

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3875022号
(P3875022)

(45) 発行日 平成19年1月31日(2007.1.31)

(24) 登録日 平成18年11月2日(2006.11.2)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 38/44 (2006.01)	A 6 1 K 37/50	
A 6 1 K 36/42 (2006.01)	A 6 1 K 35/78	S
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	

請求項の数 8 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-527633 (P2000-527633)	(73) 特許権者	500327175
(86) (22) 出願日	平成11年1月12日 (1999.1.12)		フラクタルス バイオテック
(65) 公表番号	特表2002-500236 (P2002-500236A)		FRACTALES BIOTECH
(43) 公表日	平成14年1月8日 (2002.1.8)		フランス、エフ-75015 パリ、プー
(86) 国際出願番号	PCT/FR1999/000031		ルバード ドゥ ジェネラル マーティア
(87) 国際公開番号	W01999/035247		ル ヴェリン 59
(87) 国際公開日	平成11年7月15日 (1999.7.15)		12, allée du Petit C
審査請求日	平成14年2月15日 (2002.2.15)		hevincourt, F-78470
(31) 優先権主張番号	98/00205		Saint-Remy-les-Chev
(32) 優先日	平成10年1月12日 (1998.1.12)		reuse FRANCE
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100065248
			弁理士 野河 信太郎
		(72) 発明者	デュガ, ベルナル
			フランス、エフ-95150 タヴェルニ
			、リュ オーギュスト ゴダール 7
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異種スーパーオキシドジスムターゼ (HSD) の新規な治療上の用途、及び該HSDの選択方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞及び臓器の変質が認められる疾患の治療用医薬品を製造するための、本質的にイムノ-レドックス活性を有する植物の異種SODの使用。

【請求項 2】

SODが硝酸化されていることを特徴とする請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

SODがメロン由来であることを特徴とする請求項 1 及び 2 のいずれかに記載の使用。

【請求項 4】

神経変性疾患、肝硬変、レンチウイルス感染、寄生虫感染及び抗ウイルス剤の使用により引き起こされた医原性疾患からなる群から選択される変性疾患の治療用医薬品を製造するための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の使用。

【請求項 5】

(a) 任意に修飾されているSODのジスムターゼ活性を測定し、
 (b) ジスムターゼ活性を有しないか、又は少なくとも10の因子で減じられるジスムターゼ活性を有するSODを選択し、かつ
 (c) 内因性SODの発現が阻害される細胞システムにおいて、(b)で選択したSOD類のイムノ-レドックス活性を測定すること
 からなるのを特徴とする、本質的にイムノ-レドックス活性を有する植物のSODの選択方法

10

【請求項6】

ジスムターゼ活性を測定する工程(a)が、フェリシトクロムCを還元して行われることを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項7】

工程(c)によるシステムが、HIV-1のTatタンパク質を発現する細胞からなることを特徴とする請求項5及び6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

抗ウイルス剤の薬物解毒用の、本質的にイムノ-レドックス活性を有する医薬品を製造するための植物の異種SODの使用。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

本発明は、異種SOD類(HSD類)のイムノ-レドックス活性の測定及び新規な治療上の用途ならびに該HSD類の選択方法に関する。

【0002】

通常酸素圧条件下で、酸素は、反応性酸素(過酸化水素及びスーパーオキシドアニオンのようなフリーラジカル、ヒドロキシルラジカル又は酸化窒素)を生じ、これらは、生成される反応性酸素を自動制御する主要な内因性機序(抗酸化物質、金属キレート剤、解毒酵素)を少なくとも3つ有する細胞によって迅速に破壊される。

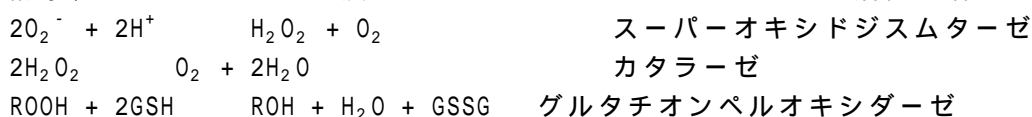
逆に、これらの機序に影響が及ぼされるか又は反応性酸素、特にフリーラジカルの生成があまりにも多い場合には、酸化ストレスと病的状態の発生がみられる。

20

【0003】

鉄、銅、亜鉛又はマンガンを含む金属タンパク質群を形成するスーパーオキシドジスムターゼつまりSOD類は、これらのスーパーオキシドラジカル(O_2^-)の毒性から細胞を守るためにスーパーオキシドアニオンの不均化を誘導できる酵素である。

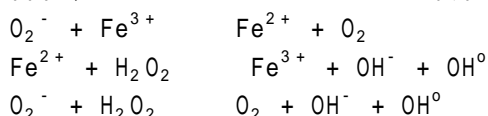
スーパーオキシドアニオンは、一般に、酸素がイオン照射に付される際に生じる付加電子を分枝状酸素が獲得した際に形成する。このアニオンは寿命が短く、SODによって過酸化水素に転化される(不均化)。この不均化は、細胞酸化剤でもある過酸化水素を生じる。過酸化水素濃度の上昇に応じて、細胞は、次のスキームにより過酸化水素の除去に関連した酵素、つまりカタラーゼ及びグルタチオンペルオキシダーゼの活性を増す：



30

【0004】

十分量のカタラーゼ及びグルタチオンペルオキシダーゼの不存在下、及び特に細胞病変に起因する少量の鉄の存在下では、過酸化水素は、以下のスキームによって、より毒性の化合物、ヒドロキシルラジカルに転化される(フェントン反応)：



40

【0005】

酸素由来フリーラジカルは多くの疾患に関与していると考えられるため、治療におけるSODの使用は、炎症状態(例えば炎症性関節症)のような反応性酸素により引き起こされる病状 [R. NORDMANNら、Cah. Nutr. Diet., 1991, 26, 6, 398-402]；肺疾患、より詳しくは気管支肺の形成異常、又は著しい量の酸素の存在に関連した他の毒性症状(中枢神経系、虚血、無血管性胃腸疾患、眼性疾患(局所的には前眼房)、又は抗癌治療の望ましくない作用に対するための闘い)において推薦されている。SODは提案され、多少なりとも成功している [Greenwald R.A., Free Radical Biol. Med., 1990, 8, 201-209]。

【0006】

2つの異なる発生群に属する3つの別のタイプのSODが、記載されている；

- 銅と亜鉛を含有するSOD。これは、通常、真核細胞の細胞質ゾル、哺乳類の細胞外液及

50

びある種の細菌に局在する。

- マンガンを含有するSOD(MnSOD)又は鉄を含有するSOD(FeSOD)。これは、原核生物又はミトコンドリアに通常局在する(MnSOD)。

- 鉄を含有するSOD(FeSOD)。これは、嫌気性細菌と原核生物に局在する。

試験されたSODのうち、半減期が維持され(sustained)、免疫学的性質のアクシデントの発生数が低いSODが、好ましい。特に、ウシ由来のCu/Zn-SOD(スーパーオキシドラジカルの不均化を触媒するホモ二量体)、大腸菌のMn-SOD、Fe-SOD、リポソームSOD類、ポリエチレングリコール結合SOD類、SODのポリマー又はコポリマー、ヒト組換え体CuZn-SOD及びMn-SOD、ならびに植物由来SOD類が挙げられる。

【0007】

種々の炎症阻害試験において、異種SOD類は、同種のSOD類より極めて大きい抗炎症活性を示すことが見出されている。

例えば、炎症がカラギーナンで誘導されているラットのモデルでは、種々のSOD類の抗炎症活性は、以下のとおりである：大腸菌Mn-SOD > ウシCu-SOD > ヒトCu-SOD > 酵母Cu-SOD > 植物Cu-SOD。この場合、ラットのCu-SODは、著しいプロ-炎症活性を示す；炎症がアドリアマイシンで誘導されているラットモデルでは、種々のSOD類の抗炎症活性は、以下のとおりである：ウシCu-SOD > 大腸菌Mn-SOD。ラットの同種Cu-SODは完全に不活性であるが、酵母のCu-SODはプロ-炎症応答を生じる。

【0008】

本出願人は、予期しなかったことに、異種SOD類(HSD類)が、ジスムターゼ活性に加えて、ジスムターゼ活性と分離することができるイムノ-レドックス活性を有していることを見出した。

本発明の目的において、「イムノ-レドックス(immuo-redox)活性」は、内因性SOD、カタラーゼ及びグルタチオンペルオキシダーゼの産生刺激を意味することを意図する。

本質的にイムノ-レドックス活性を有する、このような異種SOD類は、プロ-炎症性反応を誘導しないという事実に加えて、内因性SODの産生を誘導し、カタラーゼならびにグルタチオンペルオキシダーゼの産生を刺激する。このようにして、このようなSOD類は、細胞と臓器の変質から保護する非特異的な防御を増強する。

【0009】

本発明の対象は、細胞及び臓器の変質が認められる疾患の治療用医薬品を製造するための、本質的にイムノ-レドックス活性を有する植物の異種SODの使用である。

非特異的な防御を増強する、このような異種SOD類は、変質から細胞を保護する。つまり、それらは、変質；照射で誘導される後症作用のような変性病状、パーキンソン疾患、アルツハイマー疾患など、感染剤によって誘導される変性(エイズ、ビルハルチア、感染後の肝硬変(C型肝炎))又は医原性変性(薬物解毒作用)の由来がどのようなものでも、えり抜きの抗変質医薬品を構成する。

【0010】

有利な使用例によれば、本質的にイムノ-レドックス活性を有するSODは、硝酸化SODである。このようなSODは、そのジスムターゼ活性を失うが、イムノ-レドックス活性を保持している。

カタラーゼの誘導とグルタチオンペルオキシダーゼの産生が弱すぎて要求を満足できない際には、ジスムターゼ活性と過剰な過酸化水素の産生に関連したプロ-炎症活性のあらゆる危険性を回避するのが有用である。

驚くべきことに、ヒトの医薬品として用いられる本発明のSOD(HSD)類は、もはや、つまり実際には既にジスムターゼ活性を示さないが、イムノ-レドックス活性を保持しており、内因性SODの産生、ならびにカタラーゼとグルタチオンペルオキシダーゼの産生を刺激する。

【0011】

別の有利な使用例によれば、植物の異種SODは、特にメロンから誘導される。

別の有利な具体例によれば、SOD類は、神経変性疾患、肝硬変、レンチウイルス感染、寄

10

20

30

40

50

生虫感染及び医原性疾患(薬物解毒)からなる群から選択される変性疾患の治療用医薬品の製造に用いられる。

また、本発明の対象は、

(a) 任意に修飾されているSODのジスムターゼ活性を測定し、

(b) ジスムターゼ活性を有しないか、又は少なくとも10の因子で減じられるジスムターゼ活性を有するSODを選択し、かつ

(c) 内因性SODの発現が阻害される細胞システムにおいて、(b)で選択したSOD類のイムノ-

レドックス活性を測定することからなるのを特徴とする、本質的にイムノ-レドックス活性を有する植物の異種SODを選択する方法である。

この方法の有利な例によれば、ジスムターゼ活性を測定する工程(a)は、フェリシトクロムCを還元して行われる。

この方法の別の有利な例によれば、工程(c)によるシステムは、HIV-1のTatタンパク質を発現する細胞からなる。

【0012】

前記の記載に加えて、本発明は、本発明の対象である方法の使用例に関する以下の記載から明らかになるであろう他の記載、ならびに添付の図面からなる。

図1は、種々の条件下におけるU937細胞中での内因性SODの発現に関するSDS-PAGE電気泳動プロフィールを示す。

図2は、外因性SODで活性化後のU937細胞の内因性SOD活性を示す。

図3(グルタチオンペルオキシダーゼ)と図4(カタラーゼ)は、他の内因性酸化防止酵素が活性化される条件を示している。

図5は、種々のSOD類のジスムターゼ活性の比較を示している。

図6と7は、種々のSOD類のイムノ-レドックス活性の比較を示している。

図8と9は、自発、又はTSST-1のようなブドウ状球菌の体外毒素でCLCを刺激した後のAZTの毒性作用を示す。

図10は、CLC類における幾つかの抗レトロウイルス剤の毒性作用ならびに硝酸化SOD類の作用を示す。

図11は、自発、又はHIV-1に慢性感染したU1細胞のTSST-1誘導性アポトーシスにおけるAZTの作用を示す。

図12と13は、アルツハイマー疾患とパーキンソン疾患の2つの変性病状における種々のSOD類の作用を示す。

図14と15は、肝臓の組織片を示す。

図16は、HSD1のイムノ-レドックス活性における抗HSD-1抗体の存在の作用を示す。

図17と18は、HIV-1ウイルスの複製と、ウイルスに慢性的に感染したU1細胞のアポトーシスによる死滅における、HSD1と組み合わさった抗HSD1抗体の作用を示す。

【0013】

上記から明らかのように、本発明は、より明確に記載したにすぎない実施方法、製造及び応用に、いかなる方法によっても限定されない。逆に、本発明の要旨又は範囲から逸脱しない限り、当業者がなし得る全ての変形を包含するものである。

【0014】

実施例1：SOD類のイムノ-レドックス活性の測定

I. 材料と方法

- 細胞培養

ヒトの前単球性白血病細胞系U937を、HIV-Tatタンパク質10 μ g/mlの存在下(活性化)又は不在下(対照)で、ペニシリン100 U/ml、ストレプトマイシン100 μ g/ml及びウシ胎児血清5%で栄養価を高めたイスコブ(Iscove)培地中2 \times 10⁵細胞/mlの最終濃度で培養する。各実験について、30U/mlのSOD [ヒトの組換え体(HuSOD)、ウシ(HSD1, Sigma, St Louis, MO)又は植物(メロン由来)(HSD2, Bio-Extraction, Bron, France)]を培地に加え、24時間湿気のある5%CO₂を含む大気中で37 $^{\circ}$ Cで培養する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

- 内因性SODの測定

上記SODの存在下又は不在下でHIV-Tatタンパク質と処理しないかもしくはこれで処理したU937細胞を、5分間85℃で加熱して、10mM Tris-HCl pH 7.4、0.1% SDS、1% ノニデット (Nonidet) P-40、10 µg/ml ロイペプチン、100 µg/ml PMSF及び2 µg/ml アプロチニンからなる洗浄緩衝液に溶解する。次いで、溶解物を、簡単に超音波処理する(3x30秒)。

20 µgのサンプルを、還元条件下で12% SDS-ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動に付す。次いで、0.2 µmのビニリデンフルオライド膜にエレクトロブロットングしてタンパク質を分析し、その後、これを、ウシ血清アルブミン(BSA)1%とツイン20 0.1%を含む100mM NaCl(TBS)、10 mM Tris-HCl、pH 7.4にブロックする。

次に、インプリントを、ウサギ抗ヒトSOD抗血清又は最終濃度2 µg/mlのウサギのプレイムノ血清とインキュベートする。次いで、0.1%のツイン20を含有するTBSでインプリントを2回洗浄し、セイヨウワサビのペルオキシダーゼが結合したヤギ抗ウサギIgとインキュベートし、化学発光(luminol)でバンドを示し、オートラジオグラフィ(青い光に感受性のフィルム)で検出する。

10

【 0 0 1 6 】

- 内因性SODのジスムターゼ活性の測定

スーパーオキシドジスムターゼの全活性は、キサンチンオキシダーゼ/キサンチン系で産生されるスーパーオキシドラジカルによるフェロシトクロムcの還元阻害能力によって、上記のようにして得られる超音波処理した溶解物について測定する[McCord. J.M., 1969, J. Biol. Chem. 244, 6049]。スーパーオキシドジスムターゼの1ユニットは、室温かつpH7.8でシトクロムcの還元の50%を阻害する量として定義する。

20

- 植物の異種SODのイムノ-レドックス活性の測定

種々の由来と濃度のSODで刺激して処理した後、リン酸で緩衝させた冷生理食塩水中でU937細胞を回収し、計測する。製造者の指示に従って、TRIzol試薬(Life Technologies 15596) 1ml中で標準的な技法により全RNAを抽出する[Chomczynski. P., 1987, Anal. Biochem. 162, 156]。抽出後、RNAをイソプロピルアルコールで沈澱させ、ペレットを70%エタノールで洗浄して空気を乾燥した。乾燥したペレットを、50 µlの0.5 mM EDTA、pH 8に再懸濁して、分光測光で定量する。

逆転写には、6 µlの5x逆転写緩衝液(250 mM Tris-HCl、42℃でpH 8.3、50 mM MgCl₂、300 mM KCl、50 mM DTT)を有する1 µlのスーパースク립トII逆転写酵素[Life Technologies # 18089]、リボヌクレアーゼ阻害剤0.5 µl、オリゴ-dT (1 mg/ml) 1.5 µl 及び6 µlの2.5 mM dNTP (Boehringer Mannheim)の反応混合物中、オリゴ-dTのユニバーサルプライマーの存在下で、10 µl中、全2 µgのRNAを用いてcDNAを合成する[Young R.A., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1194]。

30

【 0 0 1 7 】

65℃で全RNAを5分インキュベーションし、氷上で冷却した後、反応混合物を加え、42℃で1時間反応させる。

PCR増幅には、同量のcDNAを50 µlの反応容量(25 mM TAPS pH 9.3、50 mM KCl、1 mM MgCl₂、各dNTP 100 µM、各プライマー 20 µM及びゴールドスター(Goldstar)ポリメラーゼ1ユニット)で30サイクルに付す。

40

増幅プログラムは、92℃で60秒、58℃で60秒及び74℃で60秒からなる5回のサイクル、その後、92℃で30秒、60℃で60秒及び74℃で60秒からなる25回のサイクルからなっている。温度は、さらに3分74℃に維持される。次いで、陽性のPCR増幅は、0.5xTAE緩衝液中1.2%アガロースゲルでの電気泳動によって決定される。

- カタラーゼとグルタチオンペルオキシダーゼを発現する遺伝子の転写の決定 処理又は未処理のU937細胞の全細胞RNAは、1979年のChirgwinら[Chirgwin J.M., 1979, Biochemistry, 18, 5294]にしたがって製造する。

逆転写とPCR増幅について、手順は上記のようにして行う。

RT-PCRについては、プライマーは、下記の文献に記載されている：

50

- MnSOD RNAの転写: Beck, Y., 1987, Nucl. Acid. Res., 15, 9076,
- Cu/ZnSOD RNAの転写: Sherman, L., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 5465,
- グルタチオンペルオキシダーゼRNAの転写: Mullenbach, G.T., 1987, Nuc. Acid. Res., 15, 5484,
- カタラーゼRNAの転写: Ponte, P., 1984, ibid 12, 1687/Sukenaga, Y., 1987, ibid, 15, 7178/Zeviani, M., 1987, Gene, 55, 205。

【 0 0 1 8 】

- 異種SOD類のイムノ-レドックス活性における抗-異種SOD抗体の存在の役割
異種SOD/抗-異種SOD抗体の相乗作用を解明するために、SOD類の異種活性におけるHSD1/抗-HSD1抗体イムノ複合体のインビトロ作用を研究した。

10

慢性的にHIV-1に感染しているU937細胞(U1細胞)とp24産生レベルが低い(< 250 pg/10⁵細胞/3日の上清中のml)細胞を、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン及び10%ウシ胎児血清(Gibco products)を補足したRPMI培地に培養する。それらは、p24の産生とアポトーシスの評価に用いる。

抗-HSD1抗体は、マウスIgG1類である(Valbiotech)。

実施した実験(図16~18)において、HSD1は10µg/ml、つまり30 U/mlで用い、抗-HSD1抗体も10µg/ml濃度で用いる。

【 0 0 1 9 】

II. 結果

U937 HIV-Tat刺激細胞での外因性SODにおけるイムノ-レドックス活性の測定

20

- 内因性SODの発現:

HIV-Tatタンパク質は、Cu/Zn-SODの発現を変えずに、U937細胞でのMn-SODタンパク質の発現を、独力でかなり減じることができる[Flores C.S., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7632]。逆に、HSD2(修飾又は未修飾の植物のSOD)は、刺激されていないU937細胞中で測定される基本的な発現を単独で強化することができる。もっとも有意な結果は、HIV-Tat活性化細胞で得られる。ここでは、Mn-SOD発現は、ヒトSOD処理後に依然として検出されないが、SODとは異種のHSD2で処理後には発現が回復される(図1)。

- 内因性SODの活性

U937細胞においてHIV-Tatタンパク質が誘導するMn-SOD発現の阻害は、種々の異種SOD類: HSD1(ウシSOD)又はHSD2(植物SOD)によって高められるが、ヒトSOD(HuSOD)のような同種SODによっては高められない。これは、HIV-Tatタンパク質が誘導するU937細胞のMn-SOD発現阻害は、図2に示すように異種の状況でのみ外因性SODによって高められ、この状況で発現されるMn-SODは活性であることを示唆している。

30

【 0 0 2 0 】

- 他の酸化防止酵素の内因性活性:

HIV-Tatタンパク質は、ペルオキシダーゼの還元基質であり、ヒラ細胞ならびにジャーカット(Jurkat)細胞でグルタチオンペルオキシダーゼ(Gpx)によって触媒されるグルタチオンGSHの全量を減ずる[Westerndorp M.O., 1995, EMBO J.; 14, 546]。

HIV-Tatタンパク質がU937細胞でのGpxの転写を低下しないあいだに、植物のSOD(HSD2)はその転写を刺激することができるが、HuSODは図3に示すようにそうすることができない

40

。異種SODによる内因性カタラーゼの転写レベルと同程度の強化が、図4に示されるように、HIV-Tatタンパク質で処理した細胞と同量の未処理細胞で認められる。

これらの結果は、HIV-Tatタンパク質を用いて得られるHIV感染刺激中のU937前単球細胞系で認められるような酸化ストレスのあいだに、全体的な酸化防止防御、特に内因性Mn-SODの阻害の強化は、異種SOD、好ましくはそのイムノ-レドックス活性のみを保持するように修飾されているSODでの処理によって回復されるが、同種SODでの処理によっては相対的に修飾されないことを示している。

【 0 0 2 1 】

- 異種SOD類のイムノ-レドックス活性におけるHSD1/抗-HSD1抗体の免疫複合体の作用

50

非感染U937マクロファージ細胞とHIV-1で慢性的に感染されたU1細胞を HSD1/抗-HSD1免疫複合体で刺激すると、図16に示す結果が得られる：HSD1類がグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)、Mn-SOD及び誘導性NOシンターゼ(iNO類)の発現を刺激するあいだに、HSD1が抗-HSD1抗体と複合すると、この刺激が著しく増強することが認められる。さらに、この同じ免疫複合体は、TNF 10ng/mlで刺激したU1細胞によるHIV-1ウイルスの複製(p24産生)を著しく減じ、最適以下用量のAZT(1µg/ml)の作用を補強する(図17)。同様に、この複合体は、AZTの存在下又は不在下で、10ng/mlのTNFで刺激したU1細胞のアポトーシスによる死滅を減じる(図18)(実施例3も参照のこと)。

これらの結果は、HSD1/抗-HSD1免疫複合体が、HSD1類の薬理作用を著しく増強することを示している。したがって、最適な薬理作用は、注射又は接種後の免疫系の刺激が支持している免疫活性を誘導するため(抗-HSD1抗体の産生)、異種SOD類を用いて得られる。

【0022】

実施例2：修飾SOD(硝酸化SOD)のジスムターゼ活性の喪失の測定

I. 材料と方法

- グルタチオンペルオキシダーゼ活性の測定：実施例1参照、
- Mn-SODの測定：実施例1参照
- 標的細胞：循環リンパ様細胞、つまりCLC。これは、U937細胞について実施例1に記載するのと同じ条件で培養する。
- 硝酸化SODの製造：これは、Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 11853-11858にあるL.A. MacMillan-Crow名義の文献に記載の方法にしたがって製造する。

II. 結果

図5は、硝酸化SOD類は、ジスムターゼ活性を喪失していることを示している。特に、本質的にイムノレドックス活性を有するSODの投与は、循環リンパ様細胞、つまりCLC類でホルボル(phorbol)エステル(PMA)が誘導するスーパーオキシドアニオンの産生に作用しない。しかし、内因性グルタチオンペルオキシダーゼとMn-SODの刺激は、同じ標的細胞では認められる(図6及び図7)。

【0023】

実施例3：医原性由来細胞変質におけるSOD類の作用：抗ウイルス剤の場合

I. 材料と方法

- 試薬
- * 慢性的にHIV-1に感染しているU937細胞(U1細胞)とp24産生レベルが低い(< 250 pg/10⁵細胞/3日の上清中/ml)細胞を、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン及び10%ウシ胎児血清(Gibco products)を補足したRPMI培地で培養する。それらは、p24の産生とアポトーシスの評価に用いる。培養培地、化学生成物及びウシ胎児血清は、これらのU1細胞に対する直接作用のない場合について試験する(活性マーカーとしてTNF-及びp24の発現)。培養液には、TSST-1(ブドウ状球菌体外毒素)(Sigma, Paris, France)、ヒトCu/Zn SOD(HuSOD)、ウシSOD(HSD1)(Sigma, St. Louis, MO)又はBio-Extraction(Bron, France)より供給されるメロンCu/Zn SOD(HSD2)も補足する。

これらのU1細胞は、TSST-1(10µg/ml)、ジノブイジン(Zinovudine)(AZT)(Wellcome)(1~10µg/ml)、サキナビル(Roche)又はリトナビル(Abbott)(10µg/ml)を用いて48時間刺激する。

対照実験では、抗レトロウイルス生成物のみを試験する。

幾つかの培養液には、最終濃度30U/mlでHuSOD、HSD1又はHSD2も補足する。

種々の濃度のこれらの試薬を用いる予備分析により、これらの最適用量を決定することができた。

培養して1~3日後に細胞上清を回収し、p24、亜硝酸塩及びTNF-のレベルを測定する。

目視可能な細胞は、トリパンブルー排除により計測する。

* HIV-p24(Pasteur Institute)とTNF-(Genzyme)タンパク質は、製造者推奨の指示にしたがってELISAで測定する。

* NOとNO₂⁻は、グリース(Greiss)反応によって測定する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

II. 試験

- TSST-1とHSDを評価するためのCLC培養

亜硝酸塩とTNF- α の産生ならびにアポトーシスを評価するのに用いられる、ヒト末梢血液単核細胞(CLC類)の単離と培養

CLC類は、汚染している多くの血小板を除くため、10分900rpmで遠心分離して10人の個体から単離する。次いで、血液サンプルをRPMI 1640培地(Bioprodukt)に希釈し、Ficoll-Hypaque勾配(Pharmacia)で2000rpmで20分遠心分離した後、CLC類を回収する。

これらのドナーは、感染(肝炎もしくはエイズ)も肝硬変も示さない。ドナーのなかには鼻炎や喘息の状態の者もいるが、受粉時期の戸外で、全く処置せずに試験した。

CLC類は、12もしくは24ウエルのプラスチック培養プレート(Nunc)中に、ペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン100 μ g/ml、エタノールアミン1.8 μ g/ml、トランスフェリン40 μ g/ml、インシュリン5 μ g/ml、リノール酸2 μ g/ml、オレイン酸2 μ g/ml、パルミチン酸2 μ g/ml、ウシ血清アルブミン 0.25%及びウシ胎児血清5%を補足したイスコブ培地で最終細胞濃度 2×10^6 細胞/mlで培養する。

この培養培地は、内毒素を含まない(リミルス(limulus)試験で評価)。

細胞は、TSST-1(10 μ M)及びHuSOD、HSD1又はHSD2(30U/ml)の存在下又は不在下で2~6日間、95%の空気と5%のCO₂を含む湿度のある大気(100%)中で37 $^{\circ}$ Cで培養する。

同様の実験を、AZT、サキナビル又はリトナビル(10 μ g/ml)の潜在的な毒性作用及びSOD類(30U/ml)のHuSOD、HSD1及びHSD2)の保護作用を評価するために行う。

【 0 0 2 5 】

- 亜硝酸塩(NO₂⁻)のアッセイ

産生される酸化窒素(NO^o)の量を評価するために、酸化窒素から得られる安定な最終生成物である亜硝酸塩(NO₂⁻)を、グリース反応により培養上清中でアッセイする。96ウエルのマイクロタイタープレートに、上清100 μ lならびに30%酢酸中1%スルフィンアミドからなる反応溶液100 μ l及び60%酢酸中0.1%のN-1-ナフチルエチレンジアミンジヒドロクロライドを加える。

標準曲線は、イスコブ培地に希釈したNaNO₂を用いて行う。光学密度(OD)は、540nmで測定する(Dynatech Laboratories Inc., Alexandria, Vaのリーダー)。

- アポトーシスの測定

アポトーシス初期の状態であるU1細胞又はCLC細胞は、ヨウ化プロピジウムで同時にラベルするか、又はせずに、FITIC-ラベルしたアネキシンV存在下のホスファチジルセリンに基づく蛍光活性細胞分類(FACS)によって評価する。アポトーシスが誘導するDNAのフラグメント化も、DNAフラグメント化検出キットApoALERT (Clontech, Palo Alto, CA)を用いて評価する。

【 0 0 2 6 】

III. 結果

- 図8及び9は、自発、又はTSST-1のようなブドウ状球菌体外毒素でCLC類を刺激した後のAZTの毒性作用(図8及び図9)を示す。図10は、CLC類での幾つかの抗ウイルス剤の毒性作用ならびに硝酸化SOD類の作用を示す。この図10で、硝酸化SOD類の作用は、酸化窒素の産生(亜硝酸塩の測定(μ M))、プロ炎症性サイトカイン産生(TNFの測定(ng/ml))及び処理中(1回治療、2回治療及び3回治療)の非感染細胞(CLC類)での細胞死の評価(アポトーシス細胞の%)に認められる。

- 下記の表1は、HIV-1のウイルス複製及び慢性感染細胞(U1)のプロ炎症状態におけるAZTの作用を示す。

【 0 0 2 7 】

【表1】

10

20

30

40

AZT ($\mu\text{g/ml}$)	スーパーオキシド (+PMA)		一酸化窒素		TNF		p24 抗原	
	対照	+TSST-1	対照	+ TSST-1	対照	+TSST-1	対照	+TSST-1
0	1.1*	2.5*	0.5	5.5	<10	275	900	2512
0.01	1.5	3.3	0.8	6.1	<10	280	750	2367
0.1	2.3	3.5	0.9	7.0	<10	325	620	1235
1	2.5	4.2	0.9	12.2	55	401	312	809
10	2.9	5.1	0.9	15.3	95	805	100	312

【 0 0 2 8 】

* PMAなしの対照は、TSST-1なしで0.3及びTSST-1で0.5である。

10

20

30

40

50

酸化窒素：結果は、 μM の亜硝酸塩で示す。

TNF：結果は、 pg/ml で示す。

p24抗原：結果は、 pg/ml で示す。

【0029】

結果は、5個の異なる実験の一連の代表実験を用いて算出している。これは、4回行った平均で、標準偏差は10%を越えない。

- 表IIと図11は、HIV-1に慢性感染したU1細胞の自発的又はTSST-1誘導性のアポトーシスについてのAZTの作用を示す。

【0030】

【表2】

10

AZT ($\mu\text{g/ml}$)	アポトーシス細胞の%	
	対照	+TSST-1
0	7 \pm 2	24 \pm 3
0.01	9 \pm 1	27 \pm 1
0.1	17 \pm 4	42 \pm 3
1	25 \pm 5	61 \pm 2
10	29 \pm 4	90 \pm 4

【0031】

アポトーシス細胞の%で示す結果(Apoptagキット)は、4つの異なる実験の平均 \pm SEMを示す。

20

* 抗ウイルス剤で処理していないか又は処理しているHIV-1感染細胞の炎症状態における非硝酸化SOD及び硝酸化SOD類の作用

表IIIは、ウイルス複製におけるHuSOD、HSD1及びHSD2の作用、ならびにHIV-1に慢性的に感染(抗ウイルス剤の存在下又は不在下)したU1細胞のプログラムされた細胞死を示す。

【0032】

【表3】

刺激	p24 (pg/ml)	アポトーシス%
A: 抗ウイルス剤なし		
対照	950 ± 25	15 ± 2
HuSOD	700 ± 12	10 ± 1
HSD1	550 ± 32	8 ± 1
HSD2	480 ± 23	6 ± 2
TSST-1	1756 ± 75	89 ± 5
TSST-1 + HuSOD	1290 ± 45	75 ± 2
TSST-1 + HSD1	900 ± 56	30 ± 4
TSST-1 + HSD2	923 ± 78	34 ± 7
B: AZT 存在下		
対照	233 ± 12	45 ± 2
HuSOD	200 ± 27	35 ± 1
HSD1	125 ± 32	18 ± 1
HSD2	130 ± 26	11 ± 2
TSST-1	1056 ± 45	98 ± 1
TSST-1 + HuSOD	890 ± 21	70 ± 2
TSST-1 + HSD1	300 ± 76	17 ± 4
TSST-1 + HSD2	223 ± 78	15 ± 7
C: サキナビル存在下		
対照	763 ± 45	15 ± 2
HuSOD	301 ± 12	13 ± 1
HSD1	223 ± 33	9 ± 1
HSD2	170 ± 21	10 ± 2
TSST-1	925 ± 54	75 ± 5
TSST-1 + HuSOD	700 ± 29	65 ± 2
TSST-1 + HSD1	313 ± 24	24 ± 5
TSST-1 + HSD2	208 ± 21	19 ± 7

10

20

【 0 0 3 3 】

【表 3 (続き) 】

30

D: リトナビル存在下		
対照	843 ± 56	15 ± 2
HuSOD	658 ± 12	10 ± 1
HSD1	221 ± 11	4 ± 1
HSD2	172 ± 19	6 ± 2
TSST-1	1025 ± 62	70 ± 3
TSST-1 + HuSOD	810 ± 13	59 ± 4
TSST-1 + HSD1	203 ± 12	34 ± 2
TSST-1 + HSD2	228 ± 11	22 ± 3
E: AZT + サキナビル+ リトナビル		
対照	203 ± 13	45 ± 2
HuSOD	150 ± 10	30 ± 3
HSD1	70 ± 12	10 ± 1
HSD2	82 ± 14	10 ± 2
TSST-1	275 ± 24	85 ± 3
TSST-1 + HuSOD	200 ± 21	62 ± 3
TSST-1 + HSD1	88 ± 10	10 ± 2
TSST-1 + HSD2	87 ± 11	5 ± 1

40

【 0 0 3 4 】

50

表IVは、HIV-1に慢性感染しているU1細胞の炎症状態に対するHuSOD、HSD1及びHSD2の作用を示す。

【0035】

【表4】

処理:	亜硝酸塩 (μM)		TNF (pg/ml)	
	対照	+TSST-1	対照	+TSST-1
対照	1 ± 0.5	12 ± 3	< 10	1256 ± 98
1: AZT	5 ± 0.2	33 ± 4	175 ± 23	2934 ± 76
2: サキナビル	1 ± 0.2	11 ± 2	< 10	1050 ± 72
3: リトナビル	1 ± 0.4	10 ± 2	< 10	1001 ± 45
1+2	1 ± 0.2	13 ± 4	< 10	1154 ± 87
1+3	1 ± 0.1	14 ± 2	< 10	1212 ± 94
1+2+3	7 ± 0.4	29 ± 3	178 ± 21	2765 ± 34
4: HuSOD	1 ± 0.2	9 ± 2	< 10	1145 ± 12
1+4	4 ± 0.3	20 ± 4	154 ± 22	975 ± 44
1+2+3+4	6 ± 0.2	24 ± 5	109 ± 17	999 ± 65
5: HSD1	1 ± 0.2	3 ± 1	< 10	221 ± 21
1+5	2 ± 0.3	9 ± 1	55 ± 10	175 ± 22
1+2+3+5	1 ± 0.4	5 ± 1	23 ± 2	108 ± 11
6: HSD2	1 ± 0.1	4 ± 2	< 10	209 ± 45
1+6	1 ± 0.2	11 ± 4	33 ± 2	200 ± 14
1+2+3+6	1 ± 0.3	6 ± 1	25 ± 4	109 ± 19

10

20

【0036】

表III及びIVは、TSST-1のみの作用下又は抗レトロウイルス剤の存在下で、ウイルス複製とアポトーシスの著しい増大が認められるが、HSD類はこれらの作用を著しく減じ、逆に、HuSODは作用を有しないか、又はほとんど作用しないことを示している。

これらの結果は、HSD類が抗レトロウイルス剤の作用を増強し、同時にその毒性作用を阻害していることを立証している。

【0037】

実施例4：変性病状におけるSOD類の作用：アルツハイマー疾患とパーキンソン疾患の場合

1. 材料と方法

- アミロイドとMPTPタンパク質の作用を評価する培養液

*ヒトマクロファージの単離

CLC類は、上記と同じ条件で23人の健常者から単離する。接着性の細胞群は、10%ウシ胎児血清(v/v)を補足したRPMI 1640培地で37℃で30分ペトリ皿(Nunc)又は6-ウエルの培養プレート(Nunc)のいずれかでCLC類(1×10^7 細胞/ml)を培養して得る。次いで、1 mM EDTA含有冷PBS溶液を加えた後、プレートを解体して単核細胞を回収する。目視できるマクロファージを85%以上含む細胞の調製物をトリパンブルー排除で評価し、非特異的なエステラーゼで染色する。

40

【0038】

*マクロファージ培養

マクロファージは、ペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン100 μg/ml及びウシ胎児血清5%を補足したイスコブ培地中、12もしくは24ウエルのプラスチック培養プレート(Nunc)で、最終濃度 2×10^6 細胞/mlに培養する。

この培養培地は、内毒素を全く含まない。細胞は、10 μg/mlのアミロイド又はMPTPの存在下又は不在下で、95%の空気と5%のCO₂を含有する湿度のある大気(100%)中で37℃で48時間培養する。

細胞上清を回収し、TNFと亜硝酸塩を測定する。アポトーシスは、細胞で直接評価する。

50

II. 結果

図12及び13は、得られた結果を示している。

これらの図は、 β -アミロイドとMPTPタンパク質がマクロファージによるTNF- α の産生を刺激し、アポトーシスによるその死を誘導していることを示している。

修飾又は未修飾のHSD類はこれらの作用を著しく減じるが、HuSOD (修飾又は未修飾)は、作用を有しないか、又はほとんど作用しない。

【0039】

実施例5：変性病状におけるSOD類の作用；照射誘導性線維症の場合

線維症の進行は、由来；感染、つまりウイルス(肝炎)、寄生虫(ビルハルツ)又は毒(アルコール、ヘロイン)が異なっても、もっとも慢性的な肝障害のあいだにあらわれる。

線維組織は、進行中に臓器の機能単位を不均衡にし、ある種の細胞群、主にディッセ(Disse)空間に局在する洞周囲細胞に作用する。

線維症のエフェクター細胞の特徴、基質沈着物に対するサイトカインの調節及びヒトの疾患の進行を制御する血清ならびに組織手段の標準化によって、いずれかの異常な線維形成の進行を制限し、減じ又はこれを止める治療法を確立することができる。

研究された寄生性疾患のうち、住血吸虫症は、門(portal)の高血圧を由来とする基質沈着物の形成を導く慢性肝炎病状の原因である。

マンソン住血吸虫によって引き起こされるネズミの肝脾性ビルハルツの実験モデルにより、イムノ-レドックス活性を有するSODの作用が示される。

マウスに感染した後、最初の病変は、門のラジカルに局在する卵の周囲で進行する細胞が介在する肉芽腫性炎症で、徐々に卵巣周性、次いで小葉性、線維症となり、その後ディッセ空間に肝炎の星状細胞(脂肪細胞)の活性化を導く。

線維症は動的なプロセスにしたがって進行するため、ある種の抗線維症治療：サイトカイン(、及び/又はインターフェロン)、コルチコステロイド又は酸化防止剤(SOD)を改善することができる。

SOD類の抗線維活性は、すでに記載されている(PCT国際出願 W0 96/16670 号及びDelanianら、1992及びLefaixら、1996)。しかし、プロ炎症作用の危険性は依然として存在しているが、本発明によるSOD類はこのような危険を回避することができる。

【0040】

1. 材料と方法

* 動物：26/28g メスのOF1 SPFマウス90匹(IFFA-CREDO, Les Oncins, L'Arbresle)

* 外寄生：各マウスに、マンソン住血吸虫プエルトリコ株のケルカリア120匹を腹腔に与える。

プロトコル1：

1. 非感染の対照マウス5匹

2. 感染した対照のマウス5匹

3. 以下の分布：

- プラセボマウス 5匹：0.9% NaCl

- マウス10匹：ウシSOD, 1 mg/kg I.M.,

- マウス10匹：ウシ SOD, 2 mg/kg I.M.,

にしたがって3 I.M. 注射/週で8週間、同時に外寄生して処理したマウス25匹

プロトコル2：

1. 非感染の対照マウス5匹

2. 感染した対照のマウス5匹

3. 以下の分布：

- プラセボマウス 5匹：0.9% NaCl

- マウス10匹：ウシSOD, 1 mg/kg I.M.,

- マウス10匹：ウシ SOD, 2 mg/kg I.M.,

- マウス10匹：メロンSOD, 栄養(gavage)により2 mg/kg

- マウス10匹：メロン SOD, 栄養により4 mg/kg

10

20

30

40

50

にしたがって3 I.M. 注射/週又は3回の栄養/週で16週間、同時に外寄生して処理したマウス45匹

* サンプル:

- ・血清: 血清マーカーの任意研究用に-20 で凍結
- ・肝臓: フラグメントを、組織学及び体型測定研究用にAFA(アルコール、ホルモル、酢酸)で固定し、別のフラグメントを生化学アッセイ用に凍結する。

【 0 0 4 1 】

II. 結果

- 肝臓の巨視分析: 外観、肉芽腫の分布
- 定性的な組織分析: ヘモトキシリン-フロキシリン-サフラン(図 1 4)とピクロシリウス(picrosirius)レッド(図 1 5) それぞれで染色した病変の描写研究、及び炎症ならびに5mmの組織片の線維症に関する半定性評価
- コラーゲンに対するシリウスレッド及びタンパク質に対するファスト(fast)グリーンの色素親和性に基づく比色定量アッセイによる全体としての線維性沈着物の定量分析: 結果は、コラーゲン μg /タンパク質 mg で示す。

10

上記から明らかのように、本発明は、より明確に記載したにすぎない実施方法、製造及び応用に、いかなる方法によっても限定されない。逆に、本発明の要旨又は範囲から逸脱しない限り、当業者がなし得る全ての变形を包含するものである。

【 図 1 】

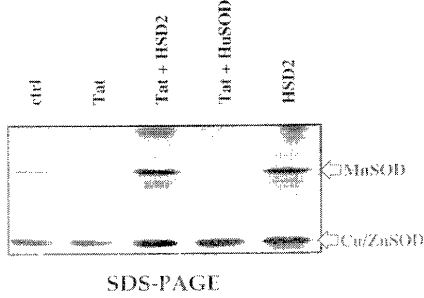
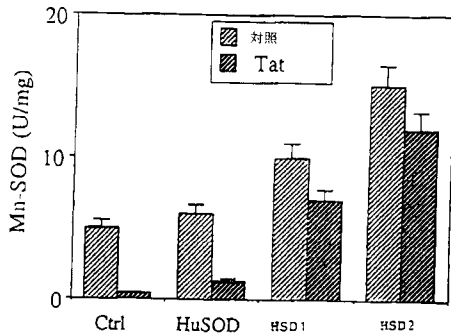


FIGURE 1

【 図 2 】



【 図 3 】

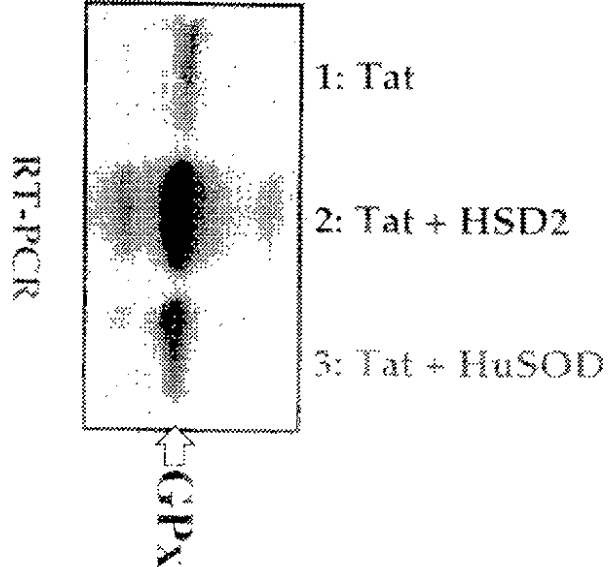
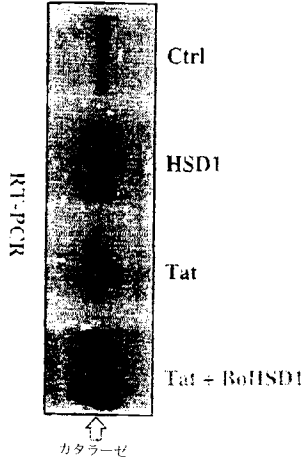
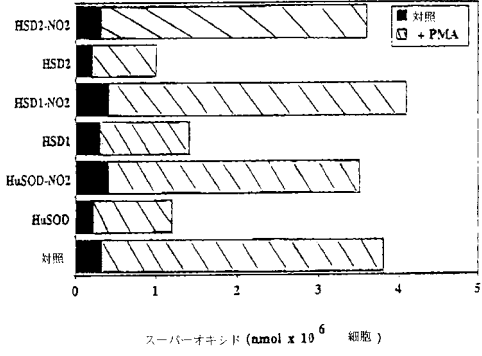


FIGURE 3

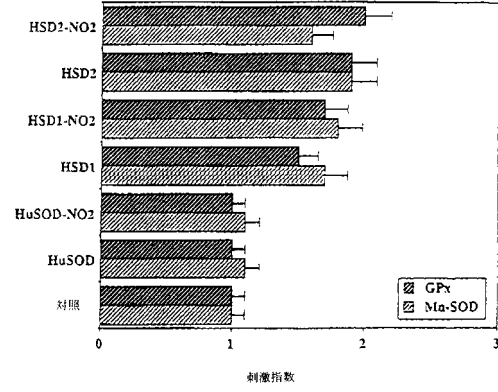
【 図 4 】



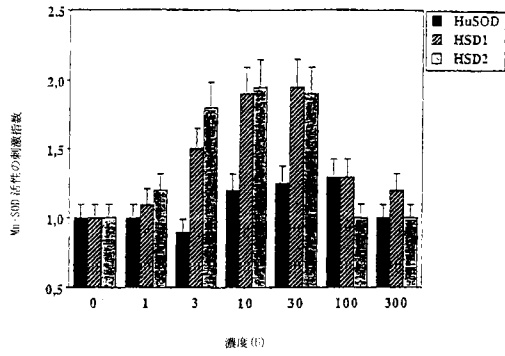
【 図 5 】



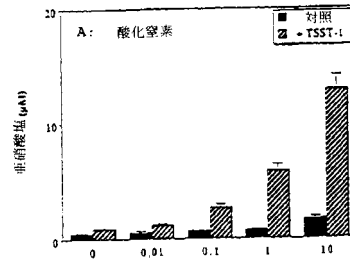
【 図 6 】



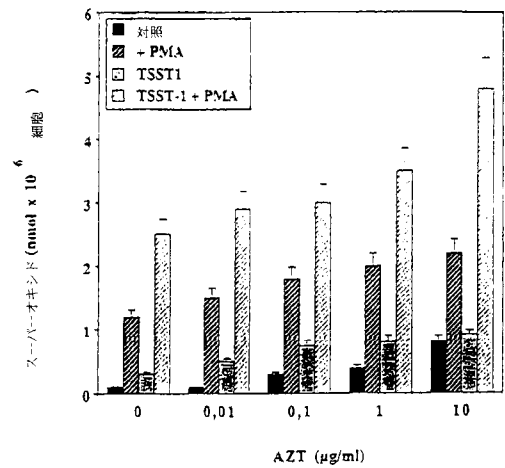
【 図 7 】



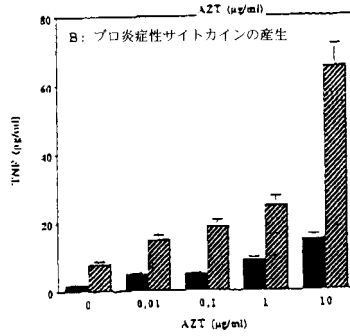
【 図 9 A 】



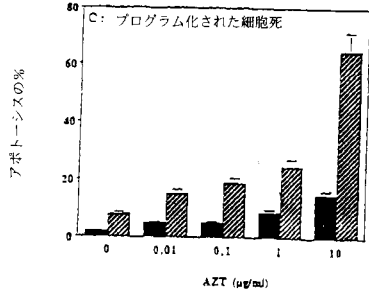
【 図 8 】



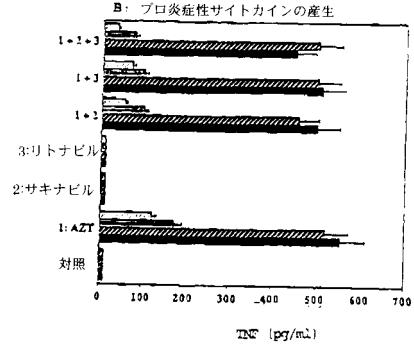
【 図 9 B 】



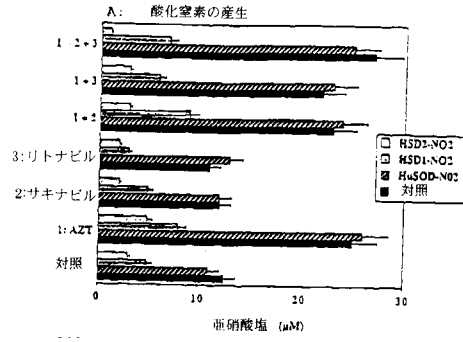
【 図 9 C 】



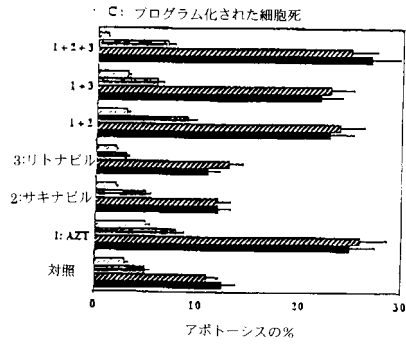
【 図 10 B 】



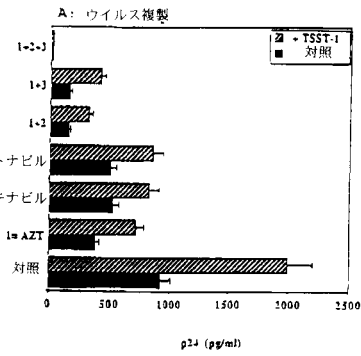
【 図 10 A 】



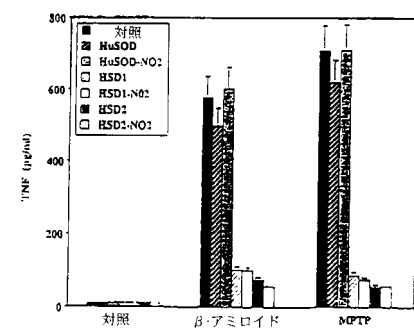
【 図 10 C 】



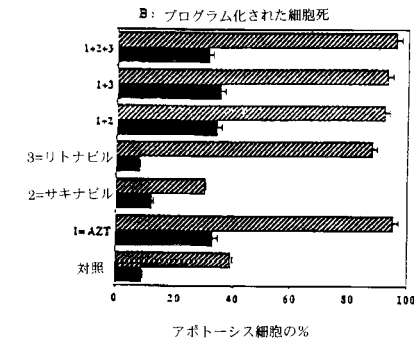
【 図 11 A 】



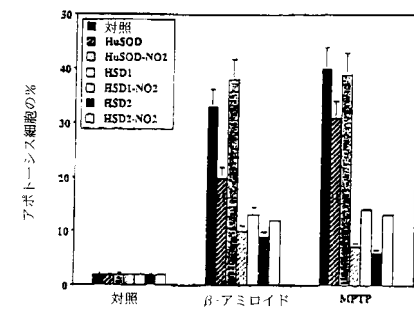
【 図 12 】



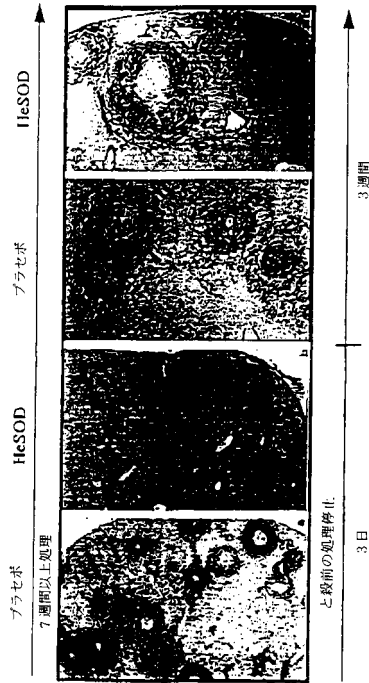
【 図 11 B 】



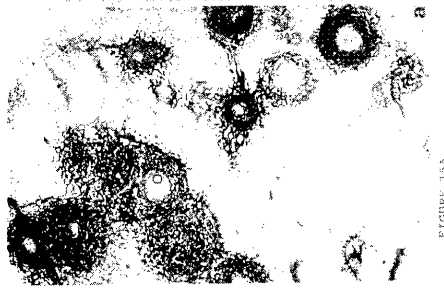
【 図 13 】



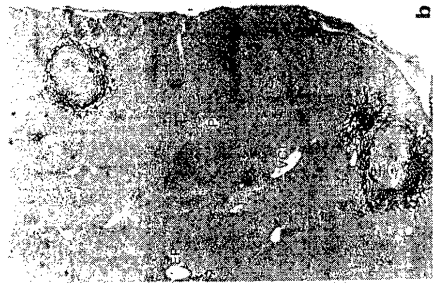
【 図 1 4 】



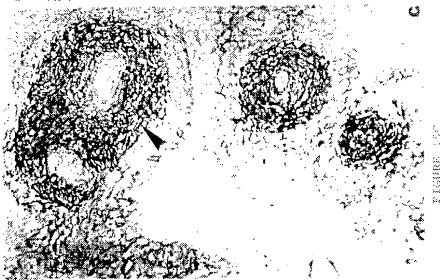
【 図 1 5 A 】



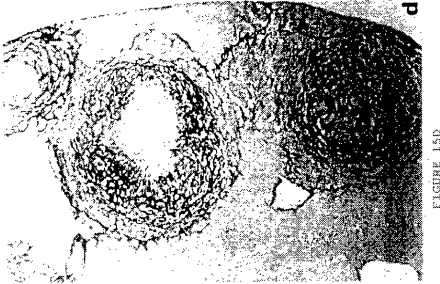
【 図 1 5 B 】



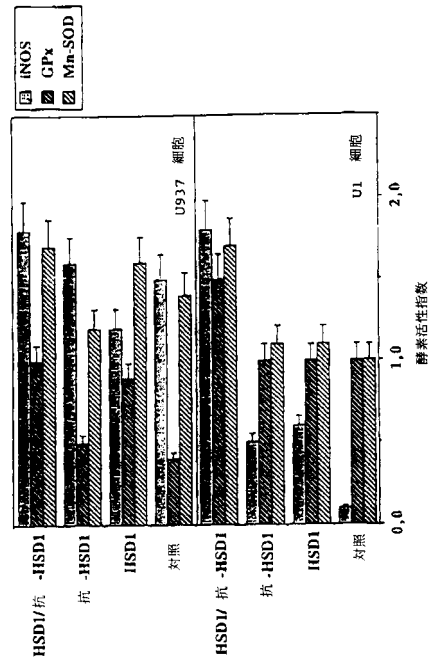
【 図 1 5 C 】



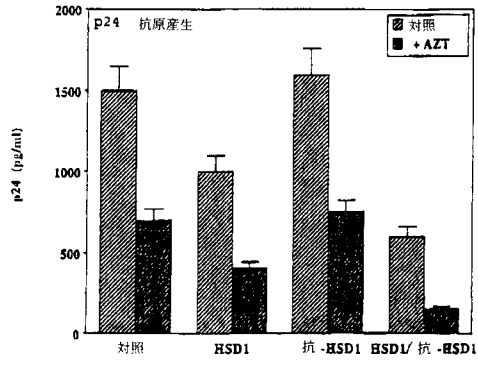
【 図 1 5 D 】



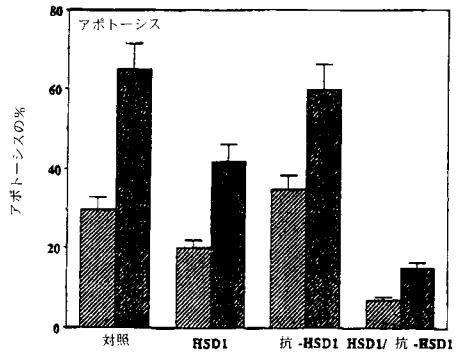
【 図 1 6 】



【 図 17 】



【 図 18 】



フロントページの続き

- (51) Int.Cl. F I
A 6 1 P 31/14 (2006.01) A 6 1 P 31/14
A 6 1 P 33/00 (2006.01) A 6 1 P 33/00
C 1 2 N 9/02 (2006.01) C 1 2 N 9/02
- (72)発明者 カランダ, アルフォース
フランス、エフ - 9 2 1 0 0 プローニュ、アヴェニュ デュ ジェネラル レクレール 8 1 3
- (72)発明者 ソジエール, ジャック
フランス、エフ - 7 8 4 7 0 サン レミ レ シュプリューセ、アレ デュ プティ シェバン
クール 1 2
- (72)発明者 ポステール, エリック
フランス、エフ - 9 2 0 0 0 ヴァンヴ、ヴィラ デ ヌゾー 4

審査官 齋藤 恵

- (56)参考文献 特開平05 - 310579 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/44
C12N 9/02
CA(STN)
BIOSIS(STN)
MEDLINE(STN)
EMBASE(STN)