

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 584**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4436** (2006.01)

**A61K 31/192** (2006.01)

**A61K 31/7032** (2006.01)

**A61K 31/7024** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/203** (2006.01)

**A61K 31/07** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2012 PCT/US2012/043875**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12178108**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2012 E 12803312 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2723347**

54 Título: **Prevención y tratamiento de afecciones inflamatorias**

30 Prioridad:

**24.06.2011 US 201161501139 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**11.05.2020**

73 Titular/es:

**GRI BIO, INC. (100.0%)  
2223 Avenida de la Playa, Suite 105  
La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**CHATURVEDI, VIPIN, KUMAR**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 759 584 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Prevención y tratamiento de afecciones inflamatorias

5 Antecedentes

Campo

10 Las presentes realizaciones se refieren a composiciones y métodos para modular el receptor de ácido retinoico (RAR) en la prevención y el tratamiento de afecciones inflamatorias del hígado.

Descripción de la técnica relacionada

15 El uso excesivo de alcohol es la causa principal de la enfermedad hepática en el mundo occidental. Se observan pruebas de lesión hepática en individuos que consumen cuatro o más bebidas alcohólicas por día (cuatro cervezas de aproximadamente 354 ml (12 onzas), cuatro copas de vino o aproximadamente 118 ml (4 onzas) de bebidas alcohólicas de alta graduación en hombres o la mitad de esa cantidad en mujeres). Aunque no se comprende por completo cómo el alcohol daña el hígado, el consumo crónico de alcohol da como resultado la secreción de citocinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL6 e IL8), tensión oxidativa, peroxidación lipídica y toxicidad de acetaldehídos, lo que da como resultado inflamación, apoptosis y, finalmente, fibrosis de las células hepáticas.

20 La enfermedad hepática alcohólica (ALD en inglés) tiene tres fases principales: enfermedad del hígado graso alcohólico, hepatitis alcohólica y cirrosis. La enfermedad del hígado graso alcohólico, que se caracteriza por una acumulación de los ácidos grasos en el hígado, habitualmente es asintomática y reversible si el individuo se abstiene de ingerir alcohol durante un par de semanas. En los casos graves, se puede experimentar debilidad, náuseas, dolor abdominal, pérdida del apetito y malestar. Aunque la mayoría de los bebedores excesivos presentan un cierto nivel de enfermedad del hígado graso, en algunos casos, la necesidad de beber en exceso solo se ha producido diariamente durante un período menor a una semana, solo uno de cada cinco bebedores excesivos desarrolla hepatitis alcohólica y uno de cada cuatro desarrolla cirrosis. La hepatitis alcohólica se caracteriza por la inflamación de los hepatocitos y, en general, se puede revertir con abstinencia. La cirrosis, que se caracteriza por la inflamación, la fibrosis (endurecimiento celular) y las membranas dañadas que impiden la desintoxicación de productos químicos en el cuerpo, terminando en cicatrices y necrosis, en general, es irreversible.

25 Los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a las diferentes fases de daño del tejido hepático en la enfermedad hepática alcohólica se comprenden de manera muy vaga. Aunque se ha realizado un avance en varias áreas, aún se carece de un enfoque terapéutico eficaz para detener esta enfermedad. Esto se debe en parte al hecho de que el hígado es un órgano único a nivel inmunológico, así como anatómico. Por ejemplo, mientras que las células parenquimales presentan funciones metabólicas, las células no parenquimales desempeñan funciones inmunológicas. Además de los hepatocitos parenquimales, el hígado contiene varias células no parenquimales, tales como LSEC, células de Kupffer, células dendríticas, células NK y células NKT, que todas pueden participar en la inmunidad. No se conoce la forma en que la respuesta inmunitaria se organiza para conferir tolerancia o inmunidad al daño inducido por el alcohol.

35 Jianhua Rao y col. (2010): "All-trans retinoic acid alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury by enhancing manganese superoxide dismutase in rats", Biological & pharmaceutical bulletin, vol. 33, n.º 5, páginas 869-875, y WANG X-D y col. (2000): "Suppression of alcohol-induced hepatocellular proliferation by all-trans-retinoic acid", ALCOHOLISM CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH, vol. 24, n.º 5 Suplemento, página 188A, desvelan que el ATRA alivia o protege contra la lesión hepática.

50 Sumario

La presente invención se dirige a una composición que comprende una cantidad de agonista selectivo de RARγ suficiente para inhibir la activación de las células NKT tipo I proinflamatorias para su uso en el tratamiento o la prevención de al menos una afección inflamatoria del hígado, en donde el agonista selectivo de RARγ es más eficaz para afectar al RARγ en relación con el RARα.

55 La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que se encuentre fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona para fines de información únicamente. Además, cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del organismo humano o animal mediante terapia. Las presentes realizaciones se refieren de manera general a métodos y composiciones para modular el sistema inmunitario innato para prevenir y someter a tratamiento el daño de tejidos asociado a afecciones inflamatorias. Por ejemplo, varias realizaciones descritas en el presente documento se refieren a la prevención y el tratamiento de la enfermedad hepática alcohólica (ALD) mediante la modulación del sistema inmunitario innato.

65 Varias realizaciones descritas en el presente documento se refieren a métodos y composiciones para manipular las

actividades de las células NKT tipo I y las células NKT tipo II, las interacciones entre las células NKT tipo I y las células NKT tipo II y sus interacciones con otras células hepáticas con el fin de someter a tratamiento, aliviar o prevenir la lesión del hígado asociada a la inflamación. En algunas realizaciones, la lesión asociada a la inflamación es una lesión hepática inducida por el alcohol. En algunas realizaciones, la lesión hepática inducida por el alcohol es la enfermedad hepática relacionada con el alcohol, la enfermedad del hígado graso, la esteatosis hepática, la hepatitis alcohólica o la cirrosis alcohólica.

Varias realizaciones se refieren a un método para prevenir, mitigar o someter a tratamiento el daño hepático inducido por inflamación posterior al consumo excesivo de alcohol mediante la inhibición de la actividad de las células NKT tipo I. En algunas realizaciones, la actividad de las células NKT tipo I proinflamatorias se inhibe mediante uno o más agonistas del RAR que se seleccionan del grupo que consiste en ATRA, retinol, 9-cis-RA o 13-cis-RA, tretinoína, AM580, AC55649, CD1530 y tazaroteno. En algunas realizaciones, la actividad de las células NKT tipo I proinflamatorias se inhibe mediante uno o más retinoides poliolefinicos, tales como isotretinoína y acitretina. En algunas realizaciones, la actividad de las células NKT tipo I proinflamatorias se inhibe mediante uno o más agonistas del RAR que se seleccionan del grupo que consiste en etretinato, acitretina e isotretinoína. Varias realizaciones se refieren a la inhibición de la actividad de las células NKT tipo I proinflamatorias mediante tazaroteno, ácido tazaroténico o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, la actividad de las células NKT tipo I proinflamatorias se inhibe mediante la activación de las células NKT tipo 2. En algunas realizaciones, la actividad de las células NKT tipo I inflamatorias se inhibe mediante uno o más sulfátidos.

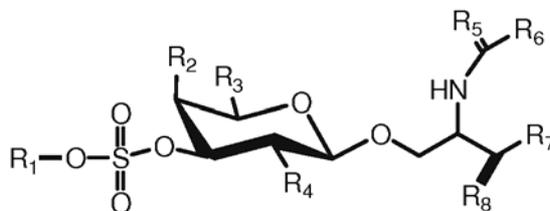
Algunas realizaciones de la presente divulgación se refieren a los mecanismos inmunitarios innatos que conducen a la lesión hepática posterior, relacionada con o causada por el consumo de alcohol. Algunas realizaciones se refieren a la manipulación de las interacciones entre estas células que confieren de manera natural tolerancia a los antígenos derivados del intestino o derivados de metabolitos y, al mismo tiempo, confieren inmunidad contra patógenos ajenos identificados.

Algunas realizaciones se refieren a un enfoque de terapia de combinación que se dirige a las células NKT tipo I y tipo II para el desarrollo de una terapia eficaz para someter a tratamiento, prevenir o mitigar el daño de tejidos asociado a afecciones inflamatorias. En algunas realizaciones, se usa un agonista del RAR para inhibir directamente la actividad de las células NKT tipo 1 y se usa un sulfátido para activar la actividad de las células NKT tipo II.

Algunas realizaciones se refieren a la prevención y al tratamiento del daño de tejidos asociado a la ALD mediante la administración del ácido *trans*retinoico total (ATRA). Varias realizaciones se refieren al uso del ATRA en la prevención y el tratamiento de la lesión hepática inducida por el alcohol, la enfermedad hepática relacionada con el alcohol, la enfermedad del hígado graso, la esteatosis hepática, la hepatitis alcohólica o la cirrosis alcohólica.

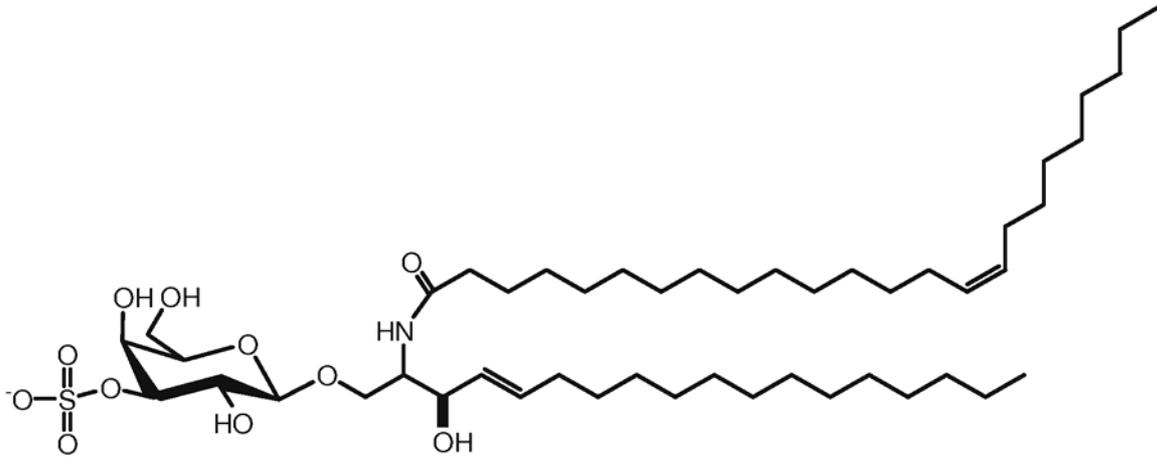
Algunas realizaciones se refieren a la prevención y al tratamiento del daño de tejidos asociado a la ALD mediante la administración de tazaroteno, ácido tazaroténico o una mezcla de los mismos. Varias realizaciones se refieren al uso de tazaroteno, ácido tazaroténico o una mezcla de los mismos en la prevención y el tratamiento de la lesión hepática inducida por el alcohol, la enfermedad hepática relacionada con el alcohol, la enfermedad del hígado graso, la esteatosis hepática, la hepatitis alcohólica o la cirrosis alcohólica.

Algunas realizaciones se refieren a la prevención y al tratamiento del daño de tejidos asociado a la inflamación mediante la administración de uno de más sulfátidos. Varias realizaciones se refieren al uso de sulfátidos en la prevención y el tratamiento de la lesión hepática inducida por el alcohol, la enfermedad hepática relacionada con el alcohol, la enfermedad del hígado graso, la esteatosis hepática, la hepatitis alcohólica o la cirrosis alcohólica. En algunas realizaciones, el sulfátido tiene la siguiente estructura química:



en donde R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en un enlace, un hidrógeno, un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub>, un alquilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub>, un alquenilo C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub>, un alquenilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub> y un azúcar C<sub>5</sub> a C<sub>12</sub>; R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi y un grupo alcoxi; R<sub>3</sub> se selecciona del grupo que consiste en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, un grupo etoxi y un grupo alcoxi; R<sub>4</sub> se selecciona del grupo que consiste en un hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo alcoxi; R<sub>5</sub> se selecciona del grupo que consiste en un hidrógeno, un hidroxilo, un carbonilo, un alcoxi y un enlace; R<sub>6</sub> se selecciona del grupo que consiste en un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquenilo C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquenilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub> y un alquino C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>; R<sub>7</sub> se selecciona del grupo que consiste en un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquenilo C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un

alqueno sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub> y un alqueno C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>; y R<sub>8</sub> se selecciona del grupo que consiste en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi y un enlace. En algunas realizaciones, el sulfátido tiene la siguiente estructura química:



5

Algunas realizaciones se refieren a la regulación de las células NKT tipo I mediante células NKT tipo II reactivas al sulfátido activadas. Varias realizaciones se refieren al papel regulador de las células NKT tipo II reactivas al sulfátido activadas sobre las células NKT tipo I en la mediación de la protección de la enfermedad autoinmunitaria y la supresión de la inmunidad antitumoral.

10

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1a representa una metodología mediante la que se determina el efecto del sulfátido sobre la célula NKT tipo I en el hígado. La Figura 1b muestra datos representativos de dos experimentos independientes que miden la proliferación celular en respuesta a una estimulación *in vitro* con  $\alpha$ GalCer en la presencia o ausencia de 10 ng/ml de IL-2. La Figura 1c muestra los resultados de la tinción intracitoplasmática de las poblaciones de sulfátido/CD1d-tetrámero+ y tetrámero- en el hígado para identificar las células del IFN- $\gamma$ + después de la inyección de 20  $\mu$ g de sulfátido. Los números encima del paréntesis indican el % de células positivas en ratones a los que se les inyectó PBS o sulfátido. La Figura 1d muestra micrografías (X200) de secciones de hígado representativas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) tomadas de ratones a las 12 a 96 horas después del tratamiento con ConA sola (fila superior) o ConA más sulfátido de cerebro bovino (fila inferior). La parte inferior izquierda muestra una micrografía representativa de una sección de hígado teñida con H&E de un ratón de control al que se le inyectó sulfátido solamente. La Figura 1e muestra gráficas que representan los niveles de alanina amino transferasa (ALT) y aspartato amino transferasa (AST) en ratones IL-12p40+/+ en diferentes intervalos de tiempo después de la inyección de ConA (símbolos cerrados) o ConA más sulfátido (símbolos abiertos). Los valores son la media  $\pm$  la desviación típica (SD en inglés) de 5 ratones por grupo.  $P < 0,001$ .

15

20

25

La Figura 2a muestra gráficos de flujo de células que expresan Gr-1/CD11b aisladas de los lóbulos cefálicos del hígado de ratones de tipo salvaje (WT), J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> mutantes y WT sometidos a tratamiento con sulfátido sometidos a cirugía de placebo o lesión por reperusión isquémica (IRI en inglés). Los recuadros muestran las poblaciones de Gr-1<sup>alto</sup> y Gr-1<sup>int</sup> analizadas en la Figura 2b. Los números al lado de los recuadros indican el porcentaje de células positivas entre los leucocitos del hígado. La Figura 2b muestra gráficos de barra que resumen el análisis citométrico de flujo. El panel izquierdo representa el % y el panel derecho representa los números absolutos de las poblaciones de Gr-1<sup>alto</sup> y Gr-1<sup>int</sup>. Los valores son la media  $\pm$  el error típico de la media (SEM en inglés). \*  $p < 0,005$ . La Figura 2c muestra una gráfica que representa el % de células de IFN- $\gamma$ +  $\alpha$ GalCer/CD1d-tetrámero+ en los hígados de ratones que presentan IRI y sometidos a tratamiento con IRI placebo y sulfátido. Los valores son la media  $\pm$  el error típico de la media (SEM).  $P < 0,01$ .

30

35

La Figura 3 representa un modelo para la mediación de la actividad de las células NKT tipo I y tipo II con sulfátidos. De acuerdo con el modelo, el sulfátido promueve la activación de las células NKT tipo II, que a su vez inactivan las células NKT tipo I. La inhibición de las células NKT tipo I se ejemplifica mediante la inhibición de la secreción de IFN- $\gamma$  que da como resultado una reducción del reclutamiento hepático de células mielocíticas, granulocitos y, en consecuencia, una reducción de la lesión de hepatocitos y células endoteliales.

40

La Figura 4 muestra micrografías representativas de tejido teñido con H&E de lóbulos cefálicos del hígado de ratones sometidos a 90 minutos de isquemia hepática seguida de 24 horas de reperusión (IRI) (fila superior) y ratones sometidos a cirugía de placebo (placebo) (fila inferior) a un aumento de 100X. De izquierda a derecha, los paneles muestran tejidos de ratones WT sin someter a tratamiento, ratones J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> sin someter a tratamiento, ratones WT sometidos a tratamiento con sulfátido y ratones J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> sometidos a tratamiento con sulfátido.

45

La Figura 5 muestra gráficas que resumen el análisis de citometría de flujo de células MNC hepáticas aisladas de los grupos de ratones macho (4 en cada uno) WT BL/6 y J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> después de 5 semanas de alimentación con dieta

líquida de Lieber-DeCarli que contenía etanol al 5 % o dieta de control que contenía cantidades similares de calorías. Valores de  $P < 0,005$ . La acumulación de células NKT tipo I activadas y células mielocíticas CD11b+Gr-1+ se observó en los hígados de ratones WT, pero no en ratones  $\alpha$ GalCer-/-.

La Figura 6 muestra un gráfico de barras que representa los niveles de ALT en suero en ratones WT (B6) y ratones  $\alpha$ GalCer-/- a los que se les inyectó (por vía intraperitoneal) 20 microgramos/ratón de sulfátido (d-1 y d10) (barras sombreadas con líneas horizontales (sulfátido)), 0,3 miligramos/animal de ATRA (d6 a d10) (barras sombreadas con líneas verticales (atRA)) o vehículo/DMSO (barras sombreadas por completo (EtOH)) y alimentados con dieta líquida de Lieber-DeCarli que contenía alcohol. Los grupos de control (barras sin sombrear) se alimentaron con una dieta de control isocalórica. Valores de  $P < 0,05$ .

La Figura 7 muestra micrografías representativas (X200) de tejido hepático extraído de ratones sometidos a tratamiento con vehículo/DMSO, sulfátido y ATRA después de la alimentación crónica más consumo en exceso de etanol. El tejido hepático de los ratones con vehículo/DMSO muestra pruebas de esteatohepatitis hepática (enfermedad del hígado graso), mientras que el tejido hepático obtenido de los ratones sometidos a tratamiento con sulfátido y ATRA parece relativamente normal.

La Figura 8a muestra un gráfico de barras que representa la proliferación (medida mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina) de células esplénicas NKT tipo I recién aisladas incubadas en  $\alpha$ GalCer sola, ATRA solo o en  $\alpha$ GalCer con niveles en aumento de ATRA. La Figura 8b muestra una gráfica que representa el nivel de secreción de citocina IL-2 mediante una célula NKT tipo I (Hy1.2) en respuesta a  $\alpha$ GalCer sola o  $\alpha$ GalCer y niveles en aumento de ATRA. La Figura 8c muestra gráficas que representan los niveles de secreción de citocina IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13, IL-6, IL-10 e IL-12 mediante las células NKT tipo I hepáticas extraídas de ratones a los que se les inyectó DMSO o ATRA y se les incubó con  $\alpha$ GalCer *in vitro*. Los datos mostrados son representativos de 2 experimentos individuales.

La Figura 9a muestra micrografías representativas (X200) de tejido hepático teñido con H&E extraído de ratones macho BL/6 y  $\alpha$ GalCer-/- después de una alimentación crónica (10 días de etanol al 5 % en dieta líquida de Lieber-DeCarli) o alimentación crónica más consumo en exceso (diez días de alimentación crónica de dieta líquida seguida de una única alimentación por sonda de 5 g/kg de etanol). La Figura 9b muestra gráficas que representan los niveles de ALT en suero en ratones BL/6 o  $\alpha$ GalCer-/- macho de control o alimentados con etanol después de una alimentación crónica o una alimentación crónica más consumo en exceso.

La Figura 10 muestra un gráfico de barras que representa la proliferación (medida mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina) de linfocitos T CD4+ reactivos a la proteína básica de mielina MBPac1-9 recién aisladas de ratones transgénicos TCR B10.PL V $\beta$ 8.2 vírgenes en respuesta a la estimulación con MBPac1-9 sola o MBPac1-9 y concentraciones graduadas de ATRA (0,15, 1,2, 18,8  $\mu$ g/ml).

La Figura 11 muestra una gráfica que representa el nivel de IL-2 secretado mediante las células NKT tipo I (Hy1.2) cultivadas *in vitro* con concentraciones graduadas de antígeno lipídico,  $\alpha$ GalCer y 0, 5 o 10  $\mu$ g/ml de ATRA durante 24 horas.

La Figura 12 muestra una gráfica que representa la proliferación (medida mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina) de células esplénicas NKT tipo I recién aisladas cultivadas en presencia de  $\alpha$ GalCer y concentraciones graduadas de ATRA, un agonista del RAR $\alpha$  (AM580), un agonista del RAR  $\beta$  2 (AC55649) o un agonista del RAR $\gamma$  (CD1530).

La Figura 13 muestra una gráfica que representa la proliferación (medida mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina) de células esplénicas NKT tipo I recién aisladas cultivadas en presencia de  $\alpha$ GalCer y concentraciones graduadas de un agonista de PPAR- $\gamma$  (rosiglitazona) o un antagonista de PPAR- $\gamma$  (GW9662).

La Figura 14 muestra una gráfica que representa la proliferación (medida mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina) de células esplénicas NKT tipo I recién aisladas cultivadas en presencia de  $\alpha$ GalCer y concentraciones graduadas de ATRA, diferentes análogos de ácido retinoico, retinol o vitamina A.

La Figura 15 muestra gráficos de barra que representan la proliferación (medida mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina) de células esplénicas NKT tipo I recién aisladas (izquierda) o hibridoma celular NKT tipo I (1.2 Hyb) cultivadas en presencia de concentraciones óptimas de  $\alpha$ GalCer (10 ng/ml) y concentraciones óptimas de ATRA, tretinoína, un agonista del RAR $\alpha$  (AM580), un agonista del RAR  $\beta$  2 (AC55649) o un agonista del RAR $\gamma$  (CD1530). Las gráficas son representativas de los datos de 3 experimentos independientes.

La Figura 16 muestra gráficas que representan los resultados de la proliferación *in vitro* de esplenocitos recién aislados (panel superior) o ensayos de liberación de citocina de hibridoma celular NKT tipo I (1.2 Hyb) (panel inferior) cultivados con concentraciones óptimas de  $\alpha$ GalCer (10 ng/ml) en presencia de concentraciones en aumento de ATRA o del agonista del RAR $\gamma$  selectivo, tazaroteno. El tazaroteno muestra una mejor inhibición de las células NKT tipo I que el ATRA.

La Figura 17 muestra una gráfica que representa los resultados de un ensayo de proliferación *ex vivo* de células NKT tipo I aisladas de ratones sometidos a tratamiento con tazaroteno, ATRA o DMSO (control) y estimulados con concentraciones valoradas de  $\alpha$ GalCer.

La Figura 18 muestra el análisis de células mononucleares aisladas de hígados de ratones a los que se les inyectó ATRA, tazaroteno o DMSO (control) y que se tñieron con  $\alpha$ GalCer/CD1d-tetrámeros y anticuerpos de cadena pan-anti-TCR $\beta$  mediante citometría de flujo. Las células NKT tipo I se indican con un recuadro. No hubo una diferencia significativa en las cantidades (mostradas al lado del recuadro) de las células NKT tipo I en los animales de control frente a aquellos a los que se les administró ATRA o tazaroteno.

#### Descripción detallada

El hígado alberga varias células especializadas del sistema inmunitario innato, incluyendo las células de Kupffer, los linfocitos citolíticos naturales (NK), los linfocitos T citolíticos naturales (NKT) y las células dendríticas. Las células NKT

son únicas en cuanto a que comparten los receptores de la superficie celular de las células NK (por ejemplo, NK1.1) y, además, expresan los receptores de los linfocitos T (TCR), lo que les permite reconocer antígenos lipídicos en el contexto de las moléculas CD1d y reunir las respuestas inmunitarias innatas con la inmunidad de adaptación. Las células NKT tienen la capacidad de regular la actividad de otras células que contribuyen a la inflamación del tejido y al daño celular asociado. Tras su activación, las células NKT secretan rápidamente grandes cantidades de IFN- $\gamma$ , IL-4, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, así como otras múltiples citocinas y quimiocinas. Dado que las células NKT pueden segregar las citocinas Th1 y Th2, resulta difícil predecir las consecuencias de la activación de las células NKT *in vivo*. En función del contexto, la activación de las células NKT desencadena cascadas de alteraciones que promueven o suprimen las diferentes respuestas inmunitarias. En algunos contextos, la activación de las células NKT conduce a la activación de las células NK, las células dendríticas (DC) y los linfocitos B.

Las células NKT reconocen los antígenos lipídicos presentados en el contexto de la molécula similar al complejo principal de histocompatibilidad (MHC en inglés) clase I monomórfico, CD1d. Las células NKT con CD1d restringida se clasifican en tipo I y tipo II, que reconocen diferentes antígenos lipídicos presentados por las moléculas CD1d. Aunque los subgrupos de células NKT son predominantemente NK1.1+ (ratón) o CD161+/CD56+ (ser humano), sus cantidades relativas son diferentes en ratones y seres humanos: por tanto, mientras que las células NKT tipo I predominan en ratones, el subgrupo de células NKT tipo II predomina en seres humanos.

El tipo I, también conocido como células NKT invariables, expresa un receptor de linfocitos T (TCR) semiinvariable, caracterizado en ratones por V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 y V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7 o V $\beta$ 2 o en seres humanos por V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q y V $\beta$ 11, es fuertemente reactivo con el glicolípido derivado de esponja marina,  $\alpha$ -galactosil ceramida ( $\alpha$ GalCer) y se identifica mediante  $\alpha$ GalCer/CD1d-tetrámeros en citometría de flujo. Las células NKT tipo I también reconocen antígenos a base de lípidos, tales como, lípidos derivados de bacterias, y un glicolípido propio, isoglobotrihexosil ceramida (iGb3). Las células NKT tipo I presentan marcadores de memoria y son únicas en el almacenamiento de ARNm preformado para las citocinas. Los ratones que carecen del gen J $\alpha$ 18 (ratones J $\alpha$ 18) presentan deficiencia únicamente en las células NKT tipo I.

Las células NKT tipo II, que son diferentes a las células NKT tipo I, son células reguladoras que pueden modular la actividad de otros varios subgrupos de células, incluyendo las células NKT tipo I. Las células NKT tipo II, reconocen el glicolípido propio, sulfátido (3'-sulfogalactosil ceramida), en ratones y seres humanos. Un subgrupo fundamental de células NKT tipo II, que se puede identificar mediante el uso de sulfátido/CD1d-tetrámeros en citometría de flujo, utiliza predominantemente los segmentos de genes V $\beta$ 8.1/V $\beta$ 3.1-J $\beta$ 2.7 y V $\alpha$ 1/V $\alpha$ 3-J $\alpha$ 7 y es reactivo a los sulfátidos. La activación de las células NKT tipo II se puede evaluar mediante la evaluación de la respuesta proliferativa *in vitro* de las células NKT tipo II a un agente candidato, así como mediante la evaluación de la expresión de C069 y del perfil de secreción de citocina mediante la tinción de citocina intracelular o PCR en tiempo real para IFN- $\gamma$ , IL-4 o IL-13. Además, la capacidad de las células NKT tipo II activadas de desenergizar las células NKT tipo I se puede evaluar mediante la evaluación de la respuesta proliferativa de las células NKT tipo I a  $\alpha$ GalCer (un potente activador de las células NKT tipo I) mediante el uso de un análisis de dilución de CF8E y tinción de citocina intracelular de las células de  $\alpha$ GalCer/CO 1 d-tetrámero.

#### Actividad de las células NKT tipo I y tipo II en el hígado después de la lesión por reperusión isquémica y la hepatitis inducida por Concanavalina A

La lesión por reperusión se produce cuando se reestablece el riego sanguíneo a un órgano o tejido después de un período de isquemia. La lesión por reperusión hepática se produce, en general, en relación con la cirugía o el traumatismo y desempeña un papel fundamental en la calidad y función del tejido de injerto después del trasplante de hígado. El desarrollo de la lesión por reperusión isquémica (IRI) se produce en al menos dos fases: un período inicial (después de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 horas de reperusión), que está controlado por la activación de las células de Kupffer, la liberación de las especies reactivas de oxígeno, el reclutamiento de células CD4<sup>+</sup> y la secreción de citocinas proinflamatorias, y un período posterior (después de la fase inicial de aproximadamente 6 a aproximadamente 48 horas de la reperusión), que se caracteriza por la acumulación de neutrófilos y la inducción de necrosis. Como se muestra en la Figura 2a, en los ratones de tipo salvaje (WT), un subgrupo de células mielocíticas (CD11b<sup>+</sup>), CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>int</sup>, que comprenden células precursoras y monocitos mielocíticos, se reúnen en los tejidos reperfusionados en la fase temprana de la lesión por reperusión e isquemia. El reclutamiento de células mielocíticas diferentes a los neutrófilos, tal como el subgrupo CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>int</sup>, sugiere que la lesión se ve mejorada por el reclutamiento de monocitos inflamatorios en el tejido reperfusionado.

Las células NKT tipo I también se activan y secretan IFN- $\gamma$  después de la reperusión isquémica. Véase la Figura 2c. La función de las células NKT tipo I en la IRI se evaluó mediante la comparación de los hígados de ratones de tipo salvaje (WT) y J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>, que carecen de las células NKT tipo I, pero que tienen niveles normales de células NKT tipo II. Como se muestra en la Figura 4, después de 90 minutos de isquemia y 24 horas de reperusión, los lóbulos cefálicos del hígado de ratones WT presentaban grandes áreas necróticas, mientras que las áreas necróticas en los ratones con deficiencia de células NKT tipo I (ratones J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>) se redujeron de manera notable en comparación. Esto indica una función patógena de las células NKT tipo I en la mediación de la lesión hepática por isquemia y reperusión.

#### Efecto de las células NKT-2 activadas con sulfátido sobre las células NKT-1

- 5 Como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 8.044.029 y la patente de Estados Unidos n.º 12/938.315, la administración de un ligando del glicolípido propio, sulfátido, así como los análogos de sulfátido sintéticos, modulan la actividad de las células NKT tipo I y tipo II. El reconocimiento de sulfátidos dependiente de CD1d activa las células NKT tipo II y las células dendríticas predominantemente plasmacitoides (pDC), pero no las poblaciones de células dendríticas convencionales (cDC) (que normalmente se activan con las células NKT tipo I), lo que conduce a un reclutamiento rápido de las células NKT tipo I en el hígado en una forma dependiente de IL-12 y MIP2. No obstante, las células NKT tipo I reclutadas no se encuentran activadas, no secretan citocinas y se vuelven anérgicas.
- 10 Las alteraciones celulares implicadas en los mecanismos inmunorreguladores después de la administración de sulfátido *in vivo* se muestran en la Figura 1. La administración de sulfátido a) suprime la proliferación *in vitro* de las células NKT tipo I en respuesta a la estimulación con  $\alpha$ GalCer (Figura 1b) y b) aumenta el porcentaje de células de sulfátido/CD1d-tetrámero+ con tinción de IFN- $\gamma$  intracitoplasmática (Figura 1c).
- 15 La secreción de IFN- $\gamma$  por las células hepáticas NKT tipo I durante la fase temprana de la lesión por isquemia y reperfusión disminuye de manera significativa en ratones que reciben sulfátido en comparación con los animales no sometidos a tratamiento. Véase la Figura 2c. Asimismo, como en la ausencia de células NKT tipo I en ratones  $J\alpha 18^{-/-}$ , la lesión hepática después de la isquemia/reperfusión se reduce de manera significativa en los ratones sometidos a tratamiento con sulfátido. Véase la Figura 4. Esto indica una función patógena de las células NKT tipo I en la mediación de la lesión hepática por isquemia y reperfusión. La función de la secreción de IFN- $\gamma$  por las células NKT tipo I puede ser una característica común de la lesión isquémica de órganos, ya que la lesión de riñón por isquemia y reperfusión también se atenúa en ratones  $J\alpha 18^{-/-}$ , que carecen de células NKT tipo I.
- 20 De manera similar a la IRI, la administración de sulfátido protege contra la hepatitis inducida por Concanavalina A (ConA), como se indica mediante la necrosis hepatocelular reducida, véase la Figura 1d, y los niveles reducidos en suero de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato amino transferasa (AST), marcadores del daño hepatocelular, véase la Figura 1e. Esto indica una función patógena de las células NKT tipo I en la hepatitis inducida por ConA.
- 25 De manera colectiva, los datos de los modelos de daño hepático, IRI y hepatitis inducida por ConA, son coherentes con una vía inmunorreguladora en la que las células NKT tipo I desempeñan un papel perjudicial y las células NKT tipo II reactivas al sulfátido desempeñan un papel protector en la inflamación hepática que surge por diferentes causas. Tal protección se asocia a la inhibición de la secreción de citocina por las células NKT tipo I (fenotipo inhibido) y una reducción significativa en el reclutamiento hepático de células mielocíticas inmaduras (CD11b+Gr-1+) CD11b+Gr-1- y células NK. La inhibición en las células NKT tipo I también se asocia a la tolerancia o modificación de las células dendríticas convencionales (cDC) y estas junto con las células NKT tipo I inhibidas inhiben la activación/expansión de los linfocitos T Th1/Th17 CD4+/CD8+ adaptables. Esto conduce a un modelo donde la administración de sulfátido estimula la actividad de las células NKT tipo II, que a su vez inhibe la actividad de las células NKT tipo I y el daño hepático causado por la inflamación mediada por las células NKT tipo I. Véase la Figura 3.
- 30 Función de las células NKT en la enfermedad hepática alcohólica
- 35 La enfermedad hepática alcohólica (ALD) se desarrolla como resultado del daño a las células hepáticas provocado por el consumo en exceso de alcohol. Puede que sean necesarios múltiples ataques antes de que se observen manifestaciones clínicas de la ALD. No obstante, como se describe en el presente documento, se observan cantidades significativamente aumentadas de células NKT tipo I (células de  $\alpha$ GalCer/CD1d-tetrámero+), células CD4+ y células mielocíticas CD11b+Gr-1+, pero no de células NKT tipo II o células CD11b+Gr-1- en el hígado después del consumo crónico de alcohol. Véanse el Ejemplo 6 y la Figura 5. La expresión potenciada del marcador CD69 indica, además, que las células NKT tipo I se encuentran parcialmente activadas. Por tanto, incluso en ausencia de cualquier signo clínico de la enfermedad (fase preclínica), las células que median una respuesta inflamatoria se acumulan en el hígado después del consumo en exceso de alcohol. En ausencia de células NKT tipo I (ratones  $J\alpha 18^{-/-}$ ), la acumulación de células mielocíticas CD11b+Gr-1+ en el hígado después del consumo crónico de alcohol se reduce de manera significativa. Véanse el Ejemplo 6 y la Figura 5. Estos datos sugieren que las células NKT tipo I se encuentran implicadas en la mediación de la fase preclínica de la ALD.
- 40 De manera congruente con los datos que sugieren una función de las células NKT tipo I en la fase preclínica de la ALD, las manifestaciones clínicas del daño hepático después del consumo en exceso de alcohol se reducen de manera significativa, como se mide, por ejemplo, mediante histología y análisis de las enzimas hepáticas, en los ratones que presentan deficiencia de células NKT tipo I ( $J\alpha 18^{-/-}$ ). Véanse el Ejemplo 6 y las Figuras 6 y 7. Estos datos sugieren que las células NKT tipo I desempeñan un papel importante en el daño al hígado provocado por el alcohol.
- 45 Las células NKT expresan receptores de linfocitos T, que les permiten reconocer los antígenos lipídicos en el contexto de las moléculas CD1d. Sin desear quedar ligados a una teoría particular, las células NKT tipo I se activan en el hígado después del consumo de etanol mediante la presentación local de lípidos propios oxidados por las células que presentan antígeno (APC) de expresión de CD1d. Las células NKT tipo I activadas, a continuación, inician un proceso de múltiples etapas que da como resultado la activación de las células de Kupffer, el reclutamiento/la activación de los granulocitos seguido del daño inflamatorio a los hepatocitos.
- 50
- 55
- 60
- 65

La interacción entre los subtipos de células NKT después del consumo de alcohol establece la fase de daño hepático y, en casos graves, la enfermedad hepática alcohólica (ALD). Varias realizaciones descritas en el presente documento se refieren a métodos y composiciones para manipular las funciones opuestas de las células NKT tipo I y las células NKT tipo II y sus interacciones con otras células hepáticas con el fin de someter a tratamiento, aliviar o prevenir la lesión al hígado después del consumo de alcohol.

Varias realizaciones descritas en el presente documento se refieren a la modulación de la actividad de los subtipos de células NKT con el fin de someter a tratamiento, mitigar o prevenir la lesión hepática inducida por el alcohol. Como se describe en el presente documento, la administración de sulfátido o agonistas del receptor de ácido retinoico (RAR) inhibe el daño hepático inducido por el alcohol. Por ejemplo, las inyecciones de sulfátido o agonista del receptor de ácido retinoico (RAR), ácido *trans*retinoico total (ATRA), durante el consumo crónico de alcohol y antes del consumo en exceso de etanol, tuvieron un efecto protector como se muestra en el examen histológico y en el análisis de los niveles de enzimas hepáticas en suero. Véanse el Ejemplo 7 y las Figuras 6 y 7.

Varias realizaciones se refieren a una función protectora en la lesión hepática inducida por el alcohol de un subgrupo fundamental de células NKT tipo II, que son reactivas al sulfátido. La activación de este subgrupo de células NKT mediante el sulfátido inhibe la lesión mediada por las células NKT tipo I después del consumo en exceso de alcohol. La protección mediada por el sulfátido se asocia a la activación de las células NKT tipo II y la inhibición de la secreción de IFN- $\gamma$  mediante las células hepáticas NKT tipo I y la supresión del reclutamiento de células mielocíticas mediado por las células NKT tipo I, por ejemplo, los subgrupos CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>int</sup> y Gr-1<sup>-</sup> y las células NK en el hígado.

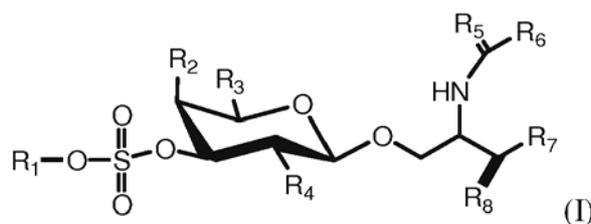
El tratamiento con sulfátido da como resultado una protección casi completa del daño hepático después del consumo en exceso de alcohol. Véanse las Figuras 6 y 7. Sin desear quedar ligados a una teoría particular, el efecto protector del sulfátido es mediado a través de la activación directa de las células NKT tipo II, que ejercen un efecto inhibitorio sobre las células NKT tipo I y las cDC.

Las líneas de linfocitos T de los linfocitos de sangre periférica (PBL en inglés) de dos donantes sanos se generaron después de la estimulación *in vitro* con  $\alpha$ GalCer o sulfátido y se analizaron mediante citometría de flujo. Aproximadamente el 2 % de los linfocitos T se tiñe con sulfátido/hCD1d-tetrámeros en esta línea celular después de dos ciclos de estimulación. De manera similar al sistema murino, estas células no usan el TCR V $\alpha$ 24-V $\alpha$ 11 invariable. Estos datos muestran la presencia de células NKT tipo II reactivas al sulfátido en individuos sanos e indican la eficacia del uso de sulfátido/CD1d-tetrámeros de ser humano en la caracterización de células NKT tipo II humanas en la enfermedad hepática alcohólica.

En algunas realizaciones el sulfátido puede ser, por ejemplo, un sulfátido derivado de cerebro bovino, que es una mezcla de aproximadamente 20 especies diferentes obtenidas a través de Sigma Inc. (Chicago, IL, EE.UU.). En otras realizaciones, el sulfátido es semisintético y es una única especie de sulfátido, por ejemplo, *cis*-tetracosenoil sulfátido o lisosulfátido obtenido a través de Maitreya Inc. (Pleasant Gap, PA, EE.UU.). En otras realizaciones más, el sulfátido puede ser un sulfátido completamente sintético.

El sulfátido derivado de la mielina del cerebro bovino se compone de una mezcla 2:1 de cadenas de acilo fundamentales saturadas/insaturadas (C<sub>24</sub>), produciéndose la insaturación en C<sub>19</sub>. Varias realizaciones se refieren al uso de análogos sintéticos de sulfátido, tales como análogos con cadena de acilo saturada (C<sub>24</sub>) y cadenas de acilo insaturadas (C<sub>24</sub>:1), así como análogos compuestos de diferentes longitudes de cadenas de acilo en el resto de ácido graso o esfingosina (más cortas, así como más largas, por ejemplo, C<sub>18</sub>, C<sub>32</sub>) e isómeros posicionales con un grupo sulfatado en 3' frente a 4' sobre el resto de galactosa (3'-803 frente a 4'-803).

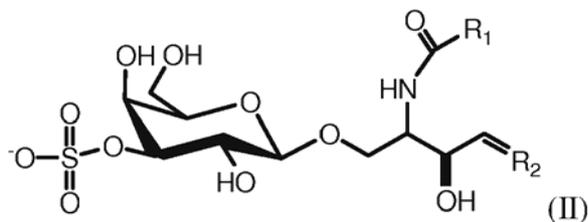
En algunas realizaciones, el sulfátido tiene la siguiente Fórmula I química:



en donde R<sub>1</sub> puede ser un enlace, un hidrógeno, un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub>, un alquilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub>, un alquenilo C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub>, un alquenilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub> o un azúcar C<sub>5</sub> a C<sub>12</sub>; R<sub>2</sub> puede ser un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi o un grupo alcoxi; R<sub>3</sub> puede ser un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, un grupo etoxi o un grupo alcoxi; R<sub>4</sub> puede ser un hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi; R<sub>5</sub> puede ser un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi o un enlace; R<sub>6</sub> puede ser un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquenilo

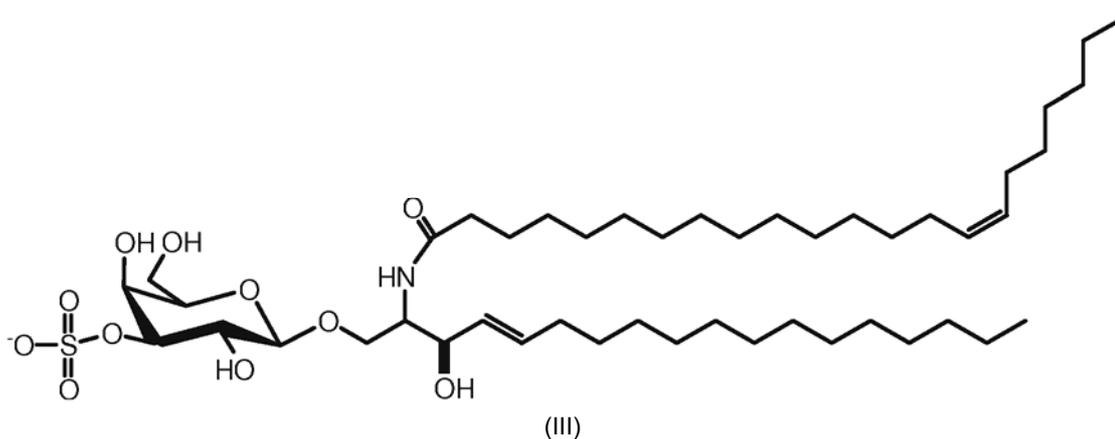
C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alqueno sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub> o un alquino C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>; R<sub>7</sub> puede ser un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alqueno C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alqueno sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub> o un alquino C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>; y R<sub>8</sub> puede ser un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi o un enlace.

5 En algunas realizaciones, el sulfátido tiene la siguiente Fórmula II química:



10 en donde R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alqueno C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alqueno sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub> y un alquino C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>; y R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi y un enlace.

En otra realización, el sulfátido tiene la siguiente estructura química:



15  
20 Como se usa en el presente documento, el término “alquilo” significa cualquier hidrocarburo saturado, ramificado o no ramificado. El término “alquilo sustituido” significa cualquier hidrocarburo saturado, sustituido, ramificado o no ramificado.

25 Como se usa en el presente documento, el término “sustituido” significa cualquier sustitución de un átomo de hidrógeno con un grupo funcional.

30 Como se usa en el presente documento, el término “grupo funcional” tiene su definición común y se refiere a restos químicos que se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en un átomo de halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquilo sustituido C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquilo perhalogenado, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, bencilo, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ciano y nitro.

35 Como se usa en el presente documento, los términos “halógeno” y “átomo de halógeno” se refieren a uno cualquiera de los átomos radioestables de la columna 17 de la tabla periódica de los elementos, preferentemente, flúor, cloro, bromo o yodo, prefiriéndose, en particular, el flúor y el cloro.

40 Como se usa en el presente documento, el término “alqueno” significa cualquier hidrocarburo insaturado, sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado. El término “alqueno sustituido” significa cualquier hidrocarburo insaturado sustituido, ramificado o no ramificado, sustituido con uno o más grupos funcionales, estando las aminas secundarias de alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> no ramificadas, las aminas secundarias de alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituidas y las aminas terciarias de alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> no ramificadas dentro de la definición de “alquilo sustituido”.

Como se usa en el presente documento, el término “alcoxi” se refiere a cualquier éter saturado o insaturado, sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado.

Como se usa en el presente documento, el término “sulfátido” conserva su significado general habitual y se refiere a un éster sulfúrico de cerebrósido que contiene uno o más grupos sulfato en la parte de azúcar de la molécula.

5 Como se usa en el presente documento, el término “cerebrósido” se refiere a cualquier compuesto lipídico que contiene un azúcar y, en general, del tipo normalmente encontrado en el cerebro y el tejido nervioso.

10 Los compuestos de Fórmula (I), (II) y (III) se pueden encontrar en la forma de las sales no tóxicas farmacéuticamente aceptables de los mismos. Las sales de Fórmula (I), (II) y (III) incluyen sales de adición de ácido, tales como sales con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico) o con ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido maleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido glutámico, ácido pantoténico, ácido laurilsulfónico, ácido metanosulfónico y ácido ftálico).

15 Los compuestos de Fórmula (I), (II) y (III) se pueden encontrar en la forma de los solvatos de los mismos (por ejemplo, hidratos).

Los compuestos de Fórmula (I), (II) y (III) se pueden producir mediante cualquier método con sentido para sintetizar sulfátidos.

20 Los compuestos de Fórmulas (I), (II) y (III) también se pueden aislar de productos naturales (por ejemplo, organismos biológicos) y purificarse mediante cromatografía en columna o similares.

25 En una realización, el sulfátido tiene la fórmula química: (2S, 3R, 4E)-N-nervónico-1-[-D-(3-sulfato)-galactopiranosil]-2-amino-octadeceno-3-ol. Esta fórmula química también se denomina como cis-tetracosenoil sulfátido.

30 En algunas realizaciones, la cantidad específica de sulfátido administrada a un paciente variará en función de la enfermedad o afección que se está sometiendo a tratamiento, así como la edad, el peso y el sexo del paciente que se está sometiendo a tratamiento. En general, a fin de lograr tal concentración final en, por ejemplo, los intestinos o la sangre, la cantidad de molécula de sulfátido en una composición de dosificación única de las presentes realizaciones, en general, será de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 100 miligramos, preferentemente de aproximadamente 2,0 miligramos a aproximadamente 60 miligramos, más preferentemente de aproximadamente 20 miligramos a aproximadamente 50 miligramos. Del mismo modo, la cantidad de compuesto terapéutico secundario en una composición de dosificación oral única de las presentes realizaciones, en general, se encontrará en el intervalo de aproximadamente 0,01 miligramos a aproximadamente 1.000 miligramos, más preferentemente de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 100 miligramos. Obviamente, la dosificación exacta variará con la enfermedad o el trastorno que se está sometiendo a tratamiento y los intervalos preferidos que pueden determinarse fácilmente.

40 En una realización, se administran de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal de sulfátido al paciente. Más preferentemente, se administran de 1 a 10 mg/kg de peso corporal de sulfátido. Preferentemente, esta dosificación se repite cada día, según sea necesario.

#### Efecto de los agonistas del receptor de ácido retinoico (RAR) sobre la actividad de las células NKT

45 Como se describe en el presente documento, la administración del agonista del receptor de ácido retinoico (RAR), ácido transretinoico total (ATRA), inhibe de manera significativa el daño hepático causado por el consumo de alcohol. La ingestión de etanol agota los ésteres retinílicos del hígado y altera los niveles fisiológicos del ácido transretinoico total (ATRA), una forma biológicamente activa de la vitamina A que brinda apoyo a muchas funciones biológicas y puede mejorar la generación, estabilidad y función de la diferenciación de los linfocitos T CD4+ vírgenes en FoxP3+ Tregs incluso en presencia de IL-6. Varias realizaciones descritas en el presente documento se refieren al descubrimiento de que el ATRA inhibe la función efectora de las células NKT tipo I, incluyendo la supresión de la secreción de citocina por estas células. Véanse los Ejemplos 8, 9 y 11 y las Figuras 8, 10 y 11. Además, el ATRA tiene un efecto de inhibición directa sobre la actividad de las células NKT tipo I, ejerciendo su efecto inhibitorio en ausencia de células que presenten antígenos. Véanse el Ejemplo 11 y la Figura 11. Además, el ATRA no inhibe directamente la actividad de los linfocitos T CD4+ restringidos por MHC que reconocen los antígenos proteicos, tales como la proteína básica miélica o MBP<sub>Ac1-9</sub>. Sin desear quedar ligados a una teoría particular, estos datos indican que el ATRA protege contra el daño hepático causado por el consumo en exceso de alcohol mediante la inhibición de las células NKT tipo I.

60 Como se describe en el presente documento, los agonistas del RAR inducen la inhibición en las células NKT tipo I. Véanse las Figuras 12, 14 y 15 a 17. Además, el daño hepático causado por la inflamación mediada por las células NKT tipo I, que resulta del consumo en exceso de alcohol, puede prevenirse, reducirse o mitigarse mediante la administración de un agonista del RAR. El hígado puede inflamarse por una diversidad de diferentes motivos. Por ejemplo, la inflamación del hígado puede estar causada por infección bacteriana o vírica, lesión o ataque del sistema inmunitario de la propia persona. Aunque la inflamación normalmente es una respuesta de protección y una etapa necesaria del proceso de curación, la inflamación crónica o prolongada puede causar una lesión. Varias realizaciones

descritas en el presente documento se refieren a la modulación mediada por el agonista del RAR de los mecanismos inmunitarios innatos que conducen a la lesión hepática posterior a, relacionada con o causada por la inflamación. Algunas realizaciones se refieren a métodos y composiciones para la inhibición mediada por el agonista del RAR de la actividad de las células NKT tipo I que modulan las interacciones entre los componentes del sistema inmunitario innato para proporcionar tolerancia a los antígenos derivados del intestino o derivados de metabolitos sin afectar o afectando mínimamente a la respuesta inmunitaria innata a patógenos no identificados propios.

Ya que los agonistas del RAR pueden desenergizar directamente las células NKT tipo I, los agonistas del RAR se pueden usar para someter a tratamiento cualquier indicación en la que las células NKT tipo I desempeñen una función patógena. Algunos ejemplos de enfermedades que se pueden someter a tratamiento mediante las realizaciones de la presente divulgación incluyen hepatitis inducida por el alcohol, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis, cirrosis fulminante, hepatitis idiopática, hepatitis inducida por virus (A, B, C y otros), hepatitis inflamatoria asociada a carcinoma hepatobiliar, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, lesión por reperfusión isquémica, trasplante de órgano sólido, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad intestinal inflamatoria (de Crohn y colitis).

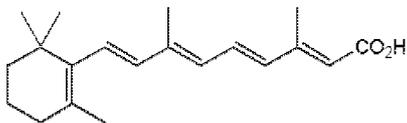
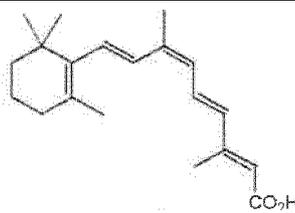
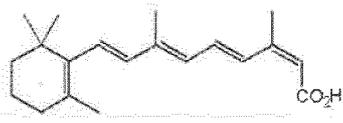
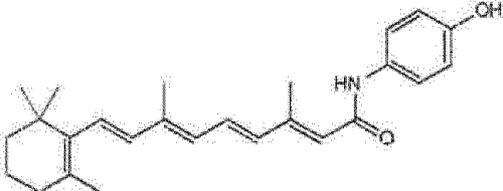
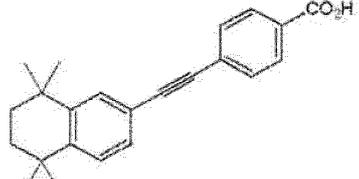
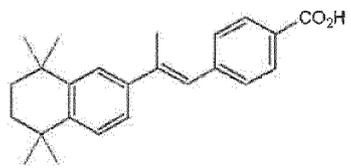
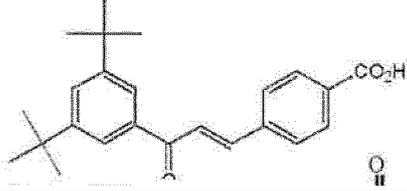
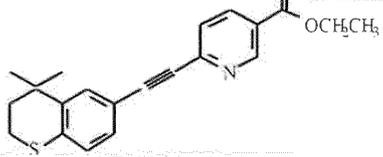
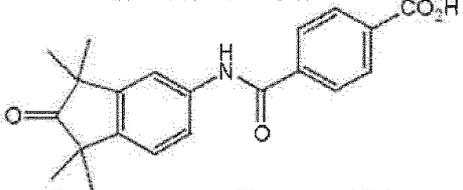
En algunas realizaciones, existen diversas indicaciones de enfermedades o trastornos relacionados con el sistema autoinmunitario o inmunitario que se someten a tratamiento, previenen o mitigan mediante la inhibición mediada por el RAR de la actividad de las células NKT tipo I. En particular, un aspecto de la presente realización se refiere a un método para someter a tratamiento a un paciente que padece síntomas de una enfermedad o trastorno relacionado con el sistema autoinmunitario o inmunitario, tal como, por ejemplo, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, SIDA, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, diabetes *mellitus* dependiente de la insulina, hepatitis autoinmunitaria, asma y enfermedad celíaca con una cantidad eficaz de un agonista del RAR. En algunas realizaciones, la inhibición mediada por el agonista del RAR de la actividad de las células NKT tipo I previene o mitiga los síntomas del asma.

Algunas realizaciones se refieren a un método para inhibir o prevenir la inflamación mediada por las células NKT tipo I después de la reperfusión isquémica mediante la administración de un agonista del RAR. Las células NKT tipo I desempeñan una función patógena en afecciones, tales como la lesión por isquemia y reperfusión. La lesión por reperfusión se puede producir en una diversidad de tejidos cuando el riego sanguíneo se reestablece después de un período de isquemia. Los ejemplos incluyen tejido del músculo esquelético después de una lesión por compresión, del músculo cardíaco en relación con un infarto de miocardio o cirugía cardíaca o enfermedad cardíaca isquémica, del tejido neural en relación con un accidente cardiovascular o traumatismo cerebral y del tejido hepático y renal en relación con una cirugía o traumatismo. La lesión por reperfusión isquémica también desempeña un papel importante en la calidad y función del tejido de injerto en el trasplante de órganos. La lesión por isquemia y reperfusión es la causa principal de la hospitalización de duración prolongada y de la disminución de la supervivencia del injerto a largo plazo. En algunas realizaciones, la inhibición mediada por el agonista del RAR de la actividad de las células NKT tipo I inhibe o previene la lesión hepática por reperfusión isquémica en relación con una cirugía o un traumatismo.

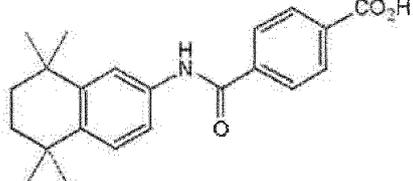
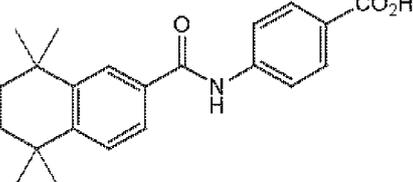
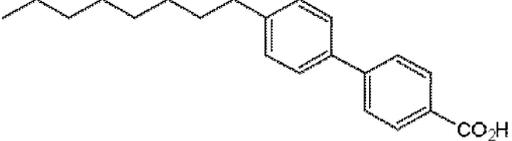
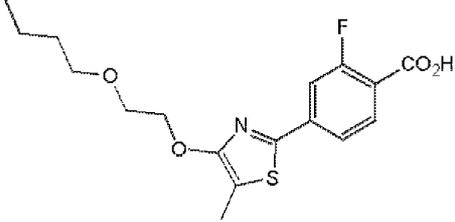
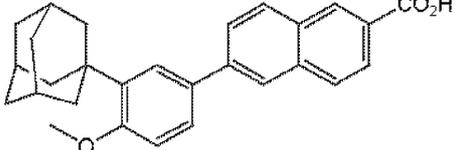
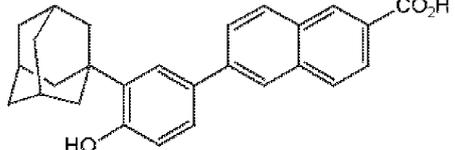
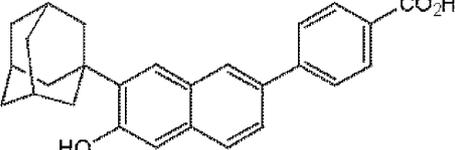
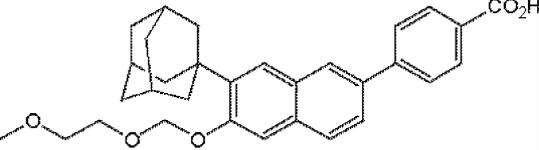
Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren a la inhibición de la actividad de las células NKT tipo I mediante uno o más agonistas del receptor de ácido retinoico (RAR). Los receptores de ácido retinoico comprenden tres subtipos principales: RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  y RAR $\gamma$ . Algunas realizaciones se refieren a la inhibición de la actividad de las células NKT tipo I mediante uno o más agonistas pan-activos del RAR, precursores de tales agonistas pan-activos del RAR y las mezclas de los mismos. Como se usa en el presente documento, la expresión "agonista pan-activo del RAR" se refiere a un agonista del RAR que afecta a, por ejemplo, activa, el RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  y RAR $\gamma$  de manera sustancialmente igual o no selectiva. Algunas realizaciones se refieren a la inhibición de la actividad de las células NKT tipo I mediante uno o más agonistas activos del RAR eficaces para afectar de manera selectiva o incluso específica a, por ejemplo, activar, al menos uno y preferente ambos precursores de RAR $\beta$  y RAR $\gamma$  con respecto a RAR $\alpha$  de tales agonistas activos del RAR y las mezclas de los mismos. Como se usa en este contexto, la expresión "de manera selectiva" significa que los precursores de agonista del RAR del agonista del RAR y las mezclas de los mismos son más eficaces, preferentemente al menos de aproximadamente 10 o aproximadamente 100 veces a aproximadamente 1.000 veces o más eficaces, para afectar a al menos uno y preferentemente ambos de RAR $\beta$  y RAR $\gamma$  con respecto a RAR $\alpha$ . Algunas realizaciones se refieren a la inhibición de la actividad de las células NKT tipo I mediante uno o más agonistas selectivos de un subtipo del RAR, precursores de tales agonistas selectivos de un subtipo del RAR y las mezclas de los mismos. Como se usa en el presente documento, la expresión "agonista selectivo de un subtipo del RAR" se refiere a un agonista del RAR que afecta de manera selectiva a, por ejemplo, activa, un subtipo del RAR. Los compuestos retinoides que presentan selectividad para RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  y RAR $\gamma$  son conocidos en la técnica y se desvelan, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6.534.544 y 6.025.388.

Varias realizaciones se refieren a un método para inhibir la actividad de las células NKT tipo I proinflamatorias mediante la administración de uno o más agonistas del receptor de ácido retinoico (RAR). Los ejemplos de agonistas del RAR incluyen, pero sin limitación, los agonistas del RAR enumerados en la Tabla 1.

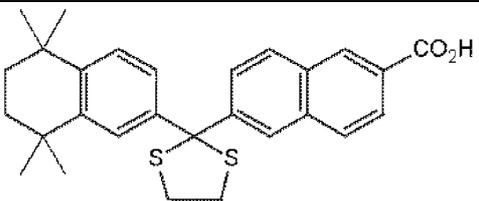
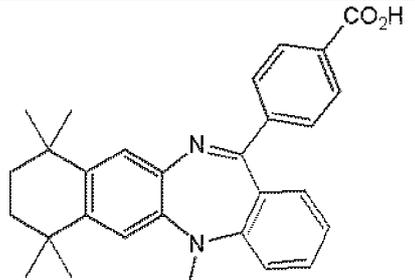
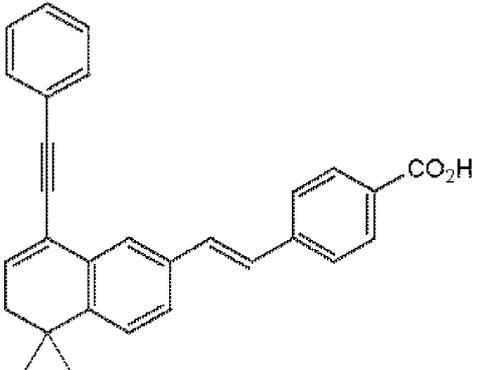
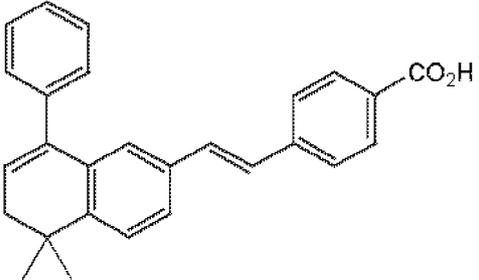
Tabla 1: Agonistas del RAR

Nombre del compuesto	Especificidad	Estructura
Tretinoína	Pan agonista de RAR	
9-cis RA	Pan agonista de RAR y RXR	
13-cis-RA	Pan agonista de RAR	
Fenretinida	Agonista de RAR Efectos independientes de RAR	
EC 23	Pan agonista de RAR	
TTNPB	Pan agonista de RAR	
Ch 55	Pan agonista de RAR	
Tazaroteno	Agonista de RARβ/γ	
BMS 753	Agonista de RARα	

(continuación)

Nombre del compuesto	Especificidad	Estructura
AM80	Agonista de RAR $\alpha$	
AM580	Agonista de RAR $\alpha$	
AC55649	Agonista de RAR $\beta$ 2	
AC261066	Agonista de RAR $\beta$ 2	
Adapaleno	Agonista de RAR $\beta$ y $\gamma$	
CD437	Agonista de RAR $\gamma$	
CD1530	Agonista de RAR $\gamma$	
CD2665	Agonista de RAR $\gamma$	

(continuación)

Nombre del compuesto	Especificidad	Estructura
MM11253	Agonista de RAR	
LE135	Agonista de RAR $\beta$	
BMS493	Pan agonista de RAR inverso	
BMS453	Agonista de RAR $\beta$ Antagonista de RAR $\alpha$ o RAR $\gamma$	

5 En algunas realizaciones, la actividad de las células NKT tipo I proinflamatorias se inhibe con uno o más agonistas del RAR que se seleccionan del grupo que consiste en ATRA, retinol, 9-cis-RA o 13-cis-RA, tretinoína, AM580, AC55649, CD1530 o Tazaroteno. En algunas realizaciones, la actividad de las células NKT tipo I proinflamatorias se inhibe con uno o más retinoides poliolefinicos, tales como isotretinoína y acitretina. En algunas realizaciones, la actividad de las células NKT tipo I proinflamatorias se inhibe con uno o más agonistas del RAR que se seleccionan del grupo que consiste en etretinato, acitretina e isotretinoína.

10 Varias realizaciones se refieren a la inhibición de la actividad de las células NKT tipo I proinflamatorias con tazaroteno, ácido tazaroténico o una mezcla de los mismos. El tazaroteno es un profármaco de éster etílico que se metaboliza en el ácido libre correspondiente, ácido tazaroténico. El tazaroteno presenta una estructura rígida de anillo cerrado que ofrece una flexibilidad conformacional limitada en comparación con el ácido transretinoico total, el ligando natural para los receptores del ácido retinoico (RAR). Este cambio estructural confiere al ácido tazaroténico especificidad para los RAR y selectividad para RAR $\beta$  y RAR $\gamma$ .

15 Los ejemplos de agonistas del RAR incluyen además ésteres de ácidos cis y trans retinoicos, por ejemplo, ésteres de alquilo, tales como alcoholes primarios, secundarios o terciarios, incluyendo pero no limitado a: metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, hexilo, heptilo, etilhexilo, octilo, nonilo, laurilo, oleilo, estearilo, hidroxietilo, hidroxipropilo, bencilo, metilbencilo alfa, propilfenilo alfa, amilo, isoamilo, anisilo, cetilo, mentilo, cinamilo, pinacol, furilo o miristilo.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los agonistas del RAR también pueden usarse para inhibir la actividad de las células NKT tipo I. Los compuestos desvelados en el presente documento que poseen un grupo suficientemente ácido, un grupo suficientemente básico o ambos funcionales y por consiguiente, pueden reaccionar con cualquiera de varias bases orgánicas o inorgánicas y ácidos inorgánicos u orgánicos para formar una sal.

Los ejemplos de ácidos que pueden usarse para formar sales de adición de ácido de los agonistas del RAR con grupos básicos incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares y ácidos orgánicos tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenil sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético y similares. Los ejemplos de dichas sales incluyen sulfato, piro sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butina-1,4-dioato, hexina-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, gamma-hidroxitirato, glicolato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, mandelato y similares.

Los ejemplos de bases que pueden utilizarse para formar sales de adición de base a partir de los agonistas del RAR con grupos ácidos incluyen, pero no se limitan a, hidróxidos de metales alcalinos tales como sodio, potasio y litio; hidróxidos de metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio; hidróxidos de otros metales, tales como aluminio y zinc; amoníaco y aminas orgánicas como mono-, di- o trialquilaminas sustituidas con hidroxilo o no sustituidas; dicitclohexilamina; tributil amina; piridina; N-metilo, N-etilamina; dietilamina; trietilamina; mono-, bis-, o tris-(2-hidroxi alquilaminas inferiores), tales como mono-, bis- o tris-(2-hidroxi etil)amina, 2-hidroxi-terc-butilamina o tris-(hidroximetil)metilamina, N,N-di-alkilo inferior-N-(hidroxilo inferior)-aminas, tales como N,N-dimetil-N-(2-hidroxi etil)amina o tri-(2-hidroxi etil)amina; N-metil-D-glucamina; y aminoácidos tales como arginina, lisina y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un receptor de un tratamiento terapéutico e incluye todos los organismos dentro del reino animal. En realizaciones preferidas, el animal se encuentra dentro de la familia de los mamíferos, tales como humanos, bovinos, ovinos, porcinos, felinos, búfalo, caninos, cabras, equinos, burros, venados y primates. El animal más preferido es el humano.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" incluyen "prevenir", "previniendo" y "prevención" respectivamente.

Como se usa en el presente documento la expresión "una cantidad eficaz" de un agente es la cantidad suficiente para tratar, inhibir o prevenir el daño hepático que resulta de la actividad de las células NKT tipo 1 proinflamatorias.

Algunas realizaciones se refieren al tratamiento previo de pacientes con un sulfátido y/o un agonista del RAR antes de la manifestación clínica de ALD. En varias realizaciones, los pacientes se tratan con una cantidad eficaz de un sulfátido y/o un agonista del RAR antes del consumo excesivo de alcohol. En algunas realizaciones más, los pacientes se tratan con una cantidad eficaz de un sulfátido y/o un agonista del RAR de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 18 horas antes del consumo excesivo de alcohol. En algunas otras realizaciones, los pacientes se tratan con una cantidad eficaz de un sulfátido y/o un agonista del RAR durante un período de consumo crónico de alcohol.

En algunas realizaciones, la cantidad específica de agonista del RAR administrada a un paciente variará en función de la enfermedad o afección que se está tratando, así como la edad, el peso y el sexo del paciente que se está tratando. Generalmente, para lograr dicha concentración final en, por ejemplo, los intestinos o la sangre, la cantidad de agonista del RAR en una composición de una dosis única de las presentes realizaciones generalmente será de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 100 miligramos, preferentemente de aproximadamente 2,0 miligramos a aproximadamente 60 miligramos, más preferentemente de aproximadamente 20 miligramos a aproximadamente 50 miligramos. Los ejemplos de dosis adecuadas incluyen: entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 mg/día; entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2 mg/día; entre aproximadamente 0,01 y 100 mg/día; entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 mg/día; entre aproximadamente 0,1 mg/día y aproximadamente 1,0 mg/día; entre aproximadamente 1,0 mg/día y aproximadamente 5,0 mg/día; entre aproximadamente 5,0 mg/día y aproximadamente 10,0 mg/día; entre aproximadamente 10,0 mg/día y aproximadamente 15 mg/día; entre aproximadamente 15,0 mg/día y aproximadamente 20,0 mg/día; entre aproximadamente 20,0 mg/día y aproximadamente 25,0 mg/día; entre aproximadamente 30,0 mg/día y aproximadamente 35,0 mg/día; entre aproximadamente 35,0 mg/día y aproximadamente 40,0 mg/día; entre aproximadamente 40,0 mg/día y aproximadamente 45,0 mg/día; entre aproximadamente 45,0 mg/día y aproximadamente 50,0 mg/día; entre aproximadamente 50,0 mg/día y aproximadamente 55,0 mg/día; entre aproximadamente 55,0 y aproximadamente 60,0 mg/día; entre aproximadamente 60,0 mg/día y aproximadamente 65,0 mg/día; entre aproximadamente 65,0 mg/día y aproximadamente 70,0 mg/día; entre aproximadamente 70,0 mg/día y aproximadamente 75,0 mg/día; entre aproximadamente 75,0 mg/día y aproximadamente 80,0 mg/día; entre aproximadamente 80,0 mg/día y aproximadamente 85,0 mg/día; entre aproximadamente 85,0 y aproximadamente

90,0 mg/día; entre aproximadamente 85,0 mg/día y aproximadamente 90,0 mg/día; entre aproximadamente 90,0 mg/día y aproximadamente 95,0 mg/día; y entre aproximadamente 95,0 mg/día y aproximadamente 100,0 mg/día. Obviamente, la dosificación exacta variará con la enfermedad o el trastorno que se está tratando y los intervalos preferidos pueden determinarse fácilmente.

5 Cuando se administra tazaroteno oralmente para producir una reducción en la actividad de las células NKT tipo I, la dosificación diaria de tazaroteno preferentemente se encuentra en un intervalo de aproximadamente 0,3 mg/día a aproximadamente 7 mg/día o de aproximadamente 8 mg/día, más preferentemente en un intervalo de aproximadamente 0,6 mg/día a aproximadamente 6,5 mg/día o aproximadamente 7 mg/día. En algunas realizaciones, el tazaroteno administrado oralmente se administra en dosis diarias de tazaroteno que incluyen 0,4 mg/día, 0,75 mg/día, 1,5 mg/día, 2,8 mg/día, 3 mg/día, 4,5 mg/día, 6 mg/día y 6,3 mg/día.

15 De conformidad con las realizaciones, el agonista del RAR puede administrarse para aliviar los síntomas de un paciente o puede administrarse para contrarrestar un mecanismo del trastorno en sí. En ciertas realizaciones, el agonista del RAR puede administrarse como una medida profiláctica. En algunas realizaciones se administran múltiples dosis del agonista del RAR. Los expertos en la materia apreciarán que estos fines de tratamiento habitualmente se encuentran relacionados y que los tratamientos pueden personalizarse para los pacientes particulares basándose en diversos factores. Estos factores pueden incluir la edad, el género o la salud del paciente y la evolución de la enfermedad o trastorno autoinmunitario o inmunitario relacionado. La metodología de tratamiento para un paciente puede personalizarse en lo que respecta a la dosificación, tiempo de administración, vía de administración y mediante la administración concurrente o secuencial de otras terapias.

25 En algunas realizaciones, pueden administrarse uno o más compuestos del agonista del RAR solos o en combinación con otro compuesto terapéutico. Por ejemplo, puede administrarse uno o más compuestos del agonista del RAR en combinación con un sulfátido. Puede utilizarse cualquier compuesto terapéutico conocido utilizado en el tratamiento de la enfermedad hepática inducida por el alcohol, la enfermedad inflamatoria, la enfermedad autoinmunitaria o la lesión por reperfusión. En algunas realizaciones, el agonista del RAR puede administrarse en combinación con sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S). En algunas realizaciones, el agonista del RAR puede administrarse en combinación con antioxidantes. En algunas realizaciones el agonista del RAR puede administrarse en combinación con, por ejemplo, corticosteroides, agentes biológicos (por ejemplo, anti-TNF-alfa y anti-IL-6), inmunomoduladores (por ejemplo, RU-486), fármacos antiinflamatorios que modifican la enfermedad (DMARDS, tales como leflunomida), inhibidores de COX-2 (celecoxib), fármacos antiinflamatorios no-esteroides (NSAIDS, como naproxeno), antidiabéticos orales (OAD, como metformina o sitaglipteno), agonistas de GLP-1, insulina, agonistas/antagonistas de PPAR, mediadores de EGF (agentes anticancerígenos), otros agentes eficaces para tratar cánceres hepáticos, terapias a base de células para los cánceres de hígado; interferones (IFN) para hepatitis C, esclerosis múltiple o lupus eritematoso; y antagonistas de LFA-1.

40 Los compuestos agonistas del RAR y los compuestos de sulfátido descritos en el presente documento pueden utilizarse como un principio activo incorporado en una composición farmacéutica. En algunas realizaciones la composición farmacéutica puede comprender un único principio activo. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender dos, tres, cuatro, cinco o más principios activos. Se contemplan todos los modos de administración, por ejemplo, oral, rectal, parenteral, tópica o intravenosa, intramuscular, intraesternal o inyección subcutánea o en una forma adecuada para la inhalación. Las formulaciones pueden, según sea adecuado, presentarse de forma conveniente en unidades de dosificación separadas y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Los principios activos se formularán generalmente con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables de conformidad con la práctica conocida y establecida. Por consiguiente, la composición farmacéutica puede formularse como un líquido, polvo, elixir, solución inyectable, suspensión, supositorio, etc.

50 Los principios activos de conformidad con algunas realizaciones pueden formularse para la administración oral tales como comprimidos, cápsulas de gelatina dura, cápsulas de gelatina blanda, que comprenden el principio activo en forma de polvo, una mezcla de excipientes, un líquido o solución, una suspensión, una solución sólida. Los principios activos de conformidad con algunas realizaciones pueden formularse para la administración intraoral (sublingual o bucal) como una forma de dosificación sólida que se disuelve rápidamente o comprimidos efervescentes, películas finas, obleas bucales o como una forma líquida o semisólida, como un gel, solución, emulsión, suspensión. Los principios activos de conformidad con algunas realizaciones pueden formularse para la administración mediante inyección como una solución, suspensión o emulsión acuosa o no acuosa. Las soluciones y suspensiones a base de aceite comprenden mezclas de aceites naturales o sintéticos como aceite de soja, aceite de semilla de algodón, aceite mineral, aceite de sésamo, aceite de ricino, aceites vegetales hidrogenados, cera de abeja. Los principios activos de conformidad con algunas realizaciones pueden formularse para la administración transdérmica como una crema, un gel, una emulsión, una solución acuosa, una solución oleosa, una suspensión, una película, un parche, una espuma. Los principios activos de conformidad con algunas realizaciones pueden formularse para la administración intranasal como un polvo, suspensión, solución, emulsión. Los principios activos de conformidad con algunas realizaciones pueden formularse para la administración pulmonar como un polvo micronizado. La administración oral se asocia con el metabolismo de primer paso así como la inducción de enzimas metabolizadoras. Por consiguiente, la fuerza y el régimen de dosificación de los ácidos retinoicos pueden personalizarse para obtener un efecto óptimo. Las vías de

administración alternativas, por ejemplo, sublingual, bucal, inyección, pulmonar y transdérmica, pueden preferirse sobre la administración oral. Las vías de administración alternativas, como las descritas, evitan el metabolismo de primer paso y la absorción de GI, demuestran una inducción enzimática menor y proporcionan una farmacocinética de repetición de dosis constante.

5 Las formulaciones farmacéuticas de conformidad con las presentes realizaciones pueden ser de liberación inmediata o de liberación modificada (por ejemplo, liberación sostenida, liberación pulsátil, liberación controlada, liberación retrasada, liberación lenta). Debido a que son inmediatamente activas, las cantidades farmacológicas de isómeros retinoides administrados oralmente pueden tener efectos secundarios. Estos efectos secundarios han sido una limitación seria para el uso de retinoides orales en la terapia. A pesar de que los retinoides aplicados tópicamente presentan una carga teratogénica pequeña existen otras toxicidades asociadas con esta vía de administración que limitan su uso incluida la irritación de la piel. Una razón fundamental de la toxicidad oral y tópica es que los retinoides se encuentran disponibles completa e inmediatamente tras la administración. Un proceso por el cual un retinoide puede encontrarse disponible *in vivo* más lentamente y de forma más continua evitaría los picos y valles en la disponibilidad del retinoide, lo que proporcionaría un nivel eficaz del compuesto *in vivo* durante un período de tiempo más prolongado y también evitaría o reduciría de forma sustancial las toxicidades que habitualmente resultan de la disponibilidad instantánea de cantidades excesivas de la sustancia. Una formulación oleosa inyectable de retinol, éster de retinol y en particular, éster graso de retinol, ácido retinoico o éster de ácido retinoico puede administrarse intramuscularmente en un régimen semanal y proporcionar una administración de liberación lenta sistémica, de conformidad con dichos principios.

25 En algunas realizaciones, la preparación de terc-butil éster de ácido transretinoico todo trans es la siguiente. A una solución de ácido transretinoico total (100 mg, 0,33 mmol) en éter anhidro se le añadió cloruro de oxalilo (42,3 mg, 0,333 mmol) a 0 grados C y se agitó a dicha temperatura durante 30 minutos y se añadió piridina (28,7 mg, 0,363 mmol), 2-metil-2-propanol (26,8 mg, 0,363 mmol) y se agitó a temperatura ambiente en la oscuridad después de lo cual la reacción se completó según se indicó mediante TLC. A continuación la mezcla de reacción se inactivó con agua y se extrajo con éter (3 veces, 10 ml), solución de bicarbonato de sodio saturado (3 veces, 5 ml) y nuevamente con agua (3 veces, 5 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>.sub.4) y se evaporó. El residuo grueso se volvió a disolver en hexano y se aplicó sobre un cartucho de sílice Sep-Pak (2 g). La elución con hexano/acetato de etilo (9,7:0,3) proporcionó el éster butílico de ácido retinoico. La purificación final se logró mediante HPLC (columna Zorbax-Sil de 10mm x 25cm, 4 ml/min) usando el sistema de disolventes hexano/isopropanol (90:10). El butirato de retinoilo todo trans puro 2 (98 mg, 82,6 %) se eluyó como un aceite espeso.

35 Algunas realizaciones se refieren a la formulación de éster butilretinoico para la inyección como se describe a continuación. Una solución de 10 g de éster butilretinoico se disolvió en una mezcla de 7 3g de aceite de algodón que contenía 0,1 g de hidroxianisol butilado y 10 g de alcohol bencílico a una temperatura levemente elevada y con mezcla de alta cizalla en condiciones asépticas. La mezcla se filtró de forma estéril y se colocó en una jeringa para su uso posterior. Para administrarse mediante inyección intramuscular. Algunas realizaciones se refieren a la formulación de palmitato de retinol en aceite de algodón como anteriormente para la inyección intramuscular.

40 Algunas realizaciones se refieren a la formulación de una forma de dosificación oral de uno o más principios activos de las presentes realizaciones como se describe a continuación. 10 g de ácido retinoico se disolvieron en una mezcla de cera de abeja, hidroxianisol butilado, edetato disódico, copos de aceite de soja hidrogenado, aceites vegetales hidrogenados y alcohol de aceite de soja a una temperatura levemente elevada y con mezcla de alta cizalla. La mezcla se selló en cápsulas de gelatina blanda en concentraciones de dosis de 2 mg, 5 mg y 10 mg para la administración oral.

50 Algunas realizaciones se refieren a la formulación de un comprimido bucal bioadhesivo que contiene uno o más principios activos de las presentes realizaciones. Se preparó una combinación de excipientes que contenía un 24 % de principio activo, un 21 % de HPMC, un 18 % de almidón de maíz, un 24 % de lactosa, un 1 % de sílice, un 2,5 % de policarbofil (Noveon), un 7,5 % de carbómero 974P, un 1,2 % de talco y un 0,7 % de estearato de magnesio. La combinación se prensó en comprimidos de aproximadamente 1 cm de diámetro.

55 Algunas realizaciones se refieren a una formulación de una película sublingual que contiene uno o más principios activos de las presentes realizaciones. Lo siguiente se mezcla en 50 g de agua: 3 g de metocel E5, 5 g de metocel E50, 1 g de klucel, 1 g de maltodextrina, 1 g de ácido cítrico, 3 g de sucralosa, 5 g de sabor a naranja, 0,2 g de parabeno, 0,1 de edetato sódico y 5 g de sorbitol. Se añadió 1 g de ácido retinoico y la mezcla se desgasificó con agitación. La composición se esparció finamente a lo largo de un soporte de película de poliéster y se dejó secar al aire en la ausencia de cualquier luz directa para evitar la degradación. A continuación la película se cortó para generar dosis de 2 a 10 mg.

65 Algunas realizaciones se refieren a un kit, que puede incluir uno o más sulfátidos, agonistas del RAR o cualquier combinación de los mismos, preferentemente como una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, se proporciona cis-tetracosenoilo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, se proporciona ATRA en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, se proporciona tazaroteno en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En varias realizaciones, puede proporcionarse opcionalmente sulfuro de

hidrógeno (H<sub>2</sub>S). En varias realizaciones, puede proporcionarse opcionalmente uno o más antioxidantes. En varias realizaciones, los kits pueden comprender además un envase adecuado y/o instrucciones para su uso. Los kits también pueden comprender un medio para la administración de uno o más sulfátidos, agonistas del RAR o cualquier combinación de los mismos, tales como un inhalador, un pulverizador (por ejemplo, aerosol nasal), una jeringa para la inyección, una aguja, una bolsa o un empaquetado a presión para cápsulas, comprimidos, supositorios. El uno o más sulfátidos, agonistas del RAR o cualquier combinación de los mismos pueden encontrarse en una forma seca o liofilizada o en una solución, particularmente en una solución estéril. Cuando se encuentra en una forma seca, el kit puede comprender un diluyente farmacéuticamente aceptable para preparar la formulación líquida. El kit puede contener un dispositivo para la administración de las composiciones, incluyendo, pero no limitado a, jeringa, pipeta, parche transdérmico o inhalador. Algunas realizaciones se refieren a kits que contienen dosificaciones suficientes de los compuestos o la composición para proporcionar un tratamiento efectivo para un individuo durante un período extendido, tales como una semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas u 8 semanas o más.

En una realización ejemplar, a un paciente adulto de 70 kg que presenta riesgo de daño hepático químico por la prescripción de fármacos o el abuso de fármacos, se le administra diariamente, de forma intramuscular, una inyección de 7 mg de tazaroteno en 1,0 ml de solución salina tamponada con fosfato para tratar el daño hepático. Esta dosificación puede ajustarse basándose en los resultados del tratamiento y la opinión del médico tratante. El tratamiento preferentemente se continúa durante al menos aproximadamente 1 o 2 semanas, preferentemente al menos aproximadamente 1 o 2 meses y puede continuarse en un régimen crónico.

En otra realización ejemplar, a un paciente adulto de 70 kg que presenta riesgo de daño hepático químico por la prescripción de fármacos o el abuso de fármacos, se le administra una dosis oral de un agonista del RAR suficiente para inhibir la actividad de las células NKT tipo I. El daño hepático puede controlarse mediante el análisis de los niveles de enzimas en suero. La dosificación de agonista del RAR puede ajustarse basándose en los resultados de la prueba de función hepática y la opinión del médico tratante. El tratamiento preferentemente se continúa durante al menos aproximadamente 1 o 2 semanas, preferentemente al menos aproximadamente 1 o 2 meses y puede continuarse en un régimen crónico. En algunas realizaciones, la duración del tratamiento coincide con la duración del comportamiento del paciente que presenta riesgo de daño hepático químico. En algunas realizaciones, el agonista del RAR se selecciona del grupo que consiste en ATRA y tazaroteno. En algunas realizaciones, al paciente se le administra además una dosis de sulfátido suficiente para activar las células NKT tipo II.

Los siguientes ejemplos se presentan para fines ilustrativos. Solamente los ejemplos que se refieren a Tazaroteno y CD1530 forman parte de la presente invención.

#### EJEMPLO 1

El sulfátido media la inhibición de las células NKT tipo I mientras que activa las células de sulfátido/CD1d-tetrámero+

Una dosis de 20 µg de sulfátido se inyectó intraperitonealmente en ratones. Después de la inyección de sulfátido, las MNC del hígado se aislaron y marcaron con CFSE. Las células se cultivaron con αGalCer (10 ng/ml) durante 96 horas en presencia o ausencia de 10 ng/ml de citocina IL-2. Las células se cultivaron con 10 ng/ml de IL-12 solo como control. Después del cultivo, las células se recolectaron, se tiñeron con mAb anti-TCRβ y tetrámeros αGalCer/CD1d, se realizó una clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y se llevaron a cabo análisis de dilución CFSE sobre las células de αGalCer/CD1d-tetrámero<sup>+</sup> (NKT tipo I). Véase la Figura 1A. Como se muestra en la Figura 1B, después de la administración de sulfátido, las células NKT tipo I no proliferaron en respuesta a un estímulo *in vitro* con αGalCer.

Las células hepáticas aisladas de ratones a los que se les inyectó PBS o 20 µg de sulfátido, se clasificaron en poblaciones de sulfátido/CD1d-tetrámero<sup>+</sup> y tetrámero<sup>-</sup> y se tiñeron para el IFN-γ intracitoplasmático. Como se muestra en la Figura 1C, los ratones a los que se les inyectó sulfátido tuvieron el mayor % de células positivas para el IFN-γ.

La administración de sulfátido da como resultado tanto la inhibición de la proliferación de células NKT tipo I como el aumento del % de células positivas para IFN-γ. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se sugiere que la administración de sulfátido activa las células dendríticas plasmacitoides (pDC) y las células NKT tipo II que secretan citocinas y quimiocinas y esta interacción resulta en la inducción de la inhibición mediada por cDC en las células NKT tipo I.

#### EJEMPLO 2

La administración de sulfátido protege contra la hepatitis inducida por ConA

Los ratones hembra C57BL/6 se trataron con 8,5 mg/kg de Conavalina A (ConA) (disuelta en solución salina tamponada con fosfato libre de pirógenos, PBS) intravenosamente (i.v.), lo que induce el daño hepático de forma similar al provocado por la hepatitis. Inmediatamente después de la inyección de ConA, se inyectó intraperitonealmente (i.p.) a los ratones 20 µg (1mg/kg/m) de sulfátido de cerebro bovino o PBS.

El daño al hígado da lugar a anomalías reveladoras (que sugieren la enfermedad hepática) detectables con pruebas de función hepática. Por ejemplo, la hepatitis vírica puede hacer que las enzimas alanina amino transferasa (ALT) y aspartato amino transferasa (AST) en las células hepáticas lesionadas se viertan al torrente sanguíneo y aumenten su nivel en sangre. Para probar el daño hepático, se recolectó suero y se midieron los niveles de las enzimas ALT y AST en suero a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas después de la inyección de Con A o Con A + sulfátido. Los niveles de enzimas en suero se midieron con la ayuda de *Laboratory Corporation of America*, San Diego, CA. Como se muestra en la Figura 1e, se observaron niveles comparables de enzimas en suero a las 6 horas de la inyección de Con A o Con A + sulfátido, no obstante, los niveles de ALT y AST en suero fueron menores a las 12, 24 y 48 horas en los ratones a los que se les inyectó ConA y sulfátido. En los ratones a los que se les inyectó Con A (●), el pico de ALT y AST en suero se dio aproximadamente a las 12 horas (ALT≈15,8x10<sup>3</sup> IU/L y AST≈22,7x10<sup>3</sup> IU/L) y regresó al punto de referencia a las 48 horas. En contraste, después de la combinación de inyección de Con A + sulfátido (○), se registró una disminución significativa en el nivel en suero de ALT y AST (ALT≈2,5x10<sup>3</sup> IU/L y AST≈5,4x10<sup>3</sup> IU/L) a las 12 horas y regresó al punto de referencia a las 24 horas. Los valores son promedios ± desviación estándar (SD) de 5 ratones por grupo. *P* < 0,001.

Los ratones se sacrificaron a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas después del tratamiento y se recolectaron sus hígados. El tejido hepático se fijó en una solución de formaldehído al 10 % y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso. El examen histológico con el uso de tinción con hematoxilina y eosina (H&E) se realizó en *Pacific Pathology Inc.*, San Diego, CA.

Como se muestra en la Figura 1d, la tinción con H&E demostró una mejora marcada en la histología hepática en los ratones tratados con Con A + sulfátido de cerebro bovino con respecto a los ratones tratados con Con A solamente. El examen histológico mostró una infiltración difusa y masiva y una necrosis grave en los intervalos de tiempo indicados después de la inyección de los ratones con Con A, Figura 1d, paneles superiores. En contraste, la inyección de sulfátido + Con A se asoció a una lesión leve en términos de una infiltración menor y una necrosis menor en las secreciones hepáticas a las 12 horas a 48 horas y la histología volvió a ser normal a las 72 horas,

Figura 1d, paneles inferiores.

En conjunto, los resultados obtenidos en el Ejemplo 1 y en el Ejemplo 2 indican que (a) el sulfátido media la inhibición de las células NKT tipo I en el hígado y (b) la administración de sulfátido activa las células de sulfátido/CD1d-tetrámero+ y protege contra la hepatitis inducida por Con A. Esto indica que las células dendríticas convencionales (cDC) tolerizadas y las células NKT tipo I anérgicas conducen colectivamente a una inhibición significativa de la cascada inflamatoria perjudicial.

### EJEMPLO 3

#### Análisis del efecto de la respuesta inmune a la lesión hepática por isquemia y reperfusión sobre la composición de la población de células CD11b+Gr-1+

El modelo de lesión hepática por isquemia y reperfusión se estableció como se describe en Shen XD, Ke B, Zhai Y, *et al.*, se requiere la vía de coestimulación de las células T CD154-CD40 en el mecanismo de la lesión hepática por isquemia/reperfusión y su bloqueo facilita y depende de la citoprotección mediada por hemo oxigenasa-1. *Transplantation* 2002, 74:315-9, incorporada en la presente en su totalidad con algunas modificaciones.

Los ratones de tipo salvaje y J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> que carecen de las células NKT tipo I pero que tienen niveles normales de células NKT tipo II (3-5 ratones/grupo) o los ratones TS (2 a 3 ratones/grupo) tratados 3 horas antes con 20  $\mu$ g de sulfátido/ratón se anestesiaron con inyección intraperitoneal de 60 mg/kg de pentobarbital sódico. Después de la laparotomía media, se aplicó un clip atraumático a la triada hepática (arteria hepática, vena portal, ducto biliar) de los 3 lóbulos cefálicos del hígado. Los lóbulos caudales mantuvieron intacta la circulación de la sangre para prevenir la congestión venosa intestinal. El peritoneo se cerró y los ratones se colocaron sobre una almohadilla de calentamiento (~37 °C). La temperatura ambiente varió entre 25 y 26 °C. Después de 90 minutos de isquemia hepática caliente, se quitó el clip, por lo que se inició la reperfusión y se suturó la pared abdominal. Se practicó eutanasia a los ratones después de 6 horas de la reperfusión y se recolectó la sangre y los lóbulos cefálicos del hígado. Los controles simulados experimentaron el mismo procedimiento pero sin oclusión vascular.

Preparación de las células. Se aislaron los leucocitos de los lóbulos cefálicos del hígado de los ratones mediante el uso de compresión mecánica seguida de separación de gradiente Percoll y lisis de RBC como se describe en Halder RC, Aguilera C, Maricic I, *et al.*, *Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT prevents inflammatory liver disease*. *J Clin Invest* 2007, 117:2302-12.

Citometría de flujo. Los leucocitos se suspendieron en tampón FACS (PBS que contenía NaN<sub>3</sub> al 0,02 % y FCS al 2 %), se bloquearon (FcR- $\gamma$  anti ratón, BD Pharmingen, San Diego, CA) y se tiñeron con anticuerpos anti ratón marcados con mCD1d-tetrámero-PE o PE-, FITC- o PE-Cy5 (BD Pharmingen, San Diego, CA o eBioscience Inc., San Diego, CA) como se indicó. La tinción con citocina intracelular (ICCS) de las células hepáticas mononucleares (MNC)

se llevó a cabo como se describe en Halder RC, Aguilera C, Maricic I, *et al.*, *Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT prevents inflammatory liver disease*. J Clin Invest 2007, 117:2302-12. El análisis se realizó con un instrumento FACSCalibur mediante el uso del software CellQuest (versión 4.0.2, BD, Franklin Lakes, NJ). Se controlaron las poblaciones de Gr-1<sup>alto</sup> y Gr-1<sup>int</sup>. Véase la Figura 2a.

5 Estadística. Los datos se expresan como promedio  $\pm$  SEM para cada grupo.  $P < 0,005$ . Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron con la prueba t de Student de una cola sin parear, mediante el uso del software GraphPad Prism (versión 5.0a, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

10 Resultados. El subgrupo de células Gr-1<sup>int</sup> se compone predominantemente de monocitos y precursores mieloides. Después de la lesión por isquemia y reperfusión (IRI), las células de Gr-1<sup>int</sup> aumentaron en aproximadamente 3,5 veces ( $p < 0,005$ ) en comparación con el placebo en los hígados de los ratones TS, mientras que no se observó ningún aumento después de la lesión por isquemia y reperfusión en los ratones J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>. Véase la Figura 2b, paneles superiores. Por consiguiente, el reclutamiento hepático de los subgrupos de células mieloides durante la lesión por isquemia y reperfusión depende de la presencia de células NKT tipo I, de las que carecen los ratones J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>.

15 Cuando se comparó con los ratones sin tratar, el subgrupo de células Gr-1<sup>int</sup> se redujo en los ratones tratados con sulfátido en aproximadamente un 50 % después de IRI. Esto sugiere que la actividad de reclutamiento de células mieloides de las células NKT tipo I se redujo después del tratamiento con sulfátido.

20 El subgrupo de células Gr-1<sup>alto</sup> que consiste principalmente en granulocitos, no difirió de forma significativa entre los hígados de los controles de placebo y los ratones a los que se les indujo lesión por isquemia y reperfusión. Figura 2b, paneles inferiores.

#### 25 EJEMPLO 4

La administración de sulfátido antes de la inducción de la lesión por isquemia y reperfusión inhibe de forma significativa la secreción de IFN- $\gamma$  de las células NKT tipo I

30 A un grupo de ratones TS (n=3) se le inyectó sulfátido (20  $\mu$ g/ratón i.p.) 3 horas antes de la inducción de isquemia (Sulf. IRI), los otros grupos (IRI (n=3), placebo (n=2)) no se trataron previamente. Se indujo lesión hepática por isquemia y reperfusión (90 minutos de isquemia y 6 horas de reperfusión) y se realizó cirugía de placebo como se describe en el Ejemplo 3.

35 Preparación de las células. Se aislaron los leucocitos de los lóbulos cefálicos del hígado de los ratones mediante el uso de compresión mecánica seguida de separación de gradiente Percoll y lisis de RBC como se describe en Halder RC, Aguilera C, Maricic I, *et al.*, *Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT prevents inflammatory liver disease*. J Clin Invest 2007, 117:2302-12.

40 Citometría de flujo. Los leucocitos se suspendieron en tampón FACS (PBS que contenía NaN<sub>3</sub> al 0,02 % y FCS al 2 %), se bloquearon (FcR- $\gamma$  anti ratón, BD Pharmingen, San Diego, CA) y se tiñeron con anticuerpos anti ratón mCD1d-tetrámero-PE cargados con  $\alpha$ GalCer (BD Pharmingen, San Diego, CA o eBioscience Inc., San Diego, CA). El análisis se realizó con un instrumento FACSCalibur mediante el uso del software CellQuest (versión 4.0.2, BD, Franklin Lakes, NJ).

45 Estadística. Los datos se expresan como promedio  $\pm$  SEM para cada grupo.  $P < 0,01$ . Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron con la prueba t de Student de una cola sin parear, mediante el uso del software GraphPad Prism (versión 5.0a, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

50 Resultados. Después de la inducción de la lesión por isquemia y reperfusión, las células NKT tipo I mostraron un aumento en la producción de IFN- $\gamma$  en comparación con las células NKT tipo I de la cirugía de placebo, mientras que la administración de sulfátido 3 horas antes de la lesión por isquemia y reperfusión redujo de forma significativa la secreción de IFN- $\gamma$  de las células NKT tipo I. Véase la Figura 2c.

#### 55 EJEMPLO 5

Supresión de las células NKT tipo I en la necrosis hepática reducida después de IRI

60 El sulfátido derivado de mielina bovina purificado (>90 % puro), comprado a Matreya Inc., Pleasant Gap, PA, se disolvió en un vehículo (solución de polisorbato-20 al 0,5 % (Tween-20) y NaCl al 0,9 %) y se diluyó en PBS. Los grupos de ratones BL/6 (sulfátido TS) y ratones J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> (sulfátido de J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>) se trataron con sulfátido (20  $\mu$ g/ratón) intraperitonealmente de 3 a 48 horas antes de la inducción de la isquemia o cirugía de placebo. La lesión hepática por isquemia y reperfusión y la cirugía de placebo se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 3 en los ratones TS y J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> tratados con sulfátido y sin tratar. Después de 90 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, los tejidos hepáticos (lóbulos cefálicos) se fijaron en formalina al 10 %, se incrustaron en parafina y las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina para el análisis histológico (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine).

Los ratones TS tratados previamente con sulfátido (sulfátido TS) y los ratones  $J\alpha 18^{-/-}$  desarrollaron únicamente necrosis mínima o no hepática después de IRI, mientras que se encontraron grandes áreas necróticas en los lóbulos cefálicos del hígado de los ratones sin tratar (WT). Véase la figura 4, paneles superiores. Los controles de placebo no mostraron necrosis. Véase la figura 4, paneles inferiores. El análisis histológico indicó que la necrosis después de IRI se redujo en los hígados de los ratones que carecían de células NKT tipo I (ratones  $J\alpha 18^{-/-}$ ) y en los ratones en que la actividad de las células NKT tipo I fue suprimida por el tratamiento con sulfátido.

#### EJEMPLO 6

##### Inducción de enfermedad hepática inducida por el alcohol en ratones TS y los que contenían células NKT tipo 1 reducidas ( $J\alpha 18^{-/-}$ )

Después de la aclimatación con dieta líquida de Lieber-DeCarli nutricionalmente adecuada durante una semana, se dio a los ratones C57BL/6J de 6-8 semanas de edad (B6) y a los ratones  $J\alpha 18^{-/-}$ , que carecían de células NKT tipo 1 pero no de células NKT tipo 2, acceso libre a una dieta líquida que contenía etanol al 5 % o una dieta isocalórica que contenía dextrina maltosa (Bio-Serv, NJ). Se tomaron las precauciones de preparar una dieta fresca todos los días mediante el uso de agua en autoclave en recipientes esterilizados y se cambió el alimento diariamente.

Los ratones B6 y  $J\alpha 18^{-/-}$  que recibieron una dieta que contenía etanol se separaron en dos grupos, el grupo que se alimentó con etanol de forma crónica y el grupo que se alimentó de forma crónica e ingirió etanol en exceso. Los ratones en el grupo que se alimentó con etanol de forma crónica se alimentaron con una dieta líquida que contenía etanol al 5 % durante hasta 4-5 semanas. Los ratones en el grupo que se alimentó de forma crónica e ingirió etanol en exceso se alimentaron con una dieta líquida que contenía etanol al 5 % durante 10 días seguido de (en el día 11) una única dosis elevada de etanol mediante sonda oral (5 g/kg de peso corporal). Los ratones en el grupo de control recibieron dextrina maltosa isocalórica mediante sonda oral. Después de la administración de la sonda oral, los ratones se mantuvieron en una almohadilla caliente de temperatura controlada y se monitorizaron. A pesar de que al comienzo se movían lentamente, la mayoría de los ratones que recibió la dosis elevada de etanol mediante sonda oral recobró su comportamiento normal a las pocas horas. Se practicó eutanasia a los ratones a las 8 a 9 horas de la administración de la sonda oral.

La tinción con H&E se realizó en el tejido de los lóbulos hepáticos obtenidos de ratones macho B6 y  $J\alpha 18^{-/-}$  alimentados con etanol después de 10 días o 4 a 5 semanas de alimentación crónica con etanol o alimentación crónica e ingestión en exceso de etanol. Como se muestra en la Figura 9a (paneles superiores), el análisis histopatológico no mostró daño hepático en los ratones B6 o  $J\alpha 18^{-/-}$  sometidos a alimentación crónica con etanol durante 10 días. Asimismo, no se observó daño hepático mediante el análisis histopatológico del tejido hepático de los ratones B6 y  $J\alpha 18^{-/-}$  sometidos a alimentación crónica con etanol durante 4-5 semanas (datos no mostrados). No obstante, los análisis histopatológicos del tejido hepático de los ratones B6 sometidos a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol, mostraron daño significativo. Véase la Figura 9a, panel izquierdo inferior. Mientras que el tejido hepático de los ratones  $J\alpha 18^{-/-}$  sometidos a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol mostró daño relativamente pequeño. Véase la Figura 9a, panel derecho inferior.

Los niveles de ALT en suero se midieron en los ratones B6 y  $J\alpha 18^{-/-}$  de control y en los ratones B6 y  $J\alpha 18^{-/-}$  alimentados con etanol después de 10 días o 4-5 semanas de alimentación crónica más consumo en exceso de etanol. Como se muestra en la Figura 9b, panel izquierdo, el etanol crónico no condujo a un aumento significativo de los niveles de ALT en suero. Los niveles de ALT en suero aumentaron de forma significativa en los ratones B6 sometidos a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol y aumentaron en menor medida en los ratones  $J\alpha 18^{-/-}$  sometidos a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol en comparación con el control. Véase la Figura 9b, panel derecho.

El daño hepático máximo (en comparación con los controles sin etanol), como se ejemplifica por histología o niveles en suero de ALT/AST, se observó en los ratones B6 y  $J\alpha 18^{-/-}$  6 a 8 horas después de una dosis elevada de etanol mediante sonda oral. Entre los grupos que recibieron alimentación crónica más consumo en exceso de etanol, los ratones  $J\alpha 18^{-/-}$ , que carecían de células NKT tipo 1, mostraron un daño hepático menor.

Dado que la alimentación crónica con etanol durante 10 días o durante 4 a 5 semanas no condujo a ningún daño hepático significativo como se ejemplifica mediante análisis histopatológico ni a ningún cambio significativo en los niveles de ALT/AST en suero, esto se refiere a la fase preclínica o subclínica de ALD. La fase clínica de ALD se indujo después de una segunda etapa de alimentación crónica y consumo en exceso de alcohol.

Las células hepáticas mononucleares (MNC) se aislaron de los grupos (4 en cada uno) de ratones B6 y  $J\alpha 18^{-/-}$  después de 5 semanas de alimentación con una dieta líquida de Lieber-DeCarli que contenía etanol al 5 % (alimentación crónica con etanol) o una dieta de control que contenía una cantidad similar de calorías. Las MNC aisladas del hígado se tiñeron con varios anticuerpos de la superficie celular y se analizaron mediante citometría de flujo. La acumulación de células NKT tipo I activadas y células mieloides CD11b+Gr-1+ se observó en los hígados de los ratones B6 pero no en los ratones  $J\alpha 18^{-/-}$ , ratones en la fase preclínica de ALD. Véase la Figura 5.

EJEMPLO 7Prevención de la lesión hepática inducida por alcohol por sulfátido o ácido retinoico todo trans (ATRA)

Los grupos de ratones B6 (WT) y J $\alpha$ 18 $^{-/-}$  macho de 7 semanas de edad se inyectaron (i.p.) con: 20 microgramos/ratón de sulfátido en los días 1 y 10; 0,3 miligramos/ratón de ATRA en los días 6-10 o vehículo/DMSO y se alimentaron con una dieta líquida que contenía etanol al 5 % durante 10 días seguida (en el día 11) de una única dosis elevada de etanol mediante sonda oral (5 g/kg de peso corporal) (grupo de alimentación crónica más consumo en exceso de etanol) o una dieta isocalórica que contenía dextrina maltosa seguida por una sonda oral isocalórica de dextrina maltosa (grupo de control). Se practicó eutanasia a los ratones a las 6 a 8 horas después de la administración de la sonda oral y se recolectó el suero y el tejido hepático.

Se determinaron los niveles de ALT en suero para cada grupo de ratones. Como se muestra en la figura 6, los niveles de ALT en suero aumentaron de forma significativa en los ratones B6 a los que se les inyectó vehículo/DMSO sometidos a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol (barra negra), mientras que los niveles de ALT en suero en los ratones B6 sometidos a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol que recibieron inyecciones de sulfátido (barra a rayas horizontales) o ATRA (barra a rayas verticales) fueron similares a los de los ratones B6 que recibieron alimentación de control (barra sin sombrear). Los niveles en suero de ALT aumentaron en los ratones J $\alpha$ 18 $^{-/-}$  a los que se les inyectó vehículo/DMSO sometidos a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol (barra negra) en comparación con los ratones J $\alpha$ 18 $^{-/-}$  que recibieron alimentación de control (barra sin sombrear), no obstante, los ratones J $\alpha$ 18 $^{-/-}$  a los que se les inyectó vehículo/DMSO sometidos a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol presentaron niveles reducidos de ALT en suero en comparación con los ratones B6 a los que se les inyectó vehículo/DMSO sometidos a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol. Véase la Figura 6.

El examen histológico para la esteatohepatitis (enfermedad del hígado graso) se llevó a cabo en el tejido hepático recolectado de los ratones B6 a los que se les inyectó vehículo/DMSO, sulfátido o ATRA después de la alimentación crónica más consumo en exceso de etanol. Como se muestra en la Figura 7, el tejido hepático de los ratones B6 a los que se les inyectó vehículo/DMSO mostraron signos significativos de daño después de la alimentación crónica más consumo en exceso de etanol. No obstante, el tejido hepático obtenido de los ratones B6 a los que se les inyectó sulfátido o ATRA, mostró pocos signos de la enfermedad del hígado graso.

Los análisis histológicos y de enzimas hepáticas en suero sugieren que la administración de sulfátido o del agonista del receptor del ácido retinoico (RAR), ATRA, puede proteger contra el daño hepático causado por el consumo excesivo de alcohol.

EJEMPLO 8Inhibición de la proliferación de las células NKT tipo I por ATRA

Las células NKT tipo I se aislaron de los bazos de ratones B6 sin tratamiento previo y se cultivaron *in vitro* con [ $^3$ H]-timidina y una concentración óptima de  $\alpha$ GalCer sola, una concentración óptima de  $\alpha$ GalCer más 0,15  $\mu$ g/ml, 12  $\mu$ g/ml o 18,8  $\mu$ g/ml de ATRA, o ATRA solo. La proliferación de las células NKT tipo I se midió mediante la incorporación de [ $^3$ H]-timidina. Como se muestra en la Figura 8a, la proliferación celular fue similar para las células NKT tipo I, cultivadas en 0,15  $\mu$ g/ml de ATRA y  $\alpha$ GalCer o  $\alpha$ GalCer sola, mientras que, en comparación, la proliferación fue reducida para las células NKT tipo I, cultivadas en 1,2  $\mu$ g/ml o 18,8  $\mu$ g/ml de ATRA y  $\alpha$ GalCer. La mayor inhibición de la proliferación de las células NKT tipo I inducida por  $\alpha$ GalCer se observó para 18,8  $\mu$ g/ml de ATRA. No se observó proliferación o fue mínima para las células NKT tipo I cultivadas en ATRA solo.

EJEMPLO 9Inhibición de la actividad de las células NKT tipo I por ATRA

El efecto de ATRA sobre la secreción de citocina IL-2 por las células NKT tipo I en respuesta a un estímulo *in vitro* con  $\alpha$ GalCer se probó mediante el co-cultivo de las células NKT (Hy1.2) y se irradió con células presentadoras de antígenos (APC) *in vitro* con una concentración óptima de  $\alpha$ GalCer en la presencia o ausencia de ATRA (0,15  $\mu$ g/ml, 1,2  $\mu$ g/ml o 18,8  $\mu$ g/ml) durante un período de 16 horas. Los sobrenadantes se recolectaron y se midieron los niveles de IL-2 secretados mediante el uso de ELISA sándwich de IL-2.

Los niveles de secreción de IL-2 no fueron afectados de forma significativa por 0,15  $\mu$ g/ml de ATRA, no obstante, se observaron reducciones significativas en la secreción de IL-2 para las células NKT tipo I cultivadas en la presencia de 1,2  $\mu$ g/ml o 18,8  $\mu$ g/ml de ATRA. La mayor reducción en la secreción de IL-2 se logró con 18,8  $\mu$ g/ml de ATRA. Véase la Figura 8b.

Se probaron los cambios funcionales en las células NKT tipo I después de la administración de ATRA. En dos experimentos independientes, grupos de ratones Black 6 (TS) se inyectaron intraperitonealmente con 0,3 mg/animal (~ 15 mg/Kg peso corporal) de ATRA o vehículo (DMSO) diariamente durante un período de 5 días. Las células NKT tipo I se purificaron y cultivaron *in vitro* con concentraciones en aumento de  $\alpha$ GalCer. Se midió la proliferación celular y se recolectaron los sobrenadantes. Se determinó la respuesta a la citocina de las células NKT tipo I aisladas después del estímulo *in vitro* con  $\alpha$ GalCer mediante ELISA sándwich para IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-13. Las células NKT tipo I aisladas de los ratones a los que se les inyectó ATRA no proliferaron en respuesta a la estimulación con  $\alpha$ GalCer (datos no mostrados). Como se muestra en la Figura 8c, las células NKT tipo I aisladas de los ratones a los que se les inyectó vehículo (DMSO) secretaron IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-13 en respuesta a la estimulación con  $\alpha$ GalCer, pero no IL-6, IL-10 o IL-12. No se detectó secreción de IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12 o IL-13 en respuesta a la estimulación con  $\alpha$ GalCer de las células NKT tipo I aisladas de los ratones a los que se les inyectó ATRA. Se observaron niveles reducidos de secreción de IL-4 de las células NKT tipo I aisladas de los ratones a los que se les inyectó ATRA en respuesta a la estimulación con  $\alpha$ GalCer. Véase la Figura 8c.

#### 15 EJEMPLO 10

##### ATRA no inhibe las células T CD4 convencionales restringidas por MHC de clase II

El efecto de ATRA sobre las células T CD4 convencionales restringidas por MHC de clase II se probó mediante el aislamiento de las células T CD4+ reactivas a la proteína básica de mielina MBPac1-9 de ratones transgénicos TCR B10.PL V $\beta$ 8.2 sin tratamiento previo y cultivo de las células *in vitro* con [<sup>3</sup>H]-timidina y una concentración óptima de MBPac1-9 en la presencia o ausencia de concentraciones graduadas de ATRA (0,15, 1,2, 18,8  $\mu$ g/ml). La proliferación de las células T CD4+ reactivas a la proteína básica de mielina MBPac1-9 se midió mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. No se observó inhibición de la proliferación estimulada por MBPac1-9 en los cultivos tratados con ATRA. Véase la figura 10. Esto sugiere que ATRA no inhibe directamente la actividad de las células T CD4 restringidas por MHC.

#### 25 EJEMPLO 11

##### 30 El tratamiento con ATRA en ausencia de células presentadoras de antígenos inhibe la función de las células NKT tipo 1

También se midió el efecto del tratamiento con ATRA sobre las células NKT tipo I en la ausencia de células presentadoras de antígenos. Las células del hibridoma NKT tipo I (Hy1.2) se cultivaron *in vitro* sin ATRA o con 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml o 20  $\mu$ g/ml de ATRA durante 24 horas. A continuación las células se lavaron tres veces y se co-cultivaron con esplenocitos irradiados (APC) en la presencia de concentraciones graduadas del antígeno lipídico,  $\alpha$ GalCer. Los sobrenadantes se recolectaron 16 horas después y los niveles de IL-2 se midieron mediante el uso de ELISA sándwich de IL-2. Como se muestra en la Figura 11, el tratamiento de las células de hibridoma NKT tipo I (Hy1.2) con ATRA inhibe la secreción de IL-2. Esto sugiere que el tratamiento con ATRA en la ausencia de células que presentan antígenos inhibe la función efectora de las células NKT tipo I.

#### 40 EJEMPLO 12

##### 45 Inhibición de la actividad de las células NKT tipo I por los agonistas selectivos de un subtipo del RAR

Los receptores del ácido retinoico (RAR) comprenden tres subtipos principales: RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  y RAR $\gamma$ . El agonista del RAR, ATRA, no es selectivo para un subtipo específico. La contribución de los subtipos del RAR a la inhibición de la actividad de las células NKT tipo I se probó con los agonistas selectivos de un subtipo del RAR de la siguiente forma. Las células esplénicas se aislaron de los ratones B6 (TS) sin tratamiento previo y se cultivaron *in vitro* en la presencia de [<sup>3</sup>H]-timidina, una concentración óptima de  $\alpha$ GalCer y concentraciones graduadas del agonista panactivo del RAR, ATRA, el agonista del RAR $\alpha$ , AM580, el agonista del RAR $\beta$  2, AC55649 o el agonista del RAR $\gamma$ , CD1530. La proliferación de las células NKT tipo 1 en respuesta a la estimulación con  $\alpha$ GalCer se midió mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina.

55 Las células NKT tipo I cultivadas en la presencia de ATRA, AM580 y CD1530, mostraron niveles similares de proliferación celular hasta una concentración de 10<sup>1</sup>  $\mu$ g/ml. Véase la Figura 12. Las células cultivadas en la presencia de 10<sup>1</sup>  $\mu$ g/ml de ATRA o CD1530 mostraron una proliferación baja o mínima, mientras que la proliferación se mantuvo para las células cultivadas en 10<sup>1</sup>  $\mu$ g/ml de AM580. Se observó una reducción en la proliferación celular en comparación con otros agonistas del RAR para el agonista del RAR $\beta$  2, AC55649, en todas las concentraciones probadas, con la excepción de 10<sup>1</sup>  $\mu$ g/ml, a cuya concentración se observó una proliferación baja o mínima para las células cultivadas en AC55649, ATRA o CD1530.

60 Estos resultados sugieren que el agonista del RAR $\beta$  2, AC55649 es un inhibidor eficaz de la actividad de las células NKT tipo I y que la vía de señalización del receptor del ácido retinoico  $\beta$ 2 (RAR- $\beta$  2) se encuentra implicada en la inhibición de las células NKT tipo I.

EJEMPLO 13Efecto de la modulación de la vía de PPAR- $\gamma$  sobre las células NKT tipo I

5 Los receptores activados por el proliferador de peroxima (PPAR) son factores de transcripción inducidos por ligandos que pertenecen a la superfamilia del receptor de hormonas nucleares, que también incluye a los receptores de la hormona tiroidea, retinoides, hormonas esteroides y vitamina D. Los PPAR regulan la expresión de genes mediante la unión con el receptor X retinoide (RXR) como compañero heterodimérico para los elementos de respuesta del proliferador de peroxima (PPRE) en el ADN. Los PPAR han jugado un papel en el metabolismo de los lípidos y energético, en la inflamación, en la implantación de embriones, en la diabetes y en el cáncer.

10 El papel de la vía de PPAR- $\gamma$  en la inhibición de las células NKT tipo I se probó mediante el cultivo de células NKT tipo I esplénicas recién aisladas con [<sup>3</sup>H]-timidina y una concentración óptima de  $\alpha$ GalCer en la presencia o ausencia de concentraciones graduadas del agonista de PPAR- $\gamma$ , rosiglitazona o el antagonista de PPAR- $\gamma$ , GW9662. La proliferación de las células NKT tipo I esplénicas en respuesta a la estimulación con  $\alpha$ GalCer se cuantificó mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Se observaron niveles similares de proliferación para las células cultivadas en el agonista de PPAR- $\gamma$ , rosiglitazona o en el antagonista de PPAR- $\gamma$ , GW9662, en todas las concentraciones. Véase la Figura 13. Estos resultados sugieren que la inhibición o activación de la vía de PPAR- $\gamma$  no inhibe directamente la proliferación de las células NKT tipo I.

EJEMPLO 14Examen del efecto de los análogos de retinol sobre la actividad de las células NKT tipo I

25 Las células esplénicas se aislaron de los ratones B6 sin tratamiento previo y se cultivaron *in vitro* con [<sup>3</sup>H]-timidina y una concentración óptima de  $\alpha$ GalCer en la presencia o ausencia de concentraciones graduadas de ATRA, Retinol, 9-cis-RA o 13-cis-RA. La proliferación de las células NKT tipo I esplénicas en respuesta a la estimulación con  $\alpha$ GalCer se cuantificó mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Como se muestra en la Figura 14, no se observó proliferación o fue mínima, para las células cultivadas en 10<sup>1</sup>  $\mu$ g/ml de ATRA, mientras que el mismo nivel de inhibición de la proliferación de las células NKT tipo I se observó únicamente a concentraciones de Retinol, 9-cis-RA o 13-cis-RA que superaron los 10<sup>1</sup>  $\mu$ g/ml.

EJEMPLO 15Examen del efecto de los agonistas del RAR sobre la actividad de las células NKT tipo I

35 Los ensayos de proliferación *in vitro* y liberación de citocina se realizaron sobre esplenocitos recién aislados e hibridomas de células NKT tipo I (1.2 Hyb). Las células se cultivaron en la presencia de [<sup>3</sup>H]-timidina y una concentración óptima de  $\alpha$ GalCer (10 ng /ml) con concentraciones de valoración de ATRA, tretinoína, el agonista del RAR $\alpha$ , AM580, el agonista del RAR  $\beta$ , AC55649 o el agonista del RAR $\gamma$ , CD1530. La proliferación de las células NKT tipo I en respuesta a la estimulación con  $\alpha$ GalCer se cuantificó mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Se midieron los niveles de IL-2 mediante el uso de ELISA sándwich de IL-2. Se determinaron las concentraciones óptimas de los agonistas del RAR. Una comparación del efecto de los agonistas del RAR en sus concentraciones óptimas se muestra en la Figura 15. Los niveles más bajos de proliferación se observaron para las células cultivadas en la presencia de ATRA, tretinoína, el agonista del RAR $\gamma$ , CD1530. Las células cultivadas en la presencia del agonista del RAR $\gamma$ , CD1530 mostraron los niveles más bajos de secreción de IL-2. Estos resultados indican que el agonista del RAR $\gamma$ , CD1530 es un inhibidor eficaz de la actividad de las células NKT tipo I.

EJEMPLO 16Comparación de la inhibición de las células NKT tipo I por ATRA y tazaroteno.

50 El efecto del agonista del RAR $\gamma$  selectivo, tazaroteno, sobre la actividad de las células NKT tipo I, se examinó mediante ensayos de proliferación *in vitro* y liberación de citocina.

55 Los ensayos de proliferación *in vitro* y liberación de citocina se realizaron sobre esplenocitos recién aislados e hibridomas de células NKT tipo I (1.2 Hyb). Las células se cultivaron en la presencia de [<sup>3</sup>H]-timidina y una concentración óptima de  $\alpha$ GalCer (10 ng /ml) con concentraciones en aumento de ATRA o tazaroteno. La proliferación de las células NKT tipo I en respuesta a la estimulación con  $\alpha$ GalCer se cuantificó mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Se midieron los niveles de IL-2 mediante el uso de ELISA sándwich de IL-2. Una comparación de la inhibición de las células NKT tipo I por ATRA y tazaroteno se muestra en la Figura 16. Mientras que los agonistas del RAR inhiben la proliferación de las células NKT tipo I y la secreción de IL-2, el tazaroteno logra sus efectos inhibidores a concentraciones inferiores. Véase la Figura 16.

EJEMPLO 17

Inhibición de las células NKT tipo I después de la administración *in vivo* de tazaroteno y ATRA

Se probaron los cambios funcionales en las células NKT tipo I después de la administración *in vivo* de tazaroteno o ATRA. Los grupos de ratones se inyectaron intraperitonealmente con 300 µg de ATRA (15 mg/kg), 300 µg de tazaroteno (15 mg/kg) o vehículo (DMSO) diariamente durante un período de 5 días. Las células NKT tipo I esplénicas se purificaron y cultivaron *in vitro* con concentraciones en aumento de αGalCer. La proliferación celular se midió a través de la cuantificación de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina y los resultados se muestran en la Figura 17. Una comparación de la respuesta proliferativa de las células aisladas de los ratones a los que se les inyectó ATRA, tazaroteno o vehículo (DMSO) a la estimulación con αGalCer, indica que la administración *in vivo* de ATRA o tazaroteno inhibe la actividad de las células NKT tipo I. No obstante, los niveles más bajos de proliferación se observaron para las células NKT tipo I aisladas de los ratones a los que se les inyectó tazaroteno. Véase la Figura 17.

Las células mononucleares se aislaron de los hígados de ratones a los que se les inyectó ATRA, tazaroteno o vehículo (DMSO) y se tiñeron con el tetrámero αGalCer/CD1d y anticuerpos pan anti-TCRβ. Se llevó a cabo la citometría de flujo y la población de células que expresan los αGalCer/tetrámeros-CD1d/TCR (células NKT tipo I) se cuantificó como se muestra en la Figura 18. No se observó ninguna diferencia significativa en los números de células NKT tipo I en los hígados de los animales de control contra aquellos a los que se les administró ATRA o tazaroteno. Véase la Figura 18. Estos resultados indican que la administración de ATRA o tazaroteno no destruye las células NKT tipo I del hígado.

EJEMPLO PREDICTIVO 18Prevención de ALD mediante la administración del agonista del RAR

La eficacia de los agonistas del RAR en la prevención o mitigación de la enfermedad hepática inducida por el alcohol se prueba mediante la inyección a grupos de ratones con una cantidad eficaz de: ATRA, tazaroteno, tretinoína, el agonista del RARα, AM580, el agonista del RAR β, AC55649, el agonista del RARγ, CD1530 o vehículo/DMSO diariamente por un período de 5 días durante el cual los ratones reciben una dieta líquida que contiene etanol al 5 % durante 10 días seguida (en el día 11) de una única dosis elevada de etanol mediante sonda oral (5 g/kg peso corporal) (grupo de alimentación crónica más consumo en exceso de etanol) o una dieta isocalórica que contenía dextrina maltosa seguida por una sonda oral isocalórica de dextrina maltosa (grupo de control). Se practicó eutanasia a los ratones a las 6 a 8 horas después de la administración de la sonda oral y se recolectó el suero y el tejido hepático.

Se determinaron los niveles de ALT en suero para cada grupo de ratones. Se esperaba que los niveles de ALT en suero aumentaran de forma significativa en los ratones a los que se les inyectó vehículo/DMSO sometidos a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol en comparación con los ratones que recibieron alimentación de control. Se esperaba que los ratones sometidos a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol que recibieron inyecciones de ATRA, tazaroteno, tretinoína, AM580, AC55649, CD1530 presentaran niveles de ALT en suero reducidos en comparación con los ratones a los que se les inyectó vehículo/DMSO sometidos a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol. Se esperaba que los niveles de ALT en suero de los ratones a los que se les inyectó ATRA, tazaroteno o tretinoína sometidos a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol fueran similares a los observados en los ratones que recibieron alimentación de control. Se esperaba que el examen histológico para determinar la esteatohepatitis hepática (enfermedad del hígado graso) mostrara un daño significativo del tejido hepático recolectado de los ratones a los que se les inyectó vehículo/DMSO después de la alimentación crónica más consumo en exceso de etanol, mientras que se esperaba un daño reducido o ningún daño para el tejido hepático recolectado de ratones a los que se les inyectó ATRA, tazaroteno, tretinoína, AM580, AC55649 o CD1530 después de la alimentación crónica más consumo en exceso de etanol.

EJEMPLO PREDICTIVO 19

Los experimentos de transferencia adoptiva se utilizan con células NKT tipo I purificadas con el tetrámero αGalCer/CD1d de ratones BL/6 tratados con ATRA o tazaroteno para examinar si cuando un número graduado de estas células se transfiere a destinatarios BL/6 nativos puede inhibir la lesión hepática después de la alimentación crónica más consumo en exceso de etanol.

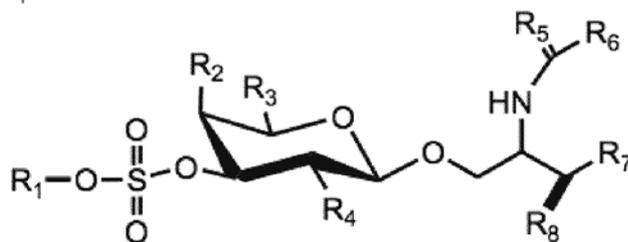
Las células T sulfátido-CD1d-tetrámero+ purificadas (clasificadas) se probaron para determinar si podían prevenir la ALD tras la transferencia adoptiva a los ratones CD1d+/+ y CD1d-/. Los ratones con genes inactivados por citocina se utilizaron como donantes de células T reactivas al sulfátido para determinar directamente el rol de la secreción de IFN-γ, IL-4 e IL-10 por las células NKT tipo II en la regulación de ALD. Las células T reactivas al sulfátido se aislaron mediante el uso de tetrámeros y cantidades graduadas (0,5-1 millón) y se transfirieron adoptivamente a los destinatarios CD1d+/+, CD1d-/- y C57BL/6. Alrededor de 1,5 millones de células de sulfátido-CD1d-tetrámero+ se aislaron de los 18 ratones C57BL/6 sin tratamiento previo. Un día después los receptores se expusieron a alimentación crónica más consumo en exceso de etanol. Para analizar los papeles de la secreción de citocina por las células NKT tipo II, se utilizó inicialmente IFN-γ, IL-4 -/- o IL-10-/- sobre el fondo de BL/6 (Jackson Lab). Los grupos de ratones BL/6 tipo silvestre o de ratones con genes inactivados se inyectaron con sulfátido (20 µg/animal) y después se les indujo ALD. En la ausencia de estas citocinas tipo 2, se esperaba que la administración de sulfátido previniera la ALD. Adicionalmente, se realizaron experimentos de transferencia celular adoptiva con células de sulfátido-CD1d-

5 tetrámero+ de ratones con genes inactivados por citocina específicos, donde las cantidades graduadas (0,5-1 millón) se transfirieron a los ratones CD1d-/- C57BL/6. Un día después los ratones destinatarios se mantuvieron con alimentación con etanol. En paralelo, las células T de sulfátido-CD1d-tetrámero+ se transfirieron de los ratones de tipo silvestre a los ratones CD1d+/+ BL/6 como control positivo. Se esperaba que estos experimentos confirmaran directamente el papel de estas citocinas secretadas por las células T reactivas al sulfátido en el control de ALD.

## REIVINDICACIONES

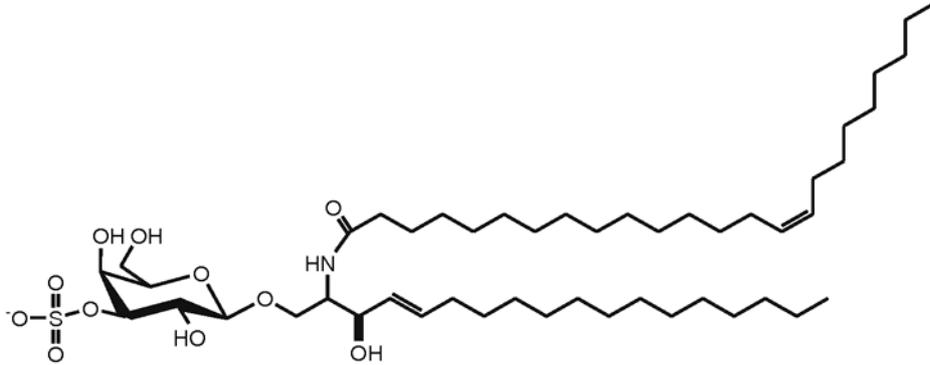
1. Una composición que comprende una cantidad de agonista selectivo de RAR $\gamma$  suficiente para inhibir la activación de las células NKT tipo I proinflamatorias para su uso en el tratamiento o la prevención de al menos una afección inflamatoria del hígado, en donde el agonista selectivo de RAR $\gamma$  es más eficaz para afectar al RAR $\gamma$  en relación con el RAR $\alpha$ .
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la afección inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad del hígado graso, hepatitis inducida por el alcohol, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis, cirrosis fulminante, hepatitis idiopática, hepatitis inducida por virus (A, B, C), hepatitis inflamatoria asociada con carcinoma hepatobiliar, lesión por reperfusión isquémica y trasplante de órgano sólido.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la afección inflamatoria del hígado es una lesión del hígado inducida por el alcohol seleccionada del grupo que consiste en:  
enfermedad del hígado relacionada con el alcohol, enfermedad del hígado graso, esteatohepatitis, hepatitis alcohólica y cirrosis alcohólica.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la afección inflamatoria es esteatohepatitis no alcohólica.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición es para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedad hepática alcohólica o lesión por reperfusión hepática.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición es para su uso en el tratamiento o la prevención de esteatohepatitis.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición es para su uso en el tratamiento o la prevención de hepatitis autoinmunitaria.
8. Una composición para su uso en la inhibición del daño hepático en un paciente que presenta riesgo de daño hepático químico por la prescripción de fármacos o el abuso de fármacos, comprendiendo la composición una cantidad de agonista selectivo de RAR $\gamma$  suficiente para tratar, inhibir o prevenir el daño hepático que resulta de la actividad de las células NKT tipo I proinflamatorias, en donde el agonista selectivo de RAR $\gamma$  es más eficaz para afectar al RAR $\gamma$  en relación con el RAR $\alpha$ .
9. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además una cantidad de sulfátido o sulfátido sintético suficiente para activar las células NKT tipo II.
10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la composición comprende un sulfátido sintético.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la composición comprende un sulfátido que tiene una estructura química seleccionada del grupo que consiste en:

la estructura química:



en donde R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en un hidrógeno, un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub>, un alquilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub>, un alquenilo C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub>, un alquenilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub> y un azúcar C<sub>5</sub> a C<sub>12</sub>; R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi y un grupo alcoxi; R<sub>3</sub> se selecciona del grupo que consiste en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, un grupo etoxi y un grupo alcoxi; R<sub>4</sub> se selecciona del grupo que consiste en un hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo alcoxi; R<sub>5</sub> se selecciona del grupo que consiste en un hidrógeno, un hidroxilo, un carbonilo, un alcoxi y un enlace; R<sub>6</sub> se selecciona del grupo que consiste en un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquenilo C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquenilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub> y un alquinilo C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>; R<sub>7</sub> se selecciona del grupo que consiste en un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquenilo

C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>, un alquenilo sustituido C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub> y un alquinilo C<sub>1</sub> a C<sub>40</sub>; y R<sub>8</sub> se selecciona del grupo que consiste en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi y un enlace; y la estructura química:



5

12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el agonista selectivo del RAR $\gamma$  comprende tazaroteno.
- 10 13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agonista selectivo del RAR $\gamma$  comprende tazaroteno y en donde el uso comprende el tratamiento de lesión hepática inducida por alcohol o daño tisular del hígado asociado a una afección inflamatoria.
- 15 14. Un método *in vitro* para inhibir la activación de las células NKT tipo I proinflamatorias, comprendiendo el método poner en contacto una cantidad eficaz de un agonista selectivo del RAR $\gamma$  con las células NKT tipo I proinflamatorias, en donde el agonista selectivo de RAR $\gamma$  es más eficaz para afectar al RAR $\gamma$  en relación con el RAR $\alpha$ .
15. El método de la reivindicación 14 en donde el agonista selectivo del RAR $\gamma$  comprende tazaroteno.

Figura 1a.

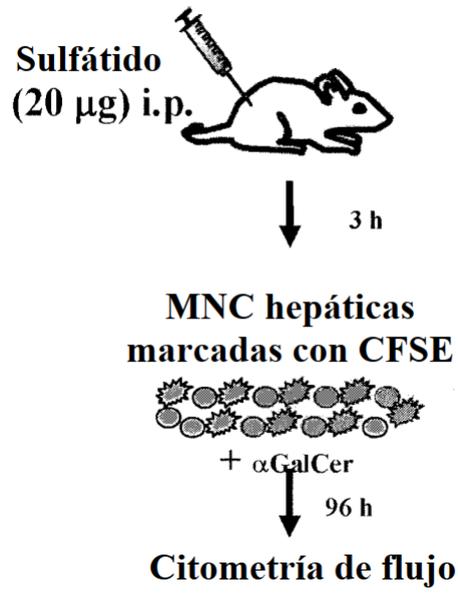


Figura 1b.

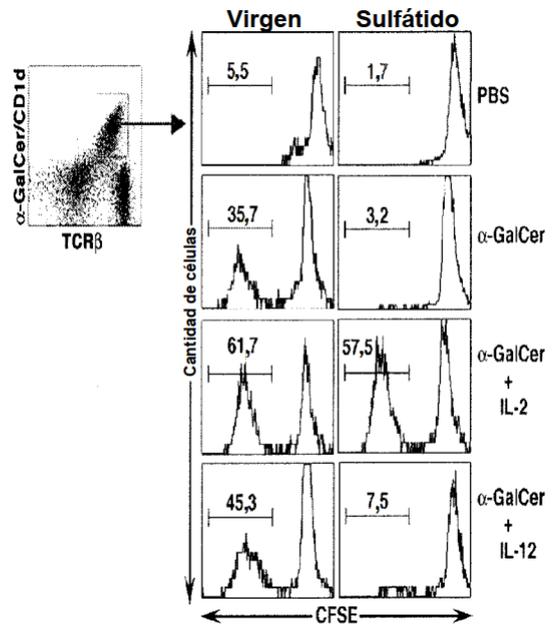


Figura 1c.

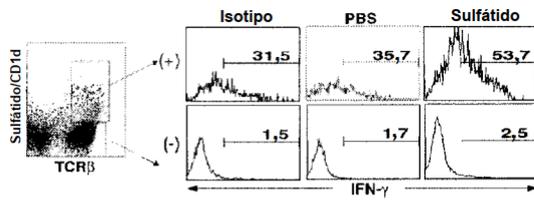


Figura 1d.

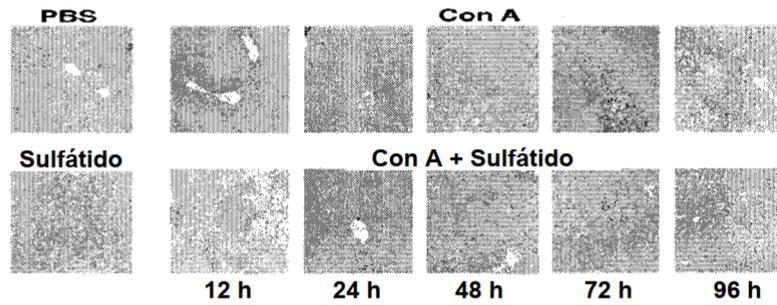


Figura 1e.

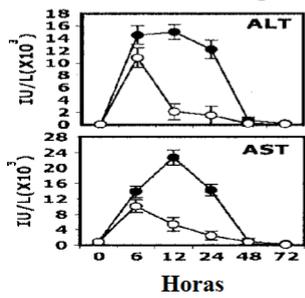


Figura 2a.

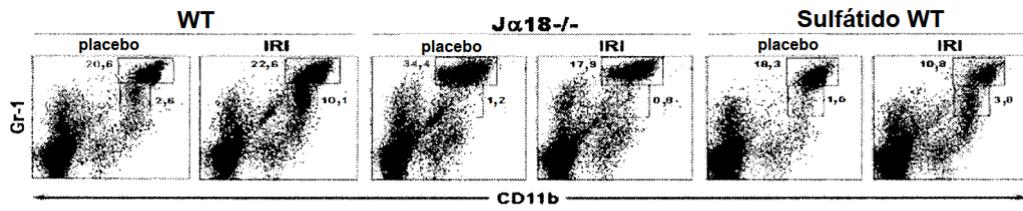


Figura 2b.

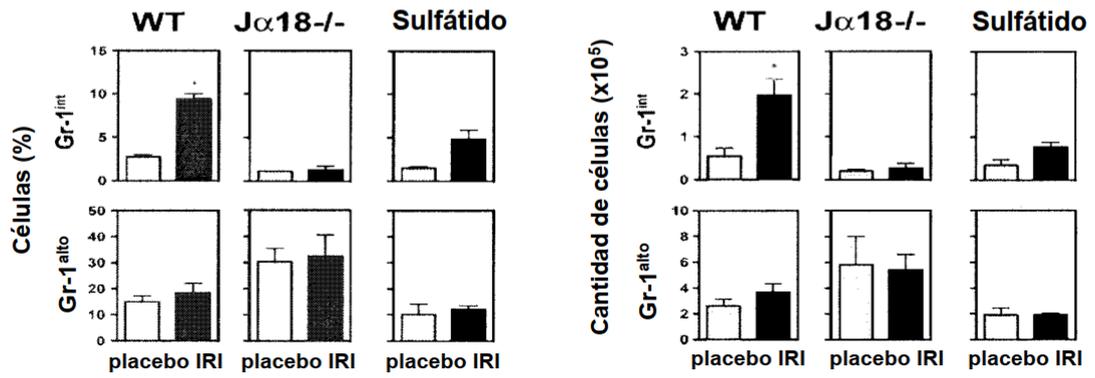


Figura 2c.

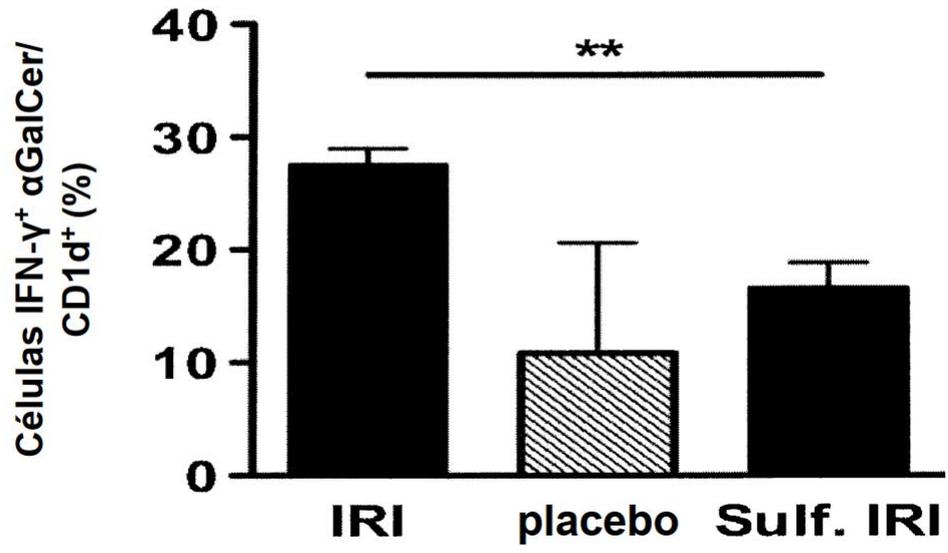
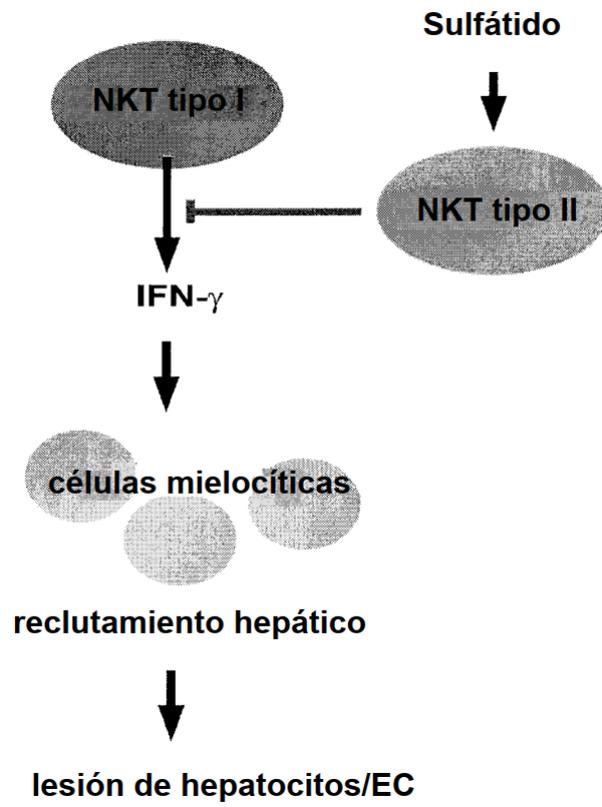


Figura 3



**Figura 4**

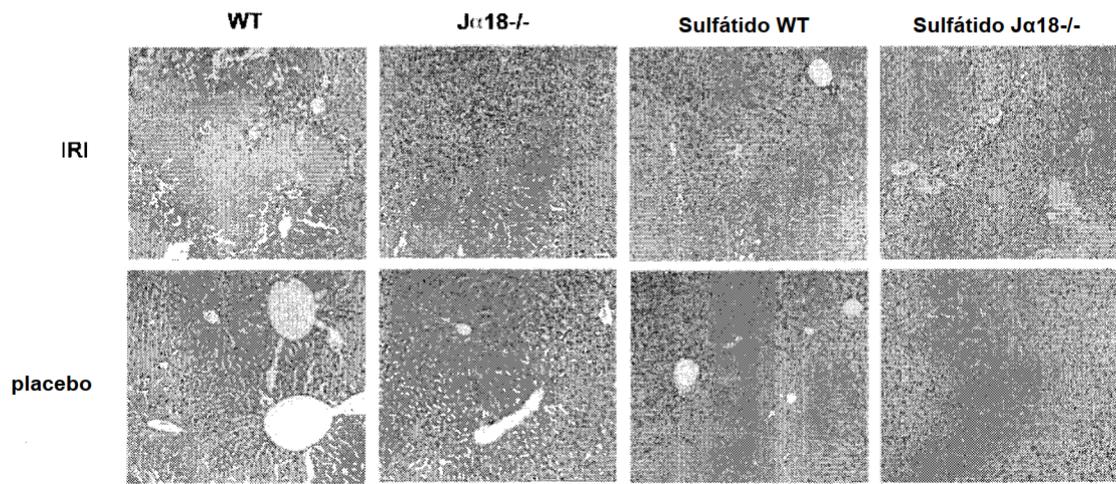


Figura 5

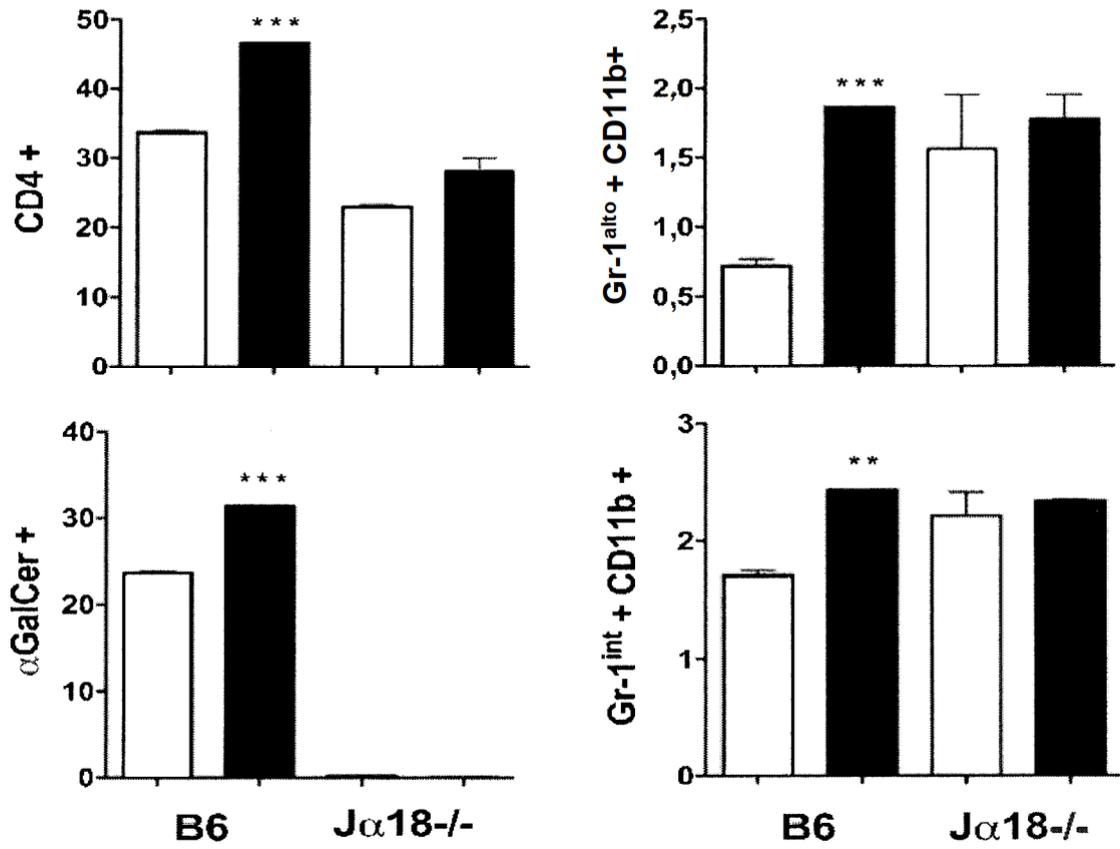
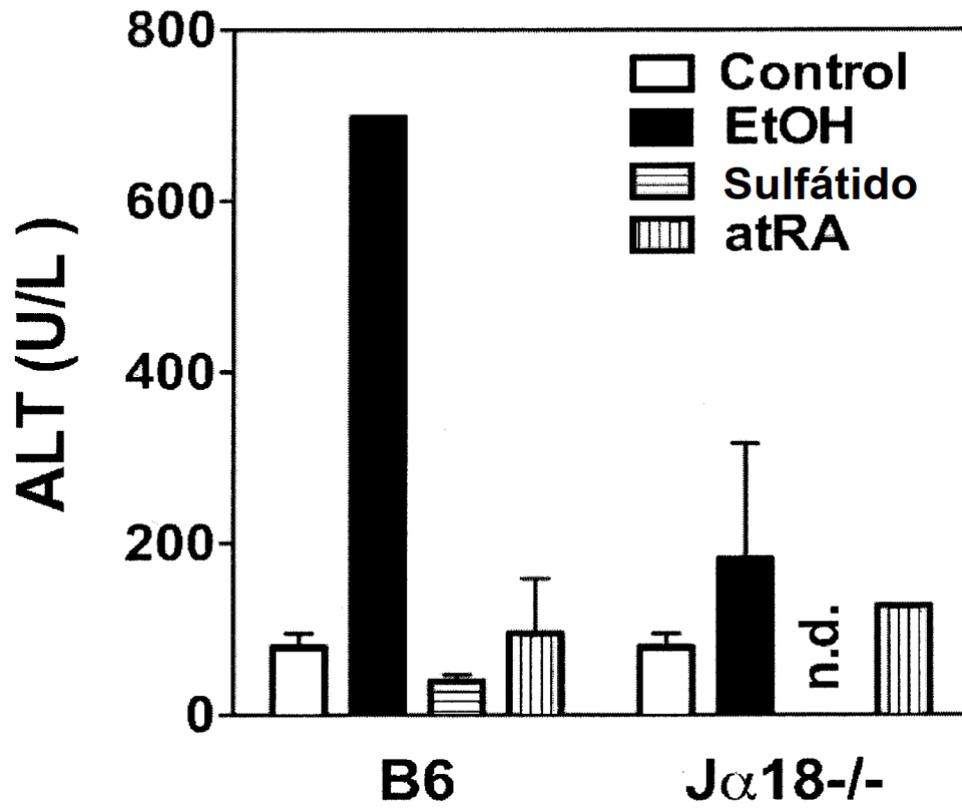


Figura 6



**Figura 7**

**Alimentación crónica + Consumo en exceso**

**Vehículo/DMSO**

**Sulfátido**

**atRA**

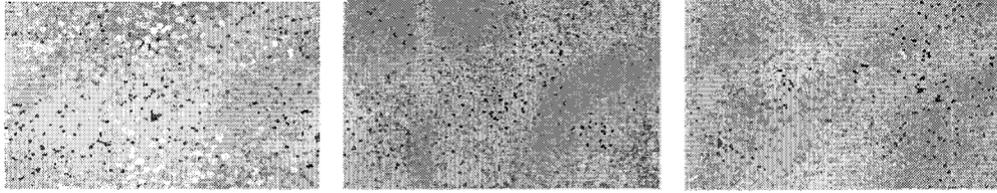


Figura 8a.

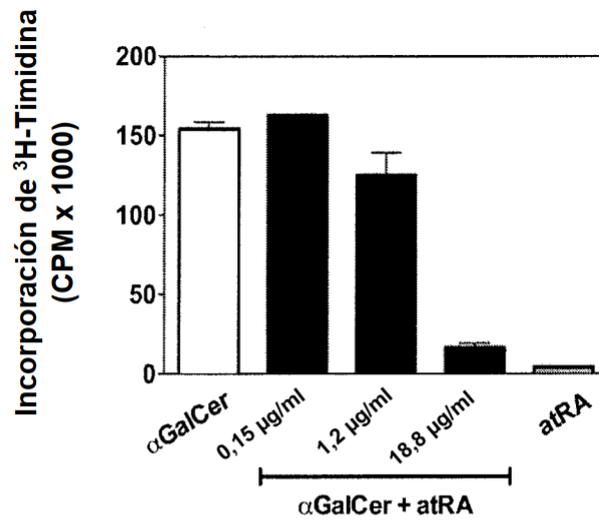


Figura 8b.

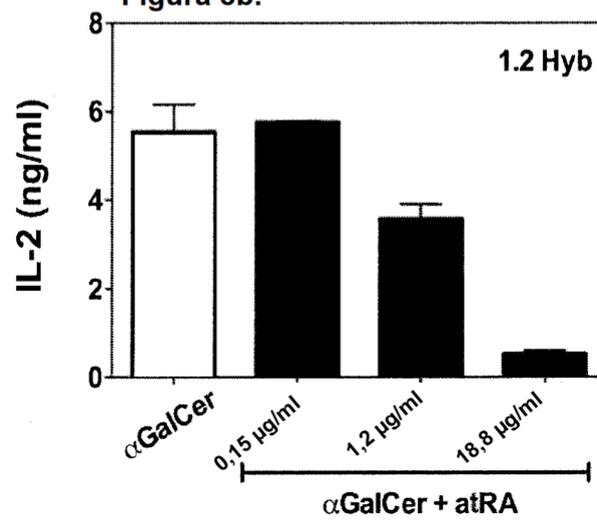


Figura 8c.

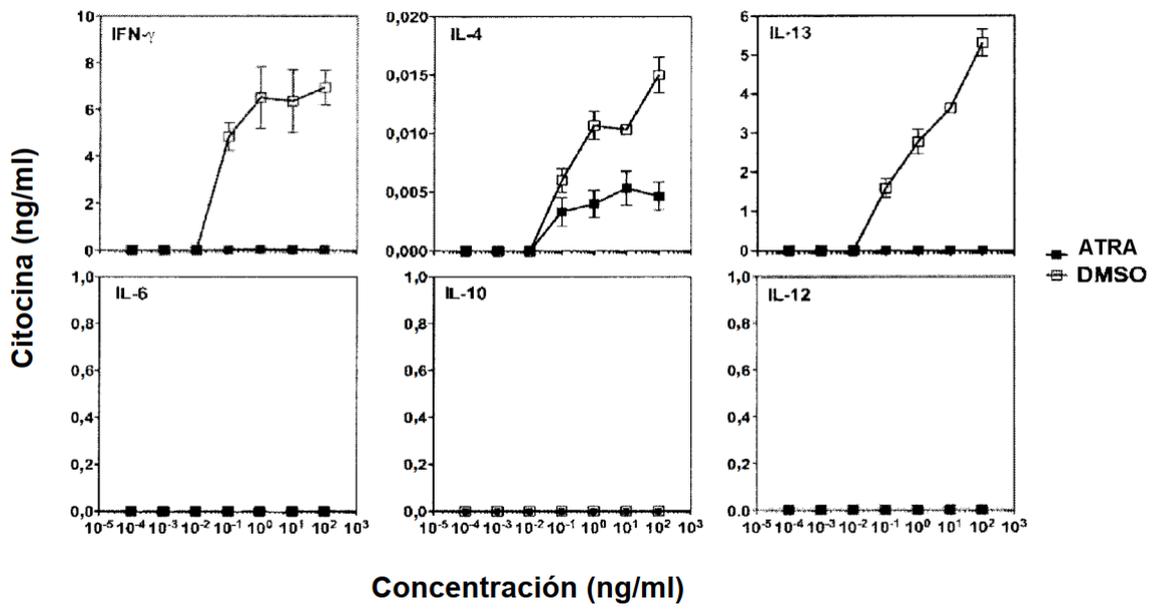


Figura 9a.

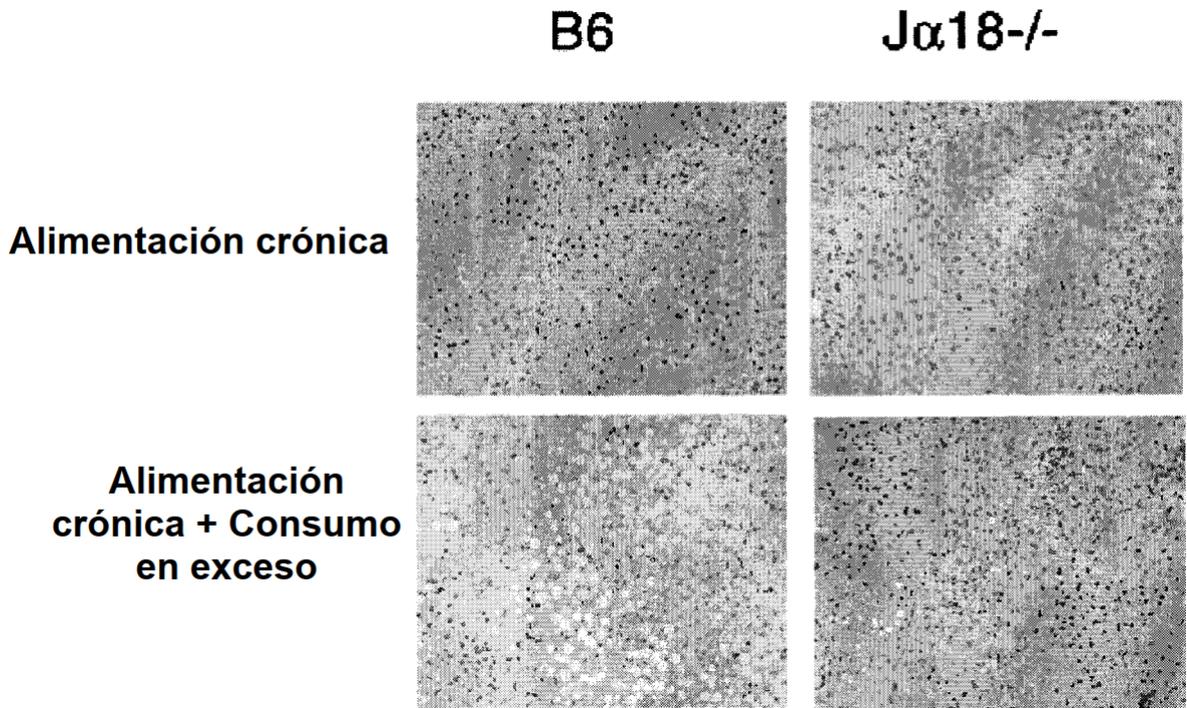


Figura 9b.

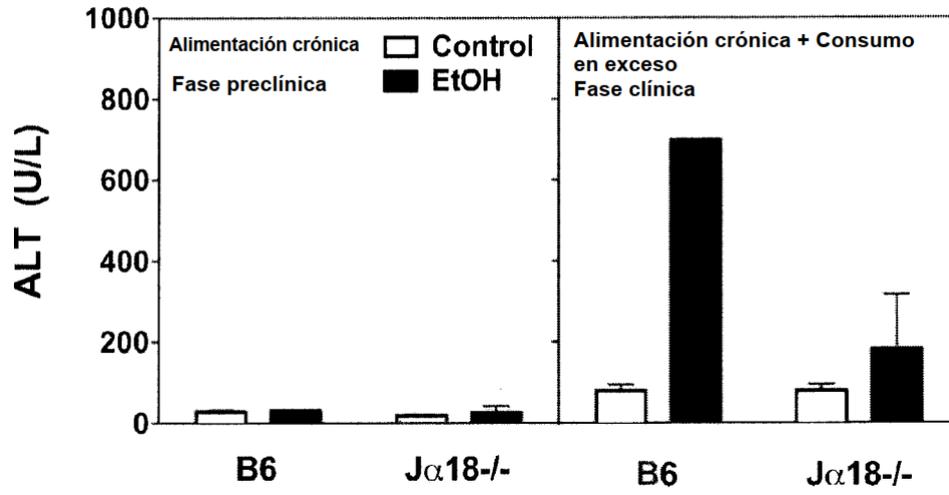


Figura 10

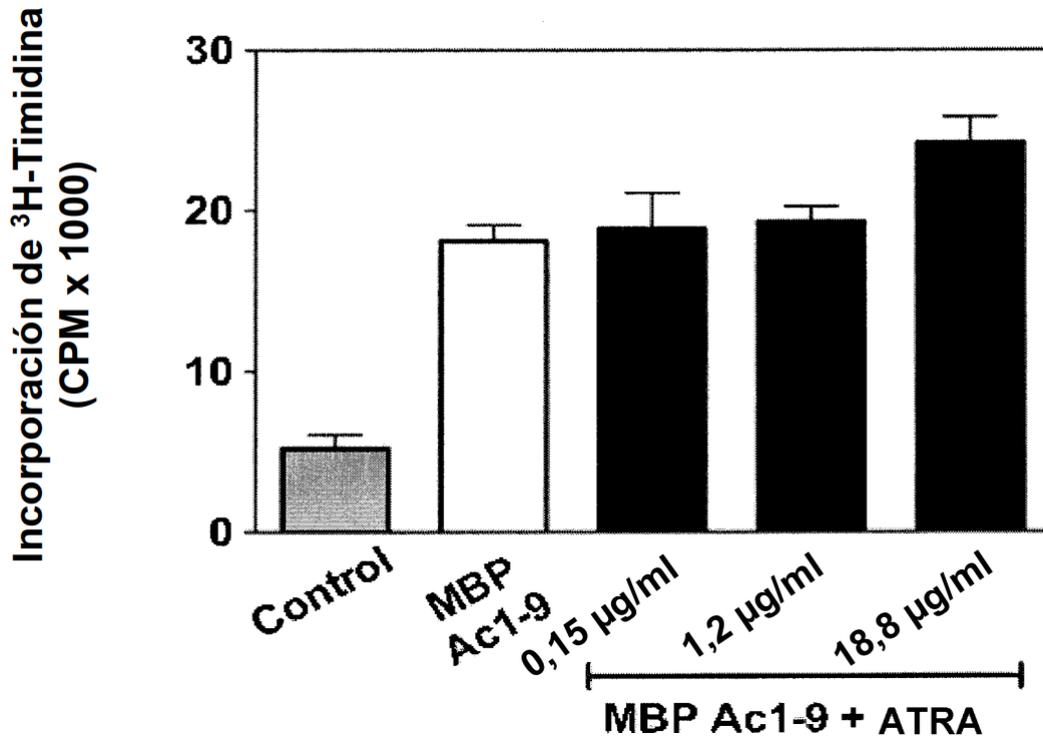


Figura 11

1.2 Hyb

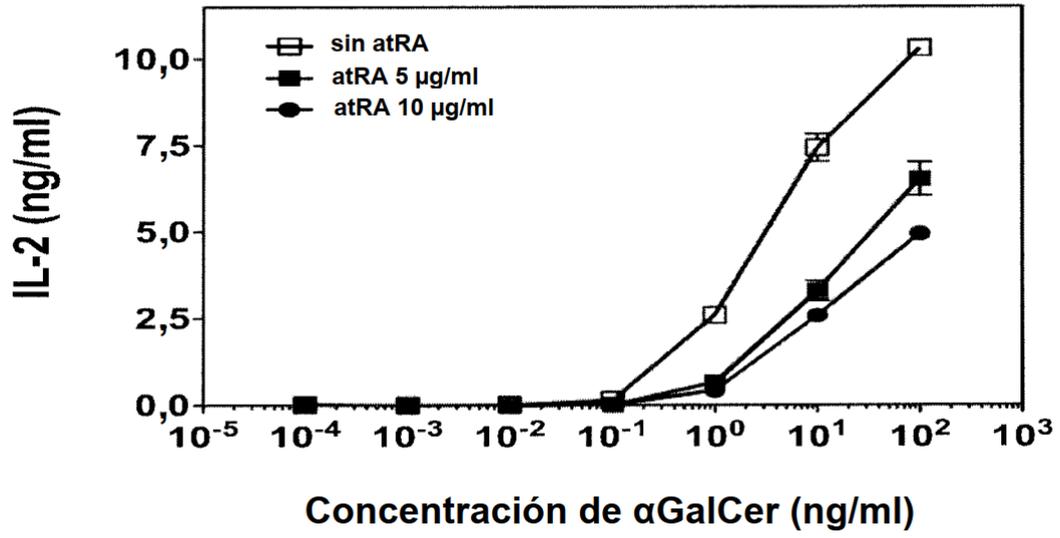


Figura 12

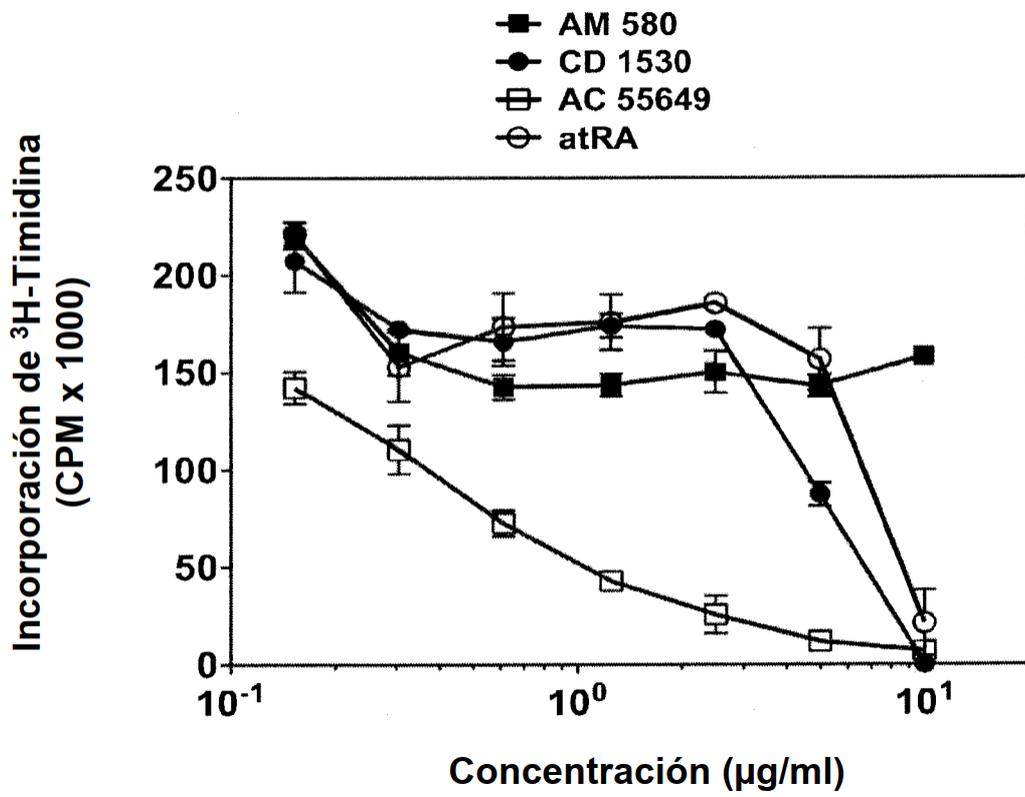


Figura 13

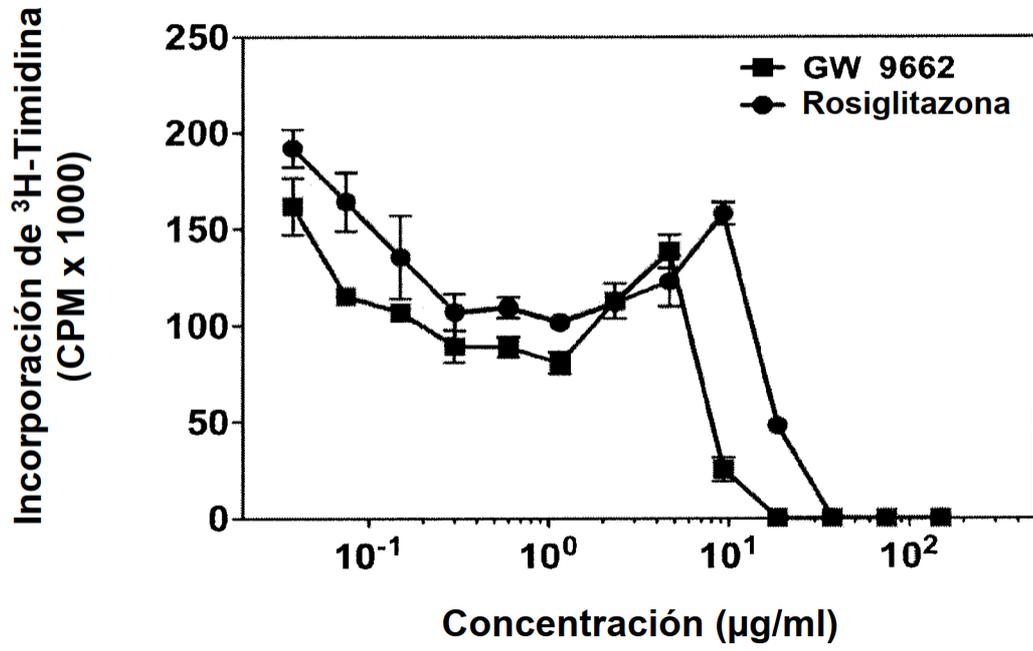


Figura 14

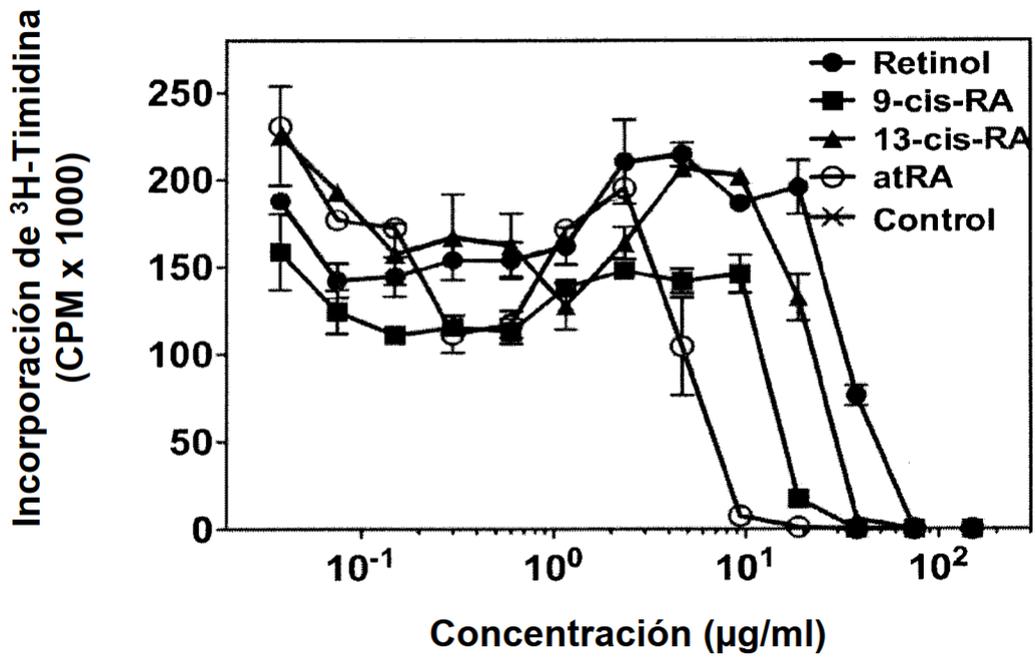


Figura 15

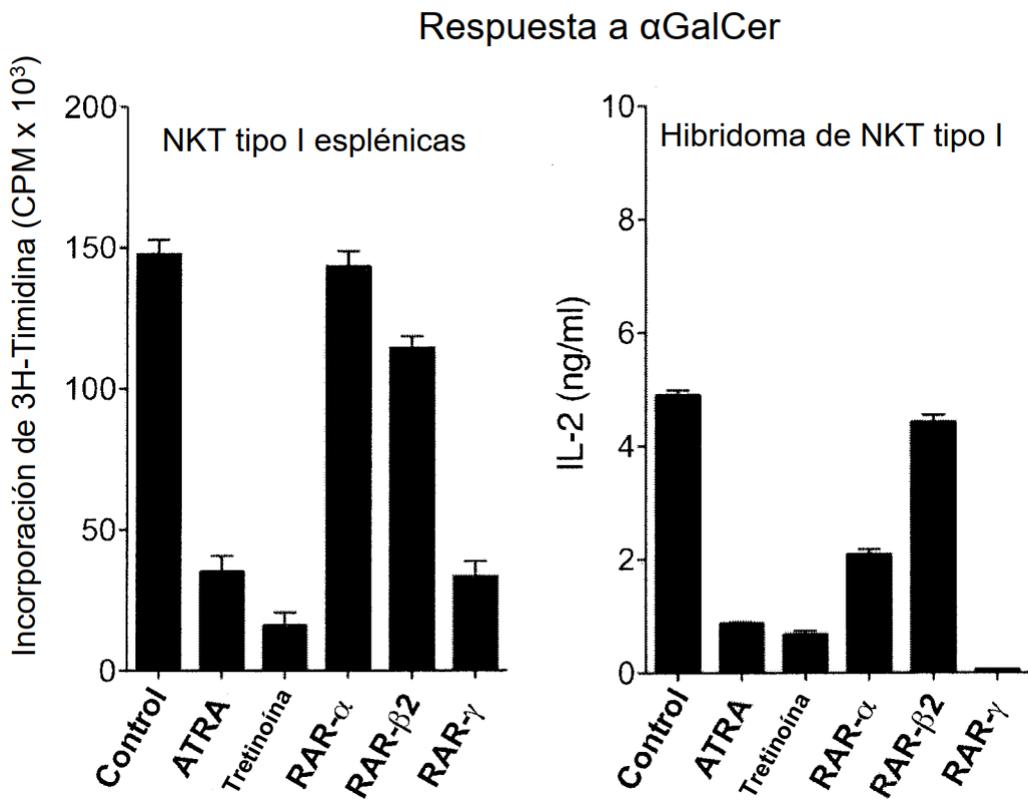


Figura 16

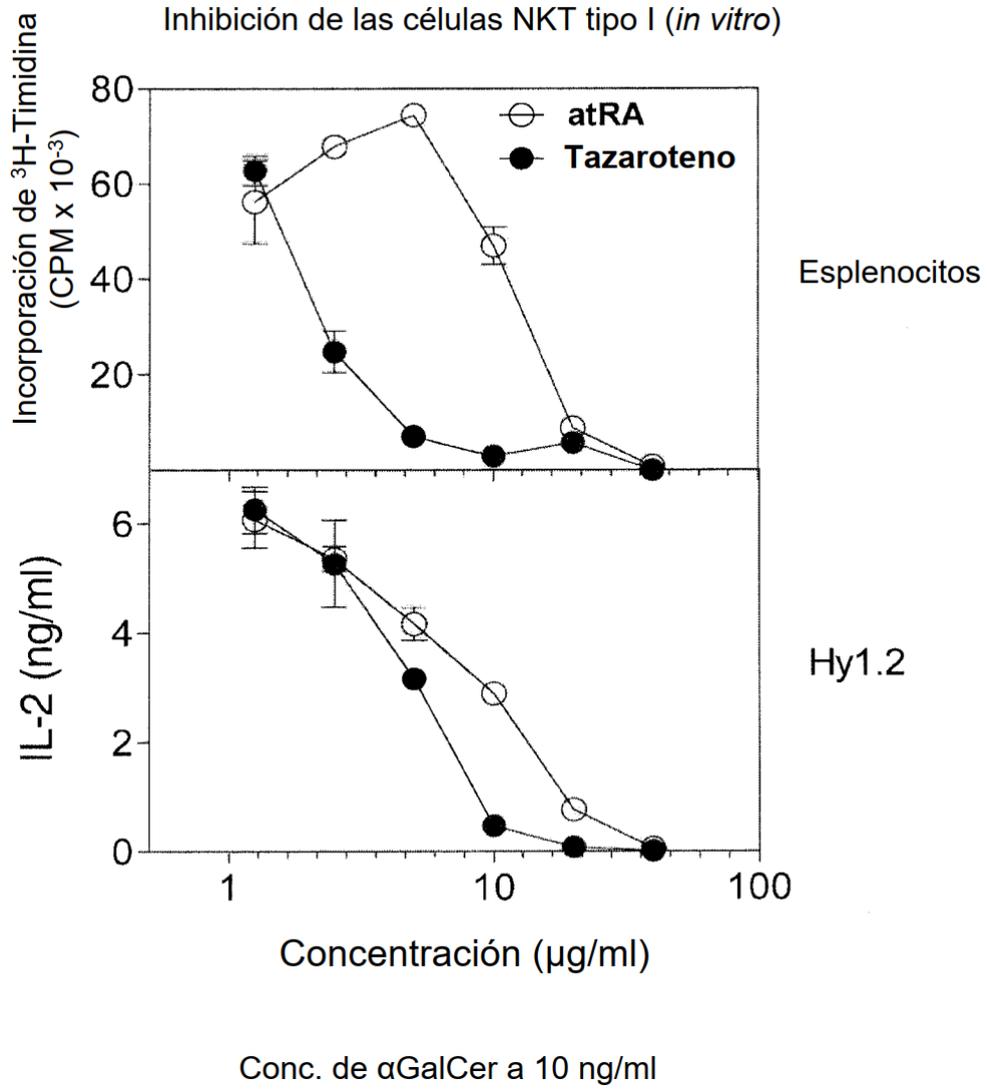
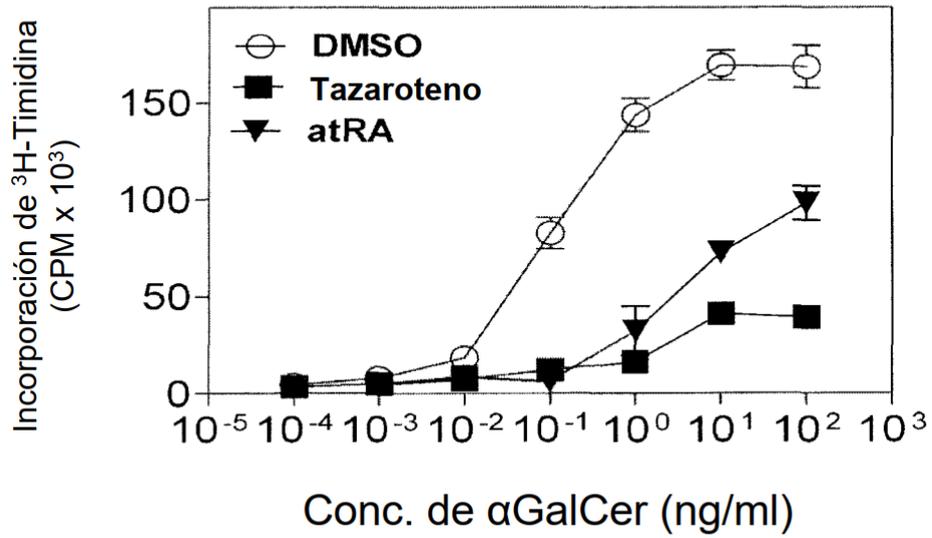


Figura 17

Inhibición de las células NKT tipo I (*in vitro*)



5 inyecciones, proliferación del bazo

Figura 18

