

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6283680号  
(P6283680)

(45) 発行日 平成30年2月21日 (2018. 2. 21)

(24) 登録日 平成30年2月2日 (2018. 2. 2)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 31/4725 (2006. 01)

A 6 1 K 31/4725

A 6 1 P 37/06 (2006. 01)

A 6 1 P 37/06

A 6 1 P 17/06 (2006. 01)

A 6 1 P 17/06

A 6 1 P 1/16 (2006. 01)

A 6 1 P 1/16

A 6 1 P 25/00 (2006. 01)

A 6 1 P 25/00

請求項の数 3 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-542309 (P2015-542309)  
 (86) (22) 出願日 平成25年11月20日 (2013. 11. 20)  
 (65) 公表番号 特表2015-537023 (P2015-537023A)  
 (43) 公表日 平成27年12月24日 (2015. 12. 24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/074264  
 (87) 国際公開番号 W02014/079868  
 (87) 国際公開日 平成26年5月30日 (2014. 5. 30)  
 審査請求日 平成28年11月17日 (2016. 11. 17)  
 (31) 優先権主張番号 61/728, 330  
 (32) 優先日 平成24年11月20日 (2012. 11. 20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 512009850  
 オンコノックス アーペーエス  
 デンマーク王国 コペンハーゲン オーレ  
 マーローズ ヴェイ 3  
 (74) 代理人 100123788  
 弁理士 宮崎 昭夫  
 (74) 代理人 100127454  
 弁理士 緒方 雅昭  
 (72) 発明者 ニコレッティ、 フェルディナンド  
 イタリア国 カターニア イー95021  
 カニッツァーロ ヴィア ルイジ スト  
 ウルツォ 3

審査官 横山 敏志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サキナビル N O の免疫調節効果

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サイトカインの生成の調節異常を患っている患者の器官特異的および全身性の自己免疫性疾患を治療するための医薬製剤の製造における、サキナビルの硝酸エステルの前記器官特異的および全身性の自己免疫性疾患治療用の有効成分としての使用方法。

【請求項 2】

前記疾患が眼科疾患である、請求項 1 に記載の使用方法。

【請求項 3】

前記疾患がブドウ膜炎である、請求項 2 に記載の使用方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫系の障害により引き起こされる疾患の治療において用いるためのサキナビルの硝酸エステルに関する。

【背景技術】

【0002】

S a q と省略されるサキナビル ( ( ( 2 S ) - N - [ ( 2 S , 3 R ) - 4 - [ ( 3 S ) - 3 - ( t e r t - ブチルカルバモイル ) - デカヒドロイソキノリン - 2 - イル ] - 3 - ヒドロキシ - 1 - フェニルブタン - 2 - イル ] - 2 - ( キノリン - 2 - イルホルムアミド ) ブタンジアミド ) は、ヒト免疫不全ウイルス ( H I V ) プロテアーゼ阻害剤であり、こ

れは、通常、高活性抗レトロウイルス療法（H A A R T）の構成要素として用いられている。その強力な抗レトロウイルス効果に加えて、この薬剤は、また、腫瘍細胞に強力に影響する（T o s c h i e t a l . , 2 0 1 1）。さらに、S a qの適用はその毒性故に制限されており（F l e x n e r , 1 9 9 8）、副作用を低減させながらS a qの抗癌特性を得るという考えにより、その薬剤の酸化窒素（N O）-修飾型、すなわちサキナビル-N O（S a q - N O）の生成が開始された。この薬剤は、親薬物へのN Oの共有結合により生成され（M a k s i m o v i c - I v a n i c e t a l . , 2 0 0 9およびW O 2 0 1 0 / 0 1 2 4 6 6（特許文献1））、綿密な研究によって、それが、S a qと比べて、メラノーマ、星状細胞腫、前立腺癌細胞および種々のヒト多剤耐性腫瘍細胞系を含む種々の腫瘍に対して優れた抗癌特性を有するが、処理に付されたマウスにおいて毒性を呈さないことが示された（M a k s i m o v i c - I v a n i c e t a l . , 2 0 0 9 ; M i j a t o v i c e t a l . , 2 0 1 1 ; R o t h w e i l e r e t a l . , 2 0 1 0 ; D o n i a e t a l . , 2 0 1 0 ; M o j i c e t a l . , 2 0 1 2）。また、S a q - N Oは、その親薬剤の抗H I V効能を維持している（C a n d u c c i e t a l . , 2 0 1 1）。これらの研究は、S a q - N Oが、抗腫瘍および抗H I V療法としての性能を有することを示している。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】国際公開第2010/012466号パンフレット

20

【発明の概要】

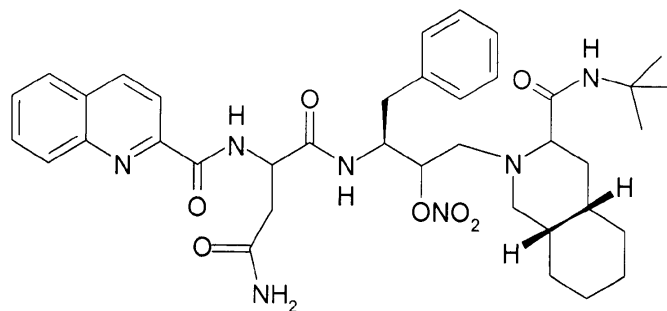
【課題を解決するための手段】

【0004】

式I：

【0005】

【化1】



30

【0006】

で示されるサキナビルの硝酸エステル（以下、N O - サキナビル、S a q - N OまたはO X - 1 0 0 1と表示される）は、興味深い免疫調節特性を有しており、多クローンのに活性化され抗原刺激されたT細胞における種々のサイトカインの生成を調節する効果があることが分かった。S a q - N Oは、T h 1、T h 2、炎症促進性および抗炎症性サイトカインの生成を調節することができる。その効果は、免疫細胞（S P CおよびL N C）または精製T細胞（C D 4陽性細胞）の多クローンのに刺激された混合集団、および抗原刺激されたT細胞（脳炎誘発性M B P - 特異的細胞）において、等しく有効である。健康個体の抹消血単核細胞（D e l m o n t e , 2 0 0 7）、およびS a qで予め処理されたマウスの脾臓細胞（P a c i f i c i e t a l . , 1 9 9 7）を用いて、試験管内および生体外条件でS a qの免疫調節特性が研究され、対立する結果が得られてきたと述べるべきである。P M Aとイオノマイシンで刺激したヒトP B M C（D e l m o n t e , 2 0 0 7）において研究された3種のサイトカイン、例えば、I L - 2、I F N - ガンマおよびT N F - アルファにおいて、S a qは、T N F - アルファの生成に影響を与えることなく

40

50

、10～20 μMの範囲の濃度でIL-2の合成およびIFN-ガンマの生成を下方制御することが分かった。同時に、Saqは、5～20 mMの範囲の濃度でPHAまたは抗-CD3-誘発増殖を阻害した。これに対して、マウスにおいて行われた生体外研究において、Saqで予め処理したマウスから得られた脾臓細胞は、対照マウスの脾臓よりも、多くのIFN-ガンマおよびIL-2を分泌した(Pacifici, 1997)。逆に、生体内でのSaqへの暴露によって、IL-1ベータ、IL-10およびTNF-アルファの生成は調節されなかった。従って、我々の試験管内研究の結果は、NO-混成が、Saqの大きな免疫薬理学的修飾を誘導し、それに続いて、非分画脾臓細胞および/または精製マウスCD4 T細胞からのIFN-ガンマ、IL-17、TNF-アルファ、IL-4およびIL-10の試験管内阻害を含む大きな程度の免疫修飾が起こることを示している(図2および3)。Saq-NOの効果は、Saqの、および、2.5および5 mMの濃度において既に観察することができる一部のサイトカインについての効果よりも、強力に規模が大きかった。精製CD4陽性T細胞からのIL-17の分泌に対する阻害効果を除いて、Saqについて、これらの濃度で、効果は見られなかった(図3)。さらに、分子研究により、Saqではなく、Saq-NOが、S6キナーゼのリン酸化を阻害することが示された(図4)。統合すると、これらのデータは、Saq-NOが、Saqとは異なりSaqよりも通常は強力な免疫調節効果を付与された新規化学物質であることを示している。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、種々の濃度のSaq-NOの存在下においてConA(1 μg/ml)で刺激したラットLNCの生存性およびサイトカイン発生への、Saq-NOの影響を示す。

【図2】図2は、マウスSPCの生存性およびサイトカイン発生への、Saq-NOおよびSaqの影響を示す。種々の濃度のSaqまたはSaq-NOの存在下においてConA(2.5 μg/ml)で刺激したBALB/cおよびC57BL/6マウスから単離。

【図3】図3は、種々の濃度のSaqまたはSaq-NOの存在下において抗-CD3および抗-CD28(いずれも、1 μg/ml)で刺激したC57BL/6マウスSPCから精製されたマウスCD4陽性細胞の生存性およびサイトカイン発生への、Saq-NOおよびSaqの影響を示す。

【図4】図4は、SaqまたはSaq-NOの存在下または不存在(対照)において抗-CD3および抗-CD28(いずれも、1 μg/ml)で刺激したまたは未処理(媒体)のC57BL/6マウスから精製されたマウスCD4陽性細胞におけるS6リン酸化への、Saq-NOおよびSaqの影響を示す。

【図5】図5は、MBP-特異的T細胞の生存性およびIFN-gおよびIL-17発生への、Saq-NOおよびSaqの影響を示す。

【図6】図6は、CFA中のMOG35-55ペプチドと百日咳毒素とで免疫化すると共に、後期予防または治療型において10 mg/kgのSaq-NO、Saqまたはビヒクルで処理したC57BL/6マウスにおけるMOG-誘発EAEにおける臨床経過および体重増加への、Saq-NOでの後期予防的(A)または治療的(B)処理の効果を示す。

【図7】図7は、C57BL/6マウスにおけるMOG-誘発EAEの進行への、試験化合物の効果を示す。

【図8】図8は、SJLマウスにおけるPLP-誘発EAEにおける臨床経過および体重増加への、Saq-NOによる後期予防的処理の効果を示す。

【図9】図9は、ブドウ膜炎の実験モデルを示す(1.11および2.7を参照)：A/免疫化の14日後におけるEAU群の組織学的網膜部分であり、光受容体の変性を伴い全網膜層に影響する損傷はあまり無い構造破壊を示している。B/対照群からの組織学的部分であり、典型的な層状形態と規則正しい網膜層を示している。GCL：ガングリオン細胞層；IPL：内網状層；OPL：外網状層；INL：内顆粒層；ONL：外顆粒層；PIS：光受容体内節；POS：光受容体外節。C/ Saq-NO処理群からの組

10

20

30

40

50

組織学的部分であり、免疫化後の S a q - N O 処理ラット 1 4 において正常網膜形態が見られる。

【図 1 0】図 1 0 は、ブドウ膜炎モデルにおける組織病理学スコアを示しており、 $10 \mu\text{g} / \text{kg}$  の S a q - N O での処理が、病理組織学的スコアを著しく改善した。 $* P < 0.05$ 。

【図 1 1】図 1 1 は、ブドウ膜炎モデルにおける生体内での酸化窒素生成を示す。全身性亜硝酸塩生成は、対照ラットと比較して、E A U 群において著しく増加した量を示した。 $(*** p < 0.001)$ 。しかしながら、S a q - N O でラットを処理すると、E A U 群と比較して、全身性酸化窒素生成が減少した。 $P = 0.51$ 。

【発明を実施するための形態】

10

【0008】

より具体的には、自己免疫性疾患の発病に含まれる炎症促進性サイトカインの生成、具体的には、マウス S P C、ラット L N C および精製マウス C D 4 陽性細胞における I N F - ガンマ、I L - 1 7、T N F - アルファ、I L - 4、I L - 1 0 および T N F の発生を、S a q - N O が下方制御することが発見された。

【0009】

重要なことに、S a q - N O は、M B P - 特異的 T 細胞における I F N - g および I L - 1 7 の生成を阻害することができ、この発見は、中枢神経系 ( C N S ) 自己免疫における S a q - N O の治療的適用を支持している。I F N - g および I L - 1 7 を生成する細胞である T h 1 および T h 1 7 細胞は、それぞれ、多発性硬化症 ( M S ) およびその動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 ( E A E ) の発病における重要な病原性集団である ( E l - b e h i e t a l . , 2010 ; F l e t c h e r e t a l . , 2010 ; J a g e r e t a l . , 2010 )。重要なことに、S a q - N O は、生体外再刺激 D L N C における I F N - g および I L - 1 7 の発生を阻害したが、生体内再刺激 S C C においても阻害し、これは、成熟中および成熟したエフェクターである T h 1 および T h 1 7 細胞の両方の抑制において有効であることを意味している。D L N C および S C C の生存性へのその効果は、I F N - g および I L - 1 7 の放出へのその効果と比べると限定的であるが、この効果は、C N S 炎症の制限に貢献することが理由で、C N S 自己免疫における S a q - N O の治療的特性も支持する。T h 1 および T h 1 7 細胞は、関節リウマチ、呼吸器炎症、全身性エリテマトーデスおよび同種移植片拒絶を含む他の器官特異的および全身性の自己免疫および炎症性疾患にも重要である ( A f z a l i e t a l . , 2007 )。

20

30

【0010】

S a q - N O は C D 4 陽性 T 細胞における S 6 リン酸化を低下させ、一方、S a q の効果はかなり弱い。それは、T 細胞におけるサイトカイン発生へのそれぞれの効果に対応している。観察された S 6 リン酸化低下は、S a q - N O が S 6 K 活性化に影響すること、および、この効果が、サイトカイン生成へのその影響に重要であることを意味している。実際、S 6 K 活性および S 6 リン酸化は、免疫細胞におけるサイトカイン発生に関係している ( L e e e t a l . , 2010 ; M e l i n o e t a l . , 2008 ; C a o e t a l . , 2008 )。

40

【0011】

S a q - N O は、例として与えられる以下に記載の実験部分に報告されているように、多発性硬化症のよく知られている 2 つのモデルにおいて強力な予防的および治療的効果となる強い免疫調節効能を有している。

【0012】

その結果、S a q - N O は、サイトカインの生成の調節異常が含まれる器官特異的および全身性自己免疫性疾患の治療における使用に有用である。

【0013】

前記疾患としては、例えば、特発性アジソン病、自己免疫性肝炎、胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、ギランバレー症候群、多発性硬化症、視神経炎、橋本甲状腺炎、乾癬、

50

関節リウマチ、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、1型糖尿病およびブドウ膜炎が挙げられる。

【0014】

Saq-NOは、虚血-再かん流および移植片対宿主病の治療、および、移植片拒絶、内毒素および外毒素血症および通風性関節炎の予防における使用にも有用である。

【0015】

本発明は、適当なキャリア/賦形剤と混合してSaq-NOを含む医薬組成物も提供する。本発明の組成物は、いかなる既知の経路によって、特に、経口、非経口、局所（眼投与を含む）、経皮または直腸経路によって投与してもよい。

【0016】

投与量は、治療すべき疾患、患者の体重、性別および年齢に従って、広い制限内で変化してよい。それは、とにかく、通常、一日10～1000mgの範囲であり、単回投与である、または一日2回または3回の投与に分割される。5～500mg、特に100～250mgの単位投与量を用いてよい。

【0017】

ブドウ膜炎の治療には、点眼剤が好ましい投与型である。局所/眼科用製剤における有効成分の濃度は0.01～10%、好ましくは0.1～2%である。ヒアルロン酸塩、タマリンド種子多糖等のような適切な賦形剤が都合よく用いられる。あるいは、滅菌溶液の硝子体内投与を用いてよい。適切な投与量は、注射当たり0.1～10mgの範囲である。

【0018】

他の投与型、例えば、経口または非経口製剤用の投与量は、毒物学的、薬物動態的および薬力学的特性に従って、並びに、患者の症状（病気の重症度および進行の程度）、体重、年齢および性別に従って、当業者により容易に決められる。投与量は、通常、親化合物であるサキナビルについて臨床診療において既に知られているものと同程度である。

【0019】

Saq-NOの代わりに、Saq-NOの非毒性塩、溶媒和物または結晶/多形型を用いても良い。

【実施例】

【0020】

（実施例部分）

1. 材料および方法

1.1 試薬

RPMI-1640媒体およびウシ胎仔血清（FCS）は、PAA Laboratories（Pasching, Austria）から得た。DMSOは、Sigma-Aldrich（St. Louis, MO）から得た。Saqは、Hoffman-La Rocheから購入した。Saq-NOは、OncoNox（コペンハーゲン、デンマーク）から得て、先に記載のように合成した（Maksimovic-Ivanic et al., 2009）。

【0021】

1.2 細胞および細胞培養

実験動物（C57BL/6マウス、BALB/cマウスおよびDark Agoutiラット）は、セルビア国ベオグラードのthe Animal House Facility of the Institute for Biological Research「Sinisa Stankovic」から得た。脾臓細胞（SPC）は、マウス脾臓から単離し、リンパ節細胞（LNC）は、未処理動物のラット頸部リンパ節から得た。流入領域リンパ節細胞（DLNC）は、ミエリン塩基性タンパク質（モルモットMBP、独国ゲッティンゲン大学のAlexander Fluegel教授から贈与）および完全フロイントアジュバント（CFA, Difco, Detroit, MI）でラットを免疫化した8～10日後に膝窩リンパ節から得た。器官を機械的に破壊し、40μmナ

10

20

30

40

50

イロンメッシュフィルターを通過させ、得られる懸濁液を遠心分離により集めた。脾臓から得られた単個細胞浮遊液からの赤血球は、RBC Lysis Buffer (eBioscience, San Diego, CA) を用いて溶解した。CD4陽性細胞は、CD4に特異的なビオチン接合抗体 (eBioscience) およびIMag SA v particles plus (BD Biosciences, San Diego, CA) を用いて、SPCから精製した。CD4集団の得られた純度は、フローサイトメトリーにより決定して97%を超えていた。SPCおよびLNCは、24穴型プレートに $5 \times 10^6$  / ml / ウエルで、DLNCは、 $2.5 \times 10^6$  / ml / ウエルで、およびCD4陽性細胞は、 $1 \times 10^6$  / ml / ウエルで接種した。脊髄 (SC) 浸潤細胞は、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の重症臨床症状をラットが示した時点でMBP+CFAで免疫化したラットのSCから得た。ラットに滅菌PBSを浸み込ませ、SCを均質化し、30%パーコール (Sigma-Aldrich) に調整し、70%パーコールグラジエントに乗せた。870gで50分間の遠心分離に続いて、SC細胞 (SCC) を40% / 70%パーコールインターフェースから回収し、RPMI - 1640媒体において洗った。SCCを、96穴型プレートに $0.5 \times 10^6$  / 200  $\mu$ l / ウエルで接種した。SPCおよびLNCは2.5  $\mu$ g / mlのコンカナバリンA (ConA, Sigma-Aldrich) で刺激し、DLNCはMBP (10 ng / ml) で刺激し、CD4陽性細胞は抗-CD3および抗-CD28抗体 (各1  $\mu$ g / ml、いずれもeBioscience製) で刺激し、および、SCCは未処理で放置した。

10

## 【0022】

20

## 1.3 細胞生存性アッセイ

ミトコンドリア活性アッセイによりSPC、LNC、DLNCおよびSCCの生存性を評価するために、我々は、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-フェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) からホルマザンへのミトコンドリア依存的還元を用いた。適切な処理の最後に、SPCおよびLNCを試験管中に集め、遠沈し、上澄みを除去し、細胞ペレットを、0.5  $\mu$ g / mlのMTT (Sigma-Aldrich) 溶液に溶解した。MTTとのインキュベーションは37℃で30分間続け、細胞をもう一度遠心分離した。DMSOをペレットに加えて、ホルマザン結晶を溶解させた。MTTアッセイにおける吸光度は、自動マイクロプレートリーダー (LKB 5060-006, LKB, Vienna, Austria) を用いて、570および540 nmで測定し、690 nmで補正した。

30

## 【0023】

## 1.4 アポトーシス細胞の検出

マウスSPC中のアポトーシスの検出は、製造者の指示に従ってアネキシンV-FITC (Biotium, Hayward, CA) を用いて細胞を染色することにより行った。アネキシンV-FITCに陽性の細胞は、アポトーシスしていると考えた。染色された細胞は、FACSCalibur cytometer (BD Biosciences) により捕捉し、CellQuest Software (BD Biosciences) を用いて分析した。

40

## 【0024】

## 1.5 ELISA

細胞培養上澄み中のサイトカイン濃度は、製造者の指示に従って、抗サイトカイン対抗体およびMaxiSorp plates (Nunc, Roskilde, Denmark) を用いてサンドイッチELISAにより決めた。マウス/ラットIL-17、マウスIL-10、マウスTNF、マウスIL-4 (eBioscience)、マウスIFN- $\gamma$ 、ラットIFN- $\gamma$ 、ラットIL-4 (R&D, Minneapolis, MN)、ラットIL-10およびラットTNF (BD Biosciences) について、サンプルを2回分析した。結果は、適当な組み換えサイトカインの既知の濃度に基づいて作られた標準曲線を用いて計算した。

## 【0025】

50

### 1.6 免疫ブロット

62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2% w/v ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、10% グリセロール、50 mM ジチオスレイトール (DTT)、0.01% w/v ブロモフェノールブルー、1 mM フェニルメタンスルホニルフルオリドまたはフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、1 µg/ml アプロチニンおよび 2 mM EDTA を含む溶液中に全細胞溶解液を調製し、タンパク質 20 µg (Lowry タンパクアッセイにより測定) を含むサンプルを、12% SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。サンプルは、セミドライ・ブロッティング・システム (Fast blot B43, Biorad, Muenchen, Germany) を用いて、5 mA/cm<sup>2</sup> にて、ポリビニリデンジフルオリド膜に電氣的移動させた。ブロットを、PBS 0.1% Tween-20 中の 5% w/v 無脂肪粉乳で遮断し、1:500 希釈で、S6 およびリン酸化 S6 への特異抗体 (Ser 240/244) (いずれも、Cell Signaling Technology, Boston, MA) を用いて調べ、続いて、1:10000 希釈で、二次抗体を用いてインキュベーションした (ECL ロバ抗ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) - 結合, GE Healthcare, Buckinghamshire, England, UK)。化学発光 (ECL, GE Healthcare) により測定を行い、X-線フィルム (Kodak, Rochester, NY) により写真を撮った。Scion Image Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation, Frederick, MD) を用いて密度測定を行った。

10

20

### 【0026】

#### 1.7 動物

7~8 週齢雄 C57BL/6 マウスおよび 6~7 週齢雌 SJL マウス (Harlan Laboratories srl, San Pietro al Natisone, Udine, Italy) を実験で用いた。それらは、食物 (Harlan Global Diet 2018) および水を自由に摂取させる標準的実験室条件 (非特異的病原体を含まない) 下に保ち、研究を始める前に、少なくとも一週間その環境に適合させた。

### 【0027】

動物を、非特異的病原体を含まない条件下で、出入り制限げっ歯類施設に収容した。自動制御環境条件を設定して、温度を 20~24 °C に維持し、相対湿度 (RH) を 30~70%、1 時間あたり 10~30 回の換気、および、天然の明暗サイクルとした。

30

### 【0028】

#### 1.8 MOG 誘発 EAE の誘導

MOG35-55 は、Genemed synthesis (San Francisco, CA) により合成された。1:1 エマルジョンを作るように Mycobacterium tuberculosis H37RA (Difco, Detroit, MI, USA) 1 mg を用いて CFA 中に乳化させた MOG の 200 µg で、マウスを免疫化した。各マウスは、エマルジョン 200 µl を皮下注射し、腋窩リンパ節に流入する 2 つの部位に分けた。百日咳毒素 (Calbiochem, Nottingham, UK) を共アジュバントとして用いて、免疫化後の 0 および 2 日目に 200 ng / マウスの投与量で腹腔内投与した。マウスを、免疫化後 30 日目まで、体重および EAE の臨床症状を測定することにより、毎日観察した。これらの臨床的等級付けは、処理のことを知らない観察者によって行なった: 0 = 疾患の兆候無し; 0.5 = 部分的尾麻痺; 1 = 尾麻痺; 1.5 = 尾麻痺 + 部分的片側後肢麻痺; 2 = 尾麻痺 + 後肢虚弱または部分的後肢麻痺; 2.5 = 尾麻痺 + 部分的後肢麻痺 (骨盤低下); 3 = 尾麻痺 + 完全後肢麻痺; 3.5 = 尾麻痺 + 完全後肢麻痺 + 失禁; 4 = 尾麻痺 + 後肢麻痺 + 前肢の虚弱または部分的麻痺; 5 = 瀕死または死亡。

40

### 【0029】

研究は、各々動物 10 匹の 4 つの群を含んでいた。全ての群を、前述した免疫化手順に従って、CFA 中の MOG35-55 ペプチドと百日咳毒素とで免疫化し、以下の処理に

50

割り当てた。

【 0 0 3 0 】

【表 1】

群	試験物質	投与量	投与経路	投与 体積/割合	頻度	型
1	サキナビル	10mg/kg	腹腔内	10mL/kg	毎日	予防
2	OX1001	10mg/kg	腹腔内	10mL/kg	毎日	予防
3	OX1001	10mg/kg	腹腔内	10mL/kg	毎日	治療
4	ビヒクル (DMSO/H <sub>2</sub> O)	---	腹腔内	10mL/kg	毎日	予防

10

【 0 0 3 1 】

後期予防的治療は、免疫化の 7 日目に開始し 30 日目まで続け、治療型は、疾患の発症時に開始し、連続して 23 日間続けた。

【 0 0 3 2 】

1.9 EAE の誘導および臨床スコア

PLP (139 - 151) は、Genemed synthesis (San Francisco CA) により合成された。EAE は、J. St. Louis et al. (4) により記載されているように誘導した。1:1 エマルジョンを作るように 6 mg/ml の Mycobacterium tuberculosis H37RA (Difco, Detroit, MI, USA) を用いて CFA 中に乳化された PLP 75 µg で、マウスを免疫化した。各マウスに、エマルジョン 200 µl を皮下注射し、腋窩および鼠径リンパ節に流入する 4 つの部位に分けた。百日咳毒素 (Calbiochem, Nottingham, UK) を共アジュバントとして使い、免疫化後 0 および 2 日目に 200 g / マウスの投与量で腹腔内投与した。マウスは、免疫化後 30 日目まで体重および EAE の臨床症状を測定することにより、毎日観察した。これらの臨床的等級付けは、処理のことを知らない観察者により行われた: 0 = 疾患の兆候無し; 0.5 = 部分的尾麻痺; 1 = 尾麻痺; 1.5 = 尾麻痺 + 部分的片側後肢麻痺; 2 = 尾麻痺 + 後肢虚弱または部分的後肢麻痺; 2.5 = 尾麻痺 + 部分的後肢麻痺 (骨盤低下); 3 = 尾麻痺 + 完全後肢麻痺; 3.5 = 尾麻痺 + 完全後肢麻痺 + 失禁; 4 = 尾麻痺 + 後肢麻痺 + 前肢の虚弱または部分的麻痺; 5 = 瀕死または死亡。

20

30

【 0 0 3 3 】

7 ~ 8 匹のマウスの 4 つの群を、7 日目から 30 日目まで、後期予防型にて、以下のよう

に処理した

第 1 群: サキナビル 10 mg / Kg (腹腔内、毎日一回)

第 2 群: Saq - NO 10 mg / Kg (皮下注射、毎日一回)

第 3 群: Saq - NO 20 mg / Kg (腹腔内、毎日一回)

第 4 群: DMSO / H<sub>2</sub>O (ビヒクル) (腹腔内、毎日一回)。

40

【 0 0 3 4 】

1.10 統計的分析

統計的分析のためにスチューデント t 検定を行った。0.05 未満の p 値は、統計的に有意であると考えた。

【 0 0 3 5 】

1.11 ウィスターラットにおける実験的自己免疫性ブドウ膜網膜炎 (EAU) の進行に対するサキナビル - NO (OX - 1001) の効果

材料および方法:

動物

雌ウィスターラット (n = 28) (8 週齢) を、Pasteur Institute

50



(Algers, Algeria) から購入した。これらのラットは、実験の開始前に、新しい環境に 1 週間慣らされ、12 時間の明暗サイクルを有し食物および水を自由に摂取できる通常条件下に維持された。

#### 【0036】

これらの動物は、4 つの群に分けられた

対照群 (n = 6) は、非処理動物のものであった

ビヒクル群 (n = 6) は、免疫化の日から始めて、毎日、DMSO を 20 % 腹腔内注射した

網膜粗抽出物免疫化ラット (EAU グループ (n = 8) と呼ぶ) は、完全フロイントアジュバント CFA 中に乳化 (v / v) された網膜粗抽出物 200  $\mu$ L を単回皮下注射し、未処理で放置した

Saq - NO (参照) 処理ラット (n = 8) は、免疫化の日から始めて、毎日、Saq - NO を 10  $\mu$ g / kg で腹腔内注射した。

#### 【0037】

網膜粗抽出物の調製：

新選なウシ眼球 (n = 20) を実験で用いた。それらを、鋸状線の直ぐ後方で切断し、次に、硝子体を、網膜剥離を起こすことなく除去した。網膜を注意深く除去し、pH 7.4 の PBS に入れた。次に、これらを、網膜抗原を放出させるために、3 回連続して熱衝撃 (-20 および +37 ) に付した。4000 rpm で 15 分間遠心分離した後、網膜粗抽出物が得られ、さらに利用するまで -20 で保存した。

#### 【0038】

実験的自己免疫性ブドウ膜炎 (EAU) の誘導：

合計体積が 200  $\mu$ L となるように、百日咳毒素は含まずに M. tuberculosis H37Ra を 1 mg / mL 含む完全フロイントアジュバント CFA の等体積で乳化した網膜粗抽出物 100  $\mu$ L で、動物を皮下的に免疫化した。動物を、免疫化後 14 日目に犠牲にした。同時に、各グループからの全てのラットも犠牲にした。

#### 【0039】

血漿採取

各実験グループから、心穿刺により、血液を EDTA 含有管に採取した。3000 rpm で 10 分間遠心分離後、血漿を採取し、グリース反応による亜硝酸塩決定まで -45 で貯蔵した。

#### 【0040】

組織学的研究のための眼球採取

病理組織学的分析のために、各グループから眼球を摘出し、10 % リン酸塩緩衝ホルムアルデヒド中で固定した。厚さ 5  $\mu$ m の組織部分を、ヘマトキシリンおよびエオシン (H & E) で染色した。標準的顕微鏡 (Zeiss) を用いてその部分を調べ、デジタルカメラを 40 倍の解像度で用いて画像を得た。組織学的基準は、構造の変化の程度に基づく。組織学的スコアを、以下のように顕微鏡的試験により半定量的に評価した。

#### 【0041】

形態変化無し, 0 ; 網膜における外核層 (ONL) の最低形態変化, 1 ; INL の萎縮, 2 ; INL の消失, 3 ; および全網膜層の損傷, 4。

#### 【0042】

亜硝酸塩濃度測定：

分光光度計を用いて、血漿中における NO 生成の指標として亜硝酸塩濃度を決めるためにグリース反応を用いた。簡単に説明すると、各サンプル 100  $\mu$ L を、グリース試薬 50  $\mu$ L (5 % スルファニルアミド、0.5 % ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩、および 20 % HCl) と混合した。これらのサンプルを室温で 20 分間インキュベーションし、543 nm での吸光度を分光光度計により読んだ。亜硝酸塩濃度は、0 ~ 200  $\mu$ mol / mL の間で亜硝酸ナトリウム (NaNO<sub>2</sub>) を用いて作った標準曲線を用いて決めた。

#### 【0043】

## 2. 結果

2.1 S a q - N O は、ラット L N C およびマウス S P C におけるサイトカインの発生を阻害する

免疫細胞中におけるサイトカイン生成を調節する S a q - N O の能力を調べるために、ラット L N C を、種々の濃度の S a q - N O の存在下に C o n A で 24 時間刺激し、I F N - g、I L - 4、I L - 17、I L - 10 および T N F の濃度を、細胞を含まない培養上澄み中において決めた。対照未処理細胞と比べると、S a q - N O は、I L - 4 を除いて、試験したサイトカインの全ての放出を投与量依存的に阻害した（図 1）。L N C 生存性は、S a q - N O の最高投与量の場合のみ影響されたが、その相違は、未処理対照と比較して統計的に有意な水準には至らなかった（図 1）。サイトカイン発生への S a q - N O の効果は、マウス S P C でも行った。ここで、S a q - N O を、S a q と並行して適用し、サイトカイン発生および細胞生存性へのそれらの影響を比較した。さらに、2 つの系のマウス、すなわち、それぞれ、原型的な T h 2 および T h 1 マウスである B A L B / c および C 5 7 B L / 6 マウスを用いた（L o h o f f e t a l . , 1998）。S a q - N O は、I F N - g、I L - 4、I L - 17、I L - 10 および T N F の放出に対して、S a q よりも強力な効果を有しており、その影響は、B A L B / c マウスと C 5 7 B L / 6 マウスとの間では区別できなかった（図 2）。S a q - N O は、ミトコンドリア活性アッセイにより決められるように、統計的に有意に S P C 生存性を阻害したが、その効果は、サイトカインの発生に対する観察された影響と比べると小さなものであった。さらに、サイトカインに対する S a q - N O の影響は、S P C 生存性に効果が無い薬剤の濃度において明らかであった（図 2）。アネキシン V 染色およびサイトフローメトリーにより測定される、S P C に対する S a q - N O および S a q のアポトーシス促進性影響は同程度であり、適用された最高薬剤投与量であっても統計的に有意ではなかった（表 2）。

【0044】

【表 2】

アネキシン V + 細胞の %		
C ( $\mu$ g / m l )	S a q - N O	S a q
0	28.9 $\pm$ 6.9	28.9 $\pm$ 6.9
5	30.2 $\pm$ 7.5	27.5 $\pm$ 4.8
10	38.4 $\pm$ 4.8	31.6 $\pm$ 6.4
20	44.5 $\pm$ 11.5	49.8 $\pm$ 4.8*

【0045】

S a q - N O および S a q で処理したマウス S P C におけるアポトーシス

興味深いことに、S a q - N O は、I F N - g、I L - 4、I L - 17 および T N F の生成を阻害したが、マウス S P C における I L - 10 の生成を刺激した。これらの結果は、S a q - N O が、免疫細胞におけるサイトカイン発生に影響を与える性能があることを示している。主に、免疫抑制効果を有するが、薬剤の種 - およびサイトカイン - 特異的効果もある。

【0046】

2.2 S a q - N O は、マウス C D 4 陽性細胞におけるサイトカインの生成を阻害する

C D 4 陽性細胞を C 5 7 B L / 6 S P C から精製し、種々の濃度の S a q - N O の存在下に、抗 - C D 3 および抗 - C D 28 抗体で 24 時間刺激した。S a q - N O の、サイトカイン発生への影響を、C D 4 陽性細胞の生存性へのその影響と、および同じパラメーターへの S a q の影響と比べた。S a q - N O は、C D 4 陽性細胞における I F N - g、I L - 4 および I L - 17 の発生を、S a q よりも効果的に阻害した（図 3）。I L - 10 に対する S a q - N O および S a q の影響は同様に有効であるが、いずれの薬剤も、

TNF 放出は調節しなかった (図 3)。Saq - NO は、細胞生存性を統計的に有意に阻害したが、その効果は、サイトカイン発生に対する効果よりは小さかった。すなわち、Saq - NO は、T 細胞のサイトカイン生成を直接影響する。

#### 【0047】

##### 2.3 Saq - NO は、S6 リン酸化を阻害する

サイトカイン発生への Saq - NO の観察された影響の原因となるかも知れない細胞内信号を決めようとして、S6 キナーゼ活性の尺度としての S6 リン酸化の水準を、免疫プロットにより検出した。CD4 陽性細胞を、Saq - NO または Saq の存在下に抗 - CD3 および抗 - CD28 で 24 時間刺激し、続いて、細胞溶解物を得、分析した。Saq ではなく Saq - NO が CD4 陽性細胞における S6 リン酸化を低下させ (図 4)、このことは、S6 キナーゼ活性が、T 細胞中において Saq - NO 特異的であってサイトカインの発生に関連する標的であるかも知れないことを意味している。

#### 【0048】

##### 2.4 Saq - NO は、サイトカイン IFN - g および IL - 17 の MBP 特異的生成を阻害する

次に、我々は、IFN - g および IL - 17 の脳炎誘発物質特異的発生への Saq - NO の影響を測定した。ラットを、MBP + CFA で免疫化し、DLNC および SCC を、それぞれ、EAE の誘導期およびピークにおいて動物から単離した。DLNC を試験管内で MBP で再刺激したが、SCC は刺激せず、両方の細胞集団を、種々の濃度の Saq - NO または Saq の存在下にインキュベーションした。その結果、Saq - NO は、DLNC における Saq よりも、IFN - g および IL - 17 の放出を、より高度に阻害した (図 5)。Saq - NO は、DLNC 生存性にも影響を与えたが、その効果は、IFN - g および IL - 17 の生成に対する影響よりもかなり小さかった (図 5)。

#### 【0049】

Saq - NO は、SCC からの IFN - g および IL - 17 の放出も阻害する性能があった (図 5)。すなわち、Saq - NO は、T 細胞の抗原特異的サイトカイン発生を効率的に調節した。

#### 【0050】

##### 2.5 C57B16 マウスにおける MOG - 誘発 EAE の発生に対する試験化合物の効果

試験化合物による長期間の腹腔内処理は、マウスの臨床的状态により判断されるように、良好に寛容されるようであった。体重の変動は、疾患の臨床スコアに起因する (図 6 A - B)。

#### 【0051】

MOG - EAE モデルは、良好に作用した。免疫化後 12 日以内にビヒクルで処理した対照において EAE の標準的兆候が表れ、EAE の標準的進行兆候を伴った (図 7 A - B 参照)。

#### 【0052】

10 mg / Kg の投与量での Saq - NO による後期予防的処理は、疾患の臨床経過を改善し、そのように処理されたマウスは、ビヒクルで処理されたマウスと比較して、かなり低い累積スコアと疾患の持続を示した (図 7 A)。全治療型での 10 mg / Kg の投与量での Saq - NO により処理されたマウスも、疾患の臨床経過の改善を示し、ビヒクルで処理されたマウスと比較して、累積スコアおよび疾患の持続が著しく低下している (図 7 B)。これに対して、サキナビルでの処理は、対照と比較して、疾患の経過を僅かに減少させた。後期予防的処理の中断において、マウスをさらに 11 日間観察し、ビヒクルおよびサキナビルで処理したマウスは同じ疾患重症度を維持し、Saq - NO で処理したマウスは、ビヒクルで処理したマウスの臨床スコアに処理中断後 9 日以内に到達する強力な疾患を発生させた (図 7 A - B)。

#### 【0053】

##### 2.6 SJL マウスにおける PLP - 誘発 EAE の発生に対する試験化合物の効果

試験化合物での長期間の腹腔間処理は、マウスの臨床状態により判断されるように、良好に寛容されるようであった。体重変動は、疾患の臨床的スコアに起因する（図 8 A）。

【 0 0 5 4 】

P L P - E A E モデルは良好に作用した。免疫化後 1 5 日以内にビヒクルで処理した対照において E A E の古典系兆候が表れ、E A E の古典的進行兆候が生じ、続いて研究中に再発および寛解を伴う（図 8 B 参照）。

【 0 0 5 5 】

1 0 m g / K g の投与量での S a q - N O による晩期予防的処理は、疾患の臨床経過を改善し、そのように処理されたマウスは、ビヒクルで処理されたマウスと比較して、著しく低い累積スコアと疾患の持続を示した（図 8 B）。高投与量の S a q - N O ( 2 0 m g / K g ) で処理およびサキナビルで処理したマウスは、ビヒクルで処理したマウスと比較して、疾患の穏やかな経過を呈し、低いが著しくない累積スコアと持続を示した。処理の中断時、マウスをさらに 2 0 日間観察した。ビヒクルで処理したマウスは、疾患の再発する寛解経過を続けたが、全ての試験化合物で処理したマウス、および最も明確には、1 0 m g / K g の投与量で S a q - N O で処理したマウスは、ビヒクルで処理したマウスの臨床スコアに処理中断後 5 日間以内に既に達する強力な疾患を発生させた（図 8 B）。

【 0 0 5 6 】

2 . 7 S a q - N O の投与が、実験的自己免疫性ブドウ膜炎を改善した

未処理で放置された網膜抗原で免疫化したラットにおいて、全網膜層に影響を与える損傷および光受容体変性により特徴付けられる網膜組織の主な構造的破壊が観察された（図 9）。ビヒクルで処理された免疫化ラットの群において、重ね合わせることができる組織的变化が観察された（データ示されず）。これに対して、S a q - N O の投与は組織学的構造を著しく改善し、対照ラットにおいて観察されるものに近い網膜組織の層状外観を示す（図 9）。

【 0 0 5 7 】

S a q - N O ( 一 日 1 0 μ g / k g ) での処理は、ブドウ膜炎の臨床スコアを著しく向上させ、疾患の病理学的兆候を改善した（ $P < 0 . 0 5$ ）（図 1 0）。

【 0 0 5 8 】

2 . 8 S a q - N O の投与は、E A U 中の循環亜硝酸塩濃度に影響を与えない

全ての群において、その最終的代謝産物である亜硝酸塩を測定することにより、生体内での酸化窒素を評価した。結果は、対照動物と比較して、誘発 E A U 中における亜硝酸塩の著しく高い生成を示した（ $6 . 0 8 \pm 0 . 6 4$  対  $1 0 . 4 2 \pm 1 . 8 4$ ）。 $1 0 \mu g / k g$  の S a q - N O を毎日投与すると、E A U グループと比較して、著しい減少ではないが、亜硝酸塩 N O の循環濃度が僅かに減少した（図 1 1）。

【 0 0 5 9 】

これらのデータは、O X - 1 0 0 1 ( S a q - N O ) による予防的処理が、ウィスターラットにおける E A U の進行を防止することを示している。これらのデータは、ヒトにおける幾つかの型の免疫炎症性ブドウ膜炎の治療用の新規薬剤としての O X - 1 0 0 1 ( S a q - N O ) の使用を保証する。

【 0 0 6 0 】

参考文献

【 0 0 6 1 】

10

20

30

40

## 【表 3 - 1】

**References**

Afzali, B. et al., 2007. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. Clin. Exp. Immunol. 148, 32-46.

Badley, A.D. et al., 1998. In vivo analysis of FAS/FasL interactions in HIV-  
infected patients. J. Clin. Invest. 102, 79- 87.

10

Canducci et al., 2011. The new and less toxic protease inhibitor saquinavir-NO maintains anti-HIV-1 properties in vitro indistinguishable from those of the parental compound saquinavir. Antiviral Res. 91, 292-295.

Cao, W. et al., 2008. Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. Nat. Immunol. 9, 1157-1164.

20

Delmonte O.M. et al., Immunology Letters 2007, 111: 111-115.

Donia, M. et al., 2011. In vitro and in vivo anticancer action of Saquinavir-NO, a novel nitric oxide derivative of the protease inhibitor saquinavir, on hormone resistant prostate cancer cells. Cell Cycle 10, 492-499.

El-behi et al., 2010. Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Neuroimmune Pharmacol. 5, 189-197.

30

Fletcher et al., 2010. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Clin. Exp. Immunol. 162, 1-11.

Flexner, C., 1998. HIV-protease inhibitors. N. Engl. J. Med. 338, 1281-1292.

Jäger, A., Kuchroo, V.K., 2010. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. Scand. J. Immunol. 72, 173-184.

40

Kumar et al., 1999. Sustained suppression of plasma HIV RNA is associated with an increase in the production of mitogen-induced MIP-1alpha and MIP-1beta. AIDS Res. Hum. Retroviruses 15, 1073- 1077.

Lee, P.S. et al., 2010. mTORC1-S6K activation by endotoxin contributes to

## 【表 3 - 2】

cytokine upregulation and early lethality in animals. PLoS One 5, e14399.

Lohoff, M et al., 1998. The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 115, 191-202.

Maksimovic-Ivanic et al., 2009. The antitumor properties of a nontoxic, nitric oxide-modified version of saquinavir are independent of Akt. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1169-1178.

10

Melino M., et al., 2008. The effect of the JNK inhibitor, JIP peptide, on human T lymphocyte proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* 181, 7300- 7306.

Mijatovic et al., 2011. Cytotoxic and immune-sensitizing properties of nitric oxide-modified Saquinavir in iNOS-positive human melanoma cells. *J. Cell Physiol.* 226, 1803-1812.

20

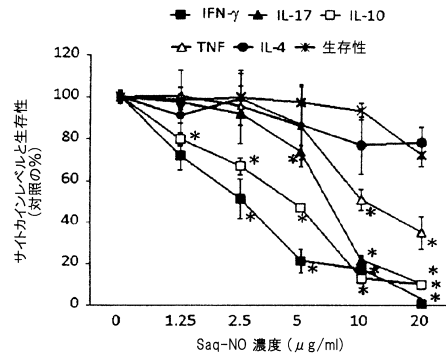
Pacifici et al., 1997. Cytokine production in saquinavir treated mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 19, 243-248.

Rothweiler F. et al., J. Jr., 2010. Anticancer effects of the nitric oxide-modified saquinavir derivative saquinavir-NO against multidrug-resistant cancer cells. *Neoplasia* 12, 1023-1030.

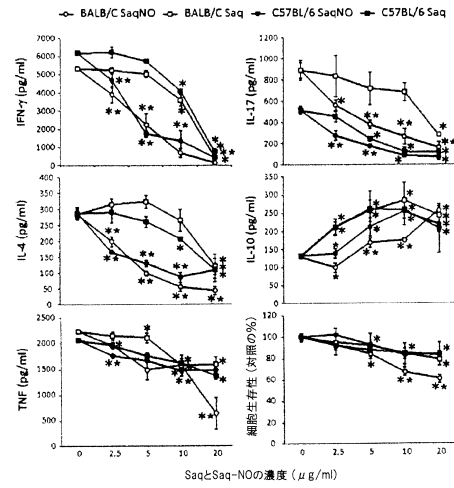
Toschi E. et al., 2011. Human immunodeficiency virus protease inhibitors reduce the growth of human tumors via a proteasome-independent block of angiogenesis and matrix metalloproteinases. *Int. J. Cancer.* 128, 82-93.

30

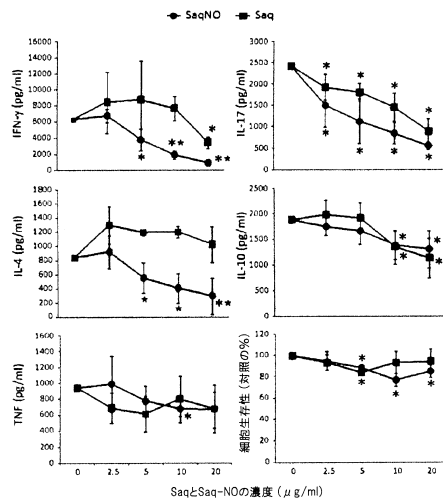
【図 1】



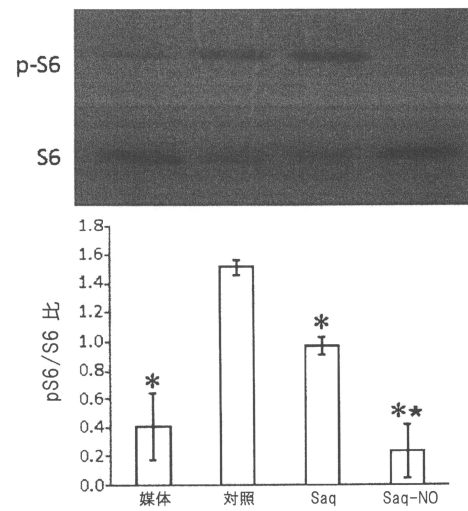
【図 2】



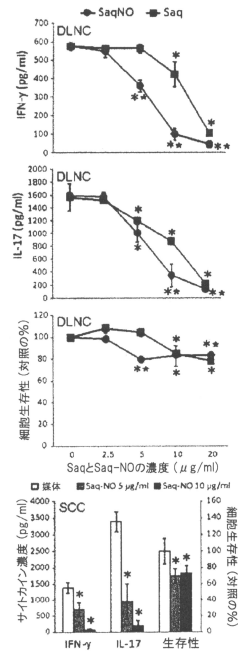
【図 3】



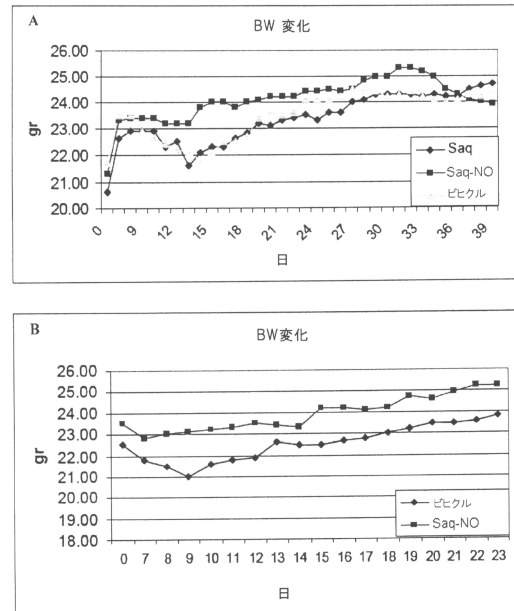
【図 4】



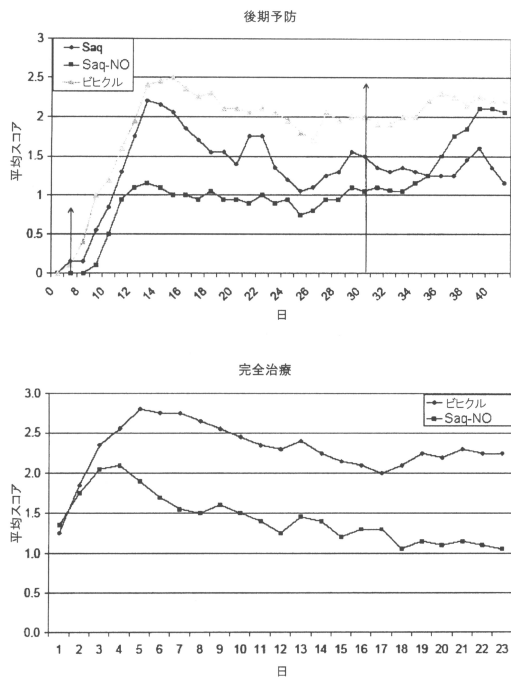
【図5】



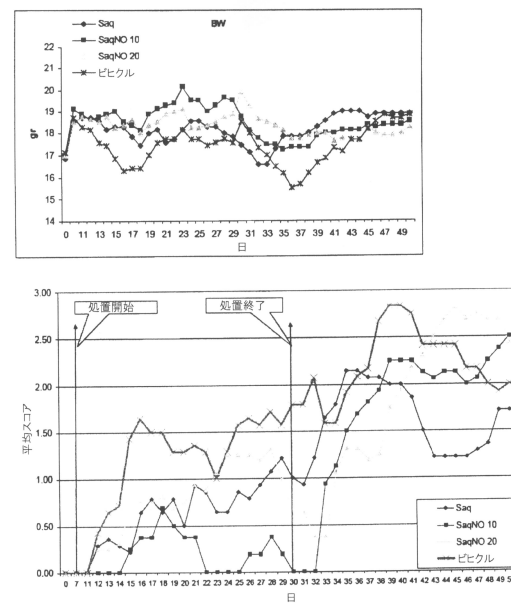
【図6】



【図7】



【図8】





【図 9】

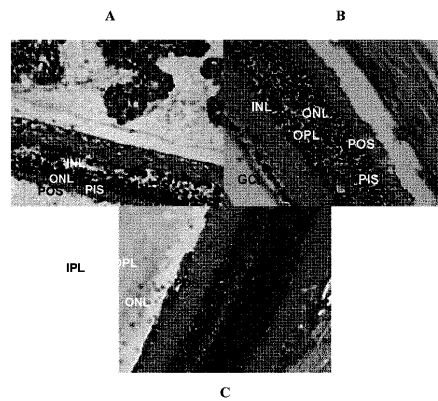
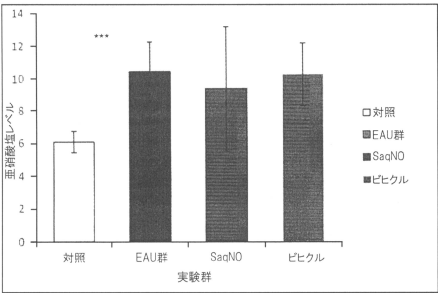
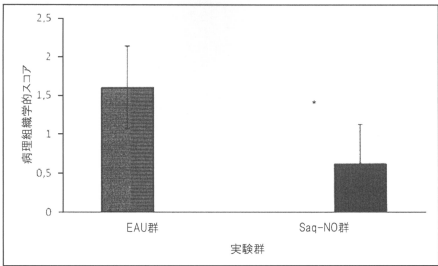


Figure 9

【図 11】



【図 10】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	19/06	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/06	
			A 6 1 P	9/00	

- (56)参考文献 特表 2 0 1 1 - 5 2 9 8 6 4 ( J P , A )  
 特表 2 0 0 5 - 5 1 1 7 6 7 ( J P , A )  
 特表 2 0 0 2 - 5 1 7 4 1 1 ( J P , A )  
 国際公開第 2 0 1 2 / 0 8 8 3 0 5 ( W O , A 1 )  
 Hosseini H. et al. , Journal of Neuroimmunology , 2 0 0 1 年 , vol. 118, no. 2, p. 233-244  
 Delmonte O. M. et al. , Immunology Letters , 2 0 0 7 年 , vol. 111, no. 2, p. 111-115  
 Pacifici R. et al. , Int. J. Immunopharmac. , 1 9 9 7 年 , vol. 19, no. 4, p. 243-248  
 Mojic M. et al. , Cell Cycle , 2 0 1 2 年 , vol. 11, no. 6, p. 1174-1182

## (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4  
 A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 P u b M e d