(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103732231 B
(45)授权公告日 2020.04.10

(21)申请号 201280039650.6

(22)申请日 2012.06.22

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103732231 A

(43)申请公布日 2014.04.16

(30)优先权数据
61/501,139 2011.06.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.02.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/043875 2012.06.22

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/178108 EN 2012.12.27

(73)专利权人 格里生物公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 维品·库马尔·查图尔维迪

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270
代理人 武晨燕 张颖玲

(51)Int.Cl.
A61K 31/7024(2006.01)

(56)对比文件
CN 1203528 A,1998.12.30,权利要求1、6-9、11.

Bin Gao, et al..Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases.《Journal of Leukocyte Biology》.2009,第86卷513-528.

C HAGER, et al..Tazarotene 0.1% gel is associated with alterations in markers of epidermal differentiation and inflammation in psoriatic plaques.《THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY》.1997,第108卷(第4期),656.

审查员 郑茹

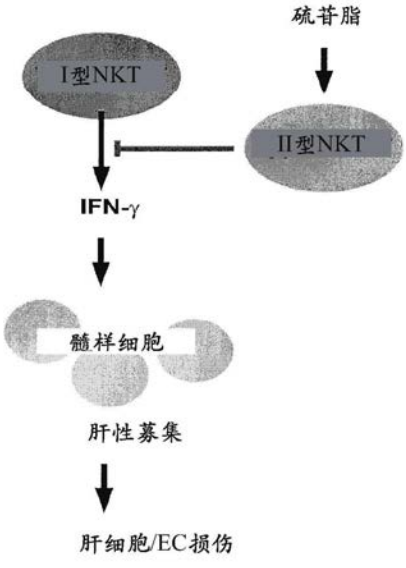
权利要求书1页 说明书27页 附图14页

(54)发明名称

炎性病症的预防和治疗

(57)摘要

在此的实施例涉及用于预防和治疗炎性病症诸如酒精性肝病(ALD)的方法。更确切地说,在此的实施例涉及通过给予一种视黄酸受体(RAR)激动剂来预防和治疗ALD。一些实施例涉及他扎罗汀在预防和治疗酒精诱发性肝损伤、酒精相关性肝病、脂肪性肝病、肝性脂肪变性、酒精性肝炎或酒精性肝硬化中的用途。



CN 103732231 B

1.包括他扎罗汀的RARγ激动剂在制备用于治疗或预防肝的炎性病症的药物中的应用,所述炎性病症选自由酒精性脂肪性肝病、酒精诱发性肝炎组成的组,所述药物包括有效抑制I型NKT细胞的激活的一个量的所述RARγ激动剂。

2.如权利要求1所述的应用,其中所述炎性病症是酒精性脂肪性肝病。

3.如权利要求1所述的应用,其中所述炎性病症是酒精性肝炎。

4.包括他扎罗汀的RARγ激动剂在制备用于治疗或预防炎性病症或自身免疫性或免疫相关性疾病或失调的药物中的应用,所述炎性病症或自身免疫性或免疫相关性疾病或失调包括如下病症的至少一种:酒精诱发性肝损伤或酒精相关性肝病;所述药物包括有效降低I型NKT细胞的活性的一个量的所述RARγ激动剂。

5.如权利要求4所述的应用,其中所述炎性病症或自身免疫性或免疫相关性疾病或失调包括酒精相关性肝病。

6.如权利要求4所述的应用,其中所述炎性病症或自身免疫性或免疫相关性疾病或失调包括酒精性肝硬化。

7.如权利要求4所述的应用,其中所述炎性病症或自身免疫性或免疫相关性疾病或失调包括酒精性肝炎。

8.如权利要求4所述的应用,其中所述I型NKT细胞的活性包括IL-4分泌。

9.包括他扎罗汀的RARγ激动剂在制备用于治疗或预防酒精性肝病的药物中的应用,所述药物包括有效抑制I型NKT细胞的活性和抑制髓样细胞释放进入患者的肝中的一个量的所述RARγ激动剂。

10.如权利要求1-9中任一项所述的应用,其中,所述RARγ激动剂由他扎罗汀组成。

11.如权利要求1-9中任一项所述的应用,其中,他扎罗汀的有效量是1mg至50mg,并且其中,该药物是用于每日给药。

炎性病症的预防和治疗

技术领域

[0001] 在此的实施例涉及用于在肝的炎性病症的预防和治疗中对视黄酸受体(RAR)进行调节的组合物和方法。

背景技术

[0002] 在西方世界,过量饮酒是肝病的一个主要原因。在一天饮用四份或更多份酒精饮料(对男性来说,四份12盎司的啤酒、四杯葡萄酒或四盎司烈性酒,或对女性来说,那个量的一半)的个体中,观察到了肝损伤的证据。尽管尚未完全理解酒精如何损害肝,长期饮酒导致促炎细胞因子(TNF-α、IL6以及IL8)的分泌、氧化应激、脂质过氧化以及乙醛毒性,导致肝细胞的炎症、凋亡并最终纤维化。

[0003] 酒精性肝病(ALD)具有三个主要阶段:酒精性脂肪性肝病、酒精性肝炎以及肝硬化。酒精性脂肪性肝病,其特征为脂肪酸在肝中的累积,通常是无症状的和可逆的,如果该个体戒酒两周的话。在严重的情况下,可能经历虚弱、恶心、腹痛、食欲不振和不适。尽管大多数重度饮酒者表现出某种水平的脂肪性肝病,在一些情况下,大量饮酒只需要在不到一周的一个时间段中每天发生,五名重度饮酒者中只有一名发展酒精性肝炎,并且四名中有一名发展肝硬化。酒精性肝炎的特征在于肝细胞的炎症,并且一般而言,通过戒酒是可逆的。肝硬化一般而言是不可逆的,其特征在于炎症、纤维化(细胞硬化)以及受损的膜,它们阻止了机体内化学物质的排毒,以瘢痕形成和坏死告终。

[0004] 对潜藏于酒精性肝病中肝组织损害不同阶段中的细胞和分子机制了解甚少。尽管在若干领域已经取得进展,一种阻止此疾病的有效治疗方法仍然是缺少的。这部分地归因于以下事实:肝在免疫学上连同在解剖学上是一种独特的器官。例如,当肝实质细胞具有代谢功能时,非实质细胞执行免疫功能。除了实质肝细胞以外,肝包含若干非实质细胞诸如LSEC、库普弗细胞、树突细胞、NK细胞以及NKT细胞,这些非实质细胞全部能够参与免疫。免疫应答如何被精心策划以给出对酒精诱发性损害的耐受或免疫性是未知的。

发明内容

[0005] 在此的实施例一般而言涉及用于对先天免疫系统进行调节以预防和治疗与炎性病症相关联的组织损害的方法和组合物。例如,在本文中所描述的若干实施例涉及通过调节先天免疫系统对酒精性肝病(ALD)进行的预防和治疗。

[0006] 在本文中所描述的若干实施例涉及用于对I型NKT细胞和II型NKT细胞的活性、I型和II型NKT细胞之间的相互作用以及它们与其他肝细胞的相互作用进行操纵以便治疗、减轻或预防与炎症相关联的对肝的损伤的方法和组合物。在一些实施例中,这种与炎症相关联的损伤是一种酒精诱发性肝损伤。在一些实施例中,该酒精诱发性肝损伤是酒精相关性肝病、脂肪性肝病、肝性脂肪变性、酒精性肝炎或酒精性肝硬化。

[0007] 若干实施例涉及一种通过抑制I型NKT细胞活性对过量饮酒之后的炎性诱发性肝损害进行预防、缓解或治疗的方法。在一些实施例中,促炎I型NKT细胞活性被一种或多种选

自下组的RAR激动剂所抑制，该组由以下各项组成：ATRA、视黄醇、9-顺式-RA或13-顺式-RA、维甲酸、AM580、AC55649、CD1530以及他扎罗汀。在一些实施例中，促炎I型NKT细胞活性被一种或多种聚烯烃型类视黄醇诸如异维甲酸和阿维A所抑制。在一些实施例中，促炎I型NKT细胞活性被一种或多种选自下组的RAR激动剂所抑制，该组由以下各项组成：阿维A酯、阿维A和异维甲酸。若干实施例涉及通过他扎罗汀、他扎罗汀酸或其一种混合物对促炎I型NKT细胞活性进行的抑制。在一些实施例中，通过激活2型NKT细胞来抑制促炎I型NKT细胞活性。在一些实施例中，炎性I型NKT细胞活性被一种或多种硫苷脂所抑制。

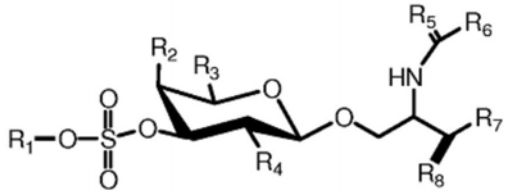
[0008] 本披露的一些实施例与这些先天免疫机制有关，这些先天免疫机制引起饮酒之后的、与饮酒有关的或由饮酒导致的肝损伤。一些实施例涉及对这些细胞之间的相互作用进行操纵，这些细胞自然地提供对肠源性抗原或代谢物衍生的抗原的耐受性，并且同时提供针对非自身经识别的病原的免疫性。

[0009] 一些实施例涉及一种靶向I型和II型NKT细胞两者的联合治疗方法，以用于开发一种有效的治疗法从而治疗、预防或缓解与炎性病症相关联的组织损害。在一些实施例中，一种RAR激动剂用于直接抑制1型NKT细胞活性，并且一种硫苷脂用于激活II型NKT细胞活性。

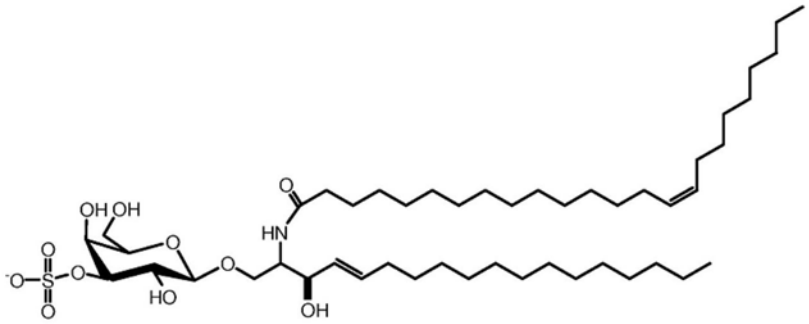
[0010] 一些实施例涉及通过给予全反式维甲酸(ATRA)来预防和治疗与ALD相关联的组织损害。若干实施例涉及ATRA在预防和治疗酒精诱发性肝损伤、酒精相关性肝病、脂肪性肝病、肝性脂肪变性、酒精性肝炎或酒精性肝硬化中的用途。

[0011] 一些实施例涉及通过给予他扎罗汀、他扎罗汀酸或其混合物来预防和治疗与ALD相关联的组织损害。若干实施例涉及他扎罗汀、他扎罗汀酸或其混合物在预防和治疗酒精诱发性肝损伤、酒精相关性肝病、脂肪性肝病、肝性脂肪变性、酒精性肝炎或酒精性肝硬化中的用途。

[0012] 一些实施例涉及通过给予一种或多种硫苷脂来预防和治疗与炎性相关联的组织损害。若干实施例涉及硫苷脂在预防和治疗酒精诱发性肝损伤、酒精相关性肝病、脂肪性肝病、肝性脂肪变性、酒精性肝炎或酒精性肝硬化中的用途。在一些实施例中，该硫苷脂具有以下化学结构：

[0013] 

[0014] 其中R_1是选自下组，该组由以下各项组成：键、氢、C_1至C_{30}烷基、C_1至C_{30}经取代的烷基、C_1至C_{30}烯基、C_1至C_{30}经取代的烯基以及C_5至C_{12}糖；R_2是选自下组，该组由以下各项组成：氢、羟基基团、甲氧基基团以及烷氧基基团；R_3是选自下组，该组由以下各项组成：氢、羟基基团、甲氧基基团、乙氧基基团以及烷氧基基团；R_4是选自下组，该组由以下各项组成：氢、羟基基团以及烷氧基基团；R_5是选自下组，该组由以下各项组成：氢、羟基、羰基、烷氧基以及键；R_6是选自下组，该组由以下各项组成：C_1至C_{40}烷基、C_1至C_{40}经取代的烷基、C_1至C_{40}烯基、C_1至C_{40}经取代的烯基以及C_1至C_{40}炔基；R_7是选自下组，该组由以下各项组成：C_1至C_{40}烷基、C_1至C_{40}经取代的烷基、C_1至C_{40}烯基、C_1至C_{40}经取代的烯基以及C_1至C_{40}炔基；以及R_8是选自下组，该组由以下各项组成：氢、羟基基团、羰基、烷氧基基团以及键。在一些实施例中，该硫苷脂具有以下化学结构：

[0015] 

[0016] 一些实施例涉及通过激活的硫苷脂反应性II型NKT细胞对I型NKT细胞进行的调节。若干实施例涉及在介导保护免受自身免疫病以及抑制抗肿瘤免疫性中经激活的硫苷脂反应性II型NKT细胞对I型NKT细胞的调节作用。

附图说明

[0017] 图1a描绘了一种方法学，通过该方法学确定在肝中硫苷脂对I型NKT的作用。图1b显示了两个独立实验的代表性数据，这两个独立实验在10ng/ml IL-2的存在或不存在下对响应于一种体外αGalCer挑战的细胞增殖进行测量。图1c显示了为了在注射20μg硫苷脂之后鉴定IFN-γ+细胞而进行的肝中硫苷脂/CD1d-四聚体+和四聚体-群体的细胞质内染色的结果。托架形(bracket)上方的数值指示在注射PBS或硫苷脂的小鼠中的百分比阳性细胞。图1d显示了在单用ConA(顶行)或用ConA加牛脑硫苷脂硫苷脂(底行)的治疗之后，在12-96小时取自小鼠的代表性的经苏木素和伊红(H和E)染色的肝切片的显微图(X200)。左下方显示了来自一只单独注射了硫苷脂的对照小鼠的一个经H和E染色的肝切片的一张代表性显微图。图1e显示了对在IL-12p40+/+小鼠中在ConA(实心符号)或ConA加硫苷脂(非实心符号)注射之后不同时间点的丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平进行描绘的图。值为每组5只小鼠的平均值±SD。$P<0.001$。

[0018] 图2a显示了从经受了假外科手术或缺血性再灌注损伤(IRI)的野生型(WT)、Jα18-/-突变型和经硫苷脂处理的WT小鼠的向头侧肝叶中分离的表达Gr-1/CD11b的细胞的流式图。这些方框显示了在图2b中所分析的这些$Gr\text{-}1^{high}$和$Gr\text{-}1^{int}$群体。方框旁边的数值指示肝白细胞中的百分比阳性细胞。图2b显示了对流式细胞术分析进行总结的条形图。左侧图描绘了百分比，而右侧图描绘了这些$Gr\text{-}1^{high}$和$Gr\text{-}1^{int}$群体的绝对数值。值为平均值±SEM。*$p<0.005$。图2c显示了对在IRI、假的以及经硫苷脂处理的IRI小鼠的肝中百分比IFN-γ+αGalCer/CDld-四聚体+细胞进行描绘的一幅图。值为平均值±SEM。$P<0.01$。

[0019] 图3描绘了一种用于硫苷脂介导I型和II型NKT细胞活性的模型。根据该模型，硫苷脂促进II型NKT细胞的激活，这些II型NKT细胞转而使I型NKT细胞失活。对IFN-γ分泌的抑制是作为对I型NKT细胞的抑制的例证，导致髓样细胞、颗粒细胞的肝募集的降低，并且因此导致肝细胞和内皮细胞损伤的降低。

[0020] 图4显示了来自经受了90分钟的肝缺血随后是24小时的再灌注的小鼠(IRI)(顶行)和经受了假外科手术的小鼠(假)(底行)的向头侧肝叶的经H和E染色的组织在100X放大率下的代表性显微图。从左至右，这些图显示了来自未经处理的WT、未经处理的$J\alpha18^{-/-}$、经硫苷脂处理的WT以及经硫苷脂处理的$J\alpha18^{-/-}$小鼠的组织。

[0021] 图5显示了对在用一种包含5％乙醇的液体利伯-德卡利(Lieber-Decarli)饮食或

包含相似数值的卡路里的对照饮食饲喂5周之后从雄性BL/6WT或Jα18-/-小鼠的组(每组中4只)中分离的肝MNC的流式细胞术分析进行总结的图。P值<0.005。在WT而不是Jα18-/-小鼠的肝中观察到了经激活的I型NKT细胞和CD11b+Gr-1+髓样细胞的累积。

[0022] 图6显示了对用20微克/小鼠的硫苷脂(d-1和d10)(用水平线画阴影的条形(硫苷脂))、0.3毫克/动物的ATRA(d6至d10)(用竖直线画阴影的条形(atRA))或媒介物/DMSO(实心阴影条形(EtOH))注射(i.p.)的并且用包含乙醇的利伯-德卡利液体饮食饲喂的WT(B6)和Jα18$^{-/-}$小鼠中的血清ALT水平进行描绘的一幅条形图。对这些对照组(无阴影条形)饲喂了一种等热量对照饮食。P值<0.05。

[0023] 图7显示了在长期的加无节制的乙醇饲喂之后从经媒介物/DMSO、硫苷脂和ATRA处理的小鼠中收获的肝组织的代表性显微图(X200)。来自媒介物/DMSO小鼠的肝组织显示了肝性脂肪性肝炎(脂肪性肝病)的证据,而从经硫苷脂和ATRA处理的小鼠中获得的肝组织显现相对正常。

[0024] 图8a显示了对在单用的αGalCer中、单用的ATRA中或在αGalCer与水平不断提高的ATRA中孵育的新鲜分离的I型NKT脾细胞的增殖(如通过[^{3}H]-胸苷掺入来测量的)进行描绘的一幅条形图。图8b显示了对响应于单用的αGalCer或αGalCer与不断提高的ATRA水平,一种I型NKT细胞(Hyl.2)所进行的IL-2细胞因子分泌的水平进行描绘的一幅图。图8c显示了对从用DMSO或ATRA注射的并且用αGalCer体外孵育的小鼠中收获的肝I型NKT细胞所进行的IFN-γ、IL-4、IL-13、IL-6、IL-10以及IL-12细胞因子分泌的水平进行描绘的图。所显示的这些数据代表2次单独实验。

[0025] 图9a显示了在长期的(10天,在液体利伯-德卡利饮食中5%乙醇)或长期的加无节制的饲喂(十天的液体饮食长期饲喂,随后单次管饲5g/kg乙醇)之后从雄性BL/6和Jα18-/-小鼠中收获的经H和E染色的肝组织的代表性显微图(X200)。图9b显示了对在长期的或长期的加无节制的饲喂之后,在对照或经乙醇饲喂的雄性BL/6或Jα18-/-小鼠中的血清ALT水平进行描绘的图。

[0026] 图10显示了对响应于用单用的MBPAc1-9或MBPAc1-9与缓变浓度的ATRA(0.15,1.2,18g/ml)的刺激,从初试B10.PL VB8.2TCR转基因小鼠中分离的新鲜分离的髓磷脂碱性蛋白MBPAc1-9-反应性CD4+T细胞的增殖(如通过[^{3}H]-胸苷掺入来测量的)进行描绘的一幅条形图。

[0027] 图11显示了对由在体外用缓变浓度的脂质抗原αGalCer以及0、5或10μg/ml的ATRA培养24小时的I型NKT细胞(Hyl.2)所分泌的IL-2的水平进行描绘的一幅图。

[0028] 图12显示了对新鲜分离的I型NKT脾细胞的增殖(如通过[^{3}H]-胸苷掺入来测量的)进行描绘的一幅图,这些新鲜分离的I型NKT脾细胞是在αGalCer和缓变浓度的ATRA、一种RARα的激动剂(AM580)、一种RARβ2的激动剂(AC55649)或一种RARγ的激动剂(CD1530)的存在下培养的。

[0029] 图13显示了对新鲜分离的I型NKT脾细胞的增殖(如通过[^{3}H]-胸苷掺入来测量的)进行描绘的一幅图,这些新鲜分离的I型NKT脾细胞是在αGalCer和缓变浓度的一种PPAR-γ的激动剂(罗格列酮)或一种PPAR-γ的拮抗剂(GW9662)的存在下培养的。

[0030] 图14显示了对新鲜分离的I型NKT脾细胞的增殖(如通过[^{3}H]-胸苷掺入来测量的)进行描绘的一幅图,这些新鲜分离的I型NKT脾细胞是在αGalCer和缓变浓度的ATRA、不同视

黄酸类似物、视黄醇或维生素A的存在下培养的。

[0031] 图15显示了对新鲜分离的I型NKT脾细胞(左)或I型NKT细胞杂交瘤(1.2Hyb)的增殖(如通过[^{3}H]-胸苷掺入来测量的)进行描绘的条形图,这些新鲜分离的I型NKT脾细胞或I型NKT细胞杂交瘤是在最佳浓度的αGalCer(10ng/ml)和最佳浓度的ATRA、维甲酸、一种RARα的激动剂(AM580)、一种RARβ2的激动剂(AC55649)或一种RARγ的激动剂(CD1530)的存在下培养的。这些图代表3次独立实验的数据。

[0032] 图16显示了对新鲜分离的脾细胞的体外增殖(顶部图)或I型NKT细胞杂交瘤(1.2Hyb)的细胞因子释放测定(底部图)的结果进行描绘的图,这些新鲜分离的脾细胞或I型NKT细胞杂交瘤是用最佳浓度的αGalCer(10ng/ml)在浓度不断提高的ATRA或选择性RARγ激动剂他扎罗汀的存在下培养的。他扎罗汀显示了相比于ATRA对I型NKT细胞更好的抑制。

[0033] 图17显示了对从小鼠中分离的I型NKT细胞的一种体外增殖测定的结果进行描绘的一幅图,这些小鼠用他扎罗汀、ATRA或DMSO(对照)进行了处理并且用经滴定的浓度的αGalCer进行了刺激。

[0034] 图18显示了通过流式细胞术对从用ATRA、他扎罗汀或DMSO(对照)注射的小鼠的肝中分离的并且用αGalCer/CD1d-四聚体和泛抗TCRβ链抗体染色的单核细胞进行的分析。I型NKT细胞由一个方框指示。在对照中相比于在给予ATRA或他扎罗汀的动物中,在I型NKT细胞的数值(挨着该方框显示)上没有显著差异。

具体实施方式

[0035] 肝聚藏着先天免疫系统的很多特化细胞,包括库普弗细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞以及树突细胞。NKT细胞是独特的,因为它们共享NK细胞的细胞表面受体(例如NK1.1),并且还表达T细胞受体(TCR),使它们能够在CD 1d分子的背景下识别脂质抗原并且连接先天免疫应答与适应性免疫。NKT细胞具有对造成组织炎症和相关联的细胞损害的其他细胞的活性进行调节的能力。一旦激活,NKT细胞快速分泌大量IFN-γ、IL-4、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子连同多种其他细胞因子和趋化因子。既然NKT细胞能够分泌Th1和Th2细胞因子两者,难以预测NKT细胞体内激活的后果。取决于背景,NKT细胞激活触发了事件的级联,这些事件的级联促进或抑制不同的免疫应答。在一些背景下,NKT细胞的激活导致NK细胞、树突细胞(DC)和B细胞的激活。

[0036] NKT细胞识别呈递于单态MHC I类样分子CD 1d背景下的脂质抗原。CD1d限制性NKT细胞被分类为I型和II型,它们识别通过CD 1d分子呈递的不同脂质抗原。尽管两种NKT细胞子集都主要是NK1.1+(小鼠)或CD161+/CD56+(人),它们的相对数值在小鼠和人中是不同的:因此,尽管I型NKT细胞在小鼠中占多数,该II型NKT细胞子集在人中占多数。

[0037] I型,也称为恒定型NKT细胞,表达一种在小鼠中的特征在于Vα14-Jα18和Vβ8.2、Vβ7或Vβ2,或在人中的特征在于Vα24-JαQ和Vβ11的半恒定型T细胞受体(TCR),与海生海绵源性糖脂α-半乳糖神经酰胺(αGalCer)具有强反应性,并且在流式细胞术中通过αGalCer/CD1d-四聚体进行鉴定。I型NKT细胞还识别基于脂质的抗原,诸如细菌源性脂类以及一种自糖脂,异红细胞三糖基神经酰胺(iGb3)。I型NKT细胞展示出记忆标记物,并且在对针对细胞因子的预先形成的mRNA进行存储中是独特的。缺少Jα18基因的小鼠(Jα18小鼠)仅在I型NKT细胞上是缺陷的。

[0038] 不同于I型NKT细胞，II型NKT细胞是调节细胞，这些调节细胞能够对若干其他细胞子集，包括I型NKT细胞的活性进行调节。II型NKT细胞在两种小鼠中以及在人中识别自糖脂，即硫苷脂(3'-磺酰化半乳糖基神经酰胺)。II型NKT细胞的一个能够在流式细胞术中使用硫苷脂/CD1d-四聚体而被鉴定的主要子集，主要利用Vβ8.1/Vβ3.1-Jβ2.7和Vα1/Vα3-Jα7基因区段，并且对硫苷脂类是反应性的。能够通过评价II型NKT细胞对一种候选剂的体外增殖性响应，连同通过评价出自针对IFN-γ、IL-4或IL-13的细胞内细胞因子染色或实时PCR的C069表达和细胞因子分泌特性来评估对II型NKT细胞的激活。另外，能够通过使用对αGalCer/CO 1d-四聚体细胞的CF8E-稀释分析和细胞内细胞因子染色来评价I型NKT细胞对αGalCer(I型NKT细胞的一种强效激活剂)的增殖性响应来评估经激活的II型NKT细胞使I型NKT细胞无反应性的能力。

[0039] 在缺血性再灌注损伤和伴刀豆球蛋白A诱发性肝炎之后肝中的I型和II型NKT细胞活性

[0040] 再灌注损伤发生于在一个时间段的缺血之后血供给恢复至一种器官或组织时。肝性再灌注损伤一般而言与外科手术或外伤结合而发生，并且在肝移植之后的移植组织的质量和功能中起主要作用。缺血性再灌注损伤(IRI)的发展发生于至少两个阶段中：一个初期(从大约1至大约6小时的再灌注之后)，该初期以库普弗细胞激活、活性氧簇的释放、$CD4^+$细胞募集以及促炎细胞因子的分泌占主导，以及一个后期(该初期之后，从大约6至大约48小时的再灌注)，该后期特征在于嗜中性细胞累积以及诱发坏死。如在图2a中所示，在野生型(WT)小鼠中，一种包括髓样前体细胞和单核细胞的髓样($CD11b^+$)细胞子集$CD11b^+Gr\text{-}1^{int}$，在缺血和再灌注损伤的早期阶段被募集到经再灌注的组织中。募集髓样细胞而不是嗜中性细胞，诸如该$CD11b^+Gr\text{-}1^{int}$子集，表明通过将炎性单核细胞募集到经再灌注的组织中，增强了损伤。

[0041] 在缺血性再灌注之后，I型NKT细胞也变得被激活，并且分泌IFN-γ。见图2c。通过比较野生型(WT)和$Jα18^{-/-}$小鼠的肝，对I型NKT细胞在IRI中的作用进行了评估，这些$Jα18^{-/-}$小鼠缺少I型NKT细胞但是具有正常水平的II型NKT细胞。如在图4中所示，在90分钟的缺血和24小时的再灌注之后，WT小鼠的向头侧肝叶具有大坏死区，而相比之下在I型NKT细胞缺陷的小鼠($Jα18^{-/-}$小鼠)中坏死区是显著减少的。这指示I型NKT细胞在介导肝性缺血和再灌注损伤中的一种致病作用。

[0042] 经硫苷脂激活的NKT-2细胞对NKT-1细胞的影响

[0043] 如在美国专利号8044,029和美国专利申请号12/938,315(特此通过引用以其全文结合)中所描述的，给予一种自糖脂配体硫苷脂连同合成的硫苷脂类似物，调节了I型和II型NKT细胞的活性。对硫苷脂的CD 1d依赖性识别激活了II型NKT细胞，并且主要是浆细胞样树突细胞(pDC)，而不是常规的树突细胞(cDC)群体(正常来说由1型NKT细胞激活)，导致I型NKT细胞以一种IL-12和MIP2依赖性方式快速募集到肝中。然而，这些经募集的I型NKT细胞没有被激活，不分泌细胞因子，并且变得无反应性。

[0044] 在给予硫苷脂之后，在体内参与免疫调节机制的细胞事件显示于图1中。硫苷脂的给予a)抑制了响应于出自αGalCer的刺激的I型NKT细胞的体外增殖(图1b)并且b)提高了用细胞质内IFN-γ染色的硫苷脂/CD 1d-四聚体+细胞的百分比(图1c)。

[0045] 相比于未经处理的动物，肝I型NKT细胞在缺血和再灌注损伤的早期阶段期间对

IFN-γ的分泌在接受硫苷脂的小鼠中是显著降低的。见图2c。另外，与在Jα18$^{-/-}$小鼠中不存在I型NKT细胞时的情况一样，缺血/再灌注之后的肝损伤在用硫苷脂处理的小鼠中是显著降低的。见图4。这指示I型NKT细胞在介导肝性缺血和再灌注损伤中的一种致病作用。由I型NKT细胞分泌IFN-γ的作用可能是缺血性器官损伤的一种共同特征，因为在缺少1型NKT的Jα18$^{-/-}$小鼠中，肾缺血和再灌注损伤也是减弱的。

[0046] 与IRI相似，给予硫苷脂保护了免受伴刀豆球蛋白A(Con A)诱发性肝炎，如通过降低的肝细胞坏死(见图1d)，以及丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)(肝细胞损害的标记物)的降低的血清水平(见图1e)所指示的。这指示I型NKT细胞在ConA诱发性肝炎中的一种致病作用。

[0047] 总的来说，来自肝损害、IRI和ConA诱发性肝炎的两种模型的数据与一种免疫调节途径一致，在该免疫调节途径中在从不同原因引起的肝脏炎症中I型NKT细胞起一种不利作用，而硫苷脂反应性II型NKT细胞起一种保护性作用。这样的保护与I型NKT细胞分泌细胞因子的抑制(经抑制的表型)以及在未成熟髓样细胞(CD 11b+Gr-1+)CD 11b+Gr-1-和NK细胞的肝性募集上的一种显著降低相关联。在I型NKT细胞中的抑制还与常规树突细胞(cDC)的耐受化或修饰相关联，并且它们与经抑制的I型NKT细胞一起抑制适应性Th1/Th17CD4+/CD8+T细胞的激活/扩增。这引出一种模型，在该模型中硫苷脂的给予刺激了II型NKT细胞的活性，这进而抑制I型NKT细胞活性以及由I型NKT细胞介导的炎症所引起的肝损害。见图3。

[0048] NKT细胞在酒精性肝病中的作用

[0049] 作为由过量饮酒所引起的对肝细胞的损害的一种结果，酒精性肝病(ALD)会发展。在观察到ALD的临床表现之前，可能需要多次伤害。然而，如在本文中所描述的，在长期饮酒之后，在肝中观察到I型NKT细胞(αGalCer/CD 1d-四聚体+细胞)、CD4+细胞以及CD 11b+Gr-1+髓样细胞而不是II型NKT细胞或CD 11b+Gr-1-细胞的显著提高的数值。见实例6和图5。CD69标记物的表达增强进一步指示I型NKT细胞是被部分激活的。因此，即使不存在疾病的任何临床体征(临床前阶段)，介导一种炎性应答的细胞在过量饮酒之后在肝中累积。在I型NKT细胞的不存在下(Jα18-/-小鼠)，CD 11b+Gr-1+髓样细胞在长期饮酒之后在肝中的累积是显著降低的。见实例6和图5。这些数据表明I型NKT细胞参与ALD的临床前阶段的介导。

[0050] 与表明I型NKT细胞在ALD的临床前阶段中的作用的数据相一致，在过量饮酒之后的肝损害的临床表现是显著降低的，如例如通过组织学和肝酶分析在I型NKT细胞缺陷的(Jα18-/-)小鼠中所测量的。见实例6以及图6和7。这些数据表明I型NKT细胞在对肝的酒精性损害中起重要作用。

[0051] NKT细胞表达T细胞受体，这些T细胞受体使它们能够在CD 1d分子的背景下识别脂质抗原。不希望受到一个特定理论的约束，通过由表达CD 1d的抗原递呈细胞(APC)来局部呈递经氧化的自脂类，在饮酒之后在肝中I型NKT细胞被激活。然后经激活的I型NKT细胞启动一种多步骤过程，该多步骤过程导致库普弗细胞激活，粒细胞的募集/激活，随后是对肝细胞的炎性损害。

[0052] 在饮酒之后NKT细胞亚型之间的相互作用为肝损害创造条件，并且在严重的情况下，为酒精性肝病(ALD)创造条件。在本文中所描述的若干实施例涉及用于对I型NKT细胞和II型NKT细胞的相反作用以及它们与其他肝脏细胞的相互作用进行操纵以便治疗、减轻或预防饮酒之后对肝的损伤的方法和组合物。

[0053] 在本文中所描述的若干实施例涉及对NKT细胞亚型的活性进行操纵以便治疗、缓解或预防对肝的酒精诱发性损伤。如在本文中所描述的，硫苷脂或视黄酸受体(RAR)激动剂的给予抑制了酒精诱发性肝损害。例如，在长期饮酒期间以及在无节制饮酒之前，硫苷脂或视黄酸受体(RAR)激动剂、全反式维甲酸(ATRA)的注射具有一种保护性效果，如通过组织学检查以及对血清中肝酶水平的分析所显示的。见实例7以及图6和7。

[0054] 若干实施例涉及II型NKT细胞的一个主要子集在酒精诱发性肝损伤中的一种保护性作用，该主要子集对硫苷脂是反应性的。硫苷脂对这个NKT细胞子集的激活抑制了过量饮酒之后I型NKT细胞介导的损伤。硫苷脂介导的保护与II型NKT细胞的激活以及肝I型NKT细胞分泌IFN-γ的抑制以及对I型NKT细胞介导的对髓样细胞的募集(例如$CD11b^{+}Gr\text{-}1^{int}$和Gr-G子集)和NK细胞到肝中的抑制相关联。

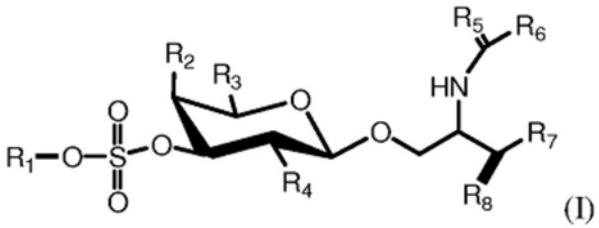
[0055] 硫苷脂治疗导致在过量饮酒之后几乎完全保护免受肝损害。见图6和7。不希望受到一个特定理论的约束，硫苷脂的保护性效果是通过II型NKT细胞的直接激活介导的，这些II型NKT细胞对I型NKT细胞和cDC施加一种抑制性影响。

[0056] 来自两名健康供者的外周血淋巴细胞(PBL)的T细胞系在用αGalCer或者硫苷脂进行体外刺激之后产生，并且通过流式细胞术进行分析。在两个周期的刺激之后，在这个细胞系中，这些T细胞株中的大约2％用硫苷脂/hCD 1d-四聚体染色。与鼠性系统相似，这些细胞不使用恒定型Vα24-Vα11TCR。这些数据显示硫苷脂反应性II型NKT细胞在健康个体中的存在，并且指示在对酒精性肝病中的人II型NKT细胞进行表征中使用硫苷脂/人CD 1d-四聚体的有效性。

[0057] 在一些实施例中，该硫苷脂可以是，例如，牛脑源性硫苷脂，该牛脑源性硫苷脂是一种从西格玛公司(Sigma Inc.)(芝加哥，伊利诺伊州，美国)获得的大约20个不同种类的混合物。在其他实施例中，该硫苷脂是半合成的，并且是一个单一种类的硫苷脂，例如从梅特雷耶公司(Maitreya Inc)(普莱曾特盖普(Pleasant Gap)，宾夕法尼亚州，美国)获得的顺-二十四碳烯酰基硫苷脂或溶血硫苷脂。在另外其他实施例中，该硫苷脂可以是一种完全合成的硫苷脂。

[0058] 来源于牛脑髓磷脂的硫苷脂包括不饱和性出现在C_{19}上的饱和/不饱和主要酰基链(C_{24})的一种2:1混合物。若干实施例涉及合成的硫苷脂类似物，诸如具有饱和酰基链(C_{24})和不饱和链(C_{24}:1)的类似物连同包括在该脂肪酸或鞘氨醇部分中不同长度的酰基链(较短的连同较长的，例如，C_{18}，C_{32})以及在该半乳糖部分上具有3'相对于4'-硫酸化基团的位置异构体(3'-803相对于4'-803)的类似物的用途。

[0059] 在一些实施例中，该硫苷脂具有以下化学式I：

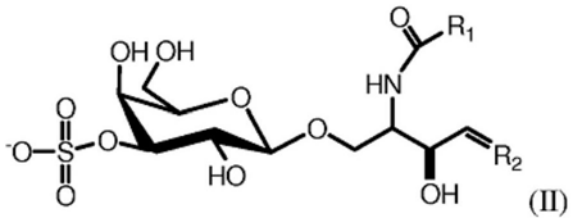
[0060] 

(I)

[0061] 其中R_1可以是键、氢、C_1至C_{30}烷基、C_1至C_{30}经取代的烷基、C_1至C_{30}烯基、C_1至C_{30}经取代的烯基或C_5至C_{12}糖；R_2可以是氢、羟基基团、甲氧基基团或烷氧基基团；R_3可以是氢、羟基基团、甲氧基基团、乙氧基基团或烷氧基基团；R_4可以是氢、羟基基团或烷氧基基团；R_5可以

是氢、羟基基团、羰基、烷氧基基团或键；R_6可以是C_1至C_{40}烷基、C_1至C_{40}经取代的烷基、C_1至C_{40}烯基、C_1至C_{40}经取代的烯基或C_1至C_{40}炔基；R_7可以是C_1至C_{40}烷基、C_1至C_{40}经取代的烷基、C_1至C_{40}烯基、C_1至C_{40}经取代的烯基或C_1至C_{40}炔基；并且R_8可以是氢、羟基基团、羰基、烷氧基基团或键。

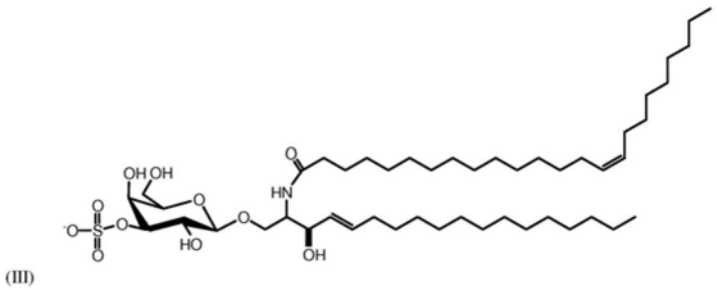
[0062] 在其他实施例中，该硫苷脂具有以下化学式II：

[0063] 

(II)

[0064] 其中R_1是选自下组，该组由以下各项组成：C_1至C_{40}烷基、C_1至C_{40}经取代的烷基、C_1至C_{40}烯基、C_1至C_{40}经取代的烯基以及C_1至C_{40}炔基；并且R_2是选自下组，该组由以下各项组成：氢、羟基基团、羰基，烷氧基基团以及键。

[0065] 在另一个实施例中，该硫苷脂具有以下化学结构：

[0066] 

(III)

[0067] 如在本文中所使用的，术语“烷基”的意思是任何无支链的或支链的饱和烃。术语“经取代的烷基”的意思是任何无支链的或支链的、经取代的饱和烃。环状化合物，环烃和具有杂原子的环状化合物两种，在“烷基”的含义之内。

[0068] 如在本文中所使用的，术语“经取代的”的意思是用一种官能团对氢原子进行的任何取代。

[0069] 如在本文中所使用的，术语“官能团”具有它的通用定义，并且指的是优选选自下组的化学部分，该组由以下各项组成：卤素原子、C_1-C_{20}烷基、经取代的C_1-C_{20}烷基、全卤代的烷基、环烷基、经取代的环烷基、芳基、经取代的芳基、苄基、杂芳基、经取代的杂芳基、氰基和硝基。

[0070] 如在本文中所使用的，术语“卤素”和“卤素原子”指的是元素周期表*的第17列的放射稳定性原子中的任何一种，优选是氟、氯、溴或碘，特别优选的是氟和氯。

[0071] 如在本文中所使用的，术语“烯基”的意思是任何无支链的或支链的、经取代的或未经取代的不饱和烃。术语“经取代的烯基”的意思是任何经一种或多种官能团取代的无支链的或支链的、经取代的不饱和烃，无支链的C_2-C_6烯基仲胺、经取代的C_2-C_6仲烯基胺以及无支链的C_2-C_6烯基叔胺在“经取代的烯基”的定义之内。环状化合物，不饱和环烃和具有杂原子的环状化合物两种，在“烯基”的含义之内。

[0072] 如在本文中所使用的，术语“烷氧基”指的是任何无支链的或支链的、经取代的或未经取代的、饱和的或不饱和的醚。

[0073] 如在本文中所使用的，术语“硫苷脂”保留了它的一般性的习惯含义，并且指的是

在分子的糖部分中包含一种或多种硫酸根基团的一种脑苷脂硫酸酯。

[0074] 如在本文中所使用的，术语“脑苷脂”指的是包含一种糖的任何脂质化合物，并且一般而言是常被发现于脑和神经组织中的类型。

[0075] 具有化学式(I)、(II)和(III)的这些化合物可以处于其药学上可接受的无毒性盐的形式。具有化学式(I)、(II)和(III)的盐包括经酸加成的盐，诸如与无机酸(例如，盐酸、硫酸、硝酸和磷酸)或与有机酸(例如，乙酸、丙酸、马来酸、油酸、棕榈酸、柠檬酸、琥珀酸、酒石酸、富马酸、谷氨酸、泛酸、月桂基磺酸、甲磺酸和邻苯二甲酸)形成的盐。

[0076] 具有化学式(I)、(II)和(III)的这些化合物可以处于其溶剂化物(例如水合物)的形式。

[0077] 具有化学式(I)、(II)和(III)的这些化合物能够通过合成硫苷脂类的任何目的性方法来生产。

[0078] 具有化学式(I)、(II)和(III)的这些化合物还能够从天然产物(例如生物有机体)中分离，并且通过柱层析或类似方式进行纯化。

[0079] 在一个实施例中，该硫苷脂具有以下化学式：(2S,3R,4E)-N-神经酸-1-[-D-(3-硫酸)-吡喃半乳糖基]-2-氨基-十八碳烯-3-醇。这个化学式也称为顺-二十四碳烯酰基硫苷脂。

[0080] 在一些实施例中，给予一名患者的硫苷脂的特定量将取决于正在治疗的该疾病或病症、连同正在治疗的该患者的年龄、重量和性别而变化。一般而言，为了在例如肠道或血液中实现这样一种终浓度，在此的实施例的一种单剂量组合物中的硫苷脂分子的量一般而言将是大约0.1毫克至大约100毫克，优选大约2.0毫克至大约60毫克，更优选大约20毫克至大约50毫克。同样地，在此的实施例的一种单次口服剂量组合物中的一种次级治疗化合物的量一般而言将是在大约0.01毫克至大约1000毫克的范围内，更优选是在大约0.1毫克至大约100毫克的范围内。明显地，确切的剂量将随着正在治疗的该疾病或失调而变化，这些优选的范围是容易确定的。

[0081] 在一个实施例中，向该患者给予0.1-10mg/kg体重的硫苷脂。更优选地，给予1-10mg/kg体重的硫苷脂。优选地，按需要每天重复这种剂量。

[0082] 视黄酸受体(RAR)激动剂对NKT细胞活性的影响

[0083] 如在本文中所描述的，视黄酸受体(RAR)激动剂全反式维甲酸(ATRA)的给予显著地抑制了由饮酒引起的肝损害。乙醇摄入耗尽了肝视黄酯类并且改变了全反式维甲酸(ATRA)的生理水平，该全反式维甲酸是维生素A的一种生物活性形式，支持许多生物功能并且即使在IL-6的存在下也可以增强初试CD4+T细胞分化为FoxP3+Treg的产生、稳定性和功能。在本文中所描述的若干实施例涉及以下发现：ATRA抑制I型NKT细胞效应子功能，包括抑制这些细胞分泌细胞因子。见实例8、9和11以及图8、10和11。另外，ATRA对I型NKT细胞活性具有一种直接抑制性效果，在抗原递呈细胞的不存在下施加它的抑制效果。见实例11、图11。另外，ATRA不直接抑制可识别蛋白抗原(诸如髓磷脂碱性蛋白或MBPAc1-9)的常规MHC限制性CD4+T细胞的活性。不希望受到一个特定理论的约束，这些数据指示ATRA通过抑制I型NKT细胞保护免受由过量饮酒引起的肝损害。

[0084] 如在本文中所描述的，RAR激动剂诱导了在I型NKT细胞中的抑制。见图12、14以及15-17。另外，由从过量饮酒导致的I型NKT细胞介导的炎症所引起的肝损害能够通过一种

RAR激动剂的给予来预防、减少或缓解。肝能够因为多种不同原因而变得发炎。例如，肝炎症可以由细菌性或病毒性感染、损伤或来自一个人自身免疫系统的攻击而引起。尽管炎症正常来说是一种保护性响应以及愈合过程的一个必要的步骤，长时间的或慢性的炎症能够引起损伤。在本文中所描述的若干实施例涉及对导致炎症之后、与炎症有关或由炎症引起的肝损伤的先天免疫机制进行RAR激动剂介导的调节。一些实施例涉及用于对I型NKT细胞活性进行RAR激动剂介导的抑制的方法和组合物，这些方法和组合物对先天免疫系统的组分之间的相互作用进行调节，以提供对肠源性或代谢产物源性抗原的耐受，而不影响或最小地影响对非自身经识别的病原的先天免疫应答。

[0085] 因为RAR激动剂能够直接使I型NKT细胞无反应性，RAR激动剂可以用于治疗在其中I型NKT细胞起一种致病作用的任何适应症。能够通过本披露的实施例进行治疗的疾病的一些实例包括，酒精诱发性肝炎、非酒精性脂肪变性肝炎、肝硬化、突发性肝硬化、特发性肝炎、病毒诱发性肝炎(甲型、乙型、丙型以及其他)、与肝胆癌相关联的炎性肝炎、多发性硬化、1型糖尿病、缺血性再灌注损伤、实体器官移植、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、肌萎缩性侧索硬化以及炎性肠病(克罗恩病和结肠炎)。

[0086] 在一些实施例中，通过对I型NKT细胞活性进行RAR激动剂介导的抑制，对自身免疫性或免疫相关性疾病或失调的各种适应症进行治疗、预防或缓解。具体地，在此的实施例的一个方面与用有效量的RAR激动剂治疗一名患者的方法有关，该患者患有一种自身免疫性或免疫相关性疾病或失调的症状，诸如，例如，多发性硬化、系统性红斑狼疮、AIDS、阿耳茨海默病、类风湿性关节炎、胰岛素依赖型糖尿病、自身免疫性肝炎、哮喘和乳糜泻。在一些实施例中，对I型NKT细胞活性进行RAR激动剂介导的抑制治疗了、预防了或缓解了哮喘症状。

[0087] 一些实施例涉及通过给予一种RAR激动剂对缺血性再灌注之后的I型NKT细胞介导的炎症进行抑制或预防的一种方法。I型NKT细胞在诸如缺血和再灌注损伤的病症中起一种致病作用。当血供给在一个时间段的缺血之后被恢复时，再灌注损伤能够在多种组织中发生。实例包括在一种挤压伤之后的骨骼肌组织、与一种心肌梗塞或心脏外科手术或缺血性心脏病有联系的心肌、与一种中风或脑外伤有联系的神经组织、以及与外科手术或外伤有联系的肝和肾组织。在器官移植中，缺血性再灌注损伤在移植组织的质量和功能中也起主要作用。缺血和再灌注损伤是住院治疗长度增加和移植物长期存活率降低的一个主要原因。在一些实施例中，对I型NKT细胞活性进行RAR激动剂介导的抑制抑制了或预防了与外科手术或外伤相关的肝性缺血性再灌注损伤。

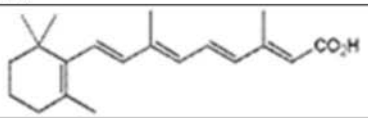
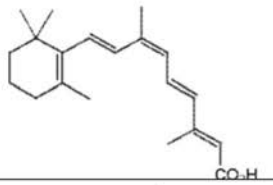
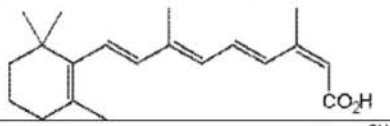
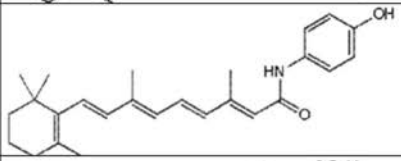
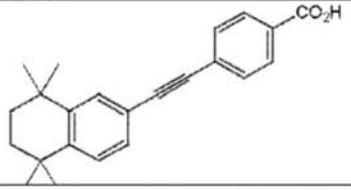
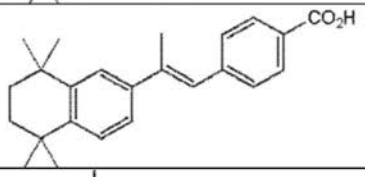
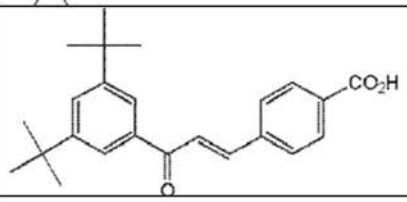
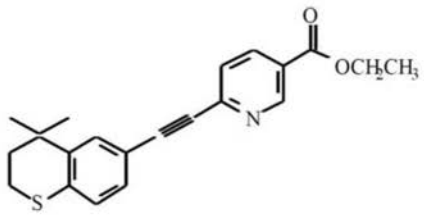
[0088] 在本文中所描述的实施例涉及通过一种或多种视黄酸受体(RAR)激动剂对I型NKT细胞活性进行的抑制。视黄酸受体包括三种主要亚型:RARα、RARβ以及RARγ。一些实施例涉及通过一种或多种泛活性RAR激动剂、此类泛活性RAR激动剂的前体以及其混合物对I型NKT细胞活性进行的抑制。如在本文中所使用的，术语“泛活性RAR激动剂”指的是一种RAR激动剂，该RAR激动剂基本上同等地或非选择性地影响，例如激活，RARα、RARβ以及RARγ。一些实施例涉及通过一种或多种活性RAR激动剂(相对于RARα，该一种或多种活性RAR激动剂有效地去选择性地或甚至特异性地影响，例如激活，RARβ和RARγ中的至少一种，并且优选的是两种)、此类活性RAR激动剂的前体以及其混合物对I型NKT细胞活性进行的抑制。如在本语境中所使用的，术语“选择性地”的意思是相对于RARα，该RAR激动剂的这些RAR激动剂前体以及其混合物更加有效地，优选地至少大约10倍或大约10倍至大约1000倍或更多倍那样有

效地，去影响RARβ和RARγ中的至少一种，并且优选是两种。一些实施例涉及通过一种或多种亚型选择性RAR激动剂、此类亚型选择性RAR激动剂的前体以及其混合物对I型NKT细胞活性进行的抑制。如在本文中所使用的，术语“亚型选择性RAR激动剂”指的是这样一种RAR激动剂，该RAR激动剂选择性地影响，例如激活一种RAR亚型。具有RARα、RARβ以及RARγ选择性的类视黄醇化合物在本领域中是已知的，并且披露于例如美国专利号6,534,544和6,025,388(它们通过引用以其全文结合于此)中。

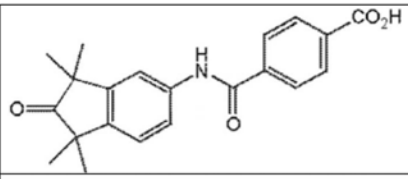
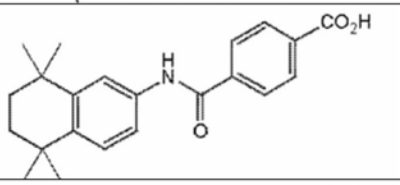
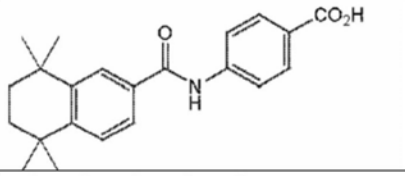
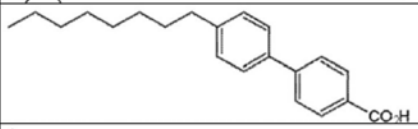
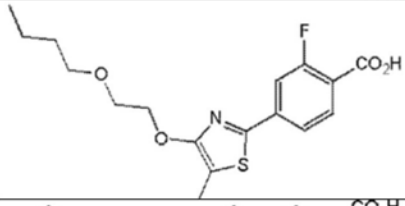
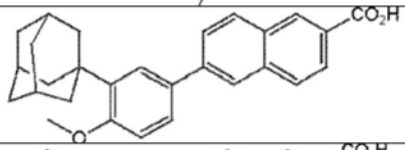
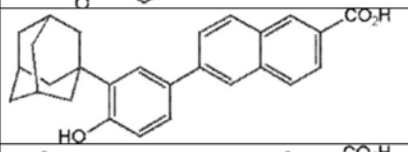
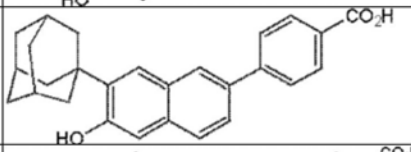
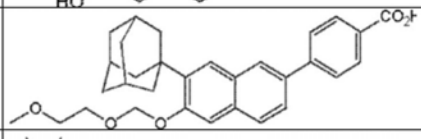
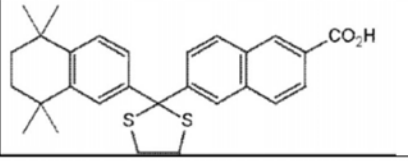
[0089] 若干实施例涉及通过给予一种或多种视黄酸受体(RAR)激动剂对促炎I型NKT细胞活性进行抑制的一种方法。RAR激动剂的实例包括但不限于在表1中所列出的这些RAR激动剂。

[0090] 表1:RAR激动剂

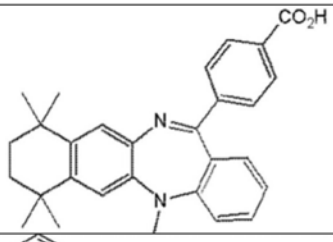
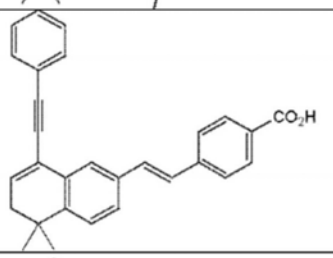
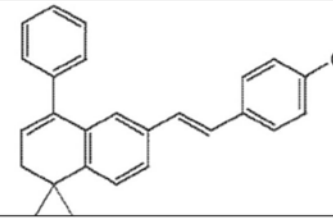
[0091]

化合物名称	特异性	结构
维甲酸	泛 RAR 激动剂	
9-顺式 RA	泛 RAR 和 RXR 激动剂	
13-顺式-RA	泛 RAR 激动剂	
芬维 A 胺	RAR 激动剂，RAR 独立性效果	
EC 23	泛 RAR 激动剂	
TTNPB	泛 RAR 激动剂	
Ch 55	泛 RAR 激动剂	
他扎罗汀	RARβ/γ 激动剂	

[0092]

BMS 753	RARα 激动剂	
AM80	RARα 激动剂	
AM580	RARα 激动剂	
AC55649	RARβ2 激动剂	
AC261066	RARβ2 激动剂	
阿达帕林	RARβ 和 γ 激动剂	
CD437	RARγ 激动剂	
CD1530	RARγ 激动剂	
CD2665	RARγ 激动剂	
MM11253	RAR 激动剂	

[0093]

LE135	RARβ 激动剂	
BMS493	泛 RAR 反激动剂	
BMS453	RARβ 激动剂，RARα 或 RARγ 拮抗剂	

[0094] 在一些实施例中，促炎I型NKT细胞活性被一种或多种选自下组的RAR激动剂所抑制，该组由以下各项组成：ATRA、视黄醇、9-顺式-RA或13-顺式-RA、维甲酸、AM580、AC55649、CD1530或他扎罗汀。在一些实施例中，促炎I型NKT细胞活性被一种或多种聚烯烃型类视黄醇诸如异维甲酸和阿维A所抑制。在一些实施例中，促炎I型NKT细胞活性被一种或多种选自下组的RAR激动剂所抑制，该组由以下各项组成：阿维A酯、阿维A和异维甲酸。

[0095] 若干实施例涉及通过他扎罗汀、他扎罗汀酸或其一种混合物对促炎I型NKT细胞活性进行的抑制。他扎罗汀是一种乙基酯药物前体，它被代谢为相应的游离酸，他扎罗汀酸。他扎罗汀具有一种刚性环锁定的结构，该刚性环锁定的结构提供了相比于全反式维甲酸(这些视黄酸受体(RAR)的天然配体)受限的构象灵活性。这种结构改变赋予了他扎罗汀酸对这些RAR的特异性以及对RARβ和RARγ的选择性。

[0096] RAR激动剂的实例进一步包括顺式-和反式-视黄酸的酯，例如烷基酯，诸如伯醇、仲醇或叔醇，包括但不限于：甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、己基、庚基、乙基己基、辛基、壬基、月桂基、油烯基、硬脂基、羟乙基、羟丙基、苄基、α-甲基苄基、α-丙基苯基、戊基、异戊基、茴香基、鲸蜡基、薄荷基、肉桂基、频哪醇、呋喃基或豆蔻基。

[0097] RAR激动剂的药学上可接受的盐也可以用于抑制I型NKT细胞活性。在本文中所披露的拥有一种足够酸性的、一种足够碱性的或两种官能团的化合物，并且相应地能够与一些有机或无机碱以及无机和有机酸中的任一种反应，以形成一种盐。

[0098] 可以用于从具有碱性基团的RAR激动剂形成酸加成盐的酸的实例包括无机酸诸如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸等，以及有机酸诸如对甲苯磺酸、甲磺酸、草酸、对溴苯基磺酸、碳酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、乙酸等。此类盐的实例包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐(decanoate)、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐(propiolate)、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯代苯甲酸盐、

甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、苯丙酸盐、苯丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、γ-羟基丁酸盐、乙醇酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、扁桃酸盐等。

[0099] 可以用于从具有酸性基团的RAR激动剂形成碱加成盐的碱的实例包括但不限于，碱金属诸如钠、钾和锂的氢氧化物；碱土金属诸如钙和镁的氢氧化物；其他金属诸如铝和锌的氢氧化物；氨水和有机胺，诸如未经取代的或经羟基取代的单烷基胺、二烷基胺或三烷基胺；二环己胺；三丁胺；吡啶；N-甲基胺、N-乙基胺；二乙胺；三乙胺；单-(2-羟基-低级烷基胺)、二-(2-羟基-低级烷基胺)或三-(2-羟基-低级烷基胺)，诸如单-(2-羟基乙基)胺、二-(2-羟基乙基)胺或三-(2-羟基乙基)胺、2-羟基-叔-丁基胺或三-(羟基甲基)甲基胺、N,N-二-低级烷基-N-(羟基低级烷基)-胺，诸如N,N-二甲基-N-(2-羟基乙基)胺、或三-(2-羟基乙基)胺；N-甲基-D-葡萄糖胺；和氨基酸诸如精氨酸、赖氨酸等。

[0100] 如在本文中所使用的，术语“患者”指的是治疗性治疗的受者，并且包括动物界之内的所有生物。在优选实施例中，该动物在哺乳动物类家族之内，诸如人、牛、绵羊、猪、猫、水牛、狗、山羊、马、驴、鹿和灵长类。最优选的动物是人。

[0101] 如在本文中所使用的，术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”对应地包括“预防(prevent)”、“预防(preventing)”和“预防(prevention)”。

[0102] 如在本文中所使用的，术语一种药剂的“一个有效量”是足以对从促炎1型NKT细胞活性导致的肝损害进行治疗、抑制或预防的量。

[0103] 一些实施例涉及在ALD的临床表现之前，用一种硫苷脂和/或一种RAR激动剂对患者进行预治疗。在若干实施例中，在无节制饮酒之前，用一个有效量的硫苷脂和/或一种RAR激动剂对患者进行治疗。在一些其他实施例中，在无节制饮酒之前的从大约0.5小时至大约18小时，用一个有效量的硫苷脂和/或一种RAR激动剂对患者进行治疗。在一些其他实施例中，在一个时间段的长期饮酒期间，用一个有效量的硫苷脂和/或一种RAR激动剂对患者进行治疗。

[0104] 在一些实施例中，给予一名患者的RAR激动剂的具体量将取决于正在治疗的该疾病或病症、连同正在治疗的该患者的年龄、重量和性别而变化。一般而言，为了在例如肠道或血液中实现这样一种终浓度，在此的实施例的一种单剂量组合物中的RAR激动剂的量一般而言将是大约0.1毫克至大约100毫克，优选大约2.0毫克至大约60毫克，更优选大约20毫克至大约50毫克。适合的剂量的实例包括：在大约0.1至大约10mg/日之间；在大约0.5至大约2mg/日之间；在大约0.01-100mg/日之间；在大约1至大约50mg/日之间；在大约0.1mg/日至大约1.0mg/日之间；在大约1.0mg/日与大约5.0mg/日之间；在大约5.0mg/日与大约10.0mg/日之间；在大约10.0mg/日与大约15mg/日之间；在大约15.0mg/日与大约20.0mg/日之间；在大约20.0mg/日与大约25.0mg/日之间；在大约30.0mg/日与大约35.0mg/日之间；在大约35.0mg/日与大约40.0mg/日之间；在大约40.0mg/日与大约45.0mg/日之间；在大约45.0mg/日与大约50.0mg/日之间；在大约50.0mg/日与大约55.0mg/日之间；在大约55.0与大约60.0mg/日之间；在大约60.0mg/日与大约65.0mg/日之间；在大约65.0mg/日与大约70.0mg/日之间；在大约70.0mg/日与大约75.0mg/日之间；在大约75.0mg/日与大约80.0mg/日之间；在大约80.0mg/日与大约85.0mg/日之间；在大约85.0与大约90.0mg/日之间；在大约85.0mg/日与大约90.0mg/日之间；在大约90.0mg/日与大约95.0mg/日之间；以及在大约

95.0mg/日与大约100.0mg/日之间。明显地，确切的剂量将随着正在治疗的该疾病或失调而变化，这些优选的范围是容易确定的。

[0105] 当口服给予他扎罗汀以实现在I型NKT细胞活性上的降低时，他扎罗汀的每日剂量优选为在大约0.3mg/日至大约7mg/日或大约8mg/日的范围内，更优选的是在大约0.6mg/日至大约6.5mg/日或大约7mg/日的范围内。在一些实施例中，口服给予的他扎罗汀是以包括0.4mg/日、0.75mg/日、1.5mg/日、2.8mg/日、3mg/日、4.5mg/日、6mg/日和6.3mg/日的他扎罗汀每日剂量进行给予的。

[0106] 依据这些实施例，可以给予RAR激动剂以减轻一名患者的症状，或可以给予RAR激动剂以抵抗该失调自身的机制。在某些实施例中，可以将RAR激动剂作为一种预防手段进行给予。在一些实施例中，给予了多剂量的RAR激动剂。本领域技术人员将领会到的是，这些治疗目的常常是相关的，并且能够基于各种因素针对特定的患者对治疗进行定制。这些因素可以包括患者的年龄、性别或健康，以及自身免疫性或免疫相关性疾病或失调的进展。针对剂量、给药时间安排、给药途径，以及通过其他疗法的同时或序贯给药，可以相应地对用于一名患者的治疗方法学进行定制。

[0107] 在一些实施例中，可以将一种或多种RAR激动剂化合物单用或与另一种治疗性化合物联合给予。例如，可以将一种或多种RAR激动剂化合物与一种硫苷脂联合给予。可以使用任何当前已知的使用于酒精性肝病、炎性疾病、自身免疫性疾病或再灌注损伤的治疗中的治疗性化合物。在一些实施例中，可以将RAR激动剂与硫化氢(H_2S)联合给予。在一些实施例中，可以将RAR激动剂与抗氧化剂联合给予。在一些实施例中，能够将RAR激动剂与以下项联合给予：例如皮质甾类、生物制剂(例如抗TNF-α和抗IL-6)、免疫调节剂(例如RU-486)、疾病修饰抗风湿药物(DMARD，诸如来氟米特)、COX-2抑制剂(塞来考昔)、非甾体抗炎药(NSAID，诸如萘普生)、口服抗糖尿病剂(OAD，诸如二甲双胍或西格列汀)、GLP-1激动剂、胰岛素、PPAR激动剂/拮抗剂、EGF介质(抗癌剂)、有效治疗肝癌的其他剂、针对肝癌的基于细胞的疗法；针对丙型肝炎、多发性硬化症或红斑狼疮的干扰素类(IFN)；以及LFA-1拮抗剂。

[0108] 在本文中所描述的这些RAR激动剂化合物和硫苷脂化合物可以用作掺入一种药物组合物中的一种活性成分。在一些实施例中，该药物组合物可以包括一种单一活性成分。在一些实施例中，该药物组合物可以包括两种、三种、四种、五种或更多种活性成分。考虑到了给药的所有模式，例如，经口腔地、经直肠地、肠胃外地、局部地、或通过静脉内、肌内、胸骨内或皮下注射或以一种适合通过吸入的形式。这些配方可以在适当情况下以离散剂量单位来方便地呈现，并且可以通过药剂学领域中熟知的这些方法中的任一种来制备。依据已知的和既定的做法，这些活性成分常规来说将用一种或多种药学上可接受的赋形剂进行配制。因此，可以将该药物组合物配制为一种液体、散剂、酏剂、可注射溶液、混悬剂、栓剂等。

[0109] 可以将根据一些实施例的活性成分针对用于口服给予的给药而配制为片剂、硬胶囊、软胶囊，包括处于散剂、具有赋形剂的共混物、液体或溶液、混悬剂、固体溶液的形式下的这些活性成分。可以将根据一些实施例的活性成分针对用于口腔内给予(舌下或颊给药)的给药而配制为一种固体剂型的快速溶解或泡腾片、薄膜、颊片，或配制为一种液体或半固体形式，诸如凝胶、溶液、乳液、混悬剂。可以将根据一些实施例的活性成分针对用于注射的给药而配制为一种水性或非水性溶液、混悬剂或乳液。油基溶液和混悬剂包括天然的和或合成的油(诸如大豆油、棉籽油、矿物油、芝麻油、蓖麻油、氢化植物油、蜂蜡)的混合物。可以

将根据一些实施例的活性成分针对用于经皮给予的给药而配制为乳膏、凝胶、乳液、水基溶液、油基溶液、混悬剂、薄膜、贴剂、泡沫剂。可以将根据一些实施例的活性成分针对用于鼻内给予的给药而配制为散剂、混悬剂、溶液、乳液。可以将根据一些实施例的活性成分针对用于肺部递送的给药而配制为一种微粉化散剂。口服给药与首过代谢连同代谢酶的诱导相关联。因此，可以针对最佳效果对口服给药的视黄酸类的剂量强度和剂量方案进行专门定制。递送的替代途径，例如舌下的、颊的、注射、肺的以及经皮的，可以是一种比口服优选的给药。给药的替代途径，诸如如所描述的那些，避免了首过代谢和GI吸收，证实了较少的酶诱导并且提供了稳定的重复剂量的药物代谢动力学。

[0110] 根据本实施例的药物配方可以是立即释放或修饰释放(例如，持续释放、脉冲释放、受控释放、延迟释放、缓慢释放)。因为它立即具有活性，药理学量的口服给予的类视黄醇异构体可能具有副作用。这些副作用已经成为对口服的类视黄醇在治疗中的用途的一种严重的限制。尽管局部涂敷的类视黄醇携带很小的致畸性倾向，存在与这种给药途径相关联的限制它们的用途的其他毒性，包括皮肤刺激。口服的和局部的毒性两者的一个主要原因是，一旦给药，这些类视黄醇全部并且立即有效。能够借以使一种类视黄醇在体内更加缓慢地并且更加持续地有效的一种过程将避免在该类视黄醇的有效性上的峰值和谷值，从而在一个更加延长的时间段上提供了一种有效体内水平的该化合物，并且还避免了或基本上降低了常常从过量该物质的突然有效性所导致的这些毒性。根据此类原理，视黄醇、视黄醇的酯、尤其视黄醇的脂肪酯、视黄酸或视黄酸酯的油基可注射配方可以进行每周的肌内给药，并且提供一种全身性缓释递送。

[0111] 在一些实施例中，对全反式维甲酸叔丁基酯的制备如下。在0℃向一种在无水乙醚中的全反式维甲酸(100mg，0.33mmol)的溶液中添加草酰氯(42.3mg，0.333mmol)，并且在那种温度下搅拌30分钟，并且添加吡啶(28.7mg，0.363mmol)、2-甲基-2-丙醇(26.8mg，0.363mmol)，并且在暗处在室温下进行搅拌，在这以后该反应完成，如由TLC所指示的。然后对该反应混合物用水进行淬灭，并且用乙醚(3×10ml)、饱和碳酸氢钠溶液(3×5ml)以及再次用水(3×5ml)进行萃取，进行干燥($MgSO_4$)并且进行蒸发。将粗残余物重新溶解于己烷中，并且施加在硅石Sep-Pak筒柱(2g)上。用己烷/乙酸乙酯(9.7:0.3)进行的洗脱提供了该视黄酸的丁基酯。通过HPLC(10mm×25cm Zorbax-Sil柱，4mL/min)使用己烷/异丙醇(90:10)溶剂系统实现最终的纯化。纯全反式视黄酰基丁酸酯2(98mg，82.6％)作为一种稠油被洗脱出来。

[0112] 一些实施例涉及如以下所描述的对用于注射的丁基视黄酸酯进行配制。在稍微升高的温度下并且在无菌条件下用高剪切混合将10g丁基视黄酸酯溶液溶解于包含0.1g丁基羟基茴香醚的73g棉籽油和10g苯甲醇的一种混合物中。对该混合物进行无菌过滤，并且填入一种注射器中，供以后使用。待通过肌内注射进行给予。一些实施例涉及对如以上用于肌内注射的棉籽油中的视黄醇棕榈酸酯进行配制。

[0113] 一些实施例涉及如以下所描述的对在此的实施例的一种或多种活性成分的一种口服剂型进行配制。在稍微升高的温度下并且用高剪切混合将10g视黄酸溶解于蜂蜡、丁基羟基茴香醚、乙二胺四乙酸二钠、氢化大豆油薄片、氢化植物油和大豆油醇的一种混合物中。将该混合物密封于在2mg、5mg和10mg剂量强度下的用于口服给药的软胶囊中。

[0114] 一些实施例涉及对包含在此的实施例的一种或多种活性成分的一种生物粘附性

口含片剂进行配制。制备了赋形剂的一种共混物，该共混物包含24％活性成分、21％HPMC、18％玉米淀粉、24％乳糖、1％石英、2.5％聚卡波非(Noveon)、7.5％卡波姆974P、1.2％滑石以及0.7％硬脂酸镁。该共混物被压制为直径大致1cm的片剂。

[0115] 某些实施例涉及对包含本实施例的一种或多种活性成分的一种舌下薄膜进行配制。将以下项混合于50g水中：3g美多秀(Methocel)E5、5g美多秀E50、1g羟丙基纤维素(Klucel)、1g麦芽糊精、1g柠檬酸、3g三氯蔗糖、5g橙味风味剂、0.2g对羟基苯甲酸酯、0.1乙二胺四乙酸钠以及5g山梨糖醇，添加1g视黄酸并且在搅拌下对该混合物进行脱气。将该组合物薄薄地涂布于一种聚酯片基，并且允许将其在任何直射光的不存在下在空气中干燥以避免降解。然后将该薄膜切成一定尺寸以产生2至10mg的剂量。

[0116] 一些实施例涉及一种试剂盒，该试剂盒可以包括一种或多种硫苷脂、RAR激动剂或其任何组合，优选的是作为一种药物组合物。在一些实施例中，在一种药学上可接受的载体中提供了顺-二十四碳烯酰基。在一些实施例中，在一种药学上可接受的载体中提供了ATRA。在一些实施例中，在一种药学上可接受的载体中提供了他扎罗汀。在若干实施例中，可以可任选地提供硫化氢(H_2S)。在若干实施例中，可以可任选地提供一种或多种抗氧化剂。在若干实施例中，试剂盒可以进一步包括适合的包装和/或使用说明书。试剂盒还可以包括用于对该一种或多种硫苷脂、RAR激动剂或其任何组合进行递送的一种工具，诸如一种吸入器、喷雾分散器(例如鼻腔喷雾)、用于注射的注射器、针、IV袋或针对胶囊、片剂、栓剂的压力包。该一种或多种硫苷脂、RAR激动剂或其任何组合可以处于一种干燥或冻干的形式，或在一种溶液，特别是一种无菌溶液中。当处于一种干燥形式时，该试剂盒可以包括用于制备一种液体配方的一种药学上可接受的稀释剂。该试剂盒可以包含一种用于给药或用于将这些组合物分散的装置，包括但不限于注射器、吸管、透皮贴剂或吸入器。一些实施例涉及包含足够剂量的这些化合物或组合物的试剂盒，以针对一个个体在一个延长的时间段(诸如1周、2周、3周、4周、6周或8周或更长)上提供有效治疗。

[0117] 在一个示例实施例中，对一名处于来自处方药或滥用药物的化学性肝损害的风险的70kg成年患者给予每天肌内(i.m.)注射在1.0ml磷酸缓冲盐水中的7mg他扎罗汀以治疗肝损害。能够基于该治疗的结果和主治医师的判断对这种剂量进行调整。治疗优选地持续至少大约1或2周，优选至少大约1或2个月，并且可以长期地持续。

[0118] 在另一个示例实施例中，对一名处于来自处方药或滥用药物的化学性肝损害的风险的70kg成年患者给予足以对1型NKT细胞的活性进行抑制的口服剂量的RAR激动剂。可以通过分析血清肝酶水平对肝损害进行监测。能够基于肝功能试验的结果和主治医师的判断对RAR激动剂的剂量进行调整。治疗优选地持续至少大约1或2周，优选至少大约1或2个月，并且可以长期地持续。在一些实施例中，治疗的持续时间与将该患者置于化学性肝损害的风险下的行为的持续时间一致。在一些实施例中，该RAR激动剂是选自下组，该组由以下各项组成：ATRA和他扎罗汀。在一些实施例中，进一步给予该患者足以将II型NKT细胞激活的一个剂量的硫苷脂。

[0119] 尽管前述的书面说明书使普通技术人员能够制造或使用目前被认为是其最佳方式的事物，普通技术人员将理解和领会到在本文中的具体实施例、方法和实例的变化、组合以及等效物的存在。因此在此的实施例不应该受以上所描述的实施例、方法以及实例的限制，而是受本实施例的范围和精神之内的所有实施例和方法的限制。

[0120] 以下实例是为了说明的目的而呈现的，而不应该解释为限制。

[0121] 实例1

[0122] 当激活硫苷脂/CD1d-四聚体+细胞时，硫苷脂介导对I型NKT细胞的抑制

[0123] 在小鼠中，腹膜内注射20μg剂量的硫苷脂。硫苷脂注射之后，对来自肝的MNC进行分离，并且用CFSE进行标记。在10ng/ml细胞因子IL-2的存在或不存在下，将这些细胞用αGalCer(10ng/ml)培养96小时。作为一个对照，单用10ng/ml IL-12对细胞进行培养。培养之后，收获细胞，用抗TCR mAb和αGalCer/CD1d-四聚体进行染色，经FACs分拣，并且对αGalCer/CD1d-四聚体$^+$(I型NKT)细胞进行CFSE稀释分析。见图1A。如在图1B中所示，在给予硫苷脂之后，响应于一种体外αGalCer挑战，I型NKT细胞未能增殖。

[0124] 从注射PBS或20μg硫苷脂的小鼠中分离的肝细胞被分拣为硫苷脂/CD 1d-四聚体+和四聚体-群体，并且针对细胞质内IFN-γ+进行染色。如在图1C中所示，注射硫苷脂的小鼠具有最大百分比的IFN-γ阳性细胞。

[0125] 硫苷脂的给予导致对I型NKT细胞增殖的抑制和在IFN-γ阳性细胞百分比上的增加。不受一个特定理论的约束，所表明的是，硫苷脂给予激活了pDC和II型NKT细胞两者，这些pDC和II型NKT细胞分泌细胞因子和趋化因子，并且这种相互作用导致了I型NKT细胞中的cDC介导的抑制诱导。

[0126] 实例2

[0127] 硫苷脂的给予保护免受ConA诱发性肝炎

[0128] 用8.5mg/kg的伴刀豆球蛋白A(ConA)(溶解于不含热原的磷酸缓冲盐水PBS中)静脉内(i.v.)处理雌性C57BL/6小鼠，该伴刀豆球蛋白A诱发肝损害，该肝损害与由肝炎引起的肝损害相似。在ConA注射之后立即用20μg(1mg/kg/m)的牛脑硫苷脂或PBS对小鼠进行腹膜内(i.p.)注射。

[0129] 对肝的损害引起了通过肝功能试验可检测的告警性异常(表明肝病)。例如，病毒性肝炎可以引起受损伤的肝细胞中的丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)酶泄露进入血流并且提高它们在血液中的水平。为了针对肝损害进行试验，在ConA或ConA+硫苷脂注射之后0、6、12、24、48和72小时，对血清进行收集，并且对血清酶ALT和AST的水平进行测量。在美国实验室公司(Laboratory Corporation of America,圣地亚哥,加利福尼亚州)的帮助下，对血清酶水平进行了测量。如在图1e中所示，在ConA或ConA+硫苷脂注射之后6小时观察到了可比水平的血清酶，然而，在12、24和48小时在用ConA和硫苷脂两者注射的小鼠中ALT和AST血清水平都是较低的。在注射ConA(●)的小鼠中，血清ALT和AST在12h左右达到峰值(ALT＝15.8×10^3IU/L以及AST＝22.7×10^3IU/L)，并且截至48小时返回至基线。相比之下，ConA+硫苷脂的组合(○)注射之后，截至12h记录了在ALT和AST的血清水平(ALT＝2.5×10^3IU/L以及AST＝5.4×10^3IU/L)上的一种显著降低，并且截至24h返回至基线。值为每组5只小鼠的平均值±SD。$P<0.001$。

[0130] 在治疗后12、24、48、72和96小时将小鼠处死，并且收集它们的肝。将肝组织在10％甲醛溶液中进行固定，并且保持在室温下直至使用。在太平洋病理学公司(Pacific Pathology Inc.,圣地亚哥,加利福尼亚州)进行了使用苏木素和伊红(H和E)染色的组织学检查。

[0131] 如在图1d中所示，H和E染色明显地证实了：相对于单用ConA处理的小鼠，在经ConA

+牛脑硫苷脂处理的小鼠中改进的肝组织学。组织学检查显示了在ConA注射小鼠之后的这些所指示的时间点处弥漫性的和大规模的入渗以及严重的坏死，图1d，顶部图。相比之下，在这些12h至48h肝切片中，硫苷脂+ConA注射就更少的入渗和更少的坏死而言与轻度损伤相关联，并且截至72h，组织学返回至正常，图1d，底部图。

[0132] 综合起来，在实例1和实例2中所获得的的结果指示：(a)硫苷脂在肝中介导对I型NKT细胞的抑制，并且(b)硫苷脂的给予将硫苷脂/CD 1d-四聚体+细胞激活并且保护免受ConA诱发性肝炎。这指示耐受化的cDC和无反应性的I型NKT细胞共同地导致对一种有害的炎性级联的一种显著抑制。

[0133] 实例3

[0134] 对肝性缺血和再灌注损伤的免疫应答对于CD 11b+Gr-1+细胞群体的组成的影响的分析

[0135] 建立肝性缺血和再灌注损伤模型，如在Shen XD,Ke B,Zhai Y等人，在肝性缺血/再灌注损伤的机制中需要CD154-CD40T-细胞共同刺激途径，并且该途径的阻断有助于并且依赖于血红素加氧酶-1介导的细胞保护作用(CD154-CD40T-cell costimulation pathway is required in the mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury,and its blockade facilitates and depends on heme oxygenase-1mediated cytoprotection)，《移植》(Transplantation)2002,74:315-9(以其全文结合于此)中所描述的，其中有很少量的修改。

[0136] 将WT小鼠和Jα18$^{-/-}$小鼠(缺少I型NKT细胞但是具有正常水平的II型NKT细胞)(3-5只小鼠/组)或3小时之前用20μg硫苷脂/小鼠处理的WT小鼠(2-3只小鼠/组)通过腹膜内注射60mg/kg戊巴比妥钠进行麻醉。在中线剖腹术之后，将一种防止损伤的夹子施加到这3个向头侧肝叶中的肝三联体(肝动脉、门静脉、胆管)。这些尾叶保留了完整的血液循环以防止肠静脉淤血。将腹膜闭合，并且将小鼠放置于一种加热垫(～37℃)上。环境温度的范围在25℃-26℃之间。在90min的部分肝性温缺血之后，去除该夹子，启动再灌注，并且将腹壁缝合。在6小时的再灌注之后，将小鼠安乐死，并且收集血液和向头侧肝叶。假对照经受了相同的步骤，但是没有经受血管阻断。

[0137] 细胞制备。使用机械破碎随后珀可梯度分离和RBC裂解，从这些小鼠的这些向头侧肝叶中分离白细胞，如在海德RC(Haider RC)，阿吉莱拉C(Aguilera C)，毛里奇卡I(Maricic I)等人，II型NKT细胞介导的I型NKT中的无反应性诱导预防了炎性肝病(Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT prevents inflammatory liver disease)，《临床研究杂志》(J Clin Invest)2007,117:2302-12中所描述的。

[0138] 流式细胞术。如所指示的，将白细胞悬浮于FACS缓冲液(包含0.02％NaN_3和2％FCS的PBS)中，进行封闭(抗鼠FcR-γ，BD Pharmingen,圣地亚哥,加利福尼亚州)，并且用载入的mCD1d-四聚体-PE或PE、FrfC或PE-Cy5标记的抗鼠抗体(BD Pharmingen,圣地亚哥,加利福尼亚州或eBioscience公司,圣地亚哥,加利福尼亚州)进行染色。实施了肝单核细胞(MNC)的细胞内细胞因子染色(ICCS)，如在海德RC(Haider RC)，阿吉莱拉C(Aguilera C)，毛里奇卡I(Maricic I)等人，II型NKT细胞介导的I型NKT中的无反应性诱导预防了炎性肝病(Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT prevents inflammatory liver disease)，《临床研究杂志》(J Clin Invest)2007,117:2302-12中所

描述的。在FACSCalibur仪器上使用CellQuest软件(版本4.0.2,BD,富兰克林湖(Franklin Lakes),新泽西州)进行分析。对Gr-1^{high}和Gr-1^{int}群体进行选通。见图2a。

[0139] 统计。数据表示为针对每组的平均值±SEM。P<0.005。通过非配对单尾学生t检验使用GraphPad Prism软件(版本5.0a,GraphPad软件公司,拉荷亚,加利福尼亚州)对组之间的统计学差异进行评估。

[0140] 结果。Gr-1^{int}子集的细胞主要包括单核细胞和髓样前体。在缺血和再灌注损伤(IRI)之后,与在WT小鼠的这些肝中的假的比较,Gr-1^{int}细胞增加了3.5倍左右(p<0.005),而在Jα18$^{-/-}$小鼠中在缺血和再灌注损伤之后没有观察到增加。见图2b,顶部图。因此,在缺血和再灌注损伤期间髓样细胞子集的肝性募集依赖于I型NKT细胞的存在,这些I型NKT细胞在Jα18$^{-/-}$小鼠中是缺少的。

[0141] 当与未经处理的小鼠相比较时,在IRI之后在经硫苷脂处理的小鼠中该Gr-1^{int}细胞子集降低了～50%。这表明了在硫苷脂处理之后,I型NKT细胞的髓样细胞募集活性降低了。

[0142] 主要由粒细胞组成的Gr-1^{high}细胞子集在假对照和经缺血和再灌注损伤诱导的小鼠的肝之间没有显著变化。图2b,底部图。

[0143] 实例4

[0144] 在缺血和再灌注损伤诱导之前硫苷脂的给予显著地抑制了I型NKT细胞分泌IFN-γ。

[0145] 用硫苷脂(20μg/小鼠,i.p.)在缺血诱导之前3小时对一组WT小鼠(n=3)进行注射(Sulf.IRI),其他组(IRI(n=3),假(n=2))没有进行预处理。如在实例3中所描述的,进行肝性缺血和再灌注损伤(90分钟的缺血和6小时的再灌注)以及假外科手术。

[0146] 细胞制备。使用机械破碎随后珀可梯度分离和RBC裂解,从鼠的向头侧肝叶中分离白细胞,如在海德RC(Haider RC),阿吉莱拉C(Aguilera C),毛里奇卡I(Maricic I)等人,II型NKT细胞介导的I型NKT中的无反应性诱导预防了炎性肝病(Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT prevents inflammatory liver disease),《临床研究杂志》(J Clin Invest)2007,117:2302-12中所描述的。

[0147] 流式细胞术。将白细胞悬浮于FACS缓冲液(包含0.02%NaN_3和2%FCS的PBS)中,进行封闭(抗鼠FcR-γ,BD Pharmingen,圣地亚哥,加利福尼亚州),并且用载有αGalCer的mCDld-四聚体-PE抗鼠抗体(BD Pharmingen,圣地亚哥,加利福尼亚州或eBioscience公司,圣地亚哥,加利福尼亚州)进行染色。在FACSCalibur仪器上使用CellQuest软件(版本4.0.2,BD,富兰克林湖(Franklin Lakes),新泽西州)进行分析。

[0148] 统计。数据表示为针对每组的平均值±SEM。P<0.01。通过非配对单尾学生t检验使用GraphPad Prism软件(版本5.0a,GraphPad软件公司,拉荷亚,加利福尼亚州)对组之间的统计学差异进行评估。

[0149] 结果。在缺血和再灌注损伤诱导之后,与来自假外科手术的I型NKT细胞相比较,I型NKT细胞表现出提高的IFN-γ产生量,而在缺血和再灌注损伤之前3小时硫苷脂的给予显著地降低了由I型NKT细胞进行的IFN-γ分泌。见图2c。

[0150] 实例5

[0151] 对I型NKT细胞的抑制导致了在IRI之后减少的肝坏死

[0152] 将经纯化的牛髓磷脂源性硫苷脂(>90％纯度)(购自梅特雷耶公司(Matreya Inc.,普莱曾特盖普(Pleasant Gap),宾夕法尼亚州)溶解于媒介物(0.5％聚山梨醇酯-20(吐温-20)和0.9％NaCl溶液)中,并且在PBS中稀释。在缺血诱导或假外科手术之前3至48小时,用硫苷脂(20μg/小鼠)向腹膜内地处理多组BL/6小鼠(WT硫苷脂)和Jα18$^{-/-}$小鼠(Jα18$^{-/-}$硫苷脂)。如在实例3中所描述的,对经硫苷脂处理的以及未经处理的WT和Jα18$^{-/-}$小鼠进行肝性缺血和再灌注损伤以及假外科手术。在90分钟的缺血和24小时的再灌注之后,将肝组织(向头侧叶)固定在10％甲醛水溶液中,包埋入石蜡中,并且用苏木素和伊红对切片进行染色以用于组织学分析(IDEXX实验室公司,韦斯特布鲁克,缅因州)。

[0153] 用硫苷脂预处理的WT小鼠(WT硫苷脂)和Jα18$^{-/-}$小鼠在IRI之后只发展出极少的或者没有发展出肝性坏死,而在这些未经处理的(WT)小鼠的这些向头侧肝叶中发现了大坏死区。见图4,顶部图。假对照没有显示出坏死。见图4,底部图。该组织学分析指示IRI之后的坏死在缺少1型NKT细胞的小鼠(Jα18$^{-/-}$小鼠)以及在其中1型NKT细胞的活性受到硫苷脂处理的抑制的小鼠的肝中是减少的。

[0154] 实例6

[0155] 在WT和缺失I型NKT细胞的(Jα18$^{-/-}$)小鼠中对酒精性肝病的诱导

[0156] 用营养充足的利伯-德卡利液体饮食驯化一周之后,6-8周龄的雄性C57BL/6J小鼠(B6)和Jα18$^{-/-}$小鼠(缺少1型NKT细胞而不是2型NKT细胞)自由食用一种包含5％乙醇的液体饮食或一种等热量的包含糊精麦芽糖的饮食(Bio-Serv,新泽西州)。采取预防措施,在已灭菌的进料器中使用高压灭菌的水,每日更换饲料以制备每日新鲜的饮食。

[0157] 接受这种包含乙醇的饮食的B6和Jα18-/-小鼠被分成两组—长期乙醇饲喂组以及长期加无节制乙醇饲喂组。对该长期乙醇饲喂组中的小鼠饲喂包含5％乙醇的液体饮食,持续长达4-5周。对在长期加无节制乙醇饲喂组中的小鼠饲喂包含5％乙醇的液体饮食,持续10天,随后(在第11天)是单次高剂量的管饲乙醇(5g/kg体重)。对在对照组中的小鼠用等热量的糊精麦芽糖进行管饲。管饲之后,将小鼠饲养在一种温度控制的暖垫上,并且进行监测。尽管起初移动缓慢,大多数接受了高剂量管饲乙醇的小鼠在几小时之内重新获得了正常行为。在管饲之后8-9小时将小鼠安乐死。

[0158] 在10天或者4-5周的长期乙醇饲喂或长期加无节制乙醇饲喂之后,对从经乙醇饲喂的雄性B6和Jα18-/-小鼠中获得的肝叶组织进行H和E染色。如在图9a(顶部图)中所示,在经受了持续10天的长期乙醇饲喂的B6或Jα18-/-小鼠中,组织病理学分析都没有显示出肝损害。另外,通过对经受了4-5周的长期乙醇饲喂的B6和Jα18-/-小鼠的肝组织的组织病理学分析,没有观察到肝损害(数据未示出)。然而,对来自经受了长期加无节制乙醇饲喂的B6小鼠的肝组织的组织病理学分析显示了显著的损害。见图9a,左下图。而来自经受了长期加无节制乙醇饲喂的Jα18-/-小鼠的肝组织显示出相对小的损害。见图9a,右下图。

[0159] 在10天或者4-5周长期乙醇饲喂以及长期加无节制饲喂之后,在对照B6和Jα18-/-小鼠以及经乙醇饲喂的B6和Jα18-/-小鼠中对血清ALT水平进行测量。如在图9b左侧图中所示,长期乙醇没有导致血清ALT水平的显著升高。与对照相比较,血清ALT水平在经受了长期加无节制乙醇饲喂的B6小鼠中得以显著提高,并且在经受了长期加无节制乙醇饲喂的Jα18-/-小鼠中在较小的程度上得以提高。见图9b,右侧图。

[0160] 如通过组织学或ALT/AST血清水平所举例说明的,最大的肝损害(与不含乙醇的对

照相比较)在B6和Jα18-/-小鼠中在高剂量乙醇管饲之后6-8小时观察到。在接受了长期加无节制乙醇饲喂的这些组之间,缺少1型NKT细胞的Jα18-/-小鼠展现出较小的肝损害。

[0161] 既然如通过组织病理学分析所举例说明的,持续10天或持续4-5周的长期乙醇饲喂没有导致任何显著的肝损害,并且没有导致在血清ALT/AST水平上的显著变化,这被称为临床前或亚临床阶段ALD。在一个第二步长期-无节制酒精饲喂之后,诱发了临床阶段ALD。

[0162] 在用一种包含5%乙醇的液体利伯-德卡利饮食(长期乙醇饲喂)或者一种包含相似数值的卡路里的对照饮食饲喂5周之后,从雄性B6以及Jα18-/-小鼠的组(每组中4只)中分离肝单核细胞(MNC)。将这些经分离的肝MNC用各种细胞表面抗体进行染色,并且通过流式细胞术进行分析。在该临床前ALD阶段中,在B6而不是$J\alpha18^{-/-}$小鼠的肝中观察到了经激活的I型NKT细胞和CD 11b+Gr-1+髓样细胞的累积。见图5。

[0163] 实例7

[0164] 硫苷脂或全反式维甲酸(ATRA)对酒精诱发性肝损伤的预防

[0165] 对多组7周龄的B6(WT)和Jα18-/-雄性小鼠用以下项进行注射(i.p.):在第1和10天,20μg/小鼠的硫苷脂;在第6-10天,0.3毫克/小鼠的ATRA,或媒介物/DMSO,并且饲喂一种包含5%乙醇的液体饮食持续10天随后(在第11天)单次高剂量的管饲乙醇(5g/kg体重)(长期加无节制乙醇饲喂组)或者一种等热量的包含糊精麦芽糖的饮食随后带有糊精麦芽糖的一种等热量的管饲(对照组)。在管饲之后6-8小时将这些小鼠安乐死,并且收获血清和肝组织。

[0166] 针对每组小鼠,确定血清ALT水平。如在图6中所示,在经受了长期加无节制乙醇饲喂的注射媒介物/DMSO的B6小鼠(黑条形)中血清ALT水平是显著提高的,而在接受硫苷脂(水平条纹的条形)或者ATRA(竖直条纹的条形)注射的经长期加无节制乙醇饲喂的B6小鼠中血清ALT水平与经对照饲喂的B6小鼠(无阴影条形)的血清ALT水平相似。在经受了长期加无节制乙醇饲喂的注射媒介物/DMSO的Jα18-/-小鼠(黑条形)中血清ALT水平与经对照饲喂的Jα18-/-小鼠(无阴影条形)相比较是提高的,然而,与经受了长期加无节制乙醇饲喂的注射媒介物/DMSO的B6小鼠相比较,经受了长期加无节制乙醇饲喂的注射媒介物/DMSO的Jα18-/-小鼠具有降低的血清ALT水平。见图6。

[0167] 在长期加无节制乙醇饲喂之后,对从注射媒介物/DMSO、硫苷脂或ATRA的B6小鼠中收获的肝组织进行了针对肝性脂肪性肝炎(脂肪性肝病)的组织学检查。如在图7中所示,来自这些注射媒介物/DMSO的B6小鼠的肝组织显示出在长期加无节制乙醇饲喂之后的损伤的显著迹象。然而,从注射了硫苷脂或ATRA的B6小鼠中获得的肝组织几乎没有显示出脂肪性肝病的迹象。

[0168] 组织学分析和血清肝酶分析表明,硫苷脂或者视黄酸受体(RAR)激动剂ATRA的给予能够保护免受由过量饮酒引起的肝损害。

[0169] 实例8

[0170] ATRA对I型NKT细胞增殖的抑制

[0171] 从初试B6小鼠的脾中分离I型NKT细胞,并且用[^{3}H]-胸苷以及单用一种最佳浓度的αGalCer、一种最佳浓度的αGalCer加0.15μg/ml、1.2μg/ml或18.8μg/ml ATRA,或者单用ATRA进行体外培养。通过[^{3}H]-胸苷掺入对这些I型NKT细胞的增殖进行测量。如在图8a中所示,对于生长于0.15μg/ml ATRA和αGalCer或单用αGalCer中的I型NKT细胞,细胞增殖是相

似的，而相比之下，对于生长于1.2μg/ml或18.8μg/ml ATRA和αGalCer中的1型NKT细胞，增殖是降低的。对于18.8μg/ml ATRA，观察到了对αGalCer诱导性I型NKT细胞增殖的最大抑制。对于生长于单用ATRA中的1型NKT细胞，没有观察到或观察到了极少的增殖。

[0172] 实例9

[0173] ATRA对I型NKT细胞活性的抑制

[0174] 通过在ATRA(0.15μg/ml、1.2μg/ml或18.8μg/ml)的存在或不存在下用一种最佳浓度的αGalCer对NKT细胞(Hy 1.2)和经辐照的抗原递呈细胞(APC)进行持续一个16小时时间段的体外共培养，测试ATRA对响应于一种体外αGalCer挑战而由I型NKT细胞分泌IL-2细胞因子的影响。对上清液进行收集，并且使用IL-2夹心ELISA对所分泌的IL-2水平进行测量。

[0175] IL-2分泌水平没有受到0.15μg/ml ATRA的显著影响，然而，对于在1.2μg/ml或18.8μg/ml ATRA的存在下所培养的I型NKT细胞，观察到了在IL-2分泌上的显著降低。由18.8μg/ml的ATRA实现了在IL-2分泌上的最大降低。见图8b。

[0176] 进一步测试了在给予ATRA之后I型NKT细胞中的功能性改变。在两次独立实验中，每天用0.3mg/动物(～15mg/Kg体重)的ATRA或媒介物(DMSO)对多组黑6(WT)小鼠进行腹膜内注射，持续一个5天的时间段。对I型NKT细胞进行纯化，并且用不断提高的浓度的αGalCer进行体外培养。对细胞增殖进行测量，并且对上清液进行收集。通过夹心ELISA针对IFN-γ、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12以及IL-13，对αGalCer体外挑战之后经分离的I型NKT的细胞因子响应进行确定。从注射ATRA的小鼠中分离的这些I型NKT细胞没有响应于αGalCer刺激而增殖(数据未示出)。如在图8c中所示，响应于αGalCer刺激，从注射媒介物(DMSO)的小鼠中分离的I型NKT细胞分泌了IFN-γ、IL-4以及IL-13，但是没有分泌IL-6、IL-10或IL-12。从注射ATRA的小鼠中分离的I型NKT细胞中，没有检测到响应于αGalCer刺激的对IFN-γ、IL-6、IL-10、IL-12或IL-13的分泌。从注射ATRA的小鼠中分离的I型NKT细胞中，响应于αGalCer刺激，观察到了IL-4分泌的水平降低。见图8c。

[0177] 实例10

[0178] ATRA不抑制II类MHC限制性常规CD4T细胞

[0179] 通过从初试B10.PL Vβ8.2TCR转基因小鼠中分离髓磷脂碱性蛋白MBPAc1-9反应性CD4+T细胞，并且在缓变浓度的ATRA(0.15，1.2，18.8μg/ml)的存在或不存在下用[^{3}H]-胸苷以及一种最佳浓度的MBPAc1-9对这些细胞进行体外培养，测试ATRA对II类MHC限制性常规CD4T细胞的影响。通过[^{3}H]-胸苷掺入对这些MBPAc1-9反应性CD4+T细胞的增殖进行测量。在经ATRA处理的培养物中，没有观察到对MBPAc1-9刺激性增殖的抑制。见图10。这表明了ATRA不直接抑制MHC限制性CD4+T细胞的活性。

[0180] 实例11

[0181] 在抗原递呈细胞的不存在下的ATRA处理抑制了1型NKT细胞功能

[0182] 还对在抗原递呈细胞的不存在下ATRA处理对I型NKT细胞的影响进行了测量。不用ATRA或者用5μg/ml、10μg/ml或20μg/ml ATRA将I型NKT杂交瘤细胞(Hy 1.2)体外培养24小时。然后将这些细胞清洗三次，并且在缓变浓度的脂质抗原αGalCer的存在下与经辐照的脾细胞(APC)进行共培养。在16小时之后，对上清液进行收集，并且使用IL-2夹心ELISA对IL-2水平进行测量。如在图11中所示，用ATRA对I型NKT杂交瘤细胞(Hy1.2)进行的处理抑制了IL-2分泌。这表明了在抗原递呈细胞的不存在下ATRA处理抑制了I型NKT细胞的效应子功

能。

[0183] 实例12

[0184] 亚型特异性RAR激动剂对I型NKT细胞活性的抑制

[0185] 视黄酸受体(RAR)包括三种主要亚型:RARα、RARβ以及RARγ。RAR激动剂ATRA不是选择性针对一种特异亚型的。用亚型选择性RAR激动剂针对RAR亚型对抑制I型NKT细胞活性的贡献进行如下测试。将脾细胞从初试B6(WT)小鼠中分离,并且在[^{3}H]-胸苷、一种最佳浓度的αGalCer以及缓变浓度的泛RAR激动剂ATRA、RARα激动剂AM580、RARβ2激动剂AC55649或RARγ激动剂CD 1530的存在下进行体外培养。通过[^{3}H]-胸苷掺入对响应于αGalCer刺激的这些I型NKT细胞的增殖进行测量。

[0186] 在存在ATRA、AM580以及CD1530的条件下所培养的I型NKT细胞表现出了相似水平的细胞增殖(高达10^1μg/ml的浓度)。见图12。在10^1μg/ml ATRA或CD1530的存在下所培养的细胞表现出了低度的或极少的增殖,而对于在10^1μg/ml AM580中所培养的细胞,维持了增殖。对于RARβ2激动剂AC55649,在所测试的所有浓度都观察到了与其他RAR激动剂相比较降低的细胞增殖,除了10^1μg/ml,在该浓度下,对于在AC55649、ATRA或CD1530中所培养的细胞,观察到了低度的或极少的增殖。

[0187] 这些结果表明RARβ2激动剂AC55649是I型NKT细胞活性的一种有效抑制剂,并且视黄酸受体-β2(RAR-β2)信号传导途径参与了对I型NKT细胞的抑制。

[0188] 实例13

[0189] PPAR-γ途径调节对I型NKT细胞的影响

[0190] 过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)是配体诱导型转录因子,它们属于核激素受体超家族,该核激素受体超家族还包括针对甲状腺激素、类视黄醇、类固醇激素以及维生素D的受体。通过在DNA中与类视黄醇X受体(RXR)作为一种杂二聚物配偶体结合至特异性过氧化物酶体增殖物反应元件(PPRE),PPAR调节基因表达。PPAR已经被认为在脂质和能量代谢、炎症、胚胎着床、糖尿病和癌症中起作用。

[0191] 通过在缓变浓度的PPAR-γ激动剂罗格列酮或PPAR-γ拮抗剂GW9662的存在或不存在下用[^{3}H]-胸苷以及一种最佳浓度的αGalCer对新鲜分离的脾I型NKT细胞进行培养,针对PPAR-γ途径在对I型NKT细胞的抑制中的作用进行了测试。通过[^{3}H]-胸苷掺入对响应于αGalCer刺激的脾I型NKT细胞的增殖进行了定量。针对在PPAR-γ激动剂罗格列酮或者PPAR-γ拮抗剂GW9662(在所有浓度下)中所培养的细胞,都观察到了相似水平的增殖。见图13。这些结果表明了对PPAR-γ途径的特异性抑制或激活不直接抑制I型NKT细胞增殖。

[0192] 实例14

[0193] 针对视黄醇类似物对I型NKT细胞活性的影响的检验

[0194] 从初试B6小鼠中分离脾细胞,并且在缓变浓度的ATRA、视黄醇、9-顺式-RA或13-顺式-RA的存在或不存在下用[^{3}H]-胸苷以及一种最佳浓度的αGalCer进行体外培养。通过[^{3}H]-胸苷掺入对响应于αGalCer刺激的这些脾I型NKT细胞的增殖进行定量。如在图14中所示,对于在10^1μg/ml ATRA中所培养的细胞,没有观察到增殖或观察到了极少的增殖,而只在视黄醇、9-顺式-RA或13-顺式-RA超过10^1μg/ml的浓度下观察到对I型NKT细胞增殖的相同水平的抑制。

[0195] 实例15

[0196] 针对RAR激动剂对I型NKT细胞活性的影响的检验

[0197] 对新鲜分离的脾细胞和I型NKT细胞杂交瘤(1.2Hyb)进行了体外增殖和细胞因子释放测定。在[^{3}H]-胸苷以及一种最佳浓度的αGalCer(10ng/ml)的存在下用滴定浓度的ATRA、维甲酸、RARα激动剂AM580、RARβ激动剂AC55649或RARγ激动剂CD 1530对这些细胞进行培养。通过[^{3}H]-胸苷掺入对响应于αGalCer刺激的I型NKT细胞的增殖进行定量。使用IL-2夹心ELISA对IL-2水平进行测量。对这些RAR激动剂的最佳浓度进行确定。在图15中显示了RAR激动剂在它们的最佳浓度下的效果的比较。对于在ATRA、维甲酸、RARγ激动剂CD 1530的存在下所培养的细胞,观察到最低水平的增殖。在RARγ激动剂CD 1530的存在下所培养的细胞显示出最低水平的IL-2分泌。这些结果指示RARγ激动剂CD 1530是I型NKT细胞活性的一种有效抑制剂。

[0198] 实例16

[0199] 对I型NKT细胞的他扎罗汀和ATRA抑制的比较

[0200] 通过体外增殖和细胞因子释放测定,检验了选择性RARγ激动剂他扎罗汀对I型NKT细胞活性的影响。

[0201] 对新鲜分离的脾细胞和I型NKT细胞杂交瘤(1.2Hyb)进行体外增殖和细胞因子释放测定。在[^{3}H]-胸苷以及一种最佳浓度的αGalCer(10ng/ml)的存在下用不断提高的浓度的ATRA或他扎罗汀对这些细胞进行培养。通过[^{3}H]-胸苷掺入对响应于αGalCer刺激的I型NKT细胞的增殖进行定量。使用IL-2夹心ELISA对IL-2水平进行测量。在图16中显示ATRA和他扎罗汀对I型NKT细胞抑制的比较。尽管通过RAR激动剂抑制了I型NKT细胞增殖和IL-2分泌,他扎罗汀在较低的浓度下实现了它的抑制性效果。见图16。

[0202] 实例17

[0203] 在他扎罗汀和ATRA的体内给予之后对I型NKT细胞的抑制

[0204] 在他扎罗汀或ATRA的体内给予之后对I型NKT细胞中的功能性改变进行测试。每天用300μg ATRA(15mg/kg)、300μg他扎罗汀(15mg/kg)或媒介物(DMSO)对多组小鼠进行腹膜内注射,持续一个5天的时间段。对脾I型NKT细胞进行纯化,并且用不断提高的浓度的αGalCer进行体外培养。通过[^{3}H]-胸苷掺入的定量对细胞增殖进行测量,并且这些结果显示于图17。从注射ATRA的、注射他扎罗汀的或注射媒介物(DMSO)的小鼠中分离的细胞对αGalCer刺激的增殖性响应的一种比较,指示ATRA或者他扎罗汀的体内给予抑制了I型NKT细胞活性。然而,针对从注射他扎罗汀的小鼠中分离的I型NKT细胞,观察到了最低水平的增殖。见图17。

[0205] 从用ATRA、他扎罗汀或媒介物(DMSO)注射的小鼠的肝中分离单核细胞,并且用αGalCer/CD 1d-四聚体以及泛抗TCRP抗体进行染色。进行流式细胞术,并且对表达αGalCer/CD1d-四聚体/TCRβ的细胞(I型NKT细胞)的群体进行定量,如在图18中所示。在对照相对于给予ATRA或他扎罗汀的动物的肝中,没有观察到在I型NKT细胞的数值上的显著差异。见图18。这些结果指示ATRA或他扎罗汀的给予没有耗尽肝I型NKT细胞。

[0206] 预示性实例18

[0207] RAR激动剂的给予对ALD的预防

[0208] 对RAR激动剂在预防或缓解酒精性肝病中的有效性进行了测试,其中通过每天用一个有效量的以下项注射多组小鼠:ATRA、他扎罗汀、维甲酸、RARα激动剂AM580、RARβ激动

剂AC55649、RARγ激动剂CD 1530或媒介物/DMSO，持续一个5天的时间段，在该时间期间对这些小鼠饲喂一种包含5％乙醇的液体饮食持续10天随后(在第11天)单次高剂量的管饲乙醇(5g/kg体重)(长期加无节制乙醇饲喂组)，或者一种等热量的包含糊精麦芽糖的饮食随后带有糊精麦芽糖的一种等热量的管饲(对照组)。在管饲之后6-8小时将这些小鼠安乐死，并且收获血清和肝组织。

[0209] 针对每组小鼠，确定血清ALT水平。与对照饲喂的小鼠相比较，在经受了长期加无节制乙醇饲喂的注射媒介物/DMSO的小鼠中，血清ALT水平预期会显著提高。与经受了长期加无节制乙醇饲喂的注射媒介物/DMSO的小鼠相比较，接受了ATRA、他扎罗汀、维甲酸、AM580、AC55649、CD1530的注射的经长期加无节制乙醇饲喂的小鼠预期会具有降低的血清ALT水平。经受了长期加无节制乙醇饲喂的注射ATRA、他扎罗汀或维甲酸的小鼠的血清ALT水平预期会相似于在经对照饲喂的小鼠中所观察到的血清ALT水平。针对肝性脂肪性肝炎(脂肪性肝病)的组织学检查预期会显示出从长期加无节制乙醇饲喂之后的注射媒介物/DMSO的小鼠中收获的肝组织的显著损害，而针对从长期加无节制乙醇饲喂之后的注射ATRA、他扎罗汀、维甲酸、AM580、AC55649或CD 1530的小鼠中收获的肝组织，预期会有降低的损害或没有损害。

[0210] 预示性实例19

[0211] 用来自经ATRA处理的或经他扎罗汀处理的BL/6小鼠的经αGalCer/CD 1d-四聚体纯化的I型NKT细胞，使用过继转移实验，以检验一个缓变数值的这些细胞当被转移入初试BL/6受者中时是否能够抑制长期加无节制乙醇饲喂之后的肝损伤。

[0212] 对经纯化的(经分拣的)硫苷脂-CD 1d-四聚体+T细胞进行测试，以确定一旦过继转移入CD 1d+/+以及CD 1d-/-小鼠中它们是否能够预防ALD。细胞因子敲除的小鼠被用作硫苷脂反应性T细胞的供体，以直接确定由II型NKT细胞进行的IFN-γ、IL-4以及IL-10分泌在ALD的调节中的作用。使用四聚体对硫苷脂反应性T细胞进行分离，并且缓变的数值(50-100万)被过继转移入CD 1d+/+以及CD 1d-/-C57BL/6受者中。从18只初试C57BL/6小鼠中分离150万左右硫苷脂-CD 1d-四聚体+细胞。一天之后，受者遭受长期加无节制乙醇饲喂。为了对II型NKT细胞分泌细胞因子的作用进行分析，起初使用在BL/6背景(杰克逊实验室(Jackson Lab))下的IFN-γ、IL-4-/-或IL-10-/-。用硫苷脂(20μg/动物)对多组BL/6野生型或敲除小鼠进行注射，并且然后诱发ALD。在这些2型细胞因子的不存在下，硫苷脂的给予预期会预防ALD。用来自特异性细胞因子敲除小鼠的硫苷脂-CD 1d-四聚体+细胞进一步进行了过继细胞转移实验，其中缓变的数值(50-100万)被转移入CD 1d-/-C57BL/6小鼠中。一天之后，受者小鼠被以乙醇饲喂来维持。平行地，作为一个阳性对照，将硫苷脂-CD 1d-四聚体+T细胞从野生型小鼠转移入CD 1d+/+BL/6小鼠中。这些实验预期会直接证实由硫苷脂反应性T细胞分泌的这些细胞因子在ALD的控制中的作用。

[0213] 等效物

[0214] 前述的书面说明书被认为足以使本领域普通技术人员能够实践在此的实施例。前述的说明书详述了某些优选实施例，并且描述了由诸位发明人想到的最佳方式。然而，将领会到的是，不论前述事项可以在文中看起来如何详尽，在此的实施例可以按多种方式进行实践，并且应该依据所附权利要求书及其任何等效物来解释。

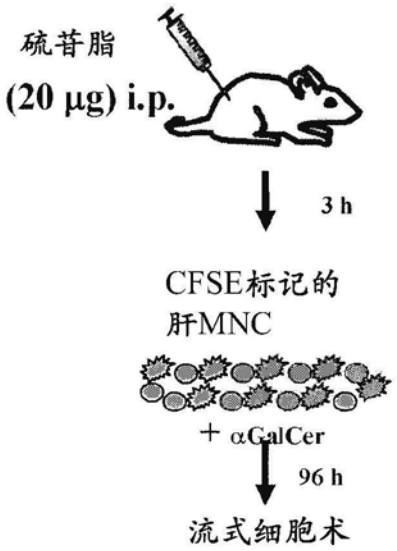

硫苷脂
(20 μg) i.p.
3 h
CFSE标记的
肝MNC
+ αGalCer
96 h
流式细胞术

图1a

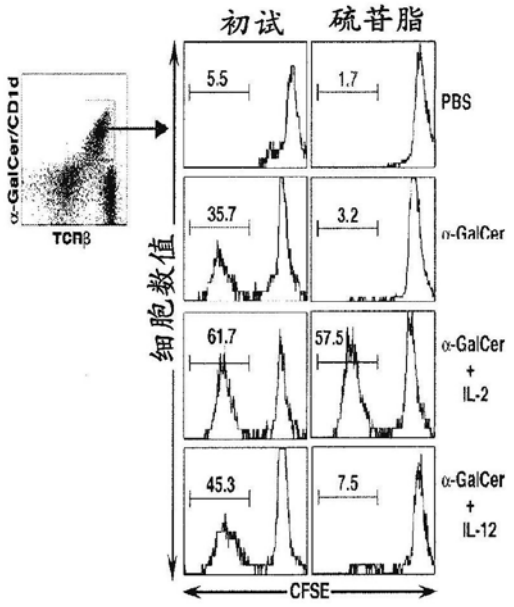

初试
硫苷脂
α-GalCer/CD1d
TCRβ
细胞数值
5.5
1.7
PBS
35.7
3.2
α-GalCer
61.7
57.5
α-GalCer
+
IL-2
45.3
7.5
α-GalCer
+
IL-12
CFSE

图1b

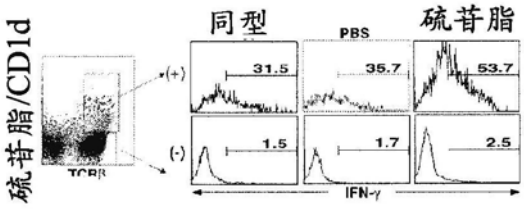

同型
PBS
硫苷脂
硫苷脂/CD1d
TCRβ
(+)
(-)
31.5
35.7
53.7
1.5
1.7
2.5
IFN-γ

图1c

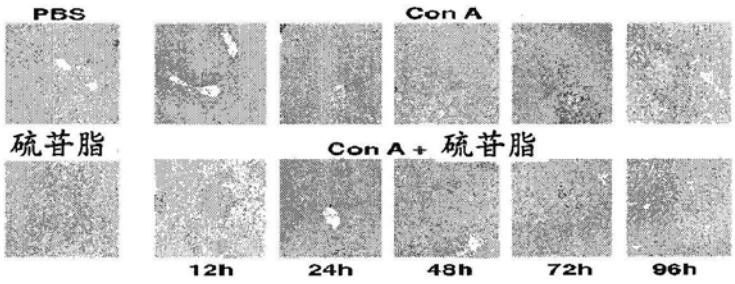


图1d

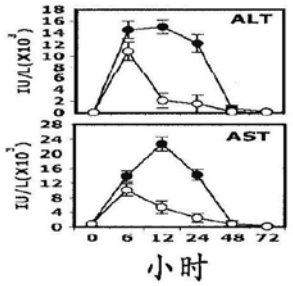


图1e

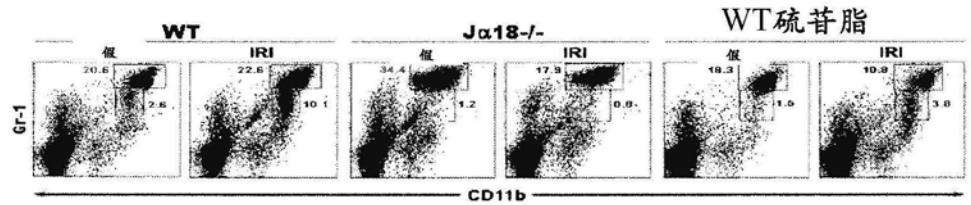


图2a

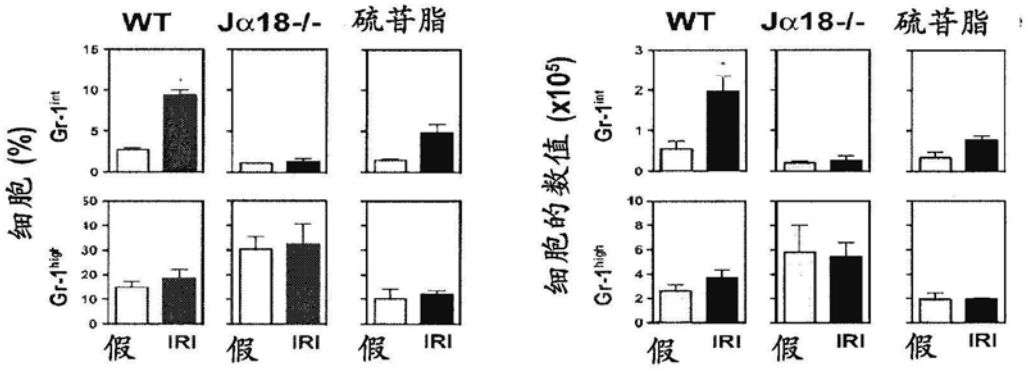


图2b

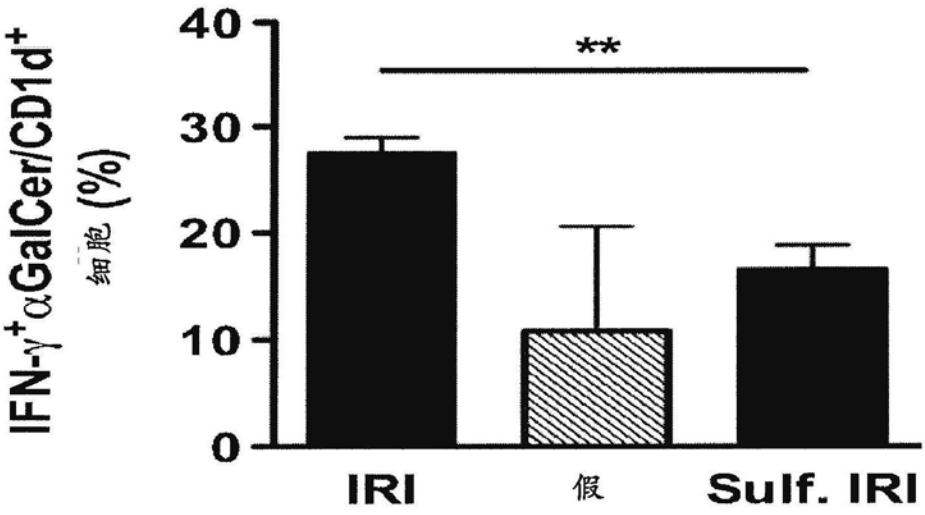

IFN-γ+αGalCer/CD1d+细胞 (%)
40
30
20
10
0
**
IRI
假
Sulf. IRI

图2c

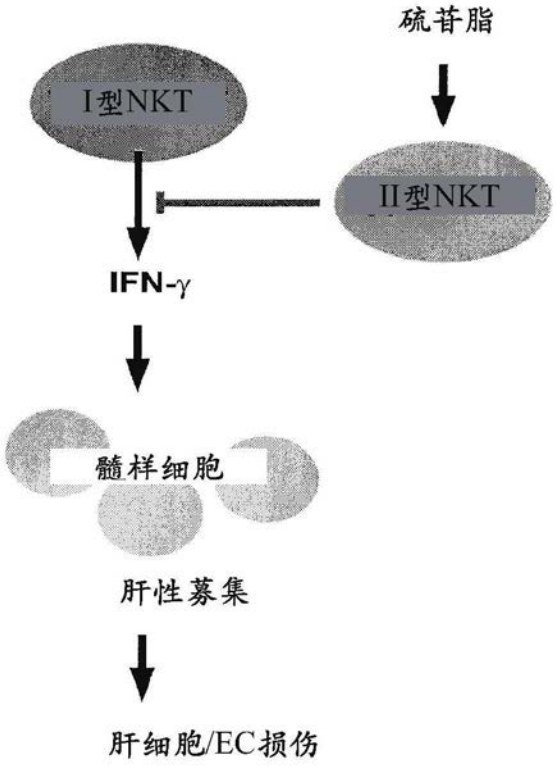

硫苷脂
I型NKT
II型NKT
IFN-γ
髓样细胞
肝性募集
肝细胞/EC损伤

图3

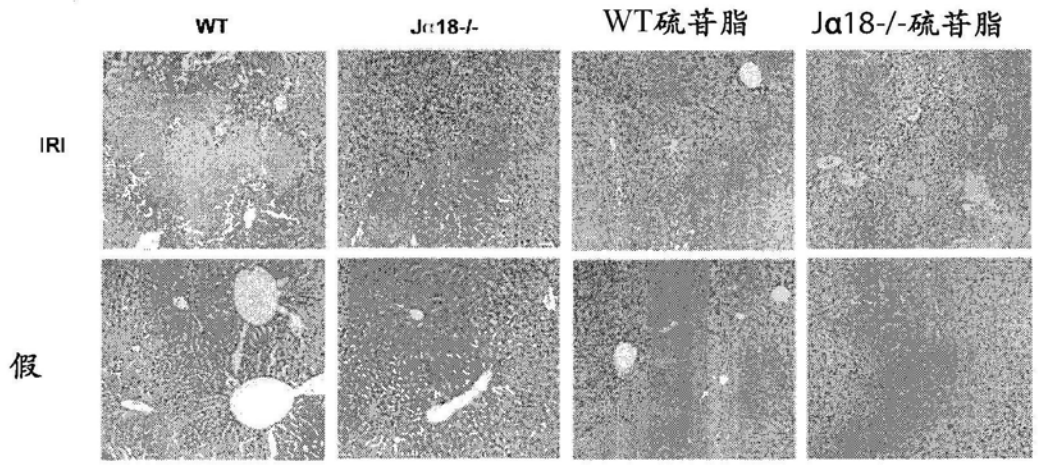

WT
Jα18-/-
WT硫苷脂
Jα18-/-硫苷脂
IRI
假

图4

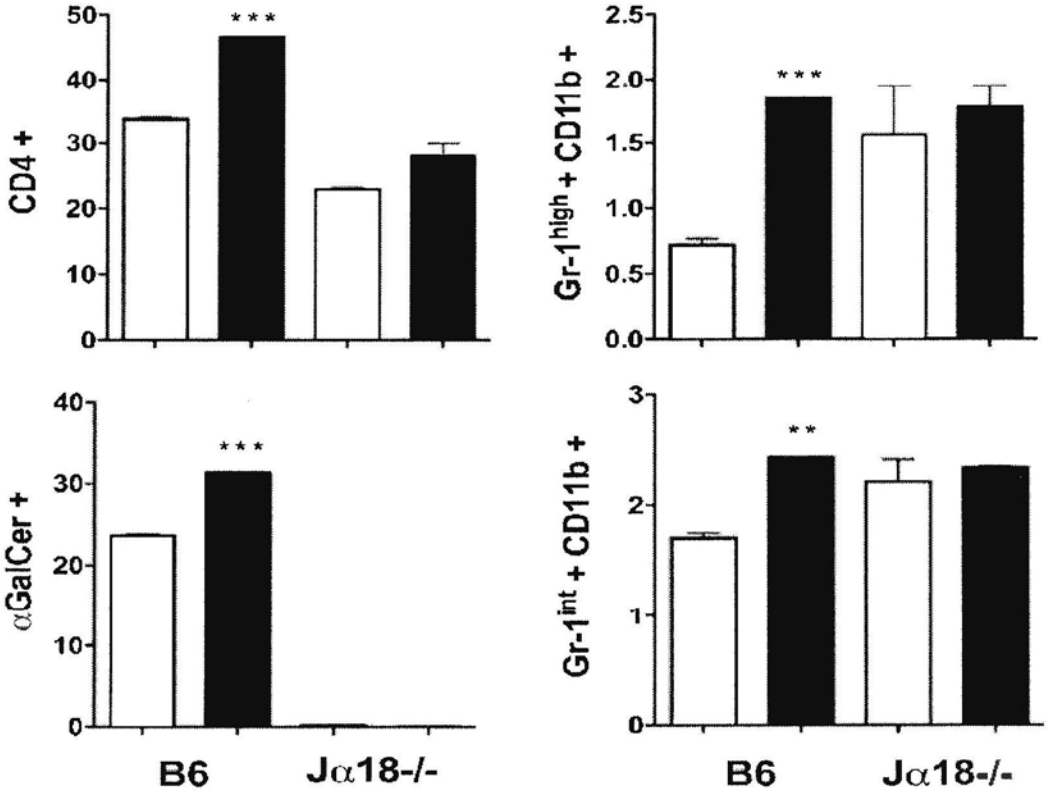

CD4 +
***
Gr-1high + CD11b +
***
αGalCer +
***
Gr-1int + CD11b +
**
B6
Jα18-/-
B6
Jα18-/-

图5

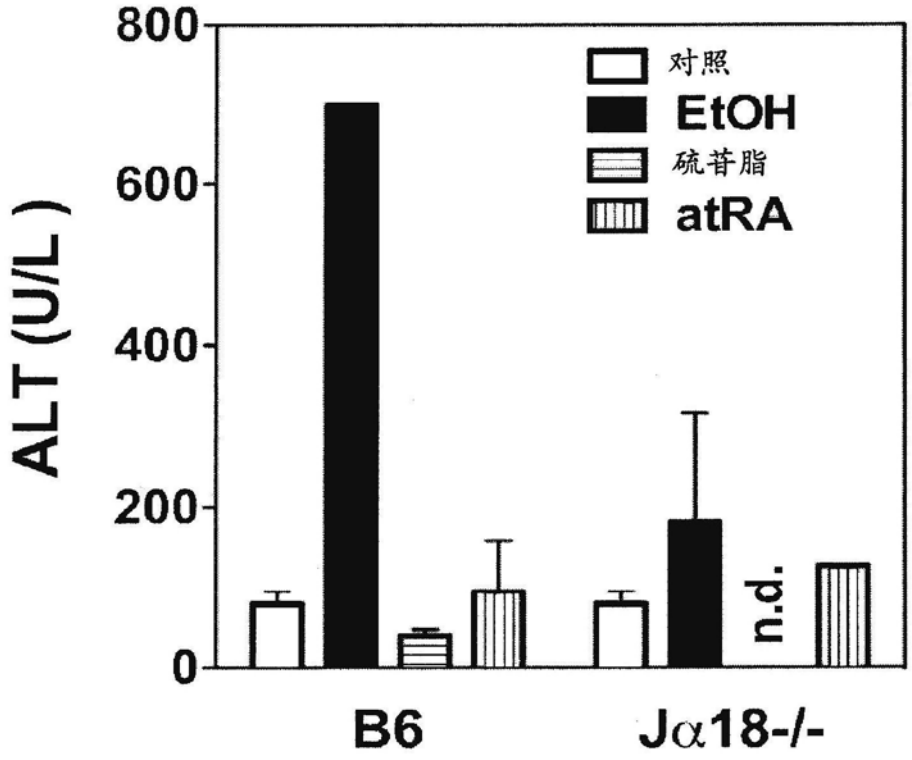

800
600
400
200
0
ALT (U/L)
对照
EtOH
硫苷脂
atRA
n.d.
B6
Jα18-/-

图6

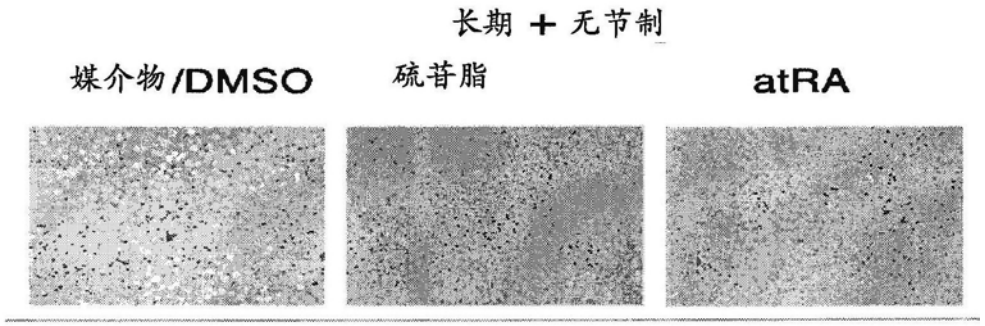

长期 + 无节制
媒介物/DMSO
硫苷脂
atRA

图7

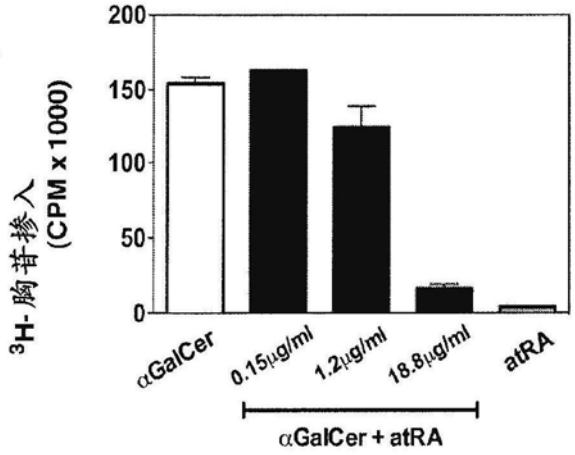

200
150
100
50
0
^{3}H- 胸苷-掺入 (CPM x 1000)
αGalCer
0.15μg/ml
1.2μg/ml
18.8μg/ml
atRA
αGalCer + atRA

图8a

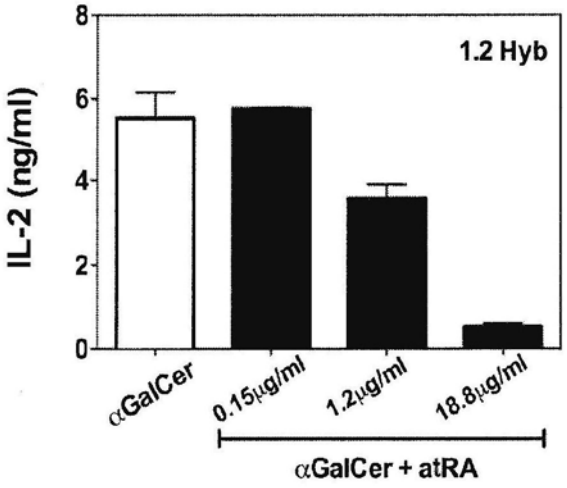

8
6
4
2
0
IL-2 (ng/ml)
1.2 Hyb
αGalCer
0.15μg/ml
1.2μg/ml
18.8μg/ml
αGalCer + atRA

图8b

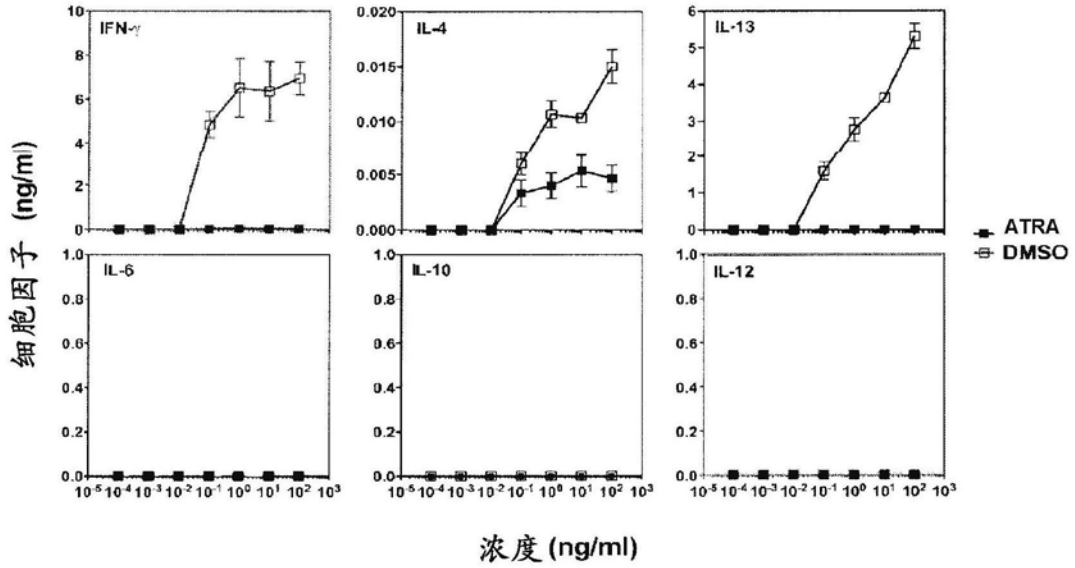

IFN-γ
IL-4
IL-13
IL-6
IL-10
IL-12
细胞因子 (ng/ml)
浓度 (ng/ml)
ATRA
DMSO

图8c

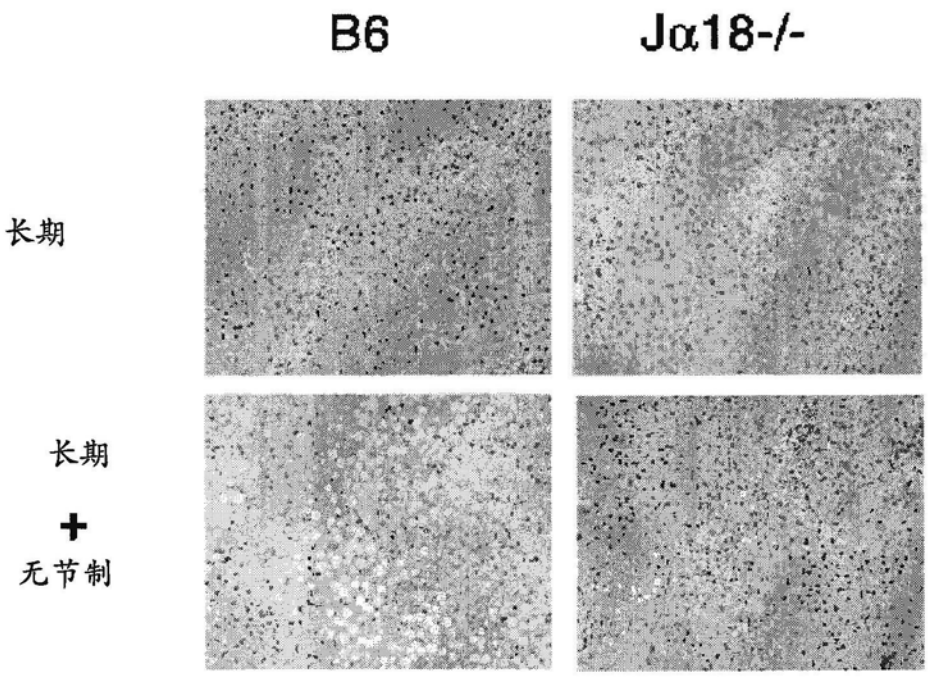

B6
Jα18-/-
长期
长期
+
无节制

图9a

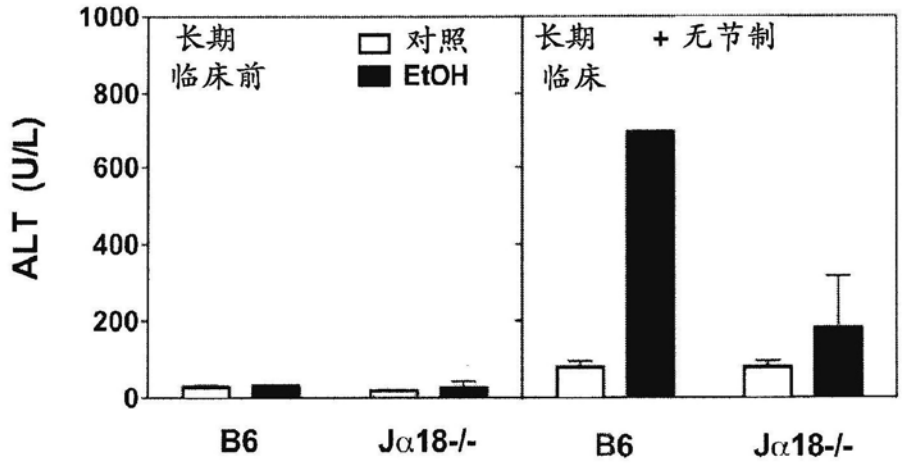

1000
800
600
400
200
0
ALT (U/L)
长期
临床前
对照
EtOH
长期
临床
+ 无节制
B6
Jα18-/-
B6
Jα18-/-

图9b

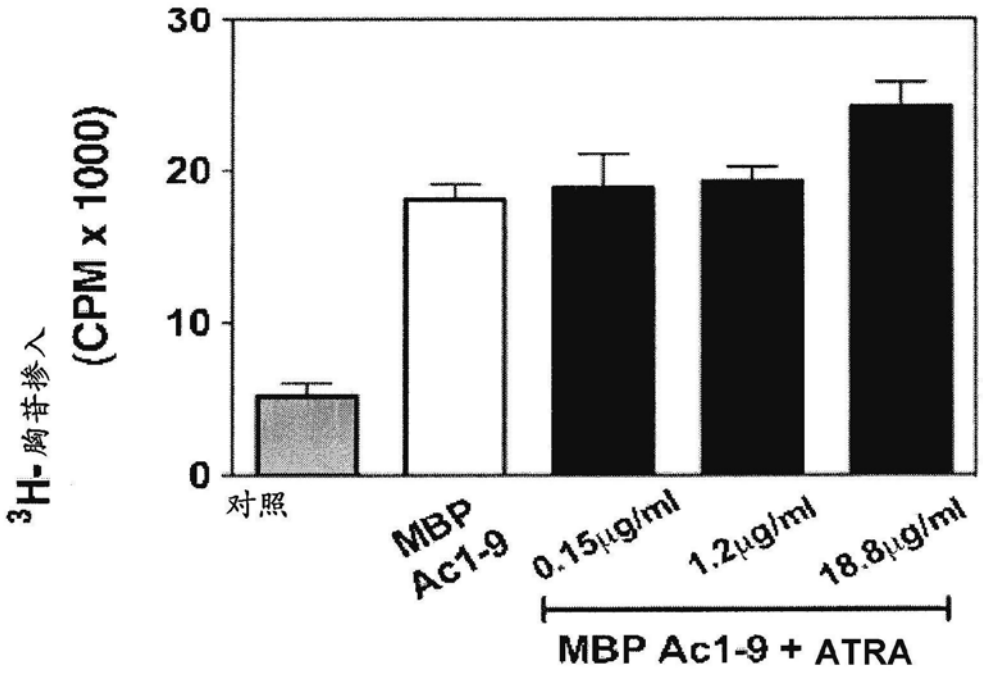

30
20
10
0
^{3}H-胸苷掺入
(CPM x 1000)
对照
MBP
Ac1-9
0.15μg/ml
1.2μg/ml
18.8μg/ml
MBP Ac1-9 + ATRA

图10

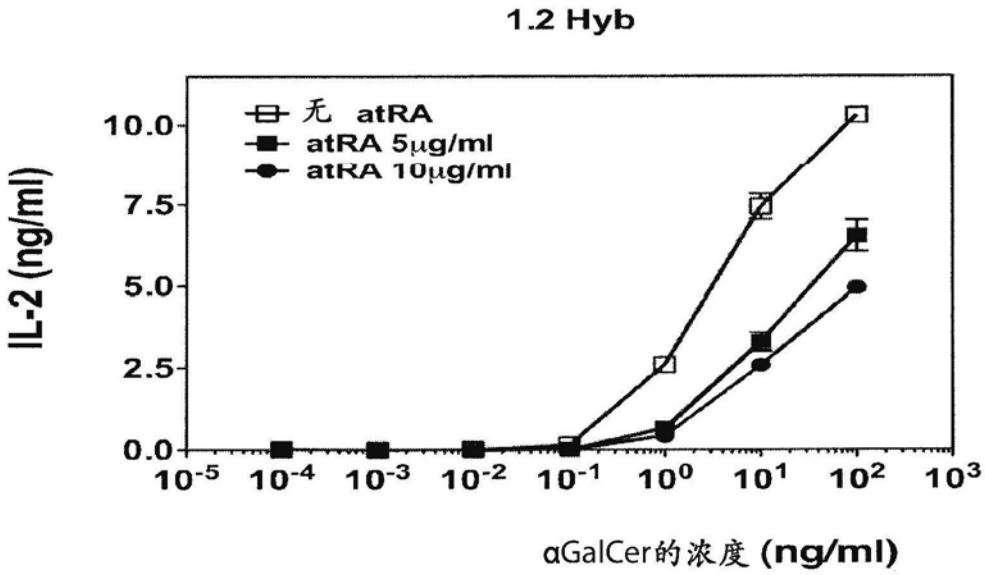

1.2 Hyb
无 atRA
atRA 5μg/ml
atRA 10μg/ml
IL-2 (ng/ml)
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100 101 102 103
αGalCer的浓度 (ng/ml)

图11

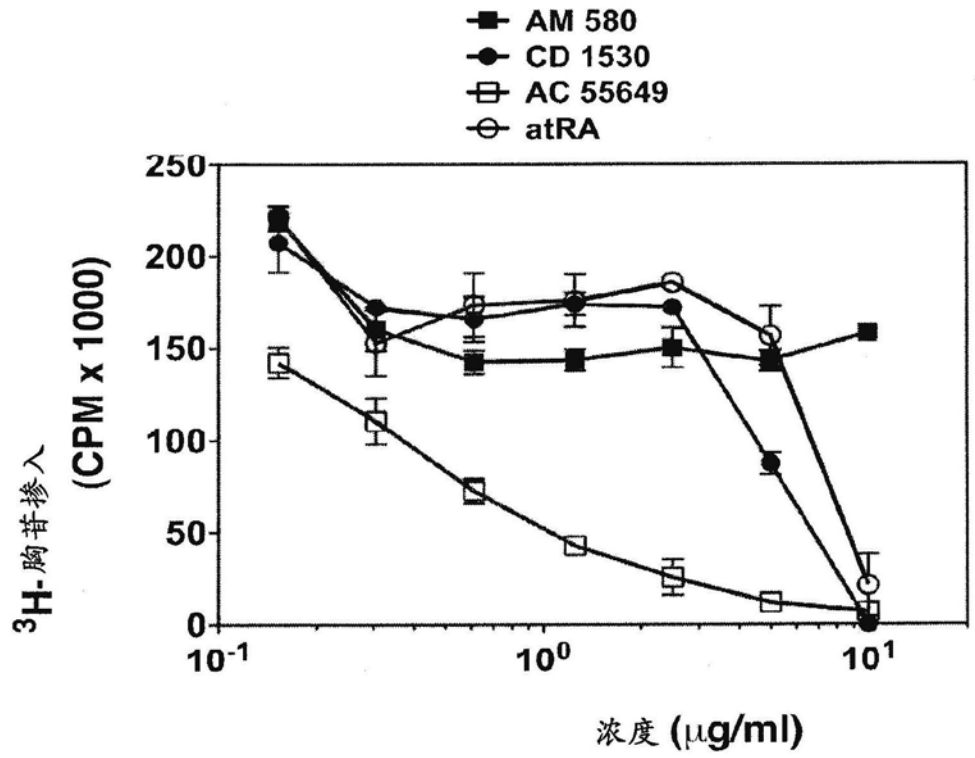

AM 580
CD 1530
AC 55649
atRA
3H-胸苷掺入 (CPM x 1000)
250
200
150
100
50
0
10-1 100 101
浓度 (μg/ml)

图12

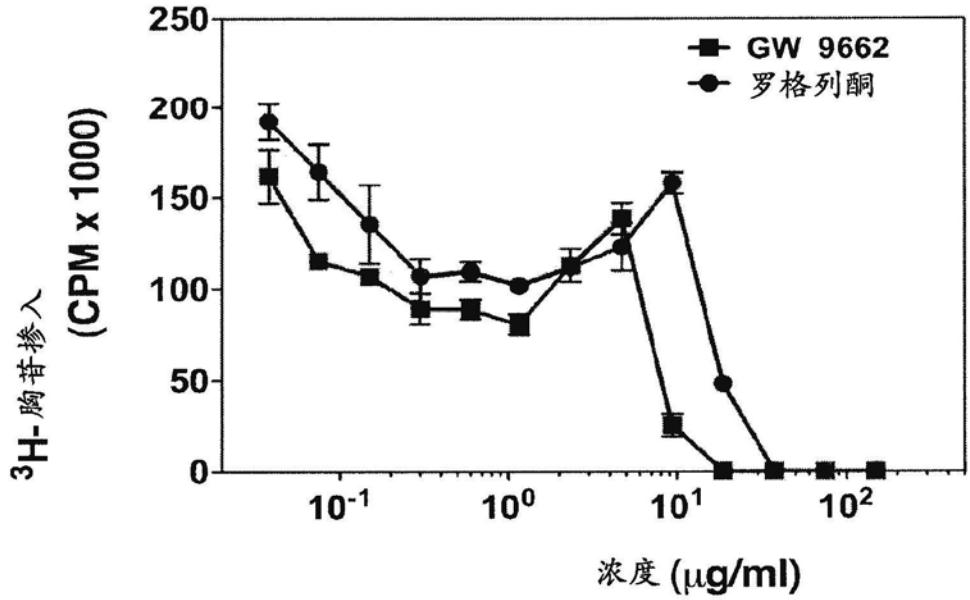

GW 9662
罗格列酮
250
200
150
100
50
0
^{3}H-胸苷掺入 (CPM x 1000)
10^{-1}
10^0
10^1
10^2
浓度 (μg/ml)

图13

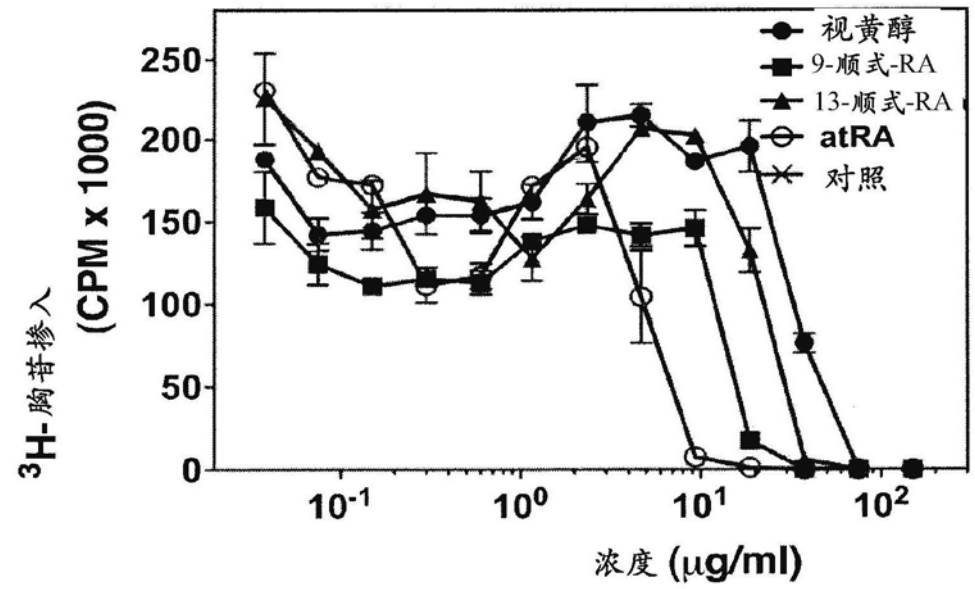

视黄醇
9-顺式-RA
13-顺式-RA
atRA
对照
250
200
150
100
50
0
^{3}H-胸苷掺入 (CPM x 1000)
10^{-1}
10^0
10^1
10^2
浓度 (μg/ml)

图14

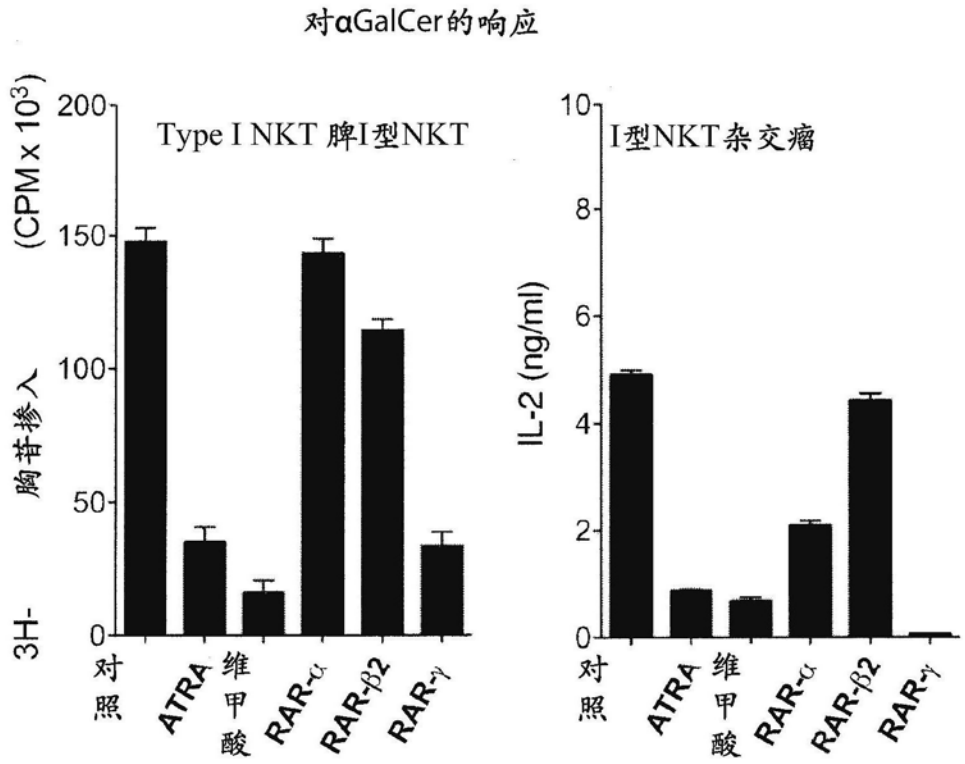

对αGalCer的响应
Type I NKT 脾I型NKT
3H-胸苷掺入 (CPM x 10³)
200
150
100
50
0
对照
ATRA
维甲酸
RAR-α
RAR-β2
RAR-γ
I型NKT杂交瘤
IL-2 (ng/ml)
10
8
6
4
2
0
对照
ATRA
维甲酸
RAR-α
RAR-β2
RAR-γ

图15

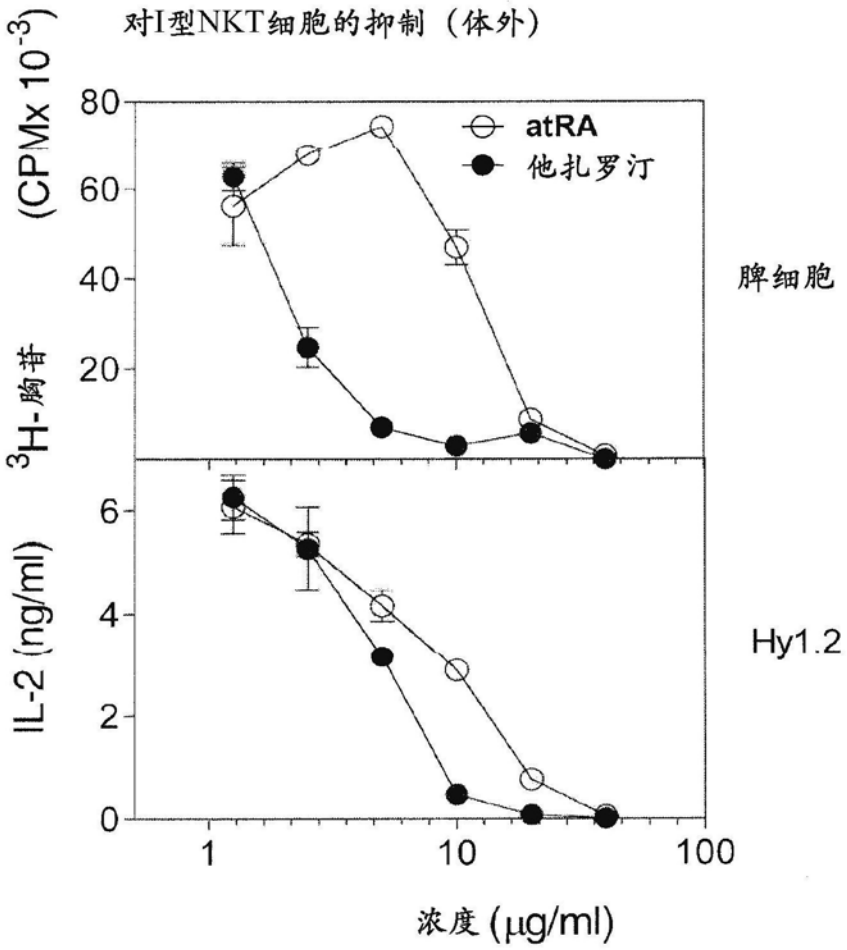
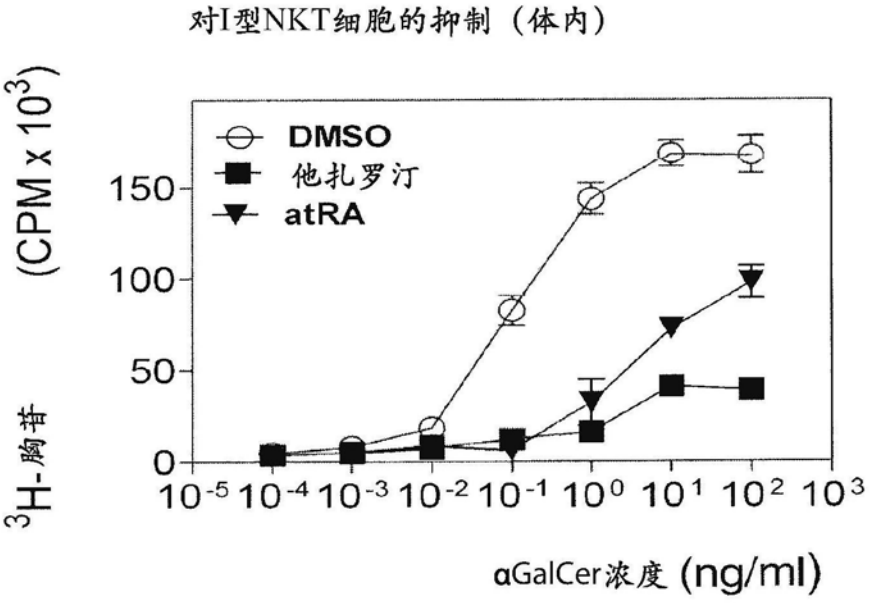

对I型NKT细胞的抑制（体外）
^{3}H-胸苷 (CPMx 10^{-3})
80
60
40
20
atRA
他扎罗汀
脾细胞
IL-2 (ng/ml)
6
4
2
0
Hy1.2
1
10
100
浓度 (μg/ml)
αGalCer浓度 10 ng/ml

图16


对I型NKT细胞的抑制（体内）
DMSO
他扎罗汀
atRA
150
100
50
0
^{3}H-胸苷 (CPM x 10^3)
10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^0 10^1 10^2 10^3
αGalCer浓度 (ng/ml)

5×注射，脾增殖

图17

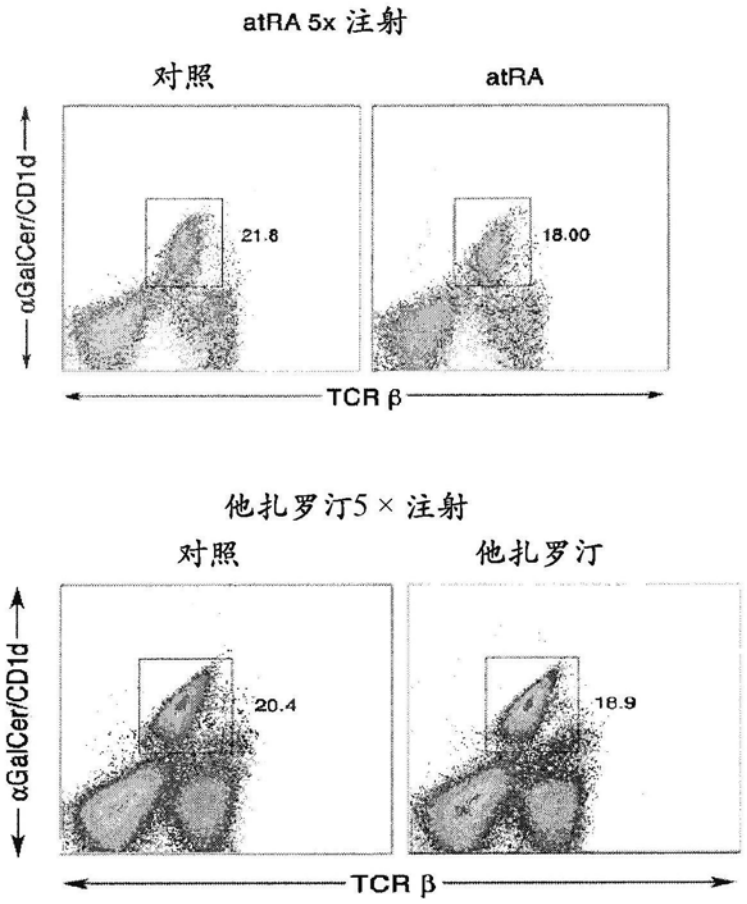

atRA 5x 注射
对照
atRA
αGalCer/CD1d
21.8
18.00
TCR β
他扎罗汀5 × 注射
对照
他扎罗汀
αGalCer/CD1d
20.4
16.9
TCR β

图18