

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-530265

(P2016-530265A)

(43) 公表日 平成28年9月29日(2016.9.29)

(51) Int.Cl.

A 61 K 45/00	(2006.01)	A 61 K 45/00
A 61 P 1/04	(2006.01)	A 61 P 1/04
A 61 P 3/10	(2006.01)	A 61 P 3/10
A 61 P 5/00	(2006.01)	A 61 P 5/00
A 61 P 17/04	(2006.01)	A 61 P 17/04

F 1

テーマコード(参考)

4 C 0 8 4

4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2016-534801 (P2016-534801)

(86) (22) 出願日

平成26年8月12日 (2014.8.12)

(85) 翻訳文提出日

平成28年3月31日 (2016.3.31)

(86) 国際出願番号

PCT/US2014/050770

(87) 国際公開番号

W02015/023691

(87) 国際公開日

平成27年2月19日 (2015.2.19)

(31) 優先権主張番号

61/865,084

(32) 優先日

平成25年8月12日 (2013.8.12)

(33) 優先権主張国

米国(US)

(71) 出願人 516044923

ベナロヤ リサーチ インスティテュート
アット バージニア メイソン
アメリカ合衆国 ワシントン 98101
, シアトル, ナインス アベニュー
1201

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫調節のための4-メチルウンベリフェロン処置

(57) 【要約】

ヒアルロン合成を阻害する化合物および薬学的に受容可能なキャリアを含む、自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患を処置するための組成物が記載される。いくつかの実施形態において、上記ヒアルロン合成を阻害する化合物は、4-メチルウンベリフェロンもしくは4-メチルウンベリフェロンの代謝産物である。自己免疫性糖尿病、多発性硬化症および/もしくは自己免疫性脱髓を処置するための、哺乳動物被験体において、ヒアルロン合成を阻害するために有効な量の化合物を有する組成物を、上記被験体に投与する工程を包含する方法もまた、記載される。

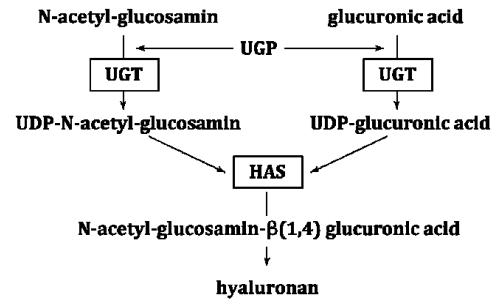


FIG. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患を処置するための組成物であって、(i)ヒアルロン酸合成を阻害する化合物、および(ii)薬学的に受容可能なキャリアを含む、組成物。

【請求項 2】

前記化合物が、UDP-グリコシルトランスフェラーゼインヒビターである、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記化合物が、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである、請求項2に記載の組成物。

【請求項 4】

前記化合物が、4-メチルウンベリフェロンである、請求項3に記載の組成物。

【請求項 5】

前記化合物が、4-メチルウンベリフェロンの代謝産物である、請求項4に記載の組成物。

【請求項 6】

前記化合物が、4-メチルウンベリフェロン-グルクロニドもしくは硫酸化4-メチルウンベリフェロンである、請求項5に記載の組成物。

【請求項 7】

前記化合物が、調節性T細胞応答を誘発するために有効である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 8】

前記化合物が、FoxP3+調節性T細胞を増大させるために有効である、請求項7に記載の組成物。

【請求項 9】

前記自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患が、自己免疫性糖尿病、多発性硬化症、シェーグレン病、自己免疫性甲状腺炎、狼瘡、関節リウマチ、乾癬、大腸炎、および喘息からなる群より選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項 10】

自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患を処置する必要性のある哺乳動物被験体において自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患を処置するための方法であって、該方法は、該被験体に、該哺乳動物被験体においてヒアルロン酸合成を阻害するために有効な量の化合物を含む組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 11】

前記化合物が、UDP-グリコシルトランスフェラーゼインヒビターである、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記化合物が、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

前記化合物が、4-メチルウンベリフェロンである、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

前記化合物が、4-メチルウンベリフェロンの代謝産物である、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

前記化合物が、4-メチルウンベリフェロン-グルクロニドもしくは硫酸化4-メチルウンベリフェロンである、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

前記化合物が、調節性T細胞応答を誘発するために有効である、請求項10に記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 17】

前記化合物が、FoxP3 + 調節性T細胞を増大させるために有効である、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

前記哺乳動物被験体が、ヒト被験体である、請求項10に記載の方法。

【請求項 19】

前記ヒト被験体が、自己免疫性糖尿病、多発性硬化症、シェーグレン病、自己免疫性甲状腺炎、狼瘡、関節リウマチ、乾癬、大腸炎、および喘息からなる群より選択される自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患に罹患しているかまたはこれらを発症するリスクがある、請求項18に記載の方法。

10

【請求項 20】

自己免疫性糖尿病に罹患しているかもしくは発症するリスクがある哺乳動物被験体において、臍島炎を処置する、かつ／または自己免疫性糖尿病の進行を逆転するための方法であって、該方法は、

該哺乳動物被験体に、該哺乳動物被験体においてヒアルロナン合成を阻害するために有効な量の化合物を含む組成物を投与する工程、
を包含する、方法。

【請求項 21】

前記化合物が、UDP-グリコシルトランスフェラーゼインヒビターもしくはUDP-グルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである、請求項20に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記化合物が、4-メチルウンベリフェロンもしくは4-メチルウンベリフェロンの代謝産物である、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

前記哺乳動物被験体が、ヒト被験体である、請求項20に記載の方法。

【請求項 24】

多発性硬化症を処置する必要性のある哺乳動物被験体において多発性硬化症を処置するための方法であって、該方法は、該被験体に、該哺乳動物被験体においてヒアルロナン合成を阻害するために有効な量の化合物を含む組成物を投与する工程を包含する、方法。

30

【請求項 25】

前記化合物が、UDP-グリコシルトランスフェラーゼインヒビターもしくはUDP-グルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである、請求項24に記載の方法。

【請求項 26】

前記化合物が、4-メチルウンベリフェロンもしくは4-メチルウンベリフェロンの代謝産物である、請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

前記哺乳動物被験体が、ヒト被験体である、請求項24に記載の方法。

【請求項 28】

前記化合物が、調節性T細胞応答を誘発するために有効である、請求項24に記載の方法。
。

40

【請求項 29】

前記化合物が、FoxP3 + 調節性T細胞を増大させるために有効である、請求項28に記載の方法。

【請求項 30】

多発性硬化症に罹患しているかもしくは発症するリスクがある哺乳動物被験体において、多発性硬化症および／または自己免疫性脱髓を処置するための方法であって、該方法は、

該哺乳動物被験体に、該哺乳動物被験体においてヒアルロナン合成を阻害するために有効な量の化合物を含む組成物を投与する工程、
を包含する、方法。

50

【請求項 3 1】

前記化合物が、 UDP - グリコシルトランスフェラーゼインヒビターもしくは UDP - グルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記化合物が、 4 - メチルウンベリフェロンもしくは 4 - メチルウンベリフェロンの代謝産物である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記哺乳動物被験体が、ヒト被験体である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記化合物が、調節性 T 細胞応答を誘発するために有効である、請求項 3 0 に記載の方法。

10

【請求項 3 5】

前記化合物が、 F o x P 3 + 調節性 T 細胞を増大させるために有効である、請求項 3 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

関連出願との相互参照

本出願は、参考として本明細書に援用される、2013年8月12日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 8 6 5 0 8 4 号に対する利益を主張する。

20

【0 0 0 2】

(発明の分野)

本開示は、免疫調節性組成物および上記組成物を使用して、ヒアルロン合成を阻害する方法に関する。本開示はまた、自己免疫疾患もしくは障害(例えば、糖尿病もしくは多発性硬化症)を処置するための組成物および方法に関する。

【0 0 0 3】

(政府の許諾権に関する陳述)

本発明は、アメリカ国立衛生研究所によって助成された契約 A I 1 0 1 9 8 4 および D K 0 9 6 0 8 7 の下での政府支援とともに行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

30

【背景技術】**【0 0 0 4】**

(背景)

自己免疫疾患もしくは障害は、身体の免疫系が健康な身体組織を誤って攻撃し破壊する場合に起こる。自己免疫疾患は、身体におけるほぼいかなる組織をも攻撃し得、全ての自己免疫疾患は、リンパ球といわれる免疫細胞による局所的炎症および浸潤によって特徴付けられる。

【0 0 0 5】

例として、自己免疫性糖尿病(1型糖尿病もしくはインスリン依存性糖尿病(I D D M)としても公知)は、身体の免疫系が、細胞といわれるインスリンを生成する臍臓の細胞を誤って破壊する場合に起こる。細胞への損傷は、身体によって生成されるインスリンの非存在もしくはその不十分な生成を生じる。自己免疫性糖尿病を含め、全ての自己免疫疾患において、リンパ球は、細胞外マトリクス(E C M)との相互作用によって、血流から標的組織へと遊走する。自己免疫性糖尿病の場合、リンパ球は、臍島の毛細管と内分泌細胞との間にある E C M との相互作用によって臍島を攻撃する。

40

【0 0 0 6】

300人の米国の小児に1人が、自己免疫性糖尿病を発症する。これら個体の多くは、自己抗体と関連する自己免疫性糖尿病のスクリーニングによって、彼らが高血糖症を示す前に同定され得る。従って、自己免疫性糖尿病を防止するための知識および手段があれば、自己免疫性糖尿病が防止され得る治療可能時間域が存在する。本願は、リスクのある個体

50

における自己免疫性糖尿病への進行を逆転および／もしくは防止するための新規な戦略を記載する。

【0007】

別の例として、多発性硬化症（MS）も自己免疫疾患であるが、MSでは、自己免疫活性は、中枢神経系（CNS）抗原に対して指向される。上記疾患は、CNSの一部の炎症によって特徴付けられ、神経軸索の周りのミエリン鞘形成の喪失（脱髓）、軸索消失、および最終的にはニューロン、希突起神経膠細胞およびグリア細胞の死滅をもたらす。MSおよび現時点での治療の包括的総説に関しては、例えば、Compston, A., et al., McAlpine's Multiple Sclerosis 4th ed., Churchill Livingstone Elsevier (2006)を参照のこと。10

【0008】

MSは、若年成人においてCNSの最も一般的な疾患のうちの1つであり、推定250万人がMSに罹患している。MSは、慢性の、進行性の身体障害性の疾患であり、一般には、青年期後のある時点にその犠牲者を襲い、一般には、20～40歳齢の間に診断されるが、開始はより早期に起こり得る。上記疾患は、直接的に遺伝性ではないが、遺伝的感受性がその発生にある役割を果たす。MSは、不均一な臨床的、病理学的および免疫学的な表現型を有する複雑な疾患である。

【0009】

MSには主に4つの臨床タイプがある：1) 明確に定義された再発と、完全な回復もしくは回復の際に続発症および後遺症とによって特徴付けられる、再発寛解型MS（RRMS）；疾患再発の間の期間は、疾患進行がないことによって特徴付けられる；2) 最初の再発寛解の経過に続いて、ときおりの寛解、部分寛解、および安定期を伴ったりせずに進行することによって特徴付けられる、二次進行型MS（SPMS）；3) 開始時から疾患が進行し、ときおりの安定期および一時的に部分的改善が認められることによって特徴付けられる、一次進行型MS（PPMS）；ならびに4) 進行性の疾患開始が、明確な急性再発を伴い、完全回復を伴ったり伴わなかったりすることによって特徴付けられる、進行性再発型MS（PRMS）；再発の間の期間は、継続的な進行によって特徴付けられる。20

【0010】

臨床的には、この病気は、最も頻繁には、再発寛解型疾患として現れ、より低頻度に、神経学的障害の確実な進行として現れる。再発寛解型MSは、病巣性もしくは多病巣性の神経学的機能障害の反復性の攻撃の形態で現れる。一見すると無作為に、長年にわたって、攻撃が起こり、寛解し、そして再発し得る。寛解はしばしば不完全であり、ある攻撃が別の攻撃に続くので、段階的な下方への進行が、結果として永久的な神経学的障害の増大とともに起こる。RRMSの通常の経過は、患者の大部分に関しては、最終的な疾患進行の開始と関連した反復する再発によって特徴付けられる。上記疾患のその後の経過は、推定不能であるが、再発寛解型疾患を有する大部分の患者は、最終的には、二次進行型疾患を発症させる。再発寛解型の相では、再発と臨床的不活性の期間とが交互に現れ、エピソード間の神経学的障害の存在に依存して、後遺症が現れることもあるし、示されないこともある。再発寛解型の相の間の再発間の期間は、臨床的には安定している。他方で、進行性MSを有する患者は、上記で定義されるとおりおよび始めからもしくはエピソード期間の後のいずれかで障害の確実な増大を示すが、この指定は、新たな再発のさらなる発生を除外しない。30

【0011】

健康な個体（すなわち、自己免疫疾患もしくは障害のない個体）において、免疫寛容は、調節性T細胞（FoxP3+調節性T細胞（Treg）が挙げられる）の集団によって維持される（Sakaguchi, S., et al., Nat. Rev. Immunol. 10, 490-500 (2010)）。Tregの非存在もしくは枯渇は、マウスおよびヒトにおいて多系統自己免疫をもたらす（Wildin, R.S. 40

, et al., *Nat. Genet.* 27, 18-20 (2001) が、*Treg* の養子免疫伝達は、自己免疫を終わらせ得る。

【0012】

MSにおいて、CNSに存在する*Treg* は、神経炎症の程度を制限し、多発性硬化症のマウスモデルである、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の間に臨床的回復を促進することが公知である。その結果、自己免疫性脱髓を処置するための多数の調査研究治療ストラテジーが、*Treg* の数および／もしくは機能を増進することに向けられている。しかし、既存の治療では、安定な機能的 FoxP3+ *Treg* を誘発しようとしてこなかつた。部分的な理由としては、インビオでの*Treg* は、流動的な集団であることがある。ナチュラル*Treg* (n*Treg*) は、胸腺での選択によって継続的に出現するのに対して、誘導性*Treg* (iT*Treg*) は、炎症刺激に応じて末梢組織において発生し、エフェクターT細胞へと戻り得る。炎症部位での局所的*Treg* の数および機能のこの変動性は、末梢組織における免疫寛容の耐久性に影響を及ぼし得る。

10

【0013】

炎症環境が免疫寛容に対して決定的な影響を有することは公知であるという事実にも拘わらず、組織の微小環境がどのようにして*Treg* の機能および数に影響を及ぼしているかについてはほとんど分かっていない。従って、自己免疫におけるリンパ球と局所的な細胞との間の境界におけるECMの役割への関心がますます高まっている (Bolliky, P. L., et al., *Curr. Diab. Rep.* 12, 471-480 (2012); Irving-Rodgers, H. F., et al., *Diabetologia* 51, 1680-1688 (2008); Hull, R. L., et al., *J. Biol. Chem.* 287, 37154-37164 (2012); Bitan, M., et al., *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 24, 413-421 (2008); Ziolkowski, A. F., et al., *J. Clin. Invest.* 122, 132-141 (2012))。

20

【0014】

炎症部位に豊富な1つの組織成分は、ヒアルロナン (HA)、すなわち細胞外マトリクス (ECM) ポリサッカリドである。HAは、多くの機能を有する (例えば、細胞の支持および固定を提供すること、組織を互いから分離すること、細胞間シグナル伝達、発生、遊走および機能を促進すること) (Bolliky, P. L., et al. (2012), 前出)。HAは、ヒアルロナンシンターゼといわれる内在性膜タンパク質のクラスによって合成され、細胞膜を通って細胞外空間へと押し出される (Laurent, T. C., et al., *Immunol. Cell Biol.* 74, A1-7 (1996))。

30

【0015】

HAは、グルクロン酸およびN-アセチルグルコサミンから構成され、交互に現れる-1,4グリコシド結合および-1,3グリコシド結合によって繋がれているジサッカリドのポリマーである。HAは、長さ25,000個のジサッカリド反復であり得る。HAのインビオでのポリマーは、5,000~20,000,000Daのサイズ範囲に及び得る。HAは、ヒアルロナンシンターゼといわれる内在性膜タンパク質のクラスによって合成され、そのうち、脊椎動物は、3つのタイプを有する: HAS1、HAS2、およびHAS3。これら酵素は、細胞膜を通って細胞外空間へと押し出されるときに、グルクロン酸およびN-アセチルグルコサミンを発生中のポリサッカリドへと反復して付加することによって、ヒアルロナンを長くする。

40

【0016】

HAは、リンパ球トラフィッキング、増殖、および抗原提示において役割を有する、炎症の重要なメディエーターである (Laurent, T. C., and Fraser, J. R., *FASEB J.* 6, 2397-2404 (1992); Bolliky, P. L., et al., *Cell Mol Immunol.* 3

50

, 211-220 (2010)。HAは、ヒト自己免疫疾患（多発性硬化症、シェーグレン病、および自己免疫性甲状腺炎が挙げられる）と関連した病変において増大する（Back, S. A., et al., *Nat. Med.* 11, 966-972 (2005); Engstroem-Laurent, A. 「Changes in hyaluronan concentration in tissues and body fluids in disease states.」 *The Biology of Hyaluronan, CIBA Foundation Symposium*, 143, 233-47 (1989).; Gianoukakis, A., et al., *Endocrinology* 148, 54-62 (2007)。HAはまた、狼瘡、関節リウマチ、乾癬、および自己免疫性甲状腺炎を有する個体の血清中で増大する（Engstroem-Laurent, 前出; Pitsillides et al., *Rheumatol.* 33, 5-10 (1994); Hansen, C., et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 14 Suppl. 15, S59-67 (1996); Torsteinsdottir et al., *Clin. Exp. Immunol.* 115, 554-560 (1999); Elkayam, O., et al., *Clin. Rheumatol.* 19, 455-457 (2000); Kubo, M., et al., *Arch. Dermatol. Res.* 290, 579-581 (1998)。 10

【0017】

HAは、慢性的に炎症を起こした組織（例えば、MS病変を含む）内で非常に豊富である（Bolliky, P. L., et al. (2012), 前出; Back, S. A., et al., 前出）。例えば、ある研究では、HAは、MSおよびEAEの脱髓病変中に蓄積することが示された。慢性的MS病変のPLPの免疫染色は、病変の中心においてミエリンの完全な喪失を示した。CD44染色から、病変における高レベルのCD44が明らかになり、GFAP発現反応性星状細胞における上昇したCD44発現もまた見出された。HA染色は、病変の脱髓した区域で高レベルのHAを示したが、病変縁部ではより低レベルであった（Back S. A., et al., 前出）。 20

【0018】

代表的には、慢性的に炎症を起こした組織内に存在するHAは、短く、非常に異化されたフラグメントの形態をとり（Bolliky, P. L., et al. (2012), 前出で総説されるとおり）、上記フラグメントは、Toll様レセプターシグナル伝達の炎症促進性アゴニストであり（Laurent, T. C., et al., *Immunol. Cell Biol.* 74, A1-7 (1996); Jiang, D., et al., *Physiol. Rev.* 91, 221-264 (2011)）、樹状細胞成熟を駆動し、ファゴサイトーシスを促進する（Jiang, D., et al., *Nat. Med.* 11, 1173-1179 (2005); Termeer, C., et al., *J. Exp. Med.* 195, 99-111 (2002)）。HA過剰発現は、おそらく増大したHAフラグメントの生成を通じて炎症を駆動する傾向にある（Olsson, M. et al., *PLoS Genet.* 7, e1001332 (2011)）。その一方で、HA合成の阻害（4-メチルウンベリフェロン（4-MU、ヒメクロモン）での処置を含む）は、炎症を低減する傾向にある（Yoshioka, Y., et al., *Arthritis Rheum.* 65, 1160-1170 (2013); McKallip, R. J., et al., *Toxins (Basel)* 5, 1814-1826 (2013); Colombaro, V. et al., *Nephrol. Dial. Transplant* 28, 2484-2493 (2013); Saito, T., et al., *Oncol. Lett.* 5, 1068-1074 (2013)）。局所的な免疫調節におけるHAの役割に関しては、低分子量HA（LMW-HA）フラグメントが、FoxP3+ Tregの機 40

50

能を阻害することは公知である (B o l l y k y , P . L . , et al . , J . Immunol . 179 , 744 - 747 (2007) ; B o l l y k y , P . L . , et al . , J . Immunol . 183 , 2232 - 2241 (2009))。これら効果は、T L R シグナル伝達を通じて、かつH A レセプターC D 4 4との相互作用を通じて、媒介される。

【0019】

健康なC N S では、星状細胞は、低レベルのH A の主な生産者であり、H A を有髓軸索の間および髓鞘と星状細胞突起との間の空間においてE C M 複合体として沈着させる (A s h e r , R . , et al . , J . Neurosci . Res . 28 , 410 - 421 (1991))。しかし、傷害の際には、反応性星状細胞は、豊富な量のH A を生成し、これは損傷した領域に蓄積する (B a c k , S . A . , et al . , 前出 ; S t r u v e , J . , et al . , G l i a 52 , 16 - 24 (2005) ; B u g i a n i , M . , et al . , B r a i n 136 , 209 - 222 (2013))。このようにして、H A は、M S 患者およびE A E を有するマウスにおける脱髓病変の中に高レベルで存在する (B a c k , S . A . , et al . , 前出)。

【0020】

4 - M U は、H A 合成の選択的インヒビターである。上記化合物は、1995年に、皮膚線維芽細胞におけるH A 合成を阻害するためにN a k a m u r a et al . によって初めてインピトロで使用された。N a k a m u r a , T . , et al . , B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 208 , 470 - 475 (1995)。2004年には、4 - M U の機構がK a k i z a k i et al . によって発見され、それ以来、4 - M U の影響を調査するために、主に癌研究において、(K a k i z a k i , I . , et al . , J . B i o l . C h e m . 279 , 33281 - 33289 (2004) ; 例えは、Y o s h i h a r a , S . , et al . , F E B S L e t t e r s 579 , 2722 - 2726 (2005) ; L o k e s h w a r , V . B . , et al . , C a n c e r R e s . 70 , 2613 - 2623 (2010) もまた参考のこと) およびアテローム性動脈硬化症研究で (N a g y , N . , et al . , C i r c u l a t i o n 122 , 2313 - 2322 (2010))、マウスおよびラットにおけるインピボ研究で4 - M U が使用されてきた。4 - M U は、既にヒトでも使用されている。それは、H e p a r v i t (がん患者のための栄養補助製品) として処方箋なしで入手できる。さらに、欧州およびアジアでは、名称ヒメクロモンの下で、胆道痙攣を処置するために処方箋があれば入手可能である。その状況では、上記薬物は、優れた安全性プロファイルを有し、数年間にわたって使用されている。

H A 沈着は慢性的に炎症を起こした組織において豊富であり、4 - M U はH A 合成の選択的インヒビターであることが公知であるが、自己免疫病因論におけるH A の役割の搖るぎない理解を提供することによって、自己免疫疾患および障害 (例えは、糖尿病およびM S) の安全かつ有効な治療を開発する必要性は未だ残っている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0021】

【非特許文献1】C o m p s t o n , A . , et al . , M c A l p i n e ' s M u l t i p l e S c l e r o s i s 4 t h e d . , C h u r c h i l l L i v i n g s t o n e E l s e v i e r (2006)

【非特許文献2】S a k a g u c h i , S . , et al . , N a t . R e v . I m m u n o l . 10 , 490 - 500 (2010)

【非特許文献3】W i l d i n , R . S . , et al . , N a t . G e n e t . 27 , 18 - 20 (2001)

【非特許文献4】B o l l y k y , P . L . , et al . , C u r r . D i a

10

20

30

40

50

- b. Rep. 12, 471-480 (2012)
- 【非特許文献5】Irving-Rodgers, H. F., et al., Diabetologia 51, 1680-1688 (2008)
- 【非特許文献6】Hull, R. L., et al., J. Biol. Chem. 287, 37154-37164 (2012)
- 【非特許文献7】Bitan, M., et al., Diabetes. Metab. Res. Rev. 24, 413-421 (2008)
- 【非特許文献8】Ziolkowski, A. F., et al., J. Clin. Invest. 122, 132-141 (2012)
- 【非特許文献9】Laurent, T. C., et al., Immunol. Cell Biol. 74, A1-7 (1996) 10
- 【非特許文献10】Laurent, T. C., and Fraser, J. R., FASEB J. 6, 2397-2404 (1992)
- 【非特許文献11】Bolliyky, P. L., et al., Cell Mol Immunol. 3, 211-220 (2010)
- 【非特許文献12】Back, S. A., et al., Nat. Med. 11, 966-972 (2005)
- 【非特許文献13】Engstroem-Laurent, A. 「Changes in hyaluronan concentration in tissues and body fluids in disease states.」 The Biology of Hyaluronan, CIBA Foundation Symposium, 143, 233-47 (1989) 20
- 【非特許文献14】Gianoukakis, A., et al., Endocrinology 148, 54-62 (2007)
- 【非特許文献15】Pitsillides et al., Rheumatol. 33, 5-10 (1994)
- 【非特許文献16】Hansen, C., et al., Clin. Exp. Rheumatol. 14 Suppl. 15, S59-67 (1996)
- 【非特許文献17】Torssteinsdottir et al., Clin. Exp. Immunol. 115, 554-560 (1999) 30
- 【非特許文献18】Elkayam, O., et al., Clin. Rheumatol. 19, 455-457 (2000)
- 【非特許文献19】Kubo, M., et al., Arch. Dermatol. Res. 290, 579-581 (1998)
- 【非特許文献20】Jiang, D., et al., Physiol. Rev. 91, 221-264 (2011)
- 【非特許文献21】Jiang, D., et al., Nat. Med. 11, 1173-1179 (2005)
- 【非特許文献22】Termeer, C., et al., J. Exp. Med. 195, 99-111 (2002) 40
- 【非特許文献23】Olsson, M. et al., PLoS Genet. 7, e1001332 (2011)
- 【非特許文献24】Yoshioka, Y., et al., Arthritis Rheum. 65, 1160-1170 (2013)
- 【非特許文献25】McKallip, R. J., et al., Toxins (Basel) 5, 1814-1826 (2013)
- 【非特許文献26】Colombaro, V. et al., Nephrol. Dial. Transplant 28, 2484-2493 (2013)
- 【非特許文献27】Saito, T., et al., Oncol. Lett. 5, 1068-1074 (2013) 50

【非特許文献28】B o l l y k y , P . L . , et al . , J . Immunol . 179 , 744 - 747 (2007)

【非特許文献29】B o l l y k y , P . L . , et al . , J . Immunol . 183 , 2232 - 2241 (2009)

【非特許文献30】A sh e r , R . , et al . , J . Neurosci . Res . 28 , 410 - 421 (1991)

【非特許文献31】S tr u v e , J . , et al . , G l i a 52 , 16 - 24 (2005)

【非特許文献32】B u g i a n i , M . , et al . , B r a i n 136 , 209 - 222 (2013)

【非特許文献33】N a k a m u r a , T . , et al . , B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 208 , 470 - 475 (1995)

【非特許文献34】K a k i z a k i , I . , et al . , J . B i o l . C h e m . 279 , 33281 - 33289 (2004)

【非特許文献35】Y o s h i h a r a , S . , et al . , F E B S L e t t e r s 579 , 2722 - 2726 (2005)

【非特許文献36】L o k e s h w a r , V . B . , et al . , C a n c e r R e s . 70 , 2613 - 2623 (2010)

【非特許文献37】N a g y , N . , et al . , C i r c u l a t i o n 122 , 2313 - 2322 (2010)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0022】

(要旨)

一局面において、本開示は、(i)ヒアルロナン合成を阻害する化合物、および(ii)薬学的に受容可能なキャリアを含む、自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患を処置するための組成物を提供する。

【0023】

一実施形態において、上記化合物は、UDP-グリコシルトランスフェラーゼインヒビターである。一実施形態において、上記化合物は、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである。

【0024】

一実施形態において、上記化合物は、4-メチルウンベリフェロンである。一実施形態において、上記化合物は、4-メチルウンベリフェロンの代謝産物である。一実施形態において、上記化合物は、4-メチルウンベリフェロングルクロニドもしくは硫酸化4-メチルウンベリフェロンである。

【0025】

一実施形態において、上記化合物は、調節性T細胞応答を誘発するために有効である。一実施形態において、上記化合物は、FoxP3+調節性T細胞を増大させるために有効である。

【0026】

一実施形態において、上記自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患は、自己免疫性糖尿病、多発性硬化症、シェーグレン病、自己免疫性甲状腺炎、狼瘡、関節リウマチ、乾癬、大腸炎、および喘息からなる群より選択される。

【0027】

一局面において、本開示は、必要性のある哺乳動物被験体において自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患を処置するための方法を提供する。上記方法は、上記被験体に、上記哺乳動物被験体においてヒアルロナン合成を阻害するために有効な量の化合物を含む組成物を投与する工程を包含する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

一実施形態において、上記化合物は、 UDP - グリコシルトランスフェラーゼインヒビターである。一実施形態において、上記化合物は、 UDP - グルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである。

【 0 0 2 9 】

一実施形態において、上記化合物は、 4 - メチルウンベリフェロンである。一実施形態において、上記化合物は、 4 - メチルウンベリフェロンの代謝産物である。一実施形態において、上記化合物は、 4 - メチルウンベリフェロングルクロニドもしくは硫酸化 4 - メチルウンベリフェロンである。

【 0 0 3 0 】

一実施形態において、上記化合物は、調節性 T 細胞応答を誘発するために有効である。一実施形態において、上記化合物は、 FoxP3 + 調節性 T 細胞を増大させるために有効である。

【 0 0 3 1 】

一実施形態において、上記哺乳動物被験体は、ヒト被験体である。一実施形態において、上記ヒト被験体は、自己免疫性糖尿病、多発性硬化症、シェーグレン病、自己免疫性甲状腺炎、狼瘡、関節リウマチ、乾癬、大腸炎、および喘息からなる群より選択される、自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患に罹患しているかまたは発症させるリスクがある。

【 0 0 3 2 】

一局面において、本開示は、自己免疫性糖尿病に罹患しているかもしくは発症させるリスクがある哺乳動物被験体において膵島炎を処置し、かつ / または自己免疫性糖尿病の進行を逆転させるための方法を提供する。上記方法は、上記哺乳動物被験体に、上記哺乳動物被験体においてヒアルロナン合成を阻害するために有効な量の化合物を含む組成物を投与する工程を包含する。

【 0 0 3 3 】

一実施形態において、上記化合物は、 UDP - グリコシルトランスフェラーゼインヒビターもしくは UDP - グルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである。一実施形態において、上記化合物は、 4 - メチルウンベリフェロンもしくは 4 - メチルウンベリフェロンの代謝産物である。一実施形態において、上記哺乳動物被験体は、ヒト被験体である。

【 0 0 3 4 】

一局面において、本開示は、必要性のある哺乳動物被験体において多発性硬化症を処置するための方法を提供する。上記方法は、上記被験体に、上記哺乳動物被験体においてヒアルロナン合成を阻害するために有効な量の化合物を含む組成物を投与する工程を包含する。

【 0 0 3 5 】

一実施形態において、上記化合物は、 UDP - グリコシルトランスフェラーゼインヒビターもしくは UDP - グルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである。一実施形態において、上記化合物は、 4 - メチルウンベリフェロンもしくは 4 - メチルウンベリフェロンの代謝産物である。

【 0 0 3 6 】

一実施形態において、上記哺乳動物被験体は、ヒト被験体である。一実施形態において、上記化合物は、調節性 T 細胞応答を誘発するために有効である。一実施形態において、上記化合物は、 FoxP3 + 調節性 T 細胞を増大させるために有効である。

【 0 0 3 7 】

一局面において、本開示は、多発性硬化症に罹患しているかもしくは発症させるリスクがある哺乳動物被験体において、多発性硬化症および / または自己免疫性脱髓を処置するための方法を提供する。上記方法は、上記哺乳動物被験体に、上記哺乳動物被験体においてヒアルロナン合成を阻害するために有効な量の化合物を含む組成物を投与する工程を包含する。

10

20

30

40

50

【0038】

一実施形態において、上記化合物は、UDP-グリコシルトランスフェラーゼインヒビターもしくはUDP-グルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである。一実施形態において、上記化合物は、4-メチルウンベリフェロンもしくは4-メチルウンベリフェロンの代謝産物である。

【0039】

一実施形態において、上記哺乳動物被験体は、ヒト被験体である。一実施形態において、上記化合物は、調節性T細胞応答を誘発するために有効である。一実施形態において、上記化合物は、FoxP3+調節性T細胞を増大させるために有効である。

【図面の簡単な説明】

10

【0040】

前述の局面および本発明に付随する利点のうちの多くは、添付の図面とともに考慮すれば、以下の詳細な説明を参照することによってよりよく理解されるようになるので、より容易に理解される。

【0041】

【図1A】図1Aは、HA合成の機構を図示する。

【0042】

【図1B】図1Bは、4-MU干渉の機構を図示し、UDPの代わりにグルクロン酸へ結合する4-MUを示す。

【0043】

20

【図2A】図2Aは、自己免疫性糖尿病なしのヒトドナーに由来する膵島の代表的HA染色を示す。

【0044】

【図2B】図2Bは、自己免疫性糖尿病を有するヒトドナーに由来する膵島の代表的HA染色を示す。

【0045】

【図2C】図2Cは、自己免疫性糖尿病なしのヒトドナーに由来する膵島内HA蓄積の代表的なより高倍率の拡大を示す。

【0046】

30

【図2D】図2Dは、自己免疫性糖尿病を有するヒトドナーに由来する膵島内HA蓄積の代表的なより高倍率の拡大を示す。

【0047】

【図3】図3は、自己免疫性糖尿病進行の間の3つの異なる時点での、対照およびDORm0マウスに由来する膵島におけるインスリンおよびHA染色を示す。最も左の列は、10週齢、16週齢および36週齢での対照マウスに由来する膵島の代表的インスリン染色を示す。左から2番目の列は、これら同じ年齢でのDORm0マウスに由来する膵島の代表的インスリン染色を示す。左から3番目の列は、対照マウスに由来する膵島の代表的HA染色を示す。最も右の列は、同様に10週齢、16週齢および36週齢でのDORm0マウスに由来する膵島の代表的HA染色を示す。

【0048】

40

【図4】図4は、自己免疫性糖尿病の進行の間の、対照およびDORm0マウスの血中グルコースレベルを示す。白抜きの棒は、対照マウスを示し、黒塗りの棒は、DORm0マウスを示す。「糖尿病」と表示された水平の実線は、この研究においてマウスを高血糖とみなす血中グルコースの量を示す。上記マウスの血中グルコースを、2週齢～20週齢の間でモニターした。

【0049】

【図5】図5は、5週齢で4-MU処置を開始したかもしくは開始しなかった場合の、対照マウスおよびDORm0マウスの血中グルコースデータを示す。「糖尿病」と表示された水平の実線は、マウスを高血糖であるとみなす血中グルコースの量を示す。

【0050】

50

【図6】図6は、4-MU処置を8週齢で開始したかもしくは開始しなかった場合の、対照マウスおよびDORMOマウスの血中グルコースデータを示す。「糖尿病」と表示された水平の実線は、マウスを高血糖であるとみなす血中グルコースの量を示す。

【0051】

【図7】図7は、4-MU処置を12週齢で開始した場合の、対照マウスおよびDORMOマウスの血中グルコースデータを示す。「糖尿病」と表示された水平の実線は、マウスが高血糖であるとみなす血中グルコースの量を示す。

【0052】

【図8】図8は、4-MU処置ありもしくはなしでの、対照マウスおよびDORMOマウスの膵島におけるHAの免疫染色を示す。上段の写真は、通常飼料で処置した（左列）か、もしくは4-MUで処置した（右列）対照動物の膵島におけるHA染色の代表的画像を示す。下段は、HAに関して染色したDORMOの膵島の代表的画像を示し、ここでは動物を、対照飼料で処置した（左列）か、もしくは4-MUで処置した（右列）。

10

【0053】

【図9】図9は、異なる処置群の間での膵島のHA染色の評価を示す。 $* < 0.05$ を有意とみなした。

【0054】

【図10】図10は、4-MUありおよびなしでの対照およびDORMOマウスの膵島におけるインスリンの免疫染色を示す。上段の写真は、通常飼料で処置した（左列）かもしくは4-MUで処置した（右列）対照動物の膵島におけるインスリン染色の代表的画像を示す。下段は、インスリンに関して染色したDORMO膵島の代表的画像を示し、ここでは動物を、通常飼料で処置した（左列）か、もしくは4-MUで処置した（右列）。

20

【0055】

【図11A】図11Aは、一連の時間を決めた採血についての血漿4-MU-グルクロニド（4-MUG）の濃度を示すグラフ表示である。

【0056】

【図11B】図11Bは、一連の時間を決めた採血についての血漿硫酸化4-MU（4-MUS）の濃度を示すグラフ表示である。

30

【0057】

【図11C】図11Cは、一連の時間を決めた採血についての血漿4-MUの濃度を示すグラフ表示である。

【0058】

【図12A】図12Aは、疾患誘発前に4-MUで処置した（事前処置プロトコル）被験体における誘発後日数の関数として、平均EAEスコアを示すグラフ表示である。

【0059】

【図12B】図12Bは、疾患誘発後であるが症状開始前に4-MUで処置した（処置プロトコル）被験体における誘発後日数の関数として、平均EAEスコアを示す代表表示である。

【0060】

【図12C】図12Cは、疾患開始後に4-MUで処置した（介入プロトコル）被験体における誘発後日数の関数として、平均EAEスコアを示す代表表示である。

40

【0061】

【図13A】図13Aは、健康な対照、対照、事前処置プロトコル、処置プロトコル、および介入プロトコルの被験体における、CD8+リンパ球およびCD4+リンパ球、ならびにマクロファージの数を示す浸潤細胞タイプの代表表示である。

【0062】

【図13B】図13Bは、健康な対照、対照、事前処置プロトコル、処置プロトコル、および介入プロトコルの被験体における、CD4+集団内のIL4+、IFN-+およびIL17+細胞の数を示す代表表示である。

【0063】

50

【図13C】図13Cは、健康な対照、対照、事前処置プロトコル、処置プロトコル、および介入プロトコルの被験体の脾臓およびリンパ節における、CD4+ T細胞のうちのCD25+のパーセンテージを示す代表表示である。

【0064】

【図13D】図13Dは、対照および4-MU処置被験体の脾臓、鼠径部リンパ節(ILN)、腸間膜リンパ節(MLN)、および脾リンパ節(PLN)におけるFoxP3+CD4+ T細胞のパーセンテージのグラフ表示である。

【0065】

【図14A】図14Aは、プレートに結合した高分子量HA(HMW-HA)もしくはaCD44抗体ありまたはなしで、TGF およびIL-2の存在下で72時間にわたって活性化したCD4+GFP/FoxP3-T細胞によるCD25およびFoxP3発現のグラフ表示である。

10

【0066】

【図14B】図14Bは、3匹のRAG-/-レシピエント被験体に関してCD44-/- (CD45.1) 対 CD44+/+ (CD45.2) T細胞の比を示す代表的プロットである。

【0067】

【図14C】図14Cは、3匹のRAG-/-レシピエント被験体に関して、総CD3+GFP/FoxP3+ T細胞のパーセントを示すグラフ表示である。

20

【発明を実施するための形態】

【0068】

(詳細な説明)

本開示は、自己免疫疾患および障害における細胞外マトリクス分子HAの重要な役割の同定ならびにHA合成を阻害する化合物、特に、4-MUの同定を記載する。本開示は、自己免疫を終わらせる新規治療剤としての4-MUの使用および自己免疫疾患もしくは障害、例えば、自己免疫性糖尿病もしくは多発性硬化症を処置するための4-MUの使用を記載する。

【0069】

本明細書で具体的に定義されなければ、本明細書で使用される全ての用語は、本開示の分野の当業者にとってのもの同じ意味を有する。以下の定義は、特許請求された主題を記載するために本明細書および特許請求の範囲で使用される場合の用語に関して明瞭さを提供するために提供される。

30

【0070】

本明細書で使用される場合、用語「調節性T細胞」もしくは「T_{reg}」細胞とは、細胞表面マーカーCD4+およびCD25+を発現し、ウェスタンプロットおよび/もしくはFoxP3 mRNA転写物によって測定されるときにFoxP3タンパク質を発現するT細胞をいう。

【0071】

本明細書で使用される場合、用語「抗原特異的調節性T細胞」もしくは「抗原特異的T_{reg}」とは、抗原の存在下で誘発されて、細胞表面マーカーCD4+およびCD25+を発現し、ウェスタンプロットおよび/もしくはFoxP3 mRNA転写物によって測定されるときにFoxP3タンパク質を発現するT_{reg}細胞をいう。

40

【0072】

本明細書で使用される場合、ペプチドもしくはポリペプチド配列の文脈において用語「～由来の、～に由来する」もしくは「その誘導体」)とは、上記ペプチドもしくはポリペプチドがその特定の記載される配列に限定されず、その配列におけるバリエーション(これは、挙げられた配列中のバリエーションが、免疫応答を調節する能力を保持する程度までアミノ酸付加、欠失、置換、もしくは変更を含み得る)をも含むことを意味する。

【0073】

本明細書で使用される場合、用語「ペプチド」もしくは「ポリペプチド」とは、アミノ酸

50

の連結された配列であり、天然、組換え、合成、または天然、合成、および組換えの改変もしくは組み合わせであり得る。

【0074】

本明細書で使用される場合、表現「有効（な）量」もしくは「治療上有効な量」とは、所望の治療結果（例えば、自己免疫疾患もしくは炎症状態の防止、改善、もしくは予防）を達成するために有効である本開示の化合物の量を指す。本開示の化合物は、治療上有効な量の上記化合物と一緒に薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物として投与され得る。本開示の文脈において、「治療上有効な量」は、所望の効果（この具体的な場合においては、自己免疫疾患もしくは障害、特に、多発性硬化症を処置すること）を達成するために必要な同定されたHAポリマーの合成、発現、および／または活性を阻害する化合物の量として理解される。一般に、投与される本開示に従う化合物の治療上有効な量は、他の要因の中でも、処置される個体、上記個体が罹患している疾患の重症度、選択される投与形態などに依存する。これが理由で、本開示で言及される用量は、当業者にとっての指標とみなされるだけでなければならず、当業者は、既に言及された変数に従って上記用量を調節しなければならない。それでもなお、本開示に従う化合物は、1日に1回もしくはそれより多く、例えば、1日に1回、2回、3回もしくは4回、0.1μg～10,000mg／日、代表的には、100～1,500mg／日の間に含まれる代表的な総1日量において投与され得る。

10

【0075】

上記被験体は、ヒトもしくは非ヒト動物、脊椎動物であり得、代表的には、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどが挙げられるが、これらに限定されない動物である。より代表的には、上記被験体は、哺乳動物であり、特定の実施形態では、ヒトである。

20

【0076】

本明細書で使用される場合、「自己免疫疾患」は、個体自体の組織から生じ、これらに対して指向される疾患もしくは障害である。自己免疫疾患もしくは障害の例としては、多発性硬化症、関節炎（関節リウマチ、若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎）、T細胞の浸潤および慢性炎症応答が関わる状態、自己免疫性心筋炎、天疱瘡、1型糖尿病（自己免疫性糖尿病もしくはインスリン依存性糖尿病（IDDm）ともいわれる）、自己免疫性肺疾患などが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0077】

本明細書で使用される場合、用語「自己免疫性糖尿病に罹患している哺乳動物被験体」とは、心臓、眼、腎臓、神経、ならびに歯肉および歯に重篤な問題をもたらし得る高い血中グルコースレベルを生じる自己免疫疾患に罹患している被験体をいう。自己免疫性糖尿病の症状としては、例えば、口渴が甚だしいこと、頻尿、強い空腹感もしくは疲労感、意図せずに体重が減少すること、ゆっくりと回復する痛みを有すること、乾燥していること、皮膚の痒み、足の感覚がなくなるもしくは足にヒリヒリ感があること、および／または視界がぼんやりしていること、が挙げられる。

【0078】

本明細書で使用される場合、用語「多発性硬化症に罹患している哺乳動物被験体」とは、脳および脊髄の神経細胞の絶縁カバーに対する損傷もしくは脱髓を生じる自己免疫疾患に罹患している被験体をいう。MSの症状としては、とりわけ、1もしくはそれより多くの四肢における麻痺もしくは虚弱、中心視界の部分的もしくは完全な喪失（通常は、一方の眼に起こり、しばしば、眼球運動の間の疼痛を伴う（視神経炎））、二重視界もしくは視界のかすみ、身体の一部のヒリヒリ感もしくは疼痛、特定の頭部の動きで発生する電気ショックのような感じ、振戦、協調の欠如もしくは不安定な歩行、呂律が回らない、疲労、目眩、および／または熱感覚過敏が挙げられる。

40

【0079】

本明細書で使用される場合、用語「処置する、処理する」もしくは「処置、処理」とは、MSと関連した少なくとも1つの症状を有効に防止、抑制、もしくは除去するために、本開示に従う化合物を投与することを意味する。MSと関連した少なくとも1つの症状を防

50

止することは、臨床上の疾患と関連した症状の開始前に、被験体に処置を施すことを含む。MSと関連した少なくとも1つの症状を抑制することは、上記疾患の臨床上の出現後に、被験体に処置を施すことを含む。

【0080】

上記のように、HAは、グルクロン酸およびN-アセチルグルコサミンから構成され、交互に出現する-1,4グリコシド結合および-1,3グリコシド結合によって連結されたジサッカリドのポリマーである。4-MUは、UGT(HAおよび胆汁の合成に関する酵素)の競合的基質として機能する(Kakizaki, I., et al., J. Biol. Chem. 279, 33281-33289 (2004))。4-MUは、胆石を防止するために、欧洲およびアジア中で使用されている。4-MUは小児および成人の両方にあいて30年超にわたって使用されており、優れた安全性プロファイルを有する。これは本来は黄疸に罹患している人々において使用するために市販される食事補助品として、米国では処方箋なしで入手可能である。

10

【0081】

図1Aおよび図1Bは、それぞれ、HA合成および4-MU干渉の機構を示す。具体的には、図1Aは、HAが合成される通常の過程を示す。化合物4-MUは、グルクロン酸に結合することが公知であり、図1Bは、4-MUがどのようにして UDP の代わりにグルクロン酸に結合するかを示す。重要な HA 前駆体への 4-MU の結合が原因で、HAを生成する酵素である HA-シンターゼ(HAS)は、HAを合成できない。

20

【0082】

以下で記載されるように、4-MUが自己免疫性の炎症を逆転させるという驚くべき特性を有することが予測外にも発見された。この知見は、自己免疫性糖尿病およびMSのマウスマルクモデルにおいて行われた。4-MUはまた、HA合成のインヒビターであり、そのデータによれば、この特性は、胆汁代謝に対するその効果よりむしろ、4-MUの抗炎症特性を担うことが示唆される。この作用機構は、炎症メディエーターとしての HA の中心的な役割と一致する。

20

【0083】

本明細書で記載されるデータは、4-MUがHA合成を標的とする新規で第1級の抗炎症薬として適用可能性を有することを示す。さらに、これらデータは、自己免疫疾患、アレルギー疾患、およびアトピー性疾患を停止させるための4-MUの使用を裏付ける。4-MUは、既知の毒性を有さないので、自己免疫性糖尿病、多発性硬化症、シェーグレン病、自己免疫性甲状腺炎、狼瘡、関節リウマチ、乾癬、大腸炎、喘息、アレルギーなどが挙げられるが、これらに限定されない自己免疫疾患を処置および防止するにあたって大きな可能性を有する。

30

【0084】

近年の報告(Bolliyky, P.L., et al. (2012), 前出; Hull, R.L., et al., 前出)は、膵島炎の媒介および自己免疫性糖尿病への進行におけるHAの重要な役割を同定している。それら研究において、大きなHAの沈着が、自己免疫性糖尿病を有するマウスを特徴付けるが、ストレプトゾシン(細胞(Bolliyky et al. (2012), 前出)にもしくは健康な非糖尿病マウス(Hull et al., 前出)に対して毒性である治療)で処置したマウスではそうではないことが示された。以降、ヒト糖尿病は、同様に膵島炎を有する膵島におけるHA沈着と関連しているが、このような沈着は非糖尿病では認められないことが見出された。図2A、図2B、図2C、および図2Dは、自己免疫性糖尿病ヒト死体ドナーからの膵島におけるHA染色に関する。図2Aは、自己免疫性糖尿病がないヒトドナーの膵島の代表的HA染色を示す。図2Bは、自己免疫性糖尿病を有するヒトドナーからの膵島の代表的HA染色を示す。図2Cは、自己免疫性糖尿病がないヒトドナーからの膵島内HA蓄積の代表的なより高倍率拡大を示す。図2Dは、自己免疫性糖尿病を有するヒトドナーからの膵島内HA蓄積の代表的なより高倍率拡大を示す。

40

【0085】

50

自己免疫性糖尿病における H A の役割を同定するために、膵島における H A の量および分布を同定した。さらに、T 1 D マウスモデルにおける自己免疫性膵島破壊に付随する H A の変化を特徴付けた。本発明者らは、H A が膵島に蓄積し、自己免疫性糖尿病疾患が進行する間に自己免疫性の攻撃を許容する環境を作り出すと決定した。

【 0 0 8 6 】

H A が膵島に蓄積し、自己免疫性糖尿病疾患が進行する間に自己免疫性の攻撃を許容する環境を作り出すと決定するために、自己免疫性糖尿病の D O R m O 二重トランスジェニックマウスモデルを使用した。D O R m O マウスは、彼らのインスリン生産性 細胞上に標的抗原を有し、その抗原を特異的に認識する免疫系をも有するように交配されているので、予想可能に自己免疫性糖尿病を発症する。D O R m O マウスは、R I P m O V A マウス（自己抗原を模倣した、細胞上でのみ発現される鶏卵オボアルブミン（O V A ）に対して特異的な遺伝子を有する系統）と D O 1 1 . 1 0 マウス（自己反応性 C D 4 + T 細胞を模倣した、O V A に対して特異的な T 細胞レセプター導入遺伝子を有する系統）との交配の結果である。D O R m O マウスは、4 週齢で始まる自己免疫性膵島炎を自発的に発症し、2 0 週齢までに全ての動物が糖尿病になる（高血糖 > 2 0 0 m g / d l ）（W e s l e y , J . D . , e t a l . , J . Immunol . 1 8 5 , 4 7 6 0 - 4 7 6 8 (2 0 1 0) (例えれば、以下の図 4 を参照のこと) 。D O R m O マウスは、ヒトにおいて見出される炎症性 細胞破壊と非常に似た自発的自己免疫を有する。

10

【 0 0 8 7 】

ヒト解剖ドナーからの知見が、D O R m O マウスにおいて再現された。このモデルにおける膵島炎は、予測されたインスリンの低下と H A の劇的な増大とが付随することが見出された。上記膵島内部での H A 分布は、主に侵襲している細胞および微小血管系の周りであった。図 3 は、自己免疫性糖尿病の進行の間の 3 つの異なる時点における、対照および D O R m O マウスの膵島におけるインスリン染色および H A 染色を示す。最も左の列は、1 0 週齢、1 6 週齢および 3 6 週齢での対照マウスからの膵島の代表的インスリン染色を示す。左から 2 番目の列は、これら同じ年齢での D O R m O マウスからの膵島の代表的インスリン染色を示す。左から 3 番目の列は、対照マウスからの膵島の代表的 H A 染色を示す。最も右の列は、同様に 1 0 週齢、1 6 週齢および 3 6 週齢における D O R m O マウスからの膵島の代表的 H A 染色を示す。

20

【 0 0 8 8 】

図 4 は、自己免疫性糖尿病の進行の間の対照および D O R m O マウスの血中グルコースレベルを示す。白抜きの棒は対照マウスを示し、黒塗りの棒は D O R m O マウスを示す。「糖尿病」と表示された水平の実線は、この研究においてマウスを高血糖とみなす血中グルコースの量を示す。上記マウスの血中グルコースを、2 週齢～2 0 週齢の間モニターした。

30

【 0 0 8 9 】

まとめると、これらデータは、H A の変化は、T 細胞による膵島組織の侵襲および破壊を伴い、自己免疫性の攻撃を許容する環境を作り出すことを示す。これらデータは、H A 指向性の治療が、自己免疫性糖尿病を処置および防止するために使用され得ることを示す。

40

【 0 0 9 0 】

第 1 の D O R m O 処置群を、上記マウスが正常な血中グルコースレベルを有するとき、5 週齢において 4 - M U を用いて開始した。4 つの異なる処置群を確立した（通常飼料に基づく対照マウス、4 - M U に基づく対照マウス、通常飼料に基づく D O R m O マウス、および 4 - M U に基づく D O R m O マウス）。対照マウスの群を、4 - M U がそれらマウスの血中グルコースレベルを変化させるか否かを調べるために、同様に 4 - M U で処置した。

図 5 は、4 - M U 処置を 5 週齢で開始した場合およびしなかった場合の対照および D O R m O マウスの血中グルコースデータを示す。「糖尿病」と表示された水平の実線は、マウスを高血糖であるとみなす血中グルコースの量を示す。図 5 を参照すると、上記 D O R m O - 4 - M U の線は、「糖尿病」と表示された水平線を下回って見える。よって、上記

50

4 - M U に基づく D O R m O マウスは、糖尿病にならないことが示された。なぜならそれらの血中グルコースレベルは、対照レベル上有るからである。さらに、4 - M U が対照動物の血中グルコースレベルを変化させないことが認められた。

【 0 0 9 1 】

この驚くべき知見に倣って、別の4 - M U 処置群を D O R m O マウスが上記5週齢処置群開始に類似の結果とともに糖尿病になる年齢に近い8週齢で開始した。図6は4 - M U 処置を8週齢で開始した場合および開始しなかった場合のいずれかの対照および D O R m O マウスの血中グルコースデータを示す。「糖尿病」と表示された水平の実線は、マウスを高血糖であるとみなす血中グルコースの量を示す。上記4 - M U 処置に基づく D O R m O マウスは23週齢に達してなお、正常な血中グルコースレベルを有した。上記対照飼料に基づく D O R m O マウスは、動物プロトコルに従って糖尿病になった後に屠殺しなければならなかった。

10

【 0 0 9 2 】

別の処置群を確立し、ここでは、上記 D O R m O マウスが既に糖尿病であった12週齢で4 - M U 処置を開始した。図7は、4 - M U 処置を12週齢で開始した場合の対照および D O R m O マウスの血中グルコースデータを示す。「糖尿病」と表示された水平の実線は、マウスを高血糖であるとみなす血中グルコースの量を示す。上記4 - M U 処置した D O R m O マウスの血中グルコースレベルの低下は、処置のわずか1週間後に認められた。このことは、確立された自己免疫性糖尿病すら4 - M U によって改善され得ることを示す。

20

【 0 0 9 3 】

膵島における H A 蓄積を、8週齢開始処置群の数匹のマウスにおいて4 - M U 処置の後に免疫染色することによって調査した。図8は、4 - M U 処置ありおよびなしの対照および D O R m O マウスの膵島における H A の免疫染色を示す。上段の写真は、通常飼料で処置した（左列）かもしくは4 - M U で処置した（右列）、対照動物の膵島における H A 染色の代表画像を示す。下段は、動物を対照飼料で処置した（左列）かもしくは4 - M U で処置した（右列）場合、H A に関して染色した D O R m O 膵島の代表画像を示す。対照飼料で処置した D O R m O マウスとは対照的に、H A 蓄積における有意な低下が4 - M U で処置した D O R m O マウスにおいて見出された。図9は、異なる処置群の間での膵島における H A 染色の評価を示す。* < 0.05 を有意とみなした。

【 0 0 9 4 】

30

H A に関して染色した動物をまた、インスリンに関して染色した。図10は、4 - M U ありおよびなしの対照および D O R m O マウスの膵島におけるインスリンに関する免疫染色を示す。上段の写真は、通常飼料で処置した（左列）かもしくは4 - M U で処置した（右列）対照動物の膵島におけるインスリン染色の代表画像を示す。下段は、インスリンに関して染色した D O R m O 膵島の代表画像を示し、ここでは動物を、対照飼料で処置した（左列）かもしくは4 - M U で処置した（右列）。4 - M U で処置した D O R m O マウスは、血中グルコースを対照レベルで維持するために十分である、膵島において有意なインスリン量を依然として有した。さらに、4 - M U を飼料に添加した場合、4 - M U が D O R m O マウスにおいて正常血糖を回復させることが示された。

【 0 0 9 5 】

40

従って、4 - M U は、自己免疫疾患および障害を、この具体例では、例えば、自己免疫性糖尿病を逆転させるという驚くべき特性を有することが発見された。

【 0 0 9 6 】

細胞外マトリクスピリサッカリド H A は、多発性硬化症において、同様に上記疾患のマウスモデルである E A E においても、脱髓病変で豊富であることが公知の重要な炎症メディエーターである。本明細書で記載されるように、H A 合成の阻害は、E A E を防止し得る。そのデータは、U D P - グリコシルトランスフェラーゼインヒビター（例えば、U D P - グルクロニルトランスフェラーゼ（ U G T ）インヒビター、例えば、4 - M U もしくは4 - M U の代謝産物）での処置が、E A E の誘発をブロックするのみならず、既に確立された E A E における臨床上の障害をも実質的に低減する能力を有することを示す。予備研

50

究では、 UDP - グリコシルトランスフェラーゼインヒビター（例えば、UGTインヒビター、例えば、4 - MUもしくは4 - MUの代謝産物）での処置が、免疫応答を、自己免疫を防止することが公知の重要な細胞集団であるFoxP3 + 調節性T細胞（Treg）の数の増大によって特徴付けられる抗炎症プロファイルに向かって方向を変えていくことが示唆されている。

【0097】

UDP - グリコシルトランスフェラーゼは、 UDP - 糖の糖部分を広い範囲の代謝産物（例えば、ホルモンおよび二次代謝産物）へと転移させるのを触媒する酵素である。一般に、 UDP - グリコシルトランスフェラーゼは、代謝産物の溶解度、安定性、貯蔵性、生体活性もしくは生物学的利用性を増大させるために、生合成経路の最終工程で作用する。 UDP - グリコシルトランスフェラーゼの1タイプは、UGT（グルクロン酸抱合反応において、 UDP - グルクロン酸のグルクロン酸成分を低分子疎水性分子に転移させるのを触媒する酵素）である。

10

【0098】

競合的阻害は、酵素上の活性部位へのインヒビターの結合が基質の結合を妨げる（逆もまた同様）酵素阻害の形態である。ある種のUGTアイソフォームに対して特異的な基質は、薬物のグルクロン酸抱合を担うUGTアイソフォームを同定するために、特異的インヒビターとして使用され得る。公知のUGTインヒビターとしては、例えば、とりわけ、アタザナビル、ゲムフィブロジル、インジナビル、ケトコナゾール、ケトコナゾール、およびバルプロ酸が挙げられる。

20

【0099】

4 - MUの代謝産物は、免疫応答を、FoxP3 + 調節性T細胞（Treg）の数の増大によって特徴付けられる抗炎症プロファイルに向かって方向を変えていくために有効であり得る。4 - MUの代謝産物は、例えば、Kakizaki, I., et al., J. Biol. Chem. 279, 33281 - 33289 (2004)、およびGarrett, E. R., et al., Biopharm. Drug Dispos. 14, 13 - 39 (1994)（これらはともに、本明細書に参考として援用される）に記載される。

30

【0100】

4 - MUの例示的代謝産物としては、4 - MUGおよび4 - MUSが挙げられる。食餌摂取から生じる4 - MUから、24時間の期間にわたって血中の4 - MUの血清レベルを決定するために、Balb / C雌性マウス（12週齢をTaconic Farmsから購入）を、5% 4 - MU含有飼料（n = 18）もしくは非4 - MU含有対照飼料（n = 3）に置いた。マウスを実験開始時および2週間目のエンドポイントにおいて秤量した。2週間目に、ヘパリン処理シリングで心臓穿刺によって採血し、氷上の収集チューブの中に入れ、遠心沈殿させ、血漿を - 80°で凍結した。血漿サンプルをその後、4 - MUおよび2種の4 - MU抱合体、4 - MUGおよび4 - MUSに関して、ガスクロマトグラフィー - 質量分析（GCMS）によって分析した。

【0101】

図11A、図11B、および図11Cは、14日間の、5% 4 - MUを含む固体飼料の後の、マウスにおける4 - MUG、4 - MUS、および非抱合体化4 - MUの血漿レベルを示す。24時間の期間にわたって、4時間ごとに採血した（n = 3 マウス / 時点）。最も優位な血漿産物は、4 - MUGである。これは、対照飼料に基づいたマウスにおいて検出不能であった（データは示さず）。予想通り、4 - MUGレベルは、マウスがより多く食べていることが公知である夜間（飼育器の中で7 PM ~ 7 AM）により高かった。遙かにより低いレベルであったが、4 - MUおよび4 - MUSが存在した。4 - MUも4 - MUSも、対照飼料を供給したマウスでは検出できなかった。4 - MUの24時間平均レベル（0.9 μg / mL）および硫酸化生成物4 - MUSの24時間平均レベル（30.5 μg / mL）は、4 - MUG（513 μg / mL）に対して、それぞれ約1 / 600倍および1 / 20倍のレベルで存在した。この結果は、2週間の5% 4 - MU含有飼

40

50

料に基づいた B a l b / C マウスが、24時間平均 4 - M U G 血漿レベル約 500 μ g / mL と、遙かに低いレベルの 4 - M U S 抱合体および非抱合体化 4 - M U を示すことを実証し、4 - M U G および 4 - M U S が 4 - M U の代謝産物であることを確認する。

【 0102 】

H A 沈着が C N S 病変に豊富であり、これが主に L M W - H A であるという報告に鑑みて、H A がこれら部位で免疫調節異常を駆動し得るという仮説を立てた。この仮説を検定するため、M S の E A E マウスモデルにおいて H A 合成の選択的インヒビター、4 - M U の効果を評価した。

【 0103 】

M S における H A の病原性の役割を確認するために、ミエリン希突起神経膠細胞糖タンパク質ペプチドフラグメント 35 ~ 55 (M O G ₃₅₋₅₅) で免疫化することによって C 57 B 1 / 6 マウスにおいて E A E を誘発させた。上記マウスを、免疫化の 4 日前 (事前処置プロトコル) 、2日目の免疫化ブースト直後 (処置プロトコル) もしくは動物が神経学的欠陥の兆候を示したとき (介入プロトコル) のいずれかで開始して、事前に確立した安全用量の飼料中の 4 - M U で処置した。図 12 A 、図 12 B 、および図 12 C は、それぞれ、事前処置プロトコル、処置プロトコル、もしくは介入プロトコルに従って、4 - M U で処置した被験体における誘導後日数の関数として、平均 E A E スコアをグラフで示す。

【 0104 】

図 12 A および図 12 B に示されるように、疾患の誘発前の 4 - M U (飼料中 5 % w / w) での処置 (事前処置プロトコル、図 12 A) もしくは疾患の誘発後であるが、症状の開始前の 4 - M U (飼料中 5 % w / w) での処置 (処置プロトコル、図 12 B) は、C 57 B 1 / 6 マウスにおける M O G ₃₅₋₅₅ ペプチド誘発性 E A E の発生率および重症度を劇的に低減した (9 / 10 の対照処置動物に対して、それぞれ 1 / 7 および 2 / 10) 。図 12 C に示されるように、神経学的症状の開始後の 4 - M U での処置 (介入プロトコル) は、処置の開始 3 日後程度の早さで疾患を有意に改善し、E A E の重症度を低減した。図 12 A 、図 12 B 、および図 12 C に関して、* P < 0.05 、 ** P < 0.01 、 *** P < 0.001 (Mann - Whitney) 。

【 0105 】

上記データは、H A 合成の阻害が、神経学的病状をもたらし、進行させる免疫活性化機構に干渉することを実証する。さらに、上記データは、4 - M U 処置が疾患進行を防止し、E A E 被験体において確立された疾患を低減することを実証する。

【 0106 】

従って、一局面において、(i) ヒアルロン酸合成を阻害する化合物、および (i i) 薬学的に受容可能なキャリアを含む、自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患を処置するための組成物が記載される。

【 0107 】

用語「薬学的に受容可能なキャリア」とは、本明細書で使用される場合、被験体への投与に適している、1種もしくはそれより多くの適合性の固体もしくは液体の充填剤、希釈剤もしくは被包物質を意味する。上記薬学的組成物の成分はまた、所望の薬学的有効性を実質的に損なう相互作用がない様式で互いに混じり合うことができる。このような調製物は、薬学的に受容可能な濃度の塩、緩衝化剤、保存剤、適合性のキャリア、アジュバントおよび必要に応じて他の治療成分を慣用的に含み得る。

【 0108 】

適切な液体もしくは固体の薬学的調製物の形態は、例えば、吸入のための水性溶液もしくは生理食塩溶液であるか、微小カプセル化されているか、エンコクリエートされている (encochleated) か、金微細粒子上に被覆されているか、リポソーム中に含まれているか (pH 依存性放出製剤を含む) 、リピドイド (lipiodol) であるか、噴霧されるか、エアロゾルであるか、皮膚移植用のペレットであるか、もしくは皮膚に引っかき入れるように鋭利な物体上に乾燥させられている。上記薬学的組成物としてまた、

10

20

30

40

50

粒剤、散剤、錠剤、被覆錠剤、(マイクロ)カプセル剤、坐剤、シロップ剤、エマルジョン、懸濁物、クリーム剤、滴剤、もしくは上記組成物の放出を長引かせた調製物が挙げられ、それらの調製において、賦形剤および添加剤ならびに／または補助剤(例えば、崩壊剤、結合剤、被覆剤、膨潤剤、滑沢剤、矯味矯臭剤、甘味剤もしくは可溶化剤)が、上記のように慣例上使用される。上記薬学的組成物は、種々の薬物送達系における使用に適している。薬物送達法の簡潔な総説に関しては、Langer, Science 249, 1527-1533 (1990) およびLanger and Tirrell, Nature 428, 487-492 (2004)を参照のこと。さらに、本明細書で記載される組成物は、デポー調製物、時間放出、遅延放出、もしくは徐放性の送達系として製剤化され得る。

10

【0109】

一実施形態において、上記化合物は、UDP-グリコシルトランスフェラーゼインヒビターである。一実施形態において、上記化合物は、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである。一実施形態において、上記化合物は、4-メチルウンベリフェロンもしくは4-メチルウンベリフェロンの代謝産物、例えば、4-メチルウンベリフェロン-グルクロニドもしくは硫酸化4-メチルウンベリフェロンである。

【0110】

EA E 病因に対する4-MU処置の効果を、疾患のピーク(免疫化後22日目)において脊髄に浸潤する細胞の免疫学的プロファイルを評価することによって分析した。浸潤物の総数は疾患スコアと相関し、主に、CD4+T細胞からなった。CD4+T細胞は、4-MUでの事前処置および早期の処置によって実質的に低減したのに対して、介入処置は、CD4+T細胞浸潤を中程度に低減した。図13Aは、浸潤する細胞タイプに関し、健康な対照、対照、事前処置プロトコル、処置プロトコル、および介入プロトコルの被験体におけるCD8+リンパ球およびCD4+リンパ球、ならびにマクロファージの数を示す。図13Aに示されるように、4-MU処置は、より低い総数の細胞浸潤物を生じ、CD8+リンパ球およびCD4+リンパ球、ならびにマクロファージの浸潤を低下させた。驚くべきことに、4-MUは、リンパ器官におけるリンパ球総数が変化しなかったという観察を考慮すれば、これら動物において全身性の免疫抑制もリンパ球増殖の全身性増加も引き起こさなかった。

20

【0111】

図13Bは、CD4+集団内の、健康な対照、対照、事前処置プロトコル、処置プロトコル、および介入プロトコルの被験体におけるIL4+細胞、IFN- +細胞およびIL17+細胞の数を示す。興味深いことに、4-MU処置後にCNSに依然として存在したCD4+T細胞をさらに分析すると、4-MU処置は、疾患重症度の低下と相関するIFN-生成Th1集団を主に低減したのに対して、IL-17生成Th17集団は、あまり影響を受けなかった。この最後の観察は、4-MU処置が、局所的ThバランスをTh1応答から外れるように方向を変えることによって、CNSにおける浸潤リンパ球のT細胞プロファイルの方向を変えることを示す。さらに、Th1細胞およびTh17細胞がEA Eにおいて有する差次的な病理的役割(Axtell, R.C., et al., Clin. Rev. Allergy Immunol. 44, 114-120 (2013); Lowther, D.E., et al., Acta Neuropathol. 126, 501-515 (2013))を考慮すると、局所的Th細胞プロファイルにおけるこの変化は、ミエリンに対する自己免疫性の攻撃の防止に寄与し得る。

30

【0112】

脊髄へのT細胞の浸潤の低下が、4-MUによる調節機構の誘発に起因し得ることを考慮して、二次リンパ器官において可能性のある調節性細胞を誘発することにおける4-MU処置の役割を、CD25+T細胞の数を分析することによって評価した。図13Cは、健康な対照、対照、事前処置プロトコル、処置プロトコル、および介入プロトコルの被験体の脾臓およびリンパ節における、CD4+T細胞のうちのCD25+のパーセンテー

40

50

ジを示す。図13Cに示されるように、免疫化前にEAE被験体において開始した4-MU処置（事前処置プロトコル）は、脾臓およびリンパ節においてCD4+CD25+細胞の数の増大を生じた。しかし、CD25は一般に、活性化の際に誘発されるので、可能性のあるTreg集団の誘発に対する4-MUの効果を、FoxP3+T細胞の誘発を分析することによってさらに評価した。

【0113】

第1に、健康なマウスを使用して、4-MU処置が、リンパ組織においてFoxP3+T細胞の数を有意に増大させることが観察された（データは示さず）。図13Dは、対照被験体および4-MU処置被験体におけるFoxP3+CD4+T細胞のパーセンテージを示す。図13Dに示されるように、D0.11マウスにおけるOVA免疫化後のTreg数を分析することによって、脾臓、腸間膜リンパ節（MLN）、鼠径リンパ節（ILN）、および脾リンパ節（PLN）を含む多数の免疫学的区画におけるFoxP3+T細胞の増大が認められた。このことは、4-MUがTreg応答を誘発することを実証する。EAEマウスのように、4-MU処置がこれらマウスにおいて全身性の免疫抑制を誘発しないことが確認された（データは示さず）。

10

【0114】

従って、一実施形態において、上記化合物は、調節性T細胞応答を誘発するために有効である。一実施形態において、上記化合物は、FoxP3+調節性T細胞を増大させるために有効である。

20

【0115】

一実施形態において、上記自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患は、自己免疫性糖尿病、多発性硬化症、シェーグレン病、自己免疫性甲状腺炎、狼瘡、関節リウマチ、乾癬、大腸炎、および喘息からなる群より選択される。一実施形態において、上記自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患は、自己免疫性糖尿病もしくは多発性硬化症である。

20

【0116】

一局面において、必要性のある哺乳動物被験体において、自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患を処置するための方法が提供される。上記方法は、上記被験体に、上記哺乳動物被験体においてヒアルロン酸合成を阻害するために有効な量の化合物を含む組成物を投与する工程を包含する。一実施形態において、上記化合物は、UDP-グリコシルトランスフェラーゼインヒビターである。一実施形態において、上記化合物は、UDPグルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである。一実施形態において、上記化合物は、4-メチルウンベリフェロンもしくは4-メチルウンベリフェロンの代謝産物、例えば、4-メチルウンベリフェロン-グルクロニドもしくは硫酸化4-メチルウンベリフェロンである。

30

【0117】

上記方法の一実施形態において、上記化合物は、調節性T細胞応答を誘発するために有効である。一実施形態において、上記化合物は、FoxP3+調節性T細胞を増大させるために有効である。

【0118】

一実施形態において、上記哺乳動物被験体は、ヒト被験体である。一実施形態において、上記ヒト被験体は、自己免疫性糖尿病、多発性硬化症、シェーグレン病、自己免疫性甲状腺炎、狼瘡、関節リウマチ、乾癬、大腸炎、および喘息からなる群より選択される自己免疫疾患、アレルギー疾患、もしくはアトピー性疾患に罹患しているかまたは発症させるリスクがある。

40

【0119】

一局面において、自己免疫性糖尿病に罹患しているかもしくは発症させるリスクがある哺乳動物被験体において、脾島炎を処置する、および/または自己免疫性糖尿病の進行を逆转させるための方法が記載される。上記方法は、上記哺乳動物被験体に、上記哺乳動物被験体においてヒアルロン酸合成を阻害するために有効な量の化合物を投与す

50

る工程を包含する。

【0120】

一実施形態において、上記化合物は、UDP-グリコシルトランスフェラーゼインヒビターもしくはUDPグルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである。一実施形態において、上記化合物は、4-メチルウンベリフェロンもしくは4-メチルウンベリフェロンの代謝産物である。一実施形態において、上記哺乳動物被験体は、ヒト被験体である。

【0121】

投与様式は、経口投与、舌下投与、鼻内投与、気管内投与、吸入、眼投与、局所投与、経皮投与、皮内投与、直腸投与、腔投与、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、胸骨内投与、もしくは経粘膜投与を介するものを含む任意の医学的に受容可能な様式であり得る。さらに、投与様式は、体外デバイスおよび／もしくは組織穿通性の電磁デバイスを介するものであり得る。

10

【0122】

選択される特定の様式は、選択される特定の化合物、所望の結果、処置される特定の状態および治療効力に必要とされる用量に依存する。本明細書で記載される方法は、一般的に、医学的に受容可能である任意の投与様式、例えば、臨床上受容不能な有害効果を引き起こすことなく、炎症応答変化の有効なレベルを生じる任意の様式を使用して実施され得る。

【0123】

上記組成物は、障害および投与様式に依存して、異なる容器、ビヒクルもしくは製剤において提供され得る。例えば、経口適用に関しては、上記組成物は、舌下錠、ガム、マウスウォッシュ、歯磨き粉、キャンディー、ゲル、フィルムなどとして；眼適用に関しては、点眼びん中の点眼剤、眼用軟膏剤、眼用ゲル、眼用パックとして、コンタクトレンズもしくは眼内レンズ上の被覆として、コンタクトレンズ保存溶液もしくは洗浄液中などにおいて；局所適用に関しては、ローション剤、軟膏剤、ゲル、クリーム剤、スプレー、ティシュー、スワブ、ワイプなどとして；腔適用もしくは直腸適用に関しては、軟膏剤、タンポン、坐剤、粘膜接着製剤などとして、投与され得る。

20

【0124】

上記組成物は、注射によって、例えば、ボーラス注射もしくは連続注入によって、静脈内経路、皮下経路、筋肉内経路、腹腔内経路、胸骨内経路を介して、投与され得る。注射用製剤は、単位投与形態で、例えば、アンプルもしくは複数用量容器において（保存剤を添加して）呈示され得る。上記組成物は、油性もしくは水性のビヒクル中で懸濁物、溶液もしくはエマルジョンのような形態をとり得、懸濁剤、安定化剤および／もしくは分散剤のような調合剤（formulatory agent）を含み得る。経口投与に関しては、上記組成物は、上記組成物と、当該分野で周知の薬学的に受容可能なキャリアとを合わせることによって、例えば、舌下錠、液体製剤、もしくは経口ゲルとして、容易に製剤化され得る。

30

【0125】

吸入による投与に関しては、上記組成物は、加圧パックもしくはネブライザーからのエアロゾルスプレー呈示の形態で、適切なプロペラント、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素もしくは他の適切なガスとともに便利に送達され得る。加圧エアロゾルの場合には、投与単位は、バルブを提供して、計量された量を送達することによって決定され得る。例えば、ゼラチンのカプセル剤およびカートリッジは、吸入器もしくは吹き入れ器における使用のために、上記組成物および適切な粉末基剤（例えば、ラクトースもしくはデンプン）の粉末ミックスを含んで製剤化され得る。治療剤の吸入のための医療用デバイスは、当該分野で公知である。いくつかの実施形態において、上記医療用デバイスは、吸入器である。他の実施形態において、上記医療用デバイスは、計量容量吸入器である。

40

【0126】

上記組成物はまた、直腸用組成物もしくは腔用組成物（例えば、坐剤もしくは停留浣腸（

50

例えば、従来の坐剤基剤（例えば、カカオ脂もしくは他のグリセリド）を含む））において製剤化され得る。

【0127】

UDPグリコシルトランスフェラーゼインヒビター、もしくはUGTインヒビター、もしくは4-MU処置によるHA合成の阻害は、FoxP3誘発を促進するので、FoxP3発現の調節におけるHAおよびそのレセプターCD44を通じたシグナル伝達の役割を調査した。図14Aは、プレートに結合したHMW-HAもしくはCD44抗体よりもしくはなしで、TGF-αおよびIL-2の存在下で72時間にわたって活性化されたCD4+GFP/FoxP3-T細胞によるCD25およびFoxP3発現を示す。図14Aに示されるように、GFP/FoxP3レポーターマウスを使用して、プレートに被覆されたHAおよび抗CD44抗体は、インビトロで、CD4+GFP/FoxP3前駆体からのFoxP3誘発を強力に減少させることが観察された。さらに、CD44-/-マウスから単離されたCD4+GFP/FoxP3-T細胞を使用するインビトロでのTreg誘発は、CD44+/-マウスもしくはCD44-/-マウスから単離された細胞より多数のFoxP3発現Tregを生じた。このことは、FoxP3誘発の低下が、発現されるCD44+対立遺伝子の数に逆比例することを示す。

10

【0128】

図14Bは、等しい数のGFP/FoxP3-CD4+-CD44+/-CD45.1およびGFP/FoxP3-CD4+CD44-/-CD45.2 T細胞を、RAG-/-宿主に共に移入した後の、FoxP3のインビオ誘発に関する。CD3+GFP/FoxP3+ T細胞の数を、移入の4日後に評価し、CD44-/- (CD45.1) 対 CD44+/- (CD45.2) T細胞の比を決定した。図14Cは、3匹のRAG-/-レシピエント動物の累積データを示す。

20

【0129】

図14Bおよび図14Cに示されるように、RAG-/-宿主への等しい数のGFP/FoxP3-CD4+CD44+/-CD45.1およびGFP/FoxP3-CD4+CD44-/-CD45.2 T細胞の共移入は、CD44-/-CD4+細胞 (CD45.1-) が、FoxP3+細胞のより大きな集団を生じることを明らかにした。このことは、CD44発現CD4 T細胞がFoxP3+Tregへと発生する可能性の低下を示す。まとめると、これらデータは、HMW-HAおよびCD44が、FoxP3誘発をインビトロおよびインビオで抑制し、CD44シグナル伝達が、Treg誘発における重要な阻害性シグナルであることを示す。

30

【0130】

まとめると、上記データは、HAのレベルの増大が、FoxP3+Tregの誘発を阻害することによって、自己免疫を促進する環境を作り出しえることを示す。さらに、上記データは、4-MU処置が、MSにおいてミエリンに対する自己免疫性の攻撃をブロックし得ることを示す。

【0131】

従って、一局面において、多発性硬化症に罹患しているかもしくは発症させるリスクがある哺乳動物被験体において、多発性硬化症および/もしくは自己免疫性脱髄を処置するための方法が提供される。上記方法は、上記哺乳動物被験体に、上記哺乳動物被験体においてヒアルロン酸合成を阻害するために有効な量の化合物を含む組成物を投与する工程を包含する。一実施形態において、上記化合物は、UDP-グリコシルトランスフェラーゼインヒビターもしくはUDPグルクロニルトランスフェラーゼインヒビターである。一実施形態において、上記化合物は、4-メチルウンベリフェロンもしくは4-メチルウンベリフェロンの代謝産物である。一実施形態において、上記哺乳動物被験体は、ヒト被験体である。

40

【0132】

上記方法の一実施形態において、上記化合物は、調節性T細胞応答を誘発するために有効である。一実施形態において、上記化合物は、FoxP3+調節性T細胞を増大させる

50

ために有効である。

【0133】

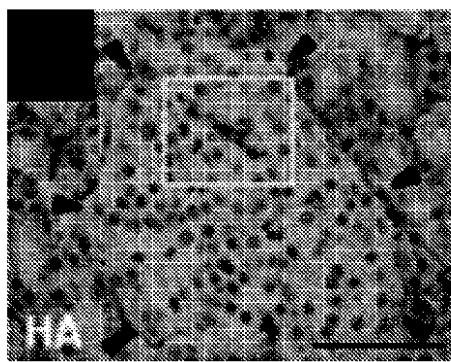
本明細書で記載される研究のうちのあるものは、プロジェクト番号 N A 9 6 5 / 2 - 1 の下でドイツ研究振興協会 (D F G) によって一部支援された。

【0134】

好ましい実施形態が例証および記載されてきたが、特許請求された主題の趣旨および範囲から逸脱することなく、種々の変更がそこで行われ得ることは認識される。

独占的所有もしくは権利が主張される本発明の実施形態は、以下のとおり定義される。

【図2A】



【図2B】

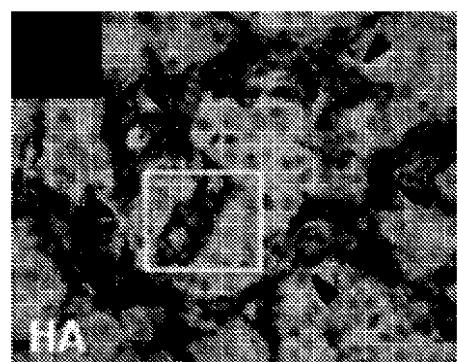
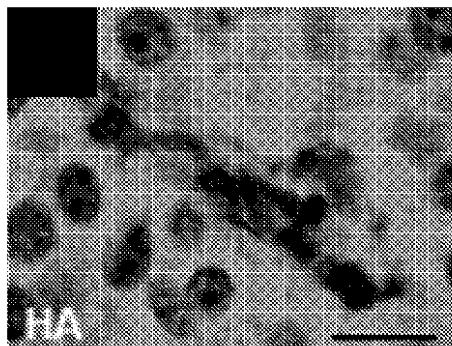


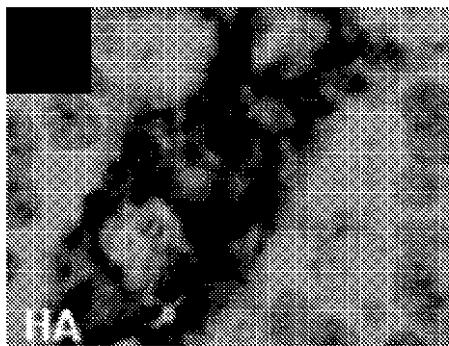
FIG. 2A

FIG. 2B

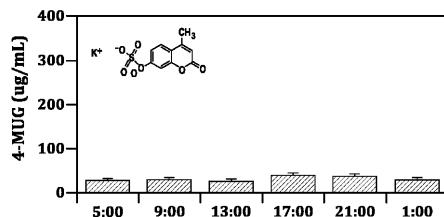
【図2C】

**FIG. 2C**

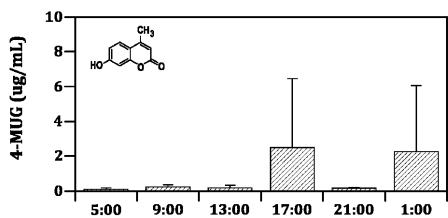
【図2D】

**FIG. 2D**

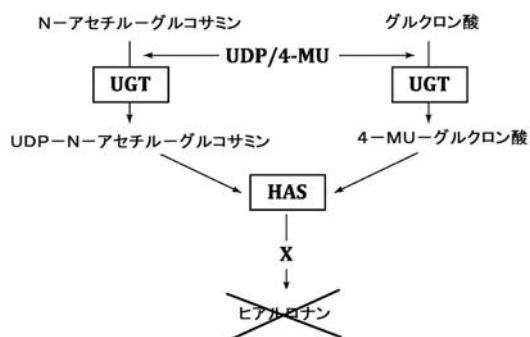
【図11B】

**FIG. 11B**

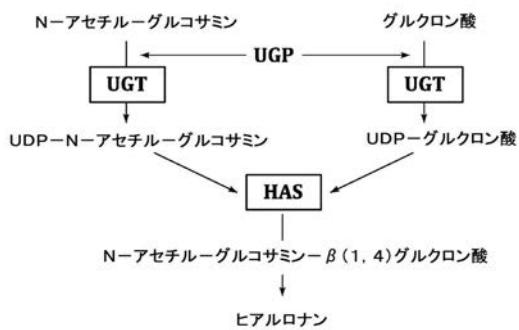
【図11C】

**FIG. 11C**

【図1B】

**FIG. 1B**

【図1A】

**FIG. 1A**

【図3】

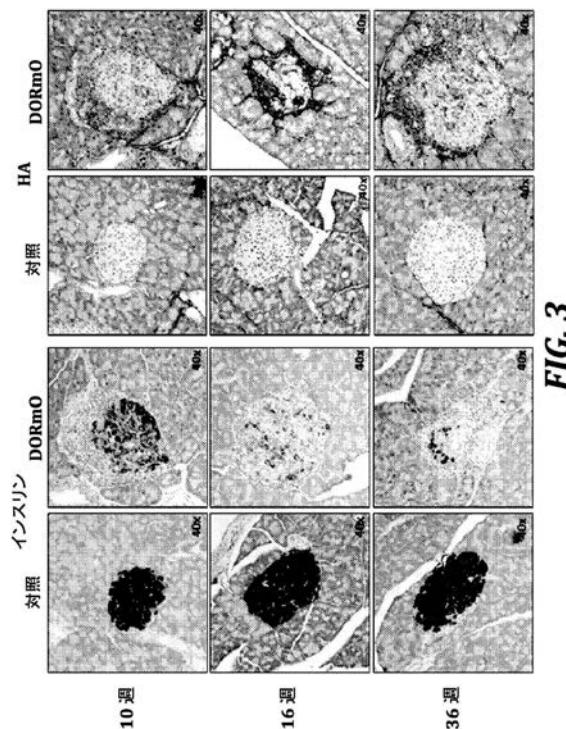


FIG. 3

【図4】

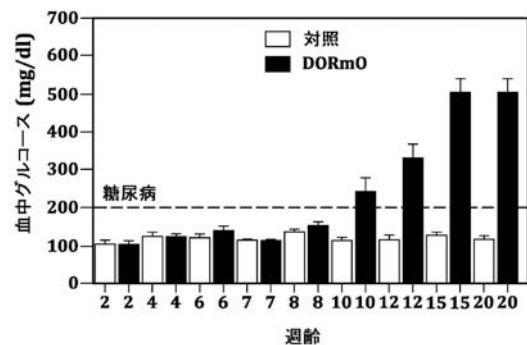


FIG. 4

【図5】

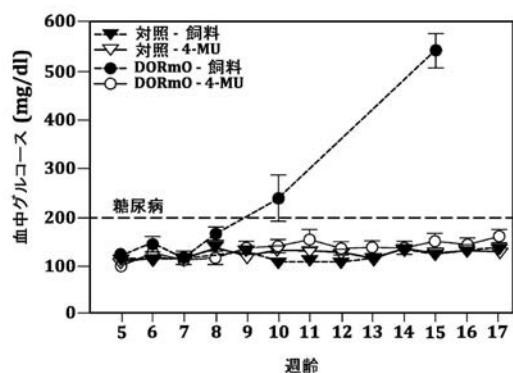


FIG. 5

【図6】

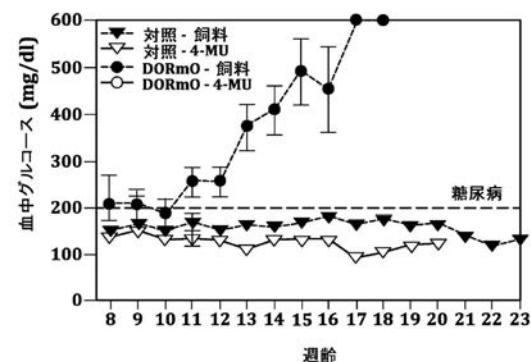


FIG. 6

【図7】

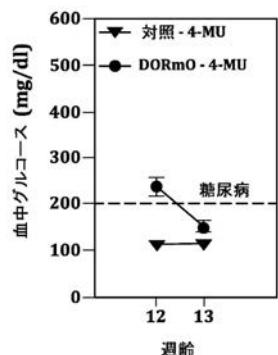


FIG. 7

【図8】

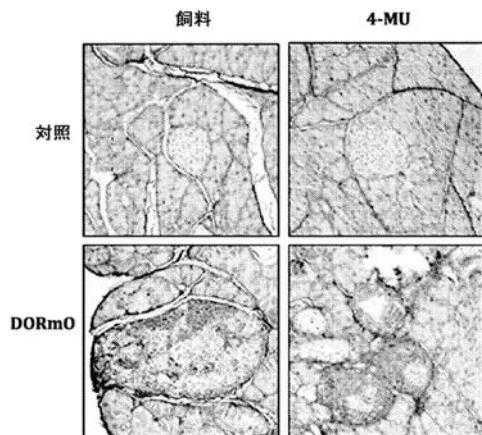


FIG. 8

【図9】

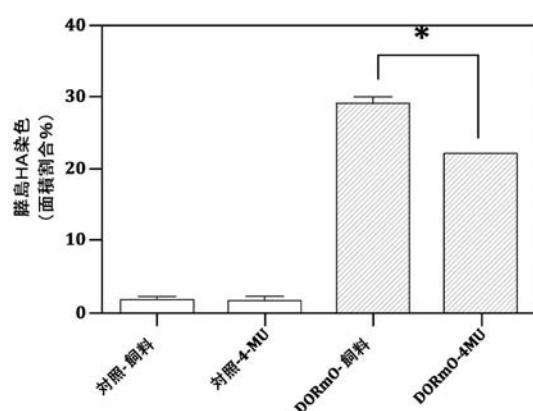


FIG. 9

【図10】

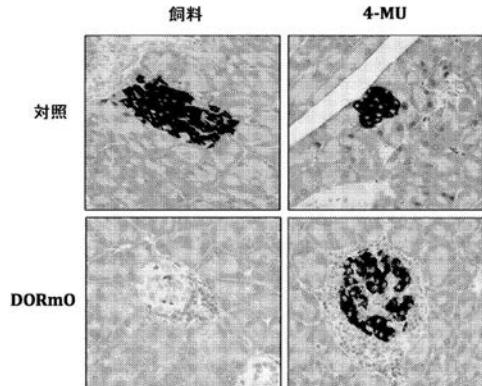


FIG. 10

【図 1 1 A】

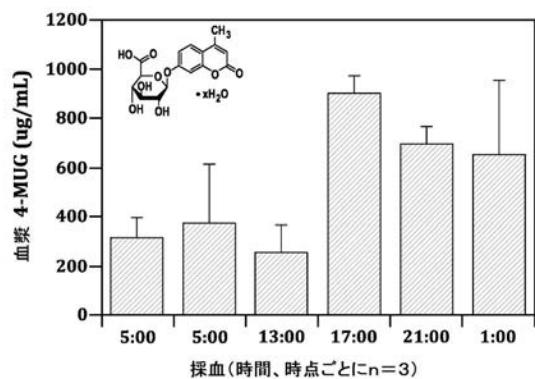


FIG. 11A

【図 1 2 A】

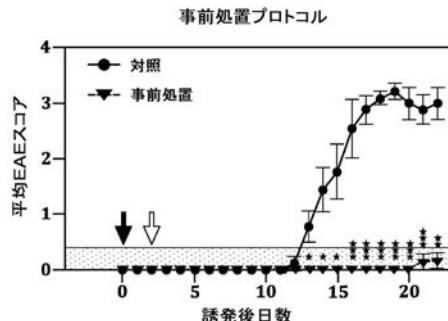


FIG. 12A

【図 1 2 B】

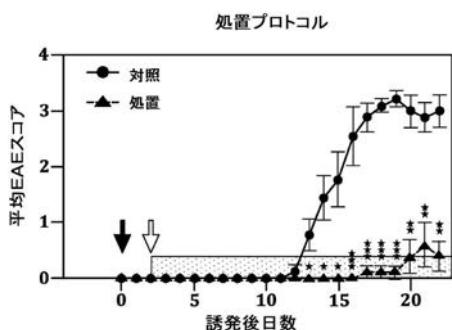


FIG. 12B

【図 1 2 C】

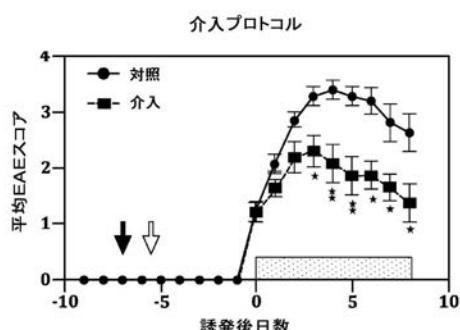


FIG. 12C

【図 1 3 A】

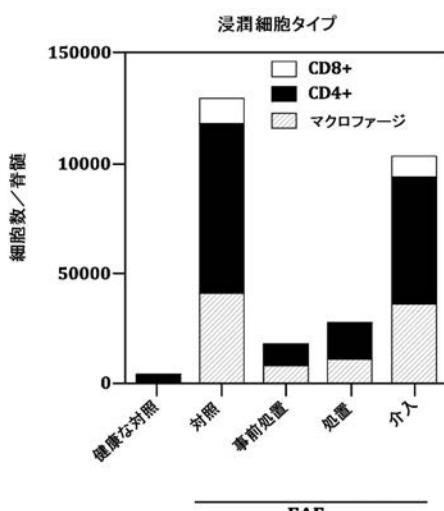


FIG. 13A

【図 13B】

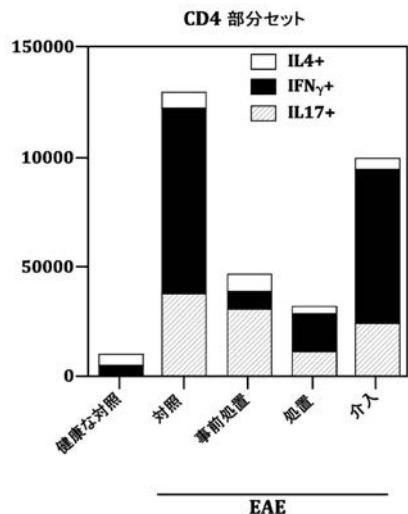


FIG. 13B

【図 13C】

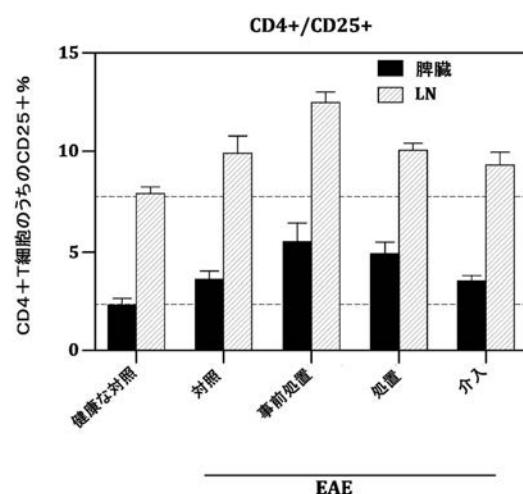


FIG. 13C

【図 13D】

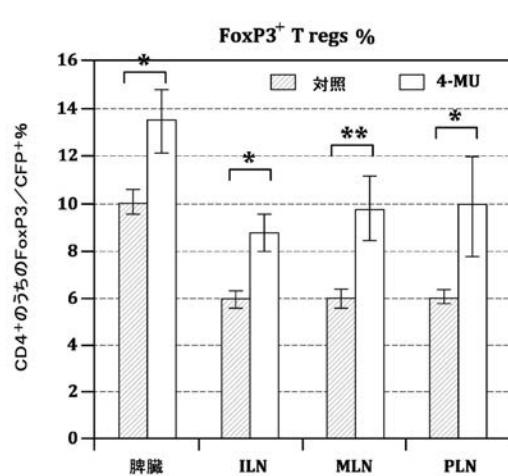


FIG. 13D

【図 14A】

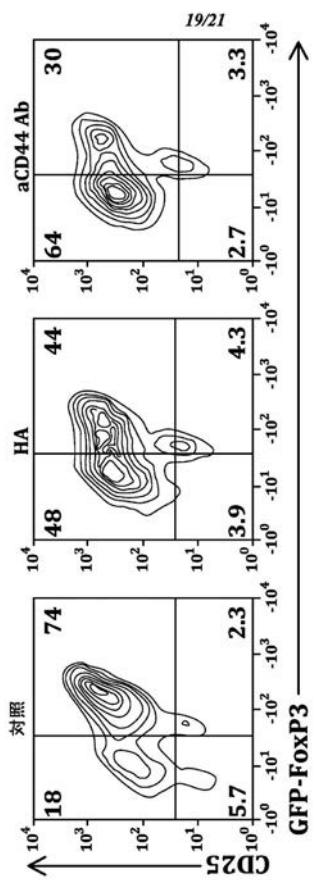


FIG. 14A

【図 1 4 B】

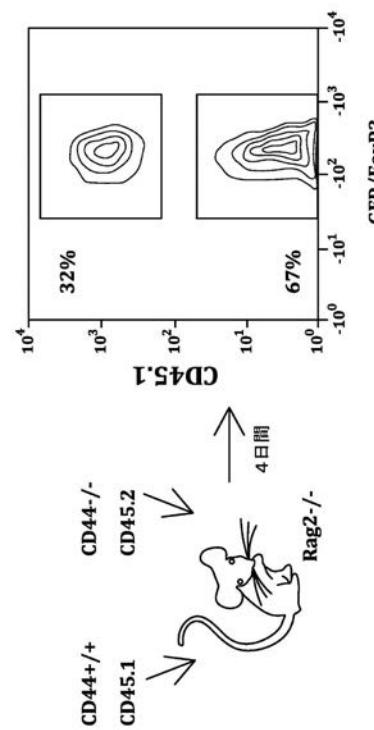


FIG. 14B

【図 1 4 C】

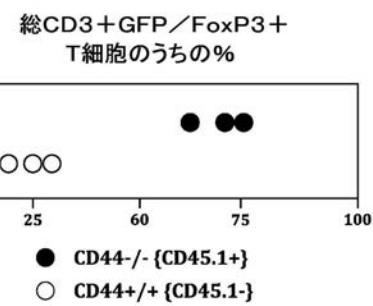


FIG. 14C

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/50770
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 5/071 (2015.01) CPC - C12N 5/0636; A61K 38/00; C12N 2501/23 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC (8): C12N 5/071 (2015.01) CPC: C12N 5/0636; A61K 38/00; C12N 2501/23		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/372.3; 435/372.2; 514/789; 435/15; 435/193		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Thomson Innovation (US Grant, AU Innov, CA App, US App, AU Grant, FR App, EP Grant, AU App, DE Util, EP App, GB App, DE Grant, WO App, CA Grant, DE App, JP App, KR Grant, KR App, Other, DWPI), Google, sciencedirect. Search terms: autoimmune allergicatopic hyaluronan synthesis glycosyltransferase 4-methylumbellifrone		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,376,475 B1 (Marth et al.) 23 April 2002 (23.04.2002) entire document especially title; claim 9; col 18, ln 64 to col 19, ln 3; col 19, ln 50-54; col 2, ln 28-31	1
Y		2-6 and 9
A		7-8
Y	Kultti et al. '4-Methylumbellifrone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3?, Experimental Cell Research, Volume 315, Issue 11, 1 July 2009, Pages 1914-1923	2-6 and 9
A	US 2008/0152640 A1 (Prehm) 26 January 2008 (26.01.2008) entire document	1-9
A	US 2012/0219506 A1 (Moore et al.) 30 August 2012 (30.08.2012) entire document	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 January 2015 (12.01.2015)	Date of mailing of the international search report 22 JAN 2015	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/50770

Box III: LACK OF UNITY

Group I: Claims 1-9 directed to composition for treating an autoimmune, allergic, or atopic disease

Group II: Claims 10-23, directed to a method for treating an autoimmune, allergic, or atopic disease in a mammalian subject in need thereof, the method comprising administering to the subject a composition comprising a compound in an amount effective to inhibit hyaluronan synthesis

Group III: Claims 24-35, directed to a method for treating multiple sclerosis in a mammalian subject in need thereof, the method comprising administering to the subject a composition comprising a compound in an amount effective to inhibit hyaluronan synthesis

The inventions listed as Group I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features:

The special technical feature of group II is a method for treating an autoimmune, allergic, or atopic disease in a mammalian subject in need thereof, the method comprising administering to the subject a composition comprising a compound in an amount effective to inhibit hyaluronan synthesis, not required by groups I and III

The special technical feature of group III is a method for treating multiple sclerosis in a mammalian subject in need thereof, the method comprising administering to the subject a composition comprising a compound in an amount effective to inhibit hyaluronan synthesis, not required by groups I and II

Common technical features:

Groups I-III share the technical features of compound that inhibits hyaluronan synthesis, and (ii) a pharmaceutically acceptable carrier.

Group I and II share the technical features of composition for treating an autoimmune, allergic, or atopic disease comprising (i) a compound that inhibits hyaluronan synthesis, and (ii) a pharmaceutically acceptable carrier

Groups II and III share the technical feature of administering a composition comprising a compound in an amount effective to inhibit hyaluronan synthesis in the mammalian subject.

These shared technical features, however, do not provide a contribution over the prior art as being anticipated by US 6,376,475 B1 to Marth et al. (hereafter 'Marth'). Marth teaches composition for treating an autoimmune, allergic, or atopic disease comprising (title; claim 9) (i) a compound that inhibits hyaluronan synthesis (compound that inhibits hyaluronan synthesis is a UD P-glycosyltransferase inhibitor ...col 18, ln 61 to col 19, ln 3, '... Compositions that contain glycosyltransferase inhibitors...), and (ii) a pharmaceutically acceptable carrier (col 19, ln 50-54, ...compositions for parenteral administration which comprise a solution of the glycosyltransferase inhibiting agent dissolved or suspended in an acceptable carrier, preferably an aqueous carrier...) and administering the composition to a mammalian subject (col 2, ln 28-31,...inhibiting an immune response in a mammal by administering to the mammal a therapeutically effective amount of an agent ...col 18, ln 64 to col 19, ln 3, '... Compositions that contain glycosyltransferase inhibitors...)

As said compound, composition and method were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify Groups I-III

Groups I-III, thus lack unity under PCT Rule 13.2, because they do not share a same or corresponding special technical feature providing a contribution over the prior art.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/50770

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

—see supplemental box —

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-9

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 K 31/7012 (2006.01)	A 6 1 K 31/7012	
A 6 1 K 31/353 (2006.01)	A 6 1 K 31/353	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(71)出願人 503115205

ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニア ユニバーシティー
アメリカ合衆国 94305-2038 カリフォルニア州 スタンフォード メイン クワッド
ビルディング 170 サード フロア ピー.オー.ボックス 20386 オフィス オブ
ザ ジェネラル カウンセル

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ボリーキー, ポール

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94306, パロ アルト, エル カミーノ レアル 1
705, スタンフォード ジュニア ユニバーシティー 気付

(72)発明者 ナギー, ナディーン

アメリカ合衆国 ワシントン 98101, シアトル, ナインス アベニュー 1201,
ベナロヤ リサーチ インスティテュート アット バージニア メイソン 気付

(72)発明者 ワイト, トーマス

アメリカ合衆国 ワシントン 98101, シアトル, ナインス アベニュー 1201,
ベナロヤ リサーチ インスティテュート アット バージニア メイソン 気付

(72)発明者 カイパース, ヘドウィグ エフ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94306, パロ アルト, エル カミーノ レアル 1
705, スタンフォード ジュニア ユニバーシティー 気付

F ターム(参考) 4C084 AA17 NA14 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA891 ZA892 ZA961 ZA962

ZB071 ZB072 ZB131 ZB132 ZB151 ZB152 ZC201 ZC202 ZC351 ZC352

ZC411 ZC412

4C086 AA01 AA02 BA08 MA01 MA04 NA14 ZA59 ZA66 ZA89 ZA96

ZB07 ZB13 ZB15 ZC20 ZC35 ZC41