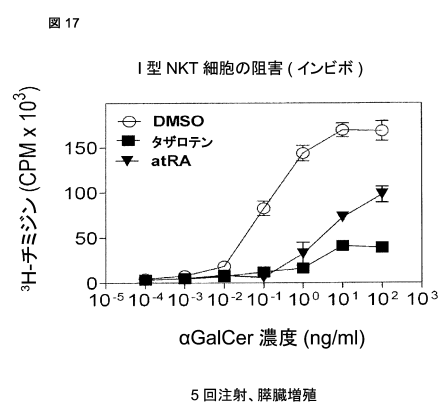
【図 16】



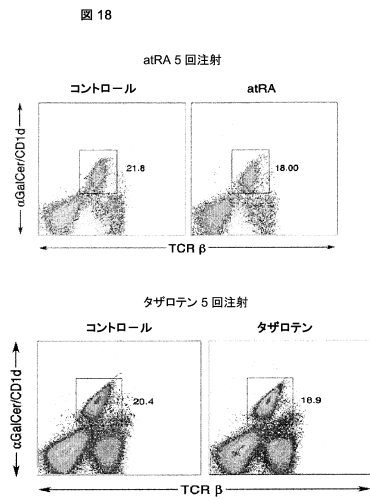
【図 15】



【図 17】



【図 18】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
			A 6 1 P	43/00	1 2 1

合議体

審判長 蔵野 雅昭

審判官 穴吹 智子

審判官 浅野 美奈

- (56)参考文献 特表平11-501661 (JP, A)
 特表2009-510124 (JP, A)
 特開平7-278176 (JP, A)
 特開平8-333318 (JP, A)
 Br. J. Dermatol., 1996年, Vol. 135, pp. 18-25

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 3 / 4 4
 A 6 1 K 4 5 / 0 0 - 4 5 / 0 8
 REGISTRY
 CAPLUS
 MEDLINE
 BIOSIS
 EMBASE
 JSTPlus
 JMedPlus
 JST7580