

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-521928

(P2009-521928A)

(43) 公表日 平成21年6月11日 (2009.6.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/42 (2006.01)	C 1 2 Q 1/42 Z N A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 B O 6 3
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	4 H O 4 5
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 104 頁)

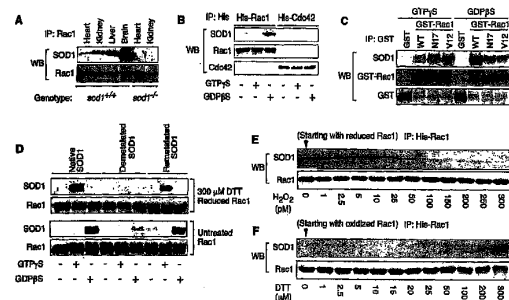
(21) 出願番号	特願2008-548723 (P2008-548723)	(71) 出願人	508197538 ユニバーシティ・オブ・アイオワ・リサーチ・フアウンデーション アメリカ合衆国アイオワ州52242-5500 アイオワシティ・サウスキャピタルストリート200・ユニバーシティキャピタルセンター2660・アイオワセンターズフォーエンタープライズ
(86) (22) 出願日	平成18年12月28日 (2006.12.28)	(74) 代理人	110000741 特許業務法人小田島特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成20年8月26日 (2008.8.26)	(72) 発明者	エンゲルハート, ジョン・エフ アメリカ合衆国アイオワ州52246 アイオワシティ・バーオークコート16
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/049424		
(87) 国際公開番号	W02007/079141		
(87) 国際公開日	平成19年7月12日 (2007.7.12)		
(31) 優先権主張番号	60/755,337		
(32) 優先日	平成17年12月30日 (2005.12.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経細胞変性疾患の治療に有用な化合物を特定する方法

(57) 【要約】

RacからSODなどのGTPアーゼの結合を変化させることによって、ROSを抑制する薬剤を特定する方法と、該方法によって特定される薬剤と、神経細胞変性疾患を抑制または治療するために、ROSを抑制する化合物を使用する方法とを提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

GTPアーゼのSODへの結合を抑制する1つ以上の薬剤を検出または判断する方法であって、

a) GTPアーゼのSODへの結合を可能にする条件下で、1つ以上の薬剤、単離されたGTPアーゼ、およびSODタンパク質を接触させるステップと、

b) 前記1つ以上の薬剤が、前記単離されたGTPアーゼの前記SODタンパク質への結合を抑制するかどうかを検出または判断するステップと、を含む、方法。

【請求項 2】

前記単離されたGTPアーゼまたは前記SODタンパク質は固定化される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記単離されたGTPアーゼは、組み換えGTPアーゼである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記単離されたGTPアーゼは、RacまたはRhoAである、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記単離されたRacタンパク質は、TVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTAGGEDYDRLRPL (SEQ ID NO: 2) を含む、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記SODタンパク質は、組み換えSODタンパク質である、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

前記SODタンパク質は、単離されたSODタンパク質である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

前記単離されたSODタンパク質は、融合タンパク質である、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記単離されたSODタンパク質は標識化される、請求項7または8に記載の方法。

【請求項 10】

前記SODタンパク質は、前記GTPアーゼとの結合を増強させる野生型SODに対する置換を有する、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

1つ以上の薬剤が結合を抑制するかどうかを特定するために、抗体が採用される、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

前記単離されたGTPアーゼは、融合タンパク質である、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 13】

前記単離されたGTPアーゼは標識化される、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 14】

前記標識はフルオロフォアである、請求項9または13に記載の方法。

【請求項 15】

前記1つ以上の薬剤は、前記SODタンパク質より前に前記単離されたGTPアーゼと接触する、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

薬剤のライブラリは、前記単離されたGTPアーゼおよび前記SODタンパク質と接触する、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

GTPアーゼのSODへの結合を抑制する1つ以上の薬剤を特定する方法であって、

a) 1つ以上の薬剤とGTPアーゼおよびSODタンパク質を含む試料とを含む混合物を提供するステップと、

b) 前記GTPアーゼの前記SODへの結合を可能にする条件に前記混合物を晒すステップと、

c) 前記1つ以上の薬剤が、前記GTPアーゼの前記SODタンパク質への結合を抑制するかどうかを特定するステップと、

を含む、方法。

10

【請求項18】

前記試料は溶解細胞を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記試料は膜画分を含む、請求項17または18に記載の方法。

【請求項20】

前記試料は、Noxを含む単離されたエンドソームまたはエンドソーム膜を含む、請求項17～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記Noxは、Nox1またはNox2である、請求項20に記載の方法。

20

【請求項22】

前記試料は無傷細胞を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項23】

前記GTPアーゼは、融合タンパク質である、請求項17～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

前記GTPアーゼは標識化される、請求項17～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

前記GTPアーゼは、RacまたはRhoAである、請求項17～24のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項26】

前記SODタンパク質は、融合タンパク質である、請求項17～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

前記SODタンパク質は標識化される、請求項17～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

前記Racタンパク質は、Rac1またはRac2である、請求項4または25に記載の方法。

【請求項29】

請求項1～28のいずれか1項に記載の方法によって特定される、1つ以上の薬剤。

40

【請求項30】

SODを結合する単離されたペプチドであって、前記ペプチドは、SEQ ID NO: 2と少なくとも90%の同一性を有し、前記ペプチドは、SEQ ID NO: 1 (全長のRac1)、SEQ ID NO: 1の残基1から177、SEQ ID NO: 3 (全長のRac2)、またはSEQ ID NO: 4 (全長のRhoA)ではない、単離されたペプチド。

【請求項31】

SEQ ID NO: 2を含む、請求項30に記載の単離されたペプチド。

【請求項32】

50

SEQ ID NO: 1 の残基 1 から 88 に対応する残基を含む、請求項 30 に記載の単離されたペプチド。

【請求項 33】

SEQ ID NO: 1 の残基 1 から 116 に対応する残基を含む、請求項 30 に記載の単離されたペプチド。

【請求項 34】

融合タンパク質を得るために異種ペプチドに融合する、請求項 30～33 のいずれか 1 項に記載の単離されたペプチド。

【請求項 35】

固定化される、請求項 30～34 のいずれか 1 項に記載の単離ペプチド。

10

【請求項 36】

SOD 結合領域を含む GTP アーゼを含む融合タンパク質と、GTP アーゼ結合領域を含む SOD を含む融合タンパク質、またはそれらの組み合わせを含む、キット。

【請求項 37】

前記 GTP アーゼまたは前記 SOD は、前記融合タンパク質を固定化するのに適したペプチドまたはタンパク質に融合する、請求項 36 に記載のキット。

【請求項 38】

前記 GTP アーゼまたは前記 SOD は、蛍光タンパク質に融合する、請求項 36 または 37 に記載のキット。

【請求項 39】

前記融合タンパク質は、請求項 34 に記載の融合タンパク質である、請求項 36 に記載のキット。

20

【請求項 40】

前記 GTP アーゼは、Rho または Rac である、請求項 36～38 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 41】

哺乳類における神経細胞変性疾患を抑制または治療する方法であって、それを必要としている哺乳類に、有効量の NADPH オキシダーゼの阻害剤を含む組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 42】

前記阻害剤は、式 (I) の化合物である、請求項 41 に記載の方法。

30

【請求項 43】

前記疾患は ALS である、請求項 41 または 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記組成物は植物抽出物を含む、請求項 41～43 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 45】

前記植物はピクロルヒザ植物である、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記阻害剤は、SOD の GTP アーゼへの結合を抑制する、請求項 41～45 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 47】

前記哺乳類はヒトである、請求項 41～46 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 48】

前記阻害剤は p47 phox を抑制する、請求項 41～47 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 49】

前記阻害剤は経口投与される、請求項 41～48 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 50】

前記投与は連日投与である、請求項 41～49 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2005年12月30日に出願された米国出願第60／755,337号の出願日の利益を主張するものであり、その開示は、参照により本願明細書に組み込まれる。

【0002】

政府の権利の記述

本発明は、少なくとも一部分においてアメリカ合衆国政府からの許可（National Institute of Diabetes and Digestive Ki
dney Diseasesの許可番号DK067928およびDK51315）を得て
なされたものである。政府は、本発明における一定の権利を有することができる。

10

【背景技術】

【0003】

発明の背景

GTPアーゼ Rac1による活性酸素種（reactive oxygen spe
cies：ROS）生成の調節は、シグナル変換（Sulciner et al., 1997）、アクチン細胞骨格再構成（Kheradmand et al., 1998）、細胞移動（Yamaoka-Tojo et al., 2004）、増殖（Irani
et al., 1997）、および分化（Puceat et al., 2003）に
関与する多くの細胞過程において重要である。ROS除去酵素は、ROS、つまり

20

【0004】

【化1】

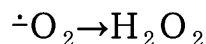


【0005】

および H_2O_2 のレベルを制御することによって細胞酸化還元ホメオスタシスを維持する上で重要な役割を担う。銅／亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ（SOD1）は、

【0006】

【化2】



30

【0007】

の変換を介して細胞内のROSを調節する細胞質内酵素を一様に発現させる（McCord et al., 1969）。細胞のROSの重要源は、7つの既知のNADPHオキシダーゼ触媒サブユニット（Nox1、Nox2 gp91phox、Nox3、Nox4、Nox5、Duox1、およびDuox2）が存在するNADPH-オキシダーゼである（Lambeth et al., 2004）。NADPHオキシダーゼは、電子をNADPHから酸素分子に移動させることによってスーパーオキシド

【0008】

【化3】



40

【0009】

を生成する。最も広く特徴を明らかにされたNADPHオキシダーゼは、食細胞gp91phox（Nox2）であり、これは種々の他の非食細胞型内でも発現する。Rac1は、Nox2の中心的な活性化因子であり、Nox複合体の3つの他のサブユニット（p40phox、p47phox、およびp67phox）を伴う（Lambeth et al., 2004）。ROS異化作用および同化作用に関与する多数の要因の特定にかかわらず、細胞が酸化還元ホメオスタシスを維持できる機構は依然として不明なところが多

50

い。

【0010】

R O S のレベルを変化させる薬剤を特定する方法が必要である。

【0011】

発明の開示

本発明は、S O D によるG T Pアーゼ、例えばR a c の調節に関連するR O S の生成を抑制する1つ以上の薬剤を特定する方法を提供する。本明細書において記述されるように、S O D 1 は、直接的な酸化還元調節された相互作用を介して、R a c 1 による内因性およびG A P 刺激されたG T P 加水分解を抑制するR a c 1 を活性化させることによって、N o x 2 g p 9 1 p h o x を介した細胞の

10

【0012】

【化4】



【0013】

生成を活発に調節することが分かった。したがって、R O S 感受性結合により制御されるR a c 1 のS O D 1 媒介による活性化は、N o x 2 依存性

【0014】

【化5】



20

【0015】

生成のための自己調節酸化還元センサを生成する。R a c 1 の35アミノ酸セグメントは、特にS O D 1 に結合することが特定され、その領域は、R a c 1 とS O D 1 との相互作用を調節する薬剤を特定するのに有用であり得る。さらに、S O D は、別のG T PアーゼであるR h o A を結合する。したがって、S O D は、N o x 1、N o x 2、N o x 3、N o x 4、N o x 5、D u o x 1、D u o x 2 を含むが、これらに限定されない1つ以上のN A D P H オキシダーゼを調節できる。さらに、S O D はG D P を結合し（図10参照）、S O D においてグアニンヌクレオチド結合モチーフは保存されるため（図11参照）、S O D へのヌクレオチド結合、例えばグアニンヌクレオチド結合を阻止する（防止または抑制あるいは変化させる）薬剤もまた、R O S 生成の調節において有用な場合がある。

30

【0016】

一実施形態において、本発明は、例えばR a c などのS O D のG T Pアーゼへの結合を調節、例えば防止、抑制または増強する1つ以上の薬剤を特定する方法を提供する。本明細書において使用される「S O D」は、S E Q I D N O : 6（ヒト S O D 1）またはS E Q I D N O : 7（ヒト S O D 2）と少なくとも80%、85%、90%、95%以上、例えば100%のアミノ酸配列同一性を有し、スーパーオキシドジスムターゼ活性を任意に有する、S O D 1 およびS O D 2 を含むタンパク質またはポリペプチドである。S O D タンパク質またはポリペプチドは、N o x またはD u o x を調節するR a c または別のG T Pアーゼ（図12A参照）を結合し、その相互作用はN A D P H オキシダーゼを調節する。一実施形態において、該方法は、1つ以上の薬剤と、S O D 結合領域を含むR a c タンパク質などの単離または精製されたG T Pアーゼと、例えばR a c またはR h o A などのG T Pアーゼ結合領域を含むS O D タンパク質とを含有するステップを含む。別の実施形態において、該方法は、1つ以上の薬剤と、S O D 結合領域を含むR a c などのG T Pアーゼと、G T Pアーゼ結合領域を含む単離または精製されたS O D タンパク質とを含有するステップを含む。別の実施形態において、該方法は、1つ以上の薬剤と、S O D 結合領域を有する、例えば単離または精製されたR a c などの単離または精製されたG T Pアーゼと、G T Pアーゼ結合領域を含む単離または精製されたS O D タンパク質とを含有するステップを含む。好ましくは、該結合領域は、より小さな断片も想定されるが、少なくとも10、例えば20、25、30、または35の野生型G T PアーゼまたはS

40

50

OD内の残基に対応する近接残基を含む。制御反応は、構成的活性化GTPアーゼ、例えばRacと相互作用し、例えば神経細胞においてNoxを活性化できるドミナントネガティブRacまたはalsinを採用してもよい。

【0017】

一実施形態において、本発明は、Rac（または別のSOD結合GTPアーゼ）とSODとの相互作用を特に抑制する薬剤を特定する体外方法を提供する。別の実施形態において、本発明は、Racまたは別のSOD結合GTPアーゼとSODとの相互作用を特に増強させる薬剤を特定する体外方法を提供する。一実施形態において、本発明は、SOD結合GTPアーゼのSODへの結合を可能にする条件下で、1つ以上の薬剤、単離されたRacタンパク質または別のSOD結合GTPアーゼ、およびSODタンパク質を含有するステップを含む方法を提供する。その後、1つ以上の薬剤が、単離されたRacタンパク質または別のSOD結合GTPアーゼのSODタンパク質への結合を抑制するかどうかを検出または判断される。結合、またはその抑制もしくは増強の検出または判断は、種々の方法によって達成でき、その一部が本明細書において記述される。例えば、RacもしくはSOD結合領域を含むその一部、またはSODもしくはGTPアーゼ結合領域を含むその一部などのGTPアーゼは、標識化されてもよく、または標識抗体として検出可能な標識に結合してもよく、および／または異種ペプチドに融合してもよく、例えば、GSTまたはヒスチジンタグに融合してもよく、これは融合タンパク質の単離および任意に検出を容易にする。あるいは、または加えて、1つ以上の薬剤は標識化されてもよく、または検出可能な標識に結合してもよい。故に、蛍光共鳴エネルギー移動アッセイ、発光共鳴エネルギー移動アッセイ、開裂アッセイ（プロテアーゼまたはヌクレアーゼ開裂）、架橋アッセイ、シンチレーション近接アッセイ、蛍光摂動アッセイ、核磁気共鳴等のアッセイ法は、薬剤が、例えばRacまたはRhoAなどのGTPアーゼのSODへの結合を抑制または増強するかどうかを検出または判断するために採用されてもよい。該方法は、細胞全体、細胞可溶化物を含んでもよく、または無細胞であってもよく、例えば、単離または精製されたGTPアーゼおよび／またはSODを使用してもよい。具体的には、該方法は、治療上有益または薬物の合理的設計の候補であってもよい薬剤を特定するように化学ライブラリを選別するために使用されてもよい。

【0018】

別の実施形態において、該方法は、1つ以上の薬剤と、例えばRacおよびSODなどのSODを結合するGTPアーゼを含む試料とを含む混合物を提供するステップを含む。該混合物は、GTPアーゼのSODへの結合を可能にする条件に晒され、1つ以上の薬剤は、GTPアーゼのSODタンパク質への結合を抑制または増強するかどうか決定される。

【0019】

また、本発明の方法によって特定される1つ以上の薬剤を提供する。下記に記述するように、これらの薬剤を使用する方法をさらに提供する。

【0020】

SODを結合する単離されたペプチドをさらに提供し、ペプチドは、全長のRac1（SEQ ID NO: 1）、全長のRac2（SEQ ID NO: 3）または全長のRhoA（SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 5）とではなく、SEQ ID NO: 2と少なくとも90%の同一性を有し、例えば、Racに対して、単離されたRacペプチドは177アミノ酸残基の長さ未満であり、RhoAに対して、単離されたRhoAペプチドは193アミノ酸残基の長さ未満である。特に、選別方法において有用なペプチドは、少なくとも20、例えば、少なくとも30、35、40、50、60、70、80以上、例えば、100、120または150アミノ酸残基のGTPアーゼを含む。また、Racもしくはその融合物などのGTPアーゼ、またはRacペプチドもしくはその融合物などのGTPアーゼペプチドをコード化する発現カセットと、SODもしくはその融合物、またはSODペプチドもしくはその融合物をコード化する発現カセットと、本発明の発現カセットを含むベクターまたは宿主細胞と、GTPアーゼもしくはSOD

、またはSODもしくはGTPアーゼをそれぞれ結合できるそのペプチドを含む融合タンパク質を含む単離または精製されたGTPアーゼまたはSODタンパク質と、を提供する。

【0021】

また、本明細書において記述されるように、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の原因になることが知られる特定のSOD1変異体において、Nox2活性化は正常に機能しない。ALS SOD1変異体は、単離された小胞およびALS遺伝子導入マウスにおいて、高レベルのNox2由来のスーパーオキシド生成を示した。したがって、Nox2の活性化過剰は、ALS G93A-SOD1遺伝子導入マウスにおいて運動ニューロン変性の一因となる場合がある。さらに、ALSに関連する特定のSOD1変異体は、SOD1のRac1への高度酸化還元非感受性結合のために、体外および体内においてより持続的なNox活性化を導くことが分かった。さらに、Nox2欠損は、運動ニューロン変性を遅延させ、ALSマウスを延命させることが分かり、例えば、SOD変異体の寿命はほぼ2倍となり、初発症状からの機能低下率はNox2遺伝子ノックアウトを背景に顕著に伸びた。興味深いことに、Nox2ヘテロ接合体マウスも寿命が延長し、麻痺の発現が遅延したため、Nox2機能の小さな変化は実質的に疾患を遅延させ得ることを示す。また、Nox1ノックアウトマウスも平均余命が向上したが (図13参照)、Nox2ノックアウトマウスと比べて顕著ではなかった。Rac1は、Nox1を調節することが証明されており、変異体SOD1によるNox2とNox1のそのように組み合わせられた異常調節は、ALSの進行の一因となる場合がある。

【0022】

アポシニン、p47phox (Nox複合体の活性化補助因子) のNox複合体への補充を抑制する。Nox2は、ALS変異体SODが存在する場合に疾患の進行を制御するようであると考慮し、アポシニンにそれらの変異体を有するマウスの延命および発病開始の遅延を試験した。アポシニンの最低試験量は、平均余命を延長し、発病開始を遅延させることが分かった (図14および17~18参照)。

【0023】

したがって、SOD間の、例えばSOD1とRac1 (食細胞Rac2も同様の相互作用を有する) などのGTPアーゼとの分子間相互作用を調節する薬剤、あるいはNADPHオキシダーゼ、例えばアポシニンなどのNoxを抑制する薬剤は、運動ニューロン変性疾患や変異体SODに関連する疾患などのニューロン変性疾患を含み、Nox2および可能性としてNox1 (これもRac1によって調節される)、または他のNADPHオキシダーゼを介する過剰なROSに関連する、または起因する疾患において治療上有益な場合がある。したがって、本発明は、ALSなどの疾患もしくはSOD1/RacによるNox2またはSOD/GTPアーゼによるNADPHオキシダーゼの異常調節の結果として過剰なROS生成が生じる他の疾患、または変異体SODに関連する、例えば、Racまたは別のGTPアーゼとの変化した、例えば増強した結合、または変化したヌクレオチド結合を有する変異体に関連する疾患において、これらの薬剤と、例えば運動ニューロン欠損および麻痺の進行を遅延させるのに有効な量、および/または運動ニューロン生存を促進するのに有効な量の治療量でこれらの薬剤を採用する方法と、を含む。例えば、薬剤は、関節炎などのアルツハイマー、パーキンソンおよびハンチントンの炎症性疾患、または他の後天性もしくは遺伝性疾患、例えば、脳虚血、脳卒中、プリオン認知症を含む認知症、ダウン症候群、多発性硬化症、メチルマロン酸血症、d-2ヒドロキオキシグルタル酸尿症、網膜変性症、ピック病、レヴィー小体関連疾患、フリードライヒ失調症および神経セロイドリポフスチン症に制限されないがこれらを含む疾患の予防、抑制または治療のために有用である。

【0024】

例えばアポシニンなどのNADPHオキシダーゼを抑制する薬剤は、マウスを延命させ、疾患の発現を遅延させるため、これらの薬剤は、神経細胞変性を有するマウスの繁殖コ

ロニーにおいて、特にこれらの薬剤を有する水を用いてまたは水中で製剤された固体飼料において有用である。

【0025】

さらに、*alsin*も*Nox*活性化およびスーパーオキシドの調節を制御し、*SOD*と同一の*Rac*領域を結合できるため、*alsin*の*Rac*への結合を変化させる、例えば抑制する薬剤は、*Nox*活性化を変化させることができる。

【0026】

哺乳類における神経細胞変性疾患を抑制または治療する方法をさらに提供する。該方法は、それを必要としている哺乳類に、有効量の*NADPH*オキシダーゼの活性の阻害剤を含む組成物、例えば式(I)の化合物を投与するステップを含む。

10

【0027】

また、哺乳類における*ROS*を増強させる方法も提供する。該方法は、それを必要としている哺乳類、例えば癌を有する哺乳類に、相互作用*GTP*アーゼと*SOD*、例えば上記の構成的活性化*Rac*または*SOD*変異体との相互作用を高める有効量の薬剤を含む組成物を投与するステップを含む。

【0028】

したがって、本発明は、例えば、過剰な*ROS*生成が生じる疾患において運動ニューロン欠損および麻痺の進行を遅延させるのに有効な量または運動ニューロン生存を促進するのに有効な量で、例えば、過剰な*ROS*によって特徴付けられ、例えば*Nox2*の*Rac*/*SOD1*制御などの*GTP*アーゼ/*SOD*の異常調節に起因する神経細胞変性疾患を抑制または治療するための薬物療法において有用である。また、運動ニューロン欠損および麻痺の進行を遅延させるための、あるいは過剰な*ROS*によって特徴付けられる神経細胞変性疾患または変異体*SOD*に関連する、例えば増強などの変化した結合、または変化したヌクレオチド結合を有する変異体に関連する疾患を抑制または治療するための薬物の製造用に、そのような薬剤の使用を提供する。さらに、例えば癌を抑制あるいは治療するために、有効量で*ROS*を高めるか、*Nox2*の*Rac*/*SOD1*制御を無調整する薬剤を提供する。

20

【0029】

図面の簡単な説明

図1A~F。*Rac1*は、酸化還元依存的に*SOD1*に結合する。A) *Rac1*は、*sod1*+/+または*sod1*-/-マウスの心臓、腎臓、肝臓および/または脳組織から免疫沈降し、続いて*SOD1*および*Rac1*に対してウェスタンブロット法(Western blotting: WB)を行った。B) 精製されたウシ*SOD1*が存在する場合における、精製された*His*タグ付き*Rac1*および*Cdc42*の体外IPに続いて、*SOD1*、*Rac1*および*Cdc42*に対してWBを行った。*His*タグ付き*GTP*アーゼは、*SOD1*とのインキュベーションに先立って、指示されたヌクレオチド類似体を前負荷した。C) 精製された*SOD1*が存在する場合における、指示されたヌクレオチド負荷の*GST*タグ付き*Rac1*変異体(または遊離*GST*)の体外IPと、それに続く*SOD1*および*GST*に対するWB。D) 精製された、未変性の、脱メタル化された、または再メタル化されたウシ*SOD1*が存在する場合における、精製された*His*タグ付き*Rac1*の体外IPと、それに続く、*SOD1*および*Rac1*に対するWB。*His*タグ付き*Rac1*は、*SOD1*とのインキュベーションに先立って、指示されたヌクレオチド類似体を前負荷した。さらに、未処置の*His*タグ付き*Rac1*および300 μM DTT前還元の前還元*His*-*Rac1*は、*SOD1*の各3つの形状を用いて体外プルダウンアッセイに使用した。E) *His*-*Rac1*を前還元し(300 μM DTT)、*GTP*γSを負荷し、その後、*SOD1*を用いてプルダウンアッセイを行う前に指示濃度の過酸化水素(H₂O₂)で処置した。F) DTTの指示濃度を、(E)に示すように、300 pMのH₂O₂処置した*His*-*Rac1*試料に加え、*SOD1*でプルダウンアッセイを行った。

30

40

【0030】

図2A~H。*SOD1*は、酸化還元依存の物理的相互作用を介して、*Rac1*活性化

50

を調節する。A) SOD1 結合ドメインを画定するために使用された GST-Rac1 欠失変異体の模式図。B) 精製されたウシ SOD1 が存在する場合における、種々の GST 11 タグ付き Rac1 欠失変異体の体外 IP。各レーン上部の数は、パネル A の GST-Rac1 融合構成の数に対応する。上部パネルは、GST の IP に続く SOD1 に対する WB であり、下部パネルは、IP に使用した精製された融合ペプチドのクーマシー染色されたゲルである。C) GST タグ付き PAK 結合ドメイン (GST-PBD) は、sod1 + / - または sod1 - / - マウス脳溶解物において GTP-Rac1 を定量化するために、プルダウンアッセイにおいて使用された。ウェスタンブロットは、GTP-Rac1 および GST-PBD 後のグルタチオン沈殿と、粗溶解物における SOD1 および Rac1 の合計レベルを示す。D) 13 sod1 + / - および 7 sod1 - / - マウス脳からの GTP-Rac1 レベルの定量化は、有意差 ($p < 0.001$ 、スチューデント t 検定) を示した。E、F) Rac1 GTP アーゼアッセイは、(E) ウシ SOD1 または (F) 大腸菌 SOD および / または GST タグ付き p29-GAP が存在する場合に行われた。His タグ付き Rac1 は、 γ P32-GTP で前付加し、反応物の一定分量は、Rac1 から遊離した $\% 32$ Pi を評価することによって、薄層クロマトグラフィーを用いて様々な時点で GTP 加水分解を分析した。G) SOD1 および / または p29-GAP が存在しない場合における、Rac1 および Cdc42 に対する GTP アーゼアッセイ。 γ P32-GTP からの 32 Pi 遊離率がプロットされる。H) SOD1 および / または $100 \mu\text{M}$ のキサンチン / 100mU のキサンチンオキシダーゼ (X/XO) が存在する場合、または存在しない場合における、Rac1 GTP アーゼアッセイ。I) 15 分の X/XO 由来の ROS への暴露の有無にかかわらず、SOD1 が存在する場合における GTP γ S 負荷された His-Rac1 のプルダウンアッセイ。本アッセイで使用された条件は、(H) に示される GTP アーゼアッセイと同一であった。(H) すべてのパネルにおけるデータは、少なくとも 3 つの独立した実験の代表的なものである。

【0031】

図 3 A ~ E。SOD1 は、エンドソーム区画において NADPH オキシダーゼによる

【0032】

【化 6】



【0033】

生成を活性化する。A) エンドソームは、イオジキサノール密度勾配分画を使用して 1 次マウス皮膚線維芽細胞 (primary mouse dermal fibroblast: PMDF) から単離させ、画分は、ルシゲニンベースの発光アッセイ (上部パネル) を使用して、また $\text{Nox}2^{\text{gpglphox}}$ 、Rac1、SOD1 および EEA1 に対するウェスタンブロット (下部パネル) によって、NADPH 依存性のスーパーオキシド生成を評価した。B) $\text{Nox}2^{\text{gpglphox}}$ 野生型およびノックアウト (KO) PMDF からの指示された細胞成分分画における、SOD1 に対するウェスタンブロット。C) ルシゲニンアッセイは、SOD1 および / または DPI (一般的な Nox 阻害剤) が存在する場合または存在しない場合の、 $\text{Nox}2$ 野生型および KO PMDF からの分画番号 10 小胞における NADPH 依存性の

【0034】

【化 7】



【0035】

生成率を評価するために使用された ($n = 6$)。D) ウシ SOD1 (Bov. SOD1) または大腸菌 SOD (Bac. SOD) が存在する場合または存在しない場合における、1 次マウス胎児線維芽細胞 (primary mouse embryonic fibroblasts: PMEF) からの小胞の分画の NADPH 依存性の

【0036】

【化8】



【0037】

産出率を評価した (n = 3)。E) ルシゲニンベースのアッセイにおいて、X/XO由来の

【0038】

【化9】



10

【0039】

を分解するためのBov. SOD1およびBac. SODの能力。F) sod1+/+, sod1+/-またはsod1-/-マウスから単離したPMNによるPMA誘導の

【0040】

【化10】



【0041】

産出を、シトクロムc還元アッセイを使用して評価した。*sod1+/+マウス (p < 0.05、スチューデントt-検定) と比べると有意差が見られた。

20

【0042】

図4A~G。ALSに関連するSOD1変異体は、向上した酸化還元非感受性、Rac1との結合およびRac1-GTP加水分解を抑制するための向上した能力を示し、エンドソームNADPH依存性の

【0043】

【化11】



【0044】

生成を活性化する。A) 精製され、細菌で発現されたSOD1タンパク質のクーマシィー染色されたSDS-PAGE。ウシSOD1を基準対照として使用した。これはヒトSOD1よりも通常早く移動する(データ図示せず)。各SOD1タンパク質のCu/Zn含有量はゲルを下回る。B) 1:10モル比(Rac1:SOD1)で指示されたヒトSOD1タンパク質(wt、L8QまたはG10V)が存在する場合における、精製された前還元のHisタグ付きRac1-GTPγSの体外IP。その後、Rac1/SOD1複合体を、2つの部分に分割し、半分を、HisタグのIPに先立って室温で15分間X/XO由来のROSで処置した。X/XO条件は、100μMの最終キサンチン濃度を有する100mM単位のキサンチンオキシダーゼ酵素を含んだ。IPに続いて、SOD1およびRac1に対してウェスタンブロットを行った。SOD1ブロットの長いおよび短い暴露は、SOD1からRac1への各突然変異型の向上した結合を明らかにすることを示す。C) 未変性のウシSOD1または指示された細菌で発現および精製されたヒトSOD1タンパク質(wt、L8QまたはG10V)を使用して、Rac1GTPアーゼアッセイを行った。Rac1:SOD1のモル比が示される。Hisタグ付きRac1をγP32-GTPを前負荷した。各型のSOD1の増加濃度が存在する場合において、γP32-GTPからの32Pi遊離率がプロットされる。D) 単離されたPMEFエンドソームによるNADPH依存性の

30

40

【0045】

【化 1 2】



【0 0 4 6】

産出の経時変化を、ヒト WT-SOD1 または L8Q-SOD1 が存在する場合または存在しない場合において測定した。パネル C および D の結果は、3 つの実験の代表的なものである。E) Rac1 を G93A-SOD1 遺伝子導入マウスまたは対照同腹子の脳組織から免疫沈降 (immunoprecipitate: IP) し、その後 SOD1 および Rac1 に対してウェスタンブロット法 (western blotting: WB) を行った。F および G) G93A-SOD1 または対照遺伝子導入同腹子の指定された年齢での、F) 脳および (G) 肝臓組織に由来する全内膜による NADPH 依存性の

10

【0 0 4 7】

【化 1 3】



【0 0 4 8】

生成である (各実験点に対して N = 3)。

【0 0 4 9】

図 5 A ~ C。A) 未変性のウシ SOD1 に対する SOD1 活性ゲル (レーン 1)、脱メタル化されたウシ SOD1 (レーン 2) および再メタル化されたウシ SOD1 (レーン 3)。ウシ SOD1 の各型の Zn および Cu 含有量は、タンパク質のモル毎の金属のモルにおいてゲルを上回る。B) His 沈殿と Rac1、SOD1 および Cdc42 に対するウェスタンブロット法とに先立って、300 μM DTT で還元し、GTPγS を前負荷し、その後ウシ SOD1 とともにインキュベートした His-Rac1 または His-Cdc42 の体外プルダウンアッセイ。C) Rac1 ポリペプチドバックボーンの 3 次元構造の略画 (Hirshberg et al., 1997)。左パネルは、スイッチ I 領域 (青)、スイッチ II 領域 (赤)、G2 領域 (赤紫) および G3 領域 (緑) を示す。右パネルは、スイッチ I、スイッチ II、G2 および G3 領域に及ぶ、強力に SOD1 (赤) を結合する最小 Rac1 ペプチドを示す。

20

【0 0 5 0】

図 6 A ~ B。SOD1 は、Rac1 の GTP 負荷に影響せず、Rac1 GTPアーゼ活性に酵素的に活性でなければならない。A) His タグ付き Rac1 を、SOD1 が存在する場合または存在しない場合において、35S-GTPγS を負荷した。タンパク質をニトロセルロース膜に結合し、過剰な非結合放射性ヌクレオチドを洗浄して除去した。残存する (結合) 35S-GTPγS を液体シンチレーション分光で定量化した。結果は、N = 3 の独立した実験に対する平均 ± SEM を示す。B) 精製され、未変性の、脱メタル化または再メタル化されたウシ SOD1 が存在する場合において、Rac1 GTPアーゼアッセイを行った。His タグ付き Rac1 を γP32-GTP を前負荷した。γP32-GTP から 32Pi 遊離率はプロットされる。結果は 2 つの実験の代表的なものである。

30

40

【0 0 5 1】

図 7。Rac を介する Nox2 ROS 生成の SOD1 媒介の調節に対する酸化還元センサモデル。還元条件下において、SOD1 を Rac-GTP に結合し、内因性および GAP 媒介の GTP 加水分解を抑制することで Rac 活性化を安定化させる。増加した Rac-GTP レベルは、Nox2 の活性化および

【0 0 5 2】

【化 1 4】



【0 0 5 3】

50

の生成をもたらす。N o x 2 複合体によって産出された

【0054】

【化15】



【0055】

は、S O D 1により、または自発的不均化を介してH₂O₂に変換される。H₂O₂の局所濃度が上昇するため、R a cの酸化はS O D 1の解離をもたらす。R a c-G T Pともはや結合しないS O D 1では、R a c-G D Pへの加水分解がより早急に発生し、N o x 2 複合体の不活性化に繋がる。その後、R a c/N o x 2が再活性化すると、S O D 1は工程を繰り返すように再循環できる。この機構を通じて、S O D 1は、R a c/N o x 2 複合体活性化の部位においてR O Sの局所濃度を検知でき、複合体の活性を制御できることを提案する。

10

【0056】

図8。種々の指示された遺伝子型の回転棒の失敗までの時間。回転棒の失敗後、通常1週間以内に死亡する。動物は、あおむけに置かれた後20秒間以内に直立できなかった場合に、臨床的に死亡および安楽死したと見なされる。

【0057】

図9。指示された遺伝子型の同年齢の同胞の脊髄中の運動ニューロン。各グループには3匹の動物があり、動物は、A L S+/N o x 2+/+グループの臨床死時に安楽死した。これは約125~135日の範囲で、4つの遺伝子型それぞれからの1匹のマウスは同日に採取された。

20

【0058】

図10。S O D 1は体外G T PおよびG D Pを結合する。A) S³⁵放射性標識 G T P γ Sは、異なる濃度の塩化マグネシウム (M g C l₂)を用いて、室温で2時間S O D 1とともにインキュベートした。結合反応物は、S D S含有緩衝液内で5分間沸騰させて中止した。試料をS D S-P A G Eで走行させ、その後ニトロセルロース膜に移動した。オートラジオグラフィーを使用して、S O D 1と結合した放射性標識ヌクレオチドを示した。B) S O D 1グアニンヌクレオチド結合 (G T PおよびG D Pが示される)の表面プラズモン共鳴 (s u r f a c e p l a s m o n r e s o n a n c e : S P R) 分析。S P Rチップ表面をウシS O D 1タンパク質で被覆する。G T PまたはG D P (5mM)を含有する試料は表面を流れ、ヌクレオチド-タンパク質結合キネティクスは監視される。

30

【0059】

図11。S O D 1における保存グアニンヌクレオチド結合モチーフ。カンジダアルビカンスからホモサピエンスまでの異なる生物からのS O D 1の配列が配置される。グアニンヌクレオチドを結合する保存された潜在配列を標識化する。S O D 1上の配列は、1つのみのアミノ酸でグアニンヌクレオチドにおけるグアニジンカ輪結合モチーフのコンセンサスN/T K x Dから逸脱する。また、S O D 1上の配列G D N x x G C Tも保存され、1つのアミノ酸でリン酸塩結合ループコンセンサスG x x x x G K T/Sから逸脱する。両モチーフは、S O D 1結晶構造および利用可能な溶質の表面に露出する。

40

【0060】

図12A~B。R a c 1、R a c 2、R h o AおよびC d c 4 2配列間の比較とR a c 1およびR h o AのS O D 1への異なる結合。A) R a c 2、R h o AおよびC d c 4 2と比較した、R a c 1上のS O D 1結合領域のアミノ酸配列アラインメント。R a c 2は、S O D 1結合領域のR a c 1と比べて97%より高い同一のアミノ酸配列を有する。一方、R h o Aは、77.7%の同一配列を有し、C d c 4 2はその領域でR a c 1と75%の同一配列を有する。B) R a c 1、R h o AまたはC d c 4 2を電磁ビーズ上で固定化し、その後、グアニンヌクレオチド (標識化したように) を負荷し、または負荷せずに、S O D 1に結合した。非結合タンパク質の洗浄後、試料をS D S-P A G E上で分離し

50

、SOD1に対して免疫ブロット法を行った。Rac1は、GDPβS結合状態でのみSOD1を結合し、一方、Cdc42は負荷したヌクレオチドにかかわらず、SOD1を結合しなかった。その一方、RhoAは、GTPγS結合状態でのみSOD1を結合した。

【0061】

図12C。ヒトRac1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1)、ヒトRac2 (SEQ ID NO:3)、ヒトRhoA (SEQ ID NO:4および5)、ヒトSOD1 (SEQ ID NO:6)、ヒトSOD2 (SEQ ID NO:7)、およびヒトalsin (SEQ ID NO:8)。

【0062】

図13。SOD1-G93Aマウスの生存に関するNox1およびNox2遺伝子ノックアウト (KO) の比較。A) Nox1を欠くALSマウス (N=6) は、そのNox1含有同腹子 (127日、N=8) よりも長く生存した (163日)。**p<0.0039。B) Nox2 KO背景でのALSマウスの生存は、Nox1 KO背景での生存よりもさらに顕著だった。

【0063】

図14。SOD1-G93Aマウスにおける生存および疾患進行のアポシニン (30 mg/Kg) 効果。A) アポシニン処置 (185日) マウス (***p<0.0001) と比較した、無処置 (125日) での生存の可能性。B) アポシニン処置マウスと比較した未処置での歩行分析。114日齢で、未処置のマウスは歩行障害を呈示し、一方、アポシニン処置マウスは正常歩行であった。C) アポシニン処置 (156.5日、n=6) マウスと比較した、未処置 (117.5日、n=20) での後肢衰弱の初観察によって判断される発病開始の平均年齢。D) 生存指標は、発病開始から臨床死までの時間であり、疾患進行のマーカである。疾患進行は、アポシニン処置マウス (32日、n=6) の方が未処置のマウス (11日、n=20) よりも遅かった。

【0064】

図15。野生型 (wild type: WT) SOD1ではないSOD1変異体の発現は、細胞Nox活性の活性化をもたらす。A) WT-SOD1またはG93A-SODを過剰に発現する非遺伝子導入または遺伝子導入マウスの脳、脊髄および肝臓からの全内膜におけるNADPH依存性のスーパーオキシド生成 (各グループにおいてN=3動物)。B) WT-SOD1またはG93A-SOD1を過剰に発現する120日の非遺伝子導入または遺伝子導入マウスからの腰髄切片におけるスーパーオキシドのジヒドロエチジウム (Dihydroethidium: DHE) 蛍光検出。DAPI染色は、下部パネルにおいて核を画定する。C、D) スーパーオキシド生成の尺度 (C) または、細胞死の尺度としてのトリパンブルー排除であり、(D) LacZ、WT-SOD1または指示された変異体SOD1を発現させるアデノウイルスベクターに感染したSH-SY (神経細胞) またはMO59J (グリア) 細胞におけるもの。E) 指示されたアデノウイルスベクターに感染し、その後アポシニン (100 μM) を用いて、または用いず72時間処置した後のSH-SYまたはMO59J細胞におけるスーパーオキシド生成および細胞死の割合。F) 120日齢の非遺伝子導入 (対照) またはG93A-SOD1遺伝子導入マウスからの脊髄細胞可溶化物を使用し、GST-Pak1との関連によって判断されたRac-GTP活性化。対照は、Pak1プルダウンアッセイに先立って、GTPγS (+) またはGDPβS (-) とともにインキュベートされた対照マウスからの溶解物を含む。

【0065】

図16。半接合体のG93A-SOD1遺伝子導入マウスのALS脳および脊髄組織のNADPH依存性スーパーオキシド生成の増加。スーパーオキシド生成は、DPI (10 μM) で抑制されたが、ロテノン (100 μM) では抑制されず、Noxが向上したROS生成に関与することを示す。

【0066】

図17。NADPHオキシダーゼ阻害剤アポシニンでの処置は、G93A-SOD1導入遺伝子に対して半接合であるマウスにおいて、寿命を増加させ、疾患進行を遅らせる。

A) 14日齢から開始する、水中の異なる投与量のアポシニンで処置したマウスの生存曲線。各処置グループのマウスの数(N)は、日数のメディアン生存時間とともに示される。B) アポシニンの各一定投与量に対する雄性および雌性マウスの生存データ。抗生物質を使用して眼感染症の処置を受けたマウスを四角形でマークする。処置に失敗および眼感染症により死亡したマウスは、四角形内にX印を付ける。円形は、眼感染症に一度もかからなかった動物を表す。各グループにおけるマウスの数(N)は、各投与量のアポシニンに対する平均生存日数を上回る。C) 発病開始の年齢(1週間の間に5%の体重減少で判断)とアポシニン投与量との関係。D) 生存指標は、各一定量のアポシニンに対し、発病開始から動物が臨床死に至るまでの時間として測定した。E) 分析前に5日間アポシニン(300mg/kg)で処置または処置されていない、最終段階G93A-SOD1遺伝子導入マウス(約120日齢)からの腰髄の全膜において、NADPH依存性のスーパーオキシド生成を測定した(各グループにおいてN=5)。F) 同一のマウスの腰髄におけるジヒドロエチジウム蛍光を(E)に示す。

10

【0067】

図18。出生後異なる年齢における、アポシニン(300mg/kg)を用いた半接合体のG93A-SOD1遺伝子導入マウスの処置。14、60および80日齢で、飲料水にアポシニンを加えたマウスの生存時間(各グループに対してN=6)。すべてのマウスは、3匹の導入遺伝子陰性同胞雌と1匹のG93A-SOD1半接合体の雄から派生した。各雌からの2匹の連続同腹仔を分析した。

20

【0068】

図19。異なる濃度のアポシニンを用いたG93A-SOD1遺伝子導入マウスの処置および120日目の腰髄における運動ニューロンの数。

【0069】

発明の詳細な説明

I. 活性酸素種およびNADPHオキシダーゼ

一般的に、脊椎動物は、感染、先天性および後天性免疫系に反応する2つの基本的機構を有する(Fearon et al., 1996)。先天性または自然免疫は、以前に宿主を侵入性薬剤に曝したかどうかにかかわらず、感染性の問題に早急に反応するための能力である。先天性系の要素は、食細胞、すなわち、多形核白血球(polymorphonuclear leukocytes: PMN)および単核食細胞系(例えば、マクロファージ)と、循環可溶性プレ酵素タンパク質の補体カスケードとを含む。これらの要素は、植物(Enyedi et al., 1992)および昆虫(Hoffmann et al., 1999)などの多種多様な多細胞生物の免疫系において機能的類似体を有する比較的的非特異的な「パターン認識」を構成する。そのようなものとして、これらの進化的な古代の要素は、生物が宿主の免疫系による以前の「目に見えない」侵入する微生物に直面した場合に、敏速で鋭敏な宿主防衛の監視機構を示す。先天性系とは対照的に、適応免疫は、脊椎動物に制限され、また、宿主細胞が病原体または腫瘍細胞の特性を特に決定する精密に調整された系を示す(Janeway et al., 1994)。しかし、かかる精度は、抗原を処置する時間および特異的リンパ球および抗体を産出する時間を必要とする。したがって、適応系は、特異性を欠く先天性系よりも新規問題への反応が遅い(Fearon et al., 1996)。

30

40

【0070】

顆粒球は、骨髄内にある多能性幹細胞から生じ、好酸球、好塩基球および好中球を含む。PMNは、ヒト末梢循環において最も数の多い白血球であり、通常多葉性の核からその名称を得ている。成人健常者における成熟PMNの日々の生成は、ほぼ 10^{11} 細胞相当である。急性感染または他の炎症ストレス時に、PMNは、最大10倍の通常日常で必要な好中球を含有する骨髄の貯蔵所から能動化される(Nauseef et al., 2000)。PMNは、それらを炎症の部位へ移動させることができる運動性および非常に可塑性の細胞であり、感染性の微生物に対する第1線防御として機能する。この目的のため、PMNは、タンパク質分解および他の細胞傷害性酵素で充填された顆粒を含有する(

50

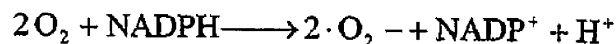
Schettler et al., 1991、Borregaard et al., 1997)。酵素の遊離に加えて、PMNは、酸素を高度な活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) に貪食および変換することもできる。貪食後、摂取した微生物は、酵素活性とROS生成との組み合わせられた作用によってファゴソーム内部で死滅され得る。

【0071】

活性化されると、PMNは、ROSに変換される膨大な酸素を消費し始め、これは、呼吸または酸化のバーストとして既知の工程である (Babior et al., 1976、Babior et al., 1978)。本工程は、酵素NADPHオキシダーゼの活性に依存する。このオキシダーゼは、受容体媒介および受容体非依存性の両工程によって活性化され得る。一般的な受容体依存性の刺激は、補体成分C5a、C3bおよびiC3b (Ogle et al., 1988)、細菌由来の走化性トリペプチドN-ホルミル-Met-Leu-Phe (fMLP) (Williams et al., 1977)、レクチンコンカナバリンA (Weinbaum et al., 1980)、ならびにオプソニン化ザイモサン (opsonized zymosan: OPZ) (Whitlin et al., 1985) である。受容体非依存性の刺激は、長鎖の不飽和脂肪酸およびホルボール12-ミリスチン酸13-アセテート (phorbol myristate acetate: PMA) を含む (Schnitzler et al., 1997)。活性化されると、オキシダーゼは、摂取した微生物を含有する細胞の外側またはファゴソーム内のいずれか一方で、膜の細胞質側でNADPHから電子を受け入れ、これらを膜の他方側で酸素分子に提供する。本方法において、スーパーオキシドアニオン ($\cdot O_2^-$) への酸素の一電子還元は、下記の式に示すようなNADPHの犠牲によって触媒される。

【0072】

【化16】

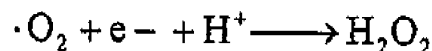


【0073】

本方法において消費された酸素の多くは、 $\cdot O_2^-$ としては表されないが、スーパーオキシドラジカルの不均化により形成される過酸化水素として相当し得る (Hampton, 1998、Roos et al., 1984)。

【0074】

【化17】



【0075】

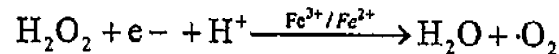
しかし、その制限された膜透過性のために、過酸化水素 (H_2O_2) は高濃度でのみ殺菌性であり (Hyslop et al., 1995)、一方、外因的に産出されたスーパーオキシドは細菌を直接的に死滅させない (Babior et al., 1975、Rosen et al., 1979)。したがって、種々の二次的な酸化体が、PMNの破壊能力を担うように提案されている。

【0076】

鉄触媒されたフェトン反応によって形成されたヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) は、作用範囲は制限されるが、ほとんどの生体分子と極度に反応する (Samuni et al., 1988)。

【0077】

【化 18】



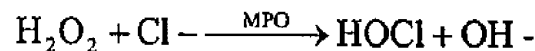
【0078】

一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) は、酸素の電子的に励起された状態として見られることが多く、過酸化を開始する膜脂質と反応してもよい (Halliwell, 1978)。PMN によって産出された H_2O_2 の多くは、ミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase: MPO) によって消費され、酵素は刺激された PMN により遊離される (Kettle et al., 1997、Nauseef, 1988、Zipfel et al., 1997、Klebanoff, 1999)。このヘムを含有するペルオキシダーゼは、アズール顆粒の主な成分であり、塩素イオンを強力な非ラジカル酸化体次亜塩素酸 (HOCl) に酸化させるのための H_2O_2 使用において独特である (Harrison et al., 1976)。MPO の他の基質は、ヨウ化物、臭化物、チオシアナイト、および亜硝酸塩を含む (Van Dalen et al., 1997、Vliet et al., 1997)。

10

【0079】

【化 19】



20

【0080】

HOCl は、PMN により生成されることが知られる最も殺菌性の酸化体であり、細菌の多くの種は $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2$ / 塩化物系で容易に死滅する (Albrich et al., 1982)。

【0081】

実験的な設定において、活性化した食細胞による ROS 生成は、ルミノールまたはルシゲニンなどのエンハンサを使用して検出できる (Faulkner et al., 1993)。ROS 検出において、ルシゲニンは最初に還元される必要があり、一方、ルミノールは不安定なエンドペルオキシドを産出するために一電子酸化される必要があり、その分解によって、光子放出による光が生成される (Halliwell et al., 1998)。ルミノールは概して HOCl を検出し、これはルミノールの検出は、主に $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2$ 系に依存し (McNally et al., 1996)、一方、ルシゲニンを使用する検出は、MPO 非依存性および $\cdot\text{O}_2^-$ に対してより特異的 (Annian et al., 1984) であることを意味する。ルミノールは細胞に入ることができるため、細胞内および細胞外に生成された ROS を検出し (Dahlgren et al., 1989)、一方、ルシゲニンは細胞膜を事実上通過できないため、細胞外での諸現象のみを検出する (Dahlgren et al., 1985)。しかし、実際の特異性は、これらの光放射を向上させる化合物のいずれを用いても決して推測できないため、結果は注意して解釈されるべきである (Liochev et al., 1997)。

30

40

【0082】

$\cdot\text{O}_2^-$ の生成は、ある程度 O_2 濃度に依存し、すべての好気性細胞内で発生するようである。ミトコンドリアにおいて、1～3% の電子が $\cdot\text{O}_2^-$ を形成するように考えられている。また、ROS は、好氣的代謝の量的に有意な生成物であることを下記の計算で示す。安静時の正常成人 (体重 70 kg と想定) は $3.5 \text{ mL } \text{O}_2 / \text{kg} / \text{分}$ を活用し、これは $352.8 \text{ l} / \text{日}$ または $14.7 \text{ mol} / \text{日}$ と同一である。1% が $\cdot\text{O}_2^-$ を作る場合、これは $0.147 \text{ mol} / \text{日}$ もしくは $53.66 \text{ mol} / \text{年}$ を得、または 1 年あたり約 1.7 kg の $\cdot\text{O}_2^-$ を得る。呼吸バースト中の O_2 取り込みの増加は、好中球の静止時 O_2 消費の 10 から 20 倍となることができる (Halliwell et al., 1997)。

50

98)。

【0083】

ROS生成に關与するNADPHオキシダーゼは、静止時PMNにおける集合されていない（したがって、不活性の）多成分酵素系である。しかし、例えば、オプソニン化微生物の細胞表面受容体への結合による食細胞の活性化は、原形質膜上の活性酵素複合体の集合をもたらす（Clark、1990、Segal et al., 1993）。正常な宿主防衛における機能的NADPHオキシダーゼの決定的な重要性は、オキシダーゼが構成タンパク質成分のうちの1つが欠乏するために機能しない障害である、慢性肉芽腫症（chronic granulomatous disease: CGD）を有する個人においてみられる、細菌および真菌感染症により最も顕著に例証される（Smith et al., 1991、Dinauer et al., 1993、Segal et al., 1989、Dinauer et al., 1987、Volpp et al., 1988）。機能的に適格なオキシダーゼを欠くそのような患者からのPMNは、刺激時の $\cdot O_2^-$ 産出に失敗する。刺激されたPMNによるROSの形成は、宿主に有利な生理学的反応であり得るが、これらのラジカルが過剰な組織損傷を生じさせる場合のある多くの炎症状態において不利益ともなり得る（Weiss、1989、Fantone et al., 1985、Jackson et al., 1988）。

【0084】

NADPHオキシダーゼの必須成分は、原形質膜および細胞質タンパク質を含む。重要な原形質膜成分は、91-kDa糖タンパク質（gp91^{phox}）および22-kDaタンパク質（p22^{phox}）で構成されているヘテロ二量体フラボチクロムbである（Rotrosen et al., 1992、Segel et al., 1992）。フラボチクロムbは、電子をNADPHから酸素分子に移動させる役目を果たし、 $\cdot O_2^-$ の産出をもたらす。PMN膜において、低分子量GTP結合タンパク質、Rap1Aは、フラボチクロムbと付随し、体内NADPHオキシダーゼ調節において重要な役割を果たす（Quinn et al., 1989、Gabig et al., 1995）。さらに、細胞質タンパク質p47^{phox}、p67^{phox}、および第2の低分子量GTP結合タンパク質、Rac2は、機能的NADPHオキシダーゼ（Clark et al., 1990、Heyworth et al., 1991、Quinn et al., 1993、DeLeo et al., 1996）を形成するために、NADPHオキシダーゼ活性（Volpp et al., 1988、Lomax et al., 1989a、Lomax et al., 1989b）およびフラボチクロムbと付随するこれらの3つのタンパク質に必要である。さらに、細胞質タンパク質、p40^{phox}が特定されているが、オキシダーゼ機能におけるその役割は完全に明らかではない（Wientjes et al., 1993）。NADPHオキシダーゼ集合の現モデルによると、p47^{phox}およびp67^{phox}は、PMN活性化中にフラボチクロムbと付随するようにen blocを転座させる（DeLeo et al., 1996、Park et al., 1992、Iyer et al., 1994）。Rac2は、膜結合したフラボチクロムbと付随するように他の2つの細胞質成分を同時に、しかし独立して転座させる（Heyworth et al., 1994、Dorseuil et al., 1995）。種々の形態のCGDを有する患者のPMNにおけるオキシダーゼ集合の研究は、p47^{phox}がフラボチクロムbに直接結合し（Heyworth et al., 1991）、gp91^{phox}上の4つの部位およびp22^{phox}上の2つの部位を含む、フラボチクロムbの少なくとも6つの領域が、p47^{phox}と相互作用する推定部位として特定されていることを示す（Kleinberg et al., 1990、Leusen et al., 1994、Leto et al., 1994、Leusen et al., 1994、Nakanish et al., 1992、DeLeo et al., 1995、Sumimoto et al., 1994、Finan et al., 1994）。

【0085】

I I . スクリーニングアッセイのための試薬の調製および本発明のスクリーニングアッセイ

本発明は、概して、SOD1を結合する領域に対応するRacなどのGTPアーゼの領域において、アミノ酸配列に特に結合する薬剤をスクリーニングする方法を提供する。該方法は、領域を含む単離または精製されたペプチド、ポリペプチドまたは融合タンパク質を用いてもよく、ペプチド、ポリペプチドまたは融合タンパク質は、非組み換え細胞（ペプチドおよびポリペプチドに対し）から、またはペプチド、ポリペプチドまたは融合タンパク質をコード化する発現カセットを有する外因性核酸を形質移入された、または化学合成によって調製された組み換え細胞である体外転写／翻訳系から遊離される。また、方法は、組み換え細胞を得るように、過渡的または安定的に細胞に導入された発現カセットからペプチド、ポリペプチドまたは融合タンパク質を発現させる細胞を用いてもよい。発現カセットは、ペプチド、ポリペプチドまたは融合タンパク質の発現を促進するプロモータを含む。プロモータは、構造的プロモータまたは、例えば誘導性の調節可能なプロモータであってもよい。

【0086】

したがって、スクリーニング方法に用いられるGTPアーゼおよびSODタンパク質は、組み換えまたは内因性（自然）であってもよく、アッセイは、例えば、単離または精製されたRacおよび単離または精製されたSODを用いるものや、例えばエンドソーム分画などのRacおよび／またはSODを供給するために細胞成分分画を用いるものなどの無細胞アッセイであってもよく、または、例えば細胞全体もしくは細胞可溶化物などの細胞ベースのアッセイであってもよい。溶解物または細胞成分分画を用いる一部のアッセイにおいて、単離された、例えば組み換えGTPアーゼまたはSODを、GTPアーゼ、SOD、またはGTPアーゼおよびSODのどちらをも含む溶解物または細胞成分分画に加えてもよい。

【0087】

一実施形態において、検査薬または薬剤のライブラリは、RacおよびSODと接触するその混合物と接触する。別の実施形態において、検査薬またはライブラリは、SODおよびGTPアーゼと接触するその混合物と接触する。一実施形態において、検査薬または薬剤のライブラリは、GTPアーゼおよびSODと、例えば、組み換えGTPアーゼもしくはSODまたは適切な結合領域を含むその部分と接触する。

【0088】

一実施形態において、SODに結合するRac1の領域に対応する、またはRac1を結合するSODの領域に対応するアミノ酸配列を有するペプチド、ポリペプチドまたは融合タンパク質は、カラム、ビーズまたは他の個体の担体、例えばマルチウエルプレートのウェルと結合する。一実施形態において、ペプチドまたはポリペプチドは、他の配列、例えばグルタチオンS-トランスフェラーゼ（glutathione S-transferase: GST）配列、Hisタグ、カルモデュリン結合ペプチド、タバコエッチウィルスプロテアーゼ、タンパク質A IgG結合ドメイン等、もしくは連結されたRacまたはSOD ポリペプチドを単離、精製または検出するのに有用な配列の組み合わせに融合する。一実施形態において、GST-Rac1は、担体、例えばマルチウエルプレート上に固定化され、1つ以上の薬剤および緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein: GFP）-SODを、固定化されたRac融合タンパク質に同時にまたは連続して加える。ウェル当たりのGFPの量または存在を検出または判断し、および試薬添加のない対応する試料においてGFPの量または存在を任意に比較する。

【0089】

GTPアーゼとSODの結合を調節する薬剤は、ROS精製を調節してもよい。ROSの生成を検出する方法および過剰ROSに関連する疾患の動物モデルは、当技術分野において既知である。具体的には、RacとSODの結合の阻害剤は、過剰ROS、例えば運動ニューロン障害により特徴付けられる疾患治療の候補である。

【0090】

A. 定義

用語「外因性」は、細胞または生物におけるタンパク質、遺伝子、核酸、またはポリヌクレオチドとの関連で使用される場合、人工的または自然な手段により細胞内または生物内に導入されたタンパク質、遺伝子、核酸、またはポリヌクレオチドを言う。外因性核酸は、異なる生物または細胞からのものであってもよく、生物または細胞内で自然に発生する核酸の1つ以上の付加的な複製物であってもよい。非限定的な例として、外因性核酸は、自然細胞とは異なる染色体位置にあり、あるいは、例えば、一遺伝子からのプロモータを、異なる遺伝子からの遺伝子生成物の読み取り枠に連結する発現カセットなどの、自然界に見られるものとは異なる核酸配列によって配置される。

10

【0091】

用語「単離された」は、核酸、ペプチド、またはポリペプチドとの関連で使用される場合、少なくとも1つの混入物核酸、ポリペプチド、またはその自然源と通常関係がある他の生物学的成分から同定および分離された核酸配列、ペプチド、またはポリペプチドを言う。単離された核酸、ペプチドまたはポリペプチドは、自然界に見られるものとは異なる形態または設定で示され、例えば、一定のDNA配列（例えば、遺伝子）は、隣接遺伝子に近接して宿主細胞染色体上で見られ、特異的タンパク質をコード化する特異的mRNA配列などのRNA配列は、多数のタンパク質をコード化する多くの他のmRNAを有する混合物として細胞内に見られる。単離された核酸分子は、一本鎖または二本鎖の形態で示されてもよい。単離された核酸分子がタンパク質の発現に活用される場合、分子は、最小限でもセンス鎖またはコード鎖（つまり、分子は一本鎖であってもよい）を含むが、センス鎖およびアンチセンス鎖（つまり、分子は二本鎖であってもよい）の両方を含んでもよい。

20

【0092】

本明細書において使用される用語「組み換えDNA分子」は、分子の生物学的技術により連結されたDNAのセグメントを含むDNA分子を言う。

【0093】

本明細書において使用される用語「組み換えタンパク質」または「組み換えポリペプチド」は、組み換えDNA分子から発現するタンパク質分子を言う。

【0094】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、特に区別されない限り本明細書において同一の意味で使用され、「ペプチド」は、概して全長のポリペプチドもしくはタンパク質の一部、または連結された配列を単離、精製または検出するのに有用なアミノ酸配列を言う。

30

【0095】

本明細書における「形質移入」、「形質転換された」または「遺伝子導入」は、少なくとも1つの組み換えDNA配列の存在によって変換または増大した任意宿主細胞または株化細胞を含むように使用される。本発明の宿主細胞は、通常、単離された線状DNA配列としてのプラスミド発現ベクターにおけるDNA配列の形質移入または組み換えウイルスベクターとの感染によって生成される。

40

【0096】

用語「配列相同性」は、2つの核酸配列間の塩基一致の比率または2つのアミノ酸配列間のアミノ酸一致の比率を意味する。配列相同性を、例えば50%などのパーセンテージを表す場合、パーセンテージは、何らかの他の配列と比較された選択配列の長さに対して一致する比率を示す。ギャップ（2つの配列のいずれか一方において）は、一致を最大化させることができ、15塩基以下のギャップ長が通常使用され、6塩基以下が好ましく、塩基以下はより好ましい。オリゴヌクレオチドをプローブまたは処置として使用する場合、標的核酸とオリゴヌクレオチド配列の配列相同性は、概して、20個の可能なオリゴヌクレオチド塩基対一致（85%）のうちの17個の標的塩基一致より少なくならず、好ましくは、10個の可能な塩基対一致（90%）のうちの9個の一致より少なくならず、よ

50

り好ましくは、20個の可能な塩基対一致(95%)のうちの19個の一致より少なくな
らない。

【0097】

2つのアミノ酸配列は、それらの配列間に部分的または完全な同一性がある場合に相同
である。例えば、85%の相同性は、2つの配列が最大一致となるように整列されたとき
に、アミノ酸の85%が同一であることを意味する。ギャップ(2つの配列のいずれか一
方における)は一致を最大化させることができ、5以下のギャップ長が好ましく、2未満
がより好ましい。あるいは、または好適には、変異データ行列および6以上のギャップペ
ナルティを用いるプログラムALIGNを使用して、5より大きいアラインメントスコア
(標準偏差単位で)を有する場合に、2つのタンパク質配列(または、少なくとも30ア
ミノ酸長のそれらに由来するポリペプチド配列)は、この用語が本明細書で使用される場
合に、相同である。Dayhoff、1972を参照。2つの配列またはその部分は、より好ましくは、ALIGNプログラムを使用して最適に整列されたときに、それらのアミ
ノ酸が50%の同一性よりも大きいまたは等しい場合に相同である。

【0098】

本明細書における用語「に対応する」は、ポリヌクレオチド配列が基準ポリヌクレオチ
ド配列のすべてまたは一部に構造的に関連すること、または、ポリペプチド配列が基準ポ
リペプチド配列のすべてまたは一部に構造的に関連することを意味し、例えば、それらは
少なくとも80%、85%、90%、95%以上、例えば99%または100%の配列同一
性を有する。対照的に、本明細書における用語「と相補的な」は、相補的な配列が基準
ポリヌクレオチド配列のすべてまたは一部と相同であることを意味する。例示として、ヌ
クレオチド配列「TATAC」は、基準配列「TATAC」に相当し、基準配列「GTAT
TA」と相補的である。

【0099】

用語「基準配列」、「比較窓」、「配列同一性」、「配列同一性のパーセンテージ」、
および「実質的に同一性」は、2つ以上のポリヌクレオチド間の配列関係を説明するた
めに使用される。「基準配列」は、配列比較の基準として使用される定義された配列であ
り、基準配列は、例えば、全長のcDNAのセグメントまたは配列表に示される遺伝子配列
としての、より大きな配列のサブセットであってもよく、または完全なcDNAもしくは
遺伝子配列を含んでもよい。概して、基準配列は、少なくとも20ヌクレオチドの長さで
あり、高い頻度で少なくとも25ヌクレオチドの長さであり、多くの場合少なくとも50
ヌクレオチドの長さである。2つのポリヌクレオチドはそれぞれ、(1)2つのポリヌク
レオチド間で類似の配列(つまり、完全なポリヌクレオチド配列の一部)を含んでもよく、
(2)2つのポリヌクレオチド間で相違する配列をさらに含んでもよい。2つ(または
2つ以上)のポリヌクレオチド間の配列比較は、通常、配列類似性の局所領域を特定お
よび比較するために、「比較窓」上の2つのポリヌクレオチドの配列を比較することによ
って行われる。

【0100】

本明細書において使用される「比較窓」は、少なくとも20個の連続したヌクレオチド
の概念的セグメントを言い、比較窓におけるポリヌクレオチド配列の一部は、2つの配列
の最適なアラインメントに対する基準配列(付加または欠失を含まない)と比べて、20
パーセント以下の付加または欠失(つまり、ギャップ)を含んでもよい。比較窓を整列す
る配列の最適なラインメントは、SmithおよびWatermanのlocal homologous algorithm(1981)、PearsonおよびLipman
のsearch for similarity method(1988)、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実現(Wisconsin Genetics S
oftware Package Release 7.0のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA、Genetics Computer Group、5
75 Science Dr., Madison, Wis.)、または検査によって行わ
れてもよく、および種々の方法により生成された最良のアライメント(つまり、比較窓上

で最高パーセンテージの相同性をもたらす)が選択される。

【0101】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列が、比較窓上で同一である(つまり、ヌクレオチドごとのヌクレオチドベースで)ことを意味する。用語「配列同一性のパーセンテージ」は、比較窓上で最適に整列された2つの配列を比較し、一致した位置数を産出するために同一の核酸塩基(例えば、A、T、C、G、U、またはI)が両配列内で発生する位置数を判断し、一致した位置数を比較窓(つまり、窓サイズ)における合計位置数で割り、配列同一性のパーセンテージを産出するためにその結果を100で乗することによって計算される。本明細書において使用される用語「実質的に同一性」は、ポリヌクレオチド配列の特性を示し、ポリヌクレオチドは、少なくとも85パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも90から95パーセントの配列同一性、より一般的には、少なくとも20個のヌクレオチド位置の比較窓上、高い頻度では、少なくとも20~50個のヌクレオチドの窓上での基準配列と比べて、少なくとも99パーセントの配列同一性を有する配列を含み、配列同一性のパーセンテージは、比較窓上で合計20パーセント以下の基準配列の欠失または付加を含んでもよいポリヌクレオチド配列と、基準配列を比較することによって計算される。

10

【0102】

ポリペプチドに適用される用語「実質的に同一性」は、2つのペプチド配列が、規定値のギャップ重量を使用するプログラムGAPまたはBESTFITなどによって最適に整列された場合に、少なくとも約80パーセントの配列同一性、好ましくは、少なくとも約90パーセントの配列同一性、より好ましくは、少なくとも約95パーセントの配列同一性、および最も好ましくは、少なくとも約99パーセントの配列同一性を共有することを意味する。

20

【0103】

本明細書において使用される「実質的に純粋」または「精製された」は、対象種が存在する優勢種であることを意味し(つまり、モル基準で、組成物における任意の他の個々の種よりもさらに豊富である)、好ましくは実質的に精製された分画は組成物であって、対象種は、存在する少なくとも約50パーセント(モル基準で)のすべての巨大分子種を含む。概して、実質的に純粋な組成物は、組成物内に存在する約80パーセントより大きいすべての巨大分子種を含み、より好ましくは、約85%、約90%、約95%、および約99%より大きい。最も好ましくは、対象種は必須の同種に精製され(混入物種は、従来の検出方法では組成物内で検出できない)、組成物は、基本的に単一巨大分子種から成る。

30

【0104】

B. 発現カセットの調製

例えば、Rac、SOD、そのペプチド、またはその融合物などのGTPアーゼをコード化する発現カセットを調製するには、形質転換のために、組み換えDNA配列またはセグメントは、環状もしくは線状、または二本鎖もしくは一本鎖であってもよい。関心遺伝子生成物をコード化するmRNA配列と実質的に相補的なRNA配列をコード化するDNA配列は、通常、逆の配向で(つまり、5'から3'よりはむしろ3'から5')カセットクロン化された「センス」DNA配列である。概して、DNA配列またはセグメントは、細胞内においてDNAの発現を促進する対照配列によって配置されたコード領域も含有できる、プラスミドDNAなどのキメラDNAの形態である。本明細書において使用される「キメラ」は、ベクターが少なくとも2つの異種からのDNAを含むこと、または、「未変性の」または野生型の種においては発生しない方法で連結または付随した同種からのDNAを含むことを意味する。

40

【0105】

転写単位またはその部分として機能するDNA配列に加えて、DNAの部分は、転写されなくてもよく、制御的または構造的な機能を果たす。例えば、DNA自体は、真核細胞において、例えば哺乳類細胞または特定の細胞種において活性であるプロモータを含んで

50

もよく、リンパ球向性ウイルスの形質転換標的であるゲノム内にすでに存在するプロモータを活用してもよい。かかるプロモータは、CMVプロモータならびにSV40の遅いプロモータとレトロウイルスLTR（末端反復配列要素）を含むが、例えば、本発明の実践においてMMTV、RSV、MLVまたはHIV LTRなどの、当業者には既知である多くの他のプロモータ要素を用いてもよい。

【0106】

また、イントロン、エンハンサ、ポリアデニル化配列等の宿主細胞において機能的な他の要素は、組み換えDNAの一部であってもよい。かかる要素は、DNAの機能に必要であってもなくてもよいが、転写、mRNAの安定性等に影響を及ぼすことによってDNAの向上した発現を提供できる。かかる要素は、細胞内において最適な性能の形質転換DNAを取得するために、上記のようなDNA内に含まれてもよい。

10

【0107】

細胞内に導入される組み換えDNAは、形質転換されるよう標的された細胞集団からの、形質転換された細胞の同定および選択を容易にするため、選択可能なマーカー遺伝子またはレポータ遺伝子のいずれか一方または両方を含むしてもよい。あるいは、選択可能なマーカーは、DNAの別々の断片上に運ばれてもよく、同時形質転換工程で使用されてもよい。選択可能なマーカーおよびレポータ遺伝子はどちらも、宿主細胞における発現を可能にするように適切な制御配列で配置されてもよい。有用な選択可能なマーカーは、当業者には既知であり、例えば、neo、hpt、dhfr、bar、aroA、puro、hyg、dapA等の抗生物質および除草剤抵抗性遺伝子を含む。また、Lundquistらの表1に記載の遺伝子も参照。（米国特許第5,848,956号）。

20

【0108】

レポータ遺伝子は、潜在的に形質転換された細胞を同定するため、および制御配列の機能性を評価するために使用される。タンパク質を容易に分析可能のようにコード化するレポータ遺伝子は、当業者には既知である。概して、レポータ遺伝子は、受容生物または組織内に存在しない、またはそれらによって発現されない遺伝子であって、例えば酵素活性などの何らかの容易に検出可能な特性によって発現が現れるタンパク質をコード化する遺伝子である。例示的なレポータ遺伝子は、大腸菌のTn9からのクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(catt)、大腸菌のuidA座β-グルクロニダーゼ遺伝子(glucuronidase:gus)、緑色、赤色または青色蛍光タンパク質遺伝子、およびルシフェラーゼ遺伝子を含む。レポータ遺伝子の発現は、DNAの受容細胞内への導入後、適切な時間に分析される。

30

【0109】

標的細胞を形質転換できる組み換えDNAを構成する一般的な方法は、当業者には既知であり、同一の組成物および同一の構成方法が本明細書において有用なDNAを生成するために活用されてもよい。

【0110】

関心DNA配列が宿主細胞によって発現されるように、組み換えDNAを有する形質転換された（遺伝子導入）細胞を産出するため、例えば物理的または生物学的方法などの特定の細胞への導入に有用な任意の工程によって、組み換えDNAを、宿主細胞に、例えば哺乳類、細菌、酵母もしくは昆虫細胞、または原核細胞内に容易に導入することができる。一実施形態において、組み換えDNAは、細胞のゲノム内へ安定に組み込まれる。

40

【0111】

組み換えDNAを宿主細胞内へ導入する物理的方法是、カルシウム媒介の方法、リポフェクション法、粒子衝突、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション等を含む。関心DNAを宿主細胞内へ導入する生物学的方法は、DNAおよびRNAウイルスベクターの使用を含む。例えばレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターなどのウイルスベクターは、哺乳類細胞、例えばヒト細胞などの真核細胞内に遺伝子を挿入するために広く利用される方法となっている。他のウイルスベクターは、ボックスウイルス、例えばワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、バキュロ

50

ウイルス等に由来することができる。

【0112】

宿主細胞における組み換えDNA配列の存在を確認するため、種々のアッセイが行われてもよい。かかるアッセイは、例えば、サザンおよびノーザンブロット法、RT-PCRおよびPCRなどの当業者には既知である分子生物学的アッセイと、例えば、免疫学的な手段（ELISAおよびウエスタンブロット）による、または他の分子アッセイより特定の遺伝子生成物有無の検出などの生化学的アッセイを含む。

【0113】

導入された組み換えDNAセグメントから生成されたRNAを検出および定量するために、RT-PCRが用いられてもよい。PCRのこの利用において、まず、逆転写酵素などの酵素を使用してRNAをDNAに逆転写し、その後、従来のPCR技術を用いてDNAを増幅する必要がある。大抵の場合、PCR技術は、有用ではあるが、RNA生成物の完全性を示さない。RNA生成物の性質に関するさらなる情報は、ノーザンブロット法で取得することができる。本技術は、RNA種の存在を実証し、そのRNAの完全性に関する情報を提供する。また、RNA種の有無は、ドットまたはスロットブロットノーザンハイブリダイゼーションを使用して実証することもできる。これらの技術は、ノーザンブロット法の改良であり、RNA種の有無のみを実証する。

【0114】

サザンブロット法およびPCRは、問題になっている組み換えDNAセグメントを検出するために使用できるが、組み換えDNAセグメントが発現するかどうかに関する情報は提供しない。発現は、導入されたDNA配列のペプチド生成物を特に特定することによって、または宿主細胞内の導入されたDNAセグメントの発現によってもたらされる表現型の変化を評価することによって評価されてもよい。

【0115】

C. ペプチド、ポリペプチドおよび融合タンパク質

本発明のペプチド、ポリペプチドまたは融合タンパク質は、例えば固相ペプチド合成法または組み換えDNAアプローチ（上記参照）によって、体外で合成できる。固相ペプチド合成法は、確立された広く利用されている方法である。これらのポリペプチドは、免疫親和性またはイオン交換カラム、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上またはDEAEなどのアニオン交換樹脂上のクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈殿、例えばSephadex G-75を使用するゲルろ過、またはリガンド親和性クロマトグラフィーでの分別によりさらに精製されることができる。

【0116】

単離され、特徴付けられると、一定のペプチド、ポリペプチド、またはその融合物の化学的に修正された誘導体は、容易に調製できる。また、例えば、本発明のペプチド、ポリペプチド、またはその融合物のアミドは、カルボン酸基または前駆物質をアミドに変換する当技術分野では既知の技術によって調製されてもよい。C末端カルボキシル基でアミドを形成する好適な方法は、適切なアミンを有する個体の担体からペプチド、ポリペプチド、またはその融合物を開裂させること、またはアルコールの存在下で開裂させてエステルを得、所望のアミンによるアミノリシスを行うことである。

【0117】

ペプチド、ポリペプチド、またはその融合物のカルボキシル基の塩は、例えば、水酸化ナトリウムなどの金属水酸化物塩基、例えば、炭酸ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウムなどの金属炭酸塩基または重炭酸塩基、または例えば、トリエチルアミン、トリエタノールアミン等などのアミン塩基などの所望の塩基の1つ以上の等価物を有するペプチド、ポリペプチド、またはその融合物を含有することによって通常の方法で調製されてもよい。

【0118】

ペプチド、ポリペプチド、またはその融合物のアミノ基のN-アシル誘導体は、最終的な縮合のためのN-アシル保護アミノ酸を活用することによって、または保護もしくは非

10

20

30

40

50

保護のペプチド、ポリペプチド、またはその融合物をアシル化することによって調製されてもよい。O-アシル誘導体は、例えば、遊離ヒドロキシポリペプチドまたはポリペプチド樹脂のアシル化によって調製されてもよい。どちらのアシル化も、ハロゲン化アシル、無水物、アシルイミダゾール等などの標準的なアシル化試薬を使用して行うことができる。N-およびO-アシル化は、所望に応じて両方一緒に行ってもよい。

【0119】

ホルミルメチオニン、ピログルタミンおよびトリメチルアラニンは、ポリペプチドのN末端残基で置換されてもよい。他のアミノ末端修飾は、アミノオキシペンタン修飾を含む。

【0120】

一実施形態において、RacもしくはRhopeプチド、ポリペプチドまたはそれらとの融合は、実質的に同一性、例えば、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 5に対応する野生型RacまたはRhopeタンパク質配列と、例えば、少なくとも80%以上、例えば、85%、90%または95%および最大100%のアミノ酸配列同一性、例えば、SEQ ID NO: 1の約残基35から約残基70の残基と実質的に同一性を有し、および任意に、SODに結合する野生型RacまたはRhopeの能率性と比較して、少なくとも1%、20%、50%以上、例えば、100%、110%以上の能率性を有するSODを結合する。故に、RacもしくはRhopeまたは置換RacもしくはRhopeのペプチドは、野生型（全長の）RacまたはRhopeと比較して、低減した、実質的に同一、または向上した能率性を有する野生型SOD（または変異体SOD）を結合してもよい。特定の残基に関連して本明細書において使用される「約」は、指定された残基の5残基以内、例えば、特定の配列における残基「X」に対応する残基「X」の1、2、3、4または5残基以内を意味する。一実施形態において、本発明のRacペプチドは、SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 2と80%、85%、90%、95%または99%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、例えば、TVFD/ENYS/VAN/DV/IM/EVDG/SKP/QVN/ELG/ALWDTAGQEDYDRLRPLを有するペプチドまたはそれと80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有し、SODを結合するアミノ酸配列である。

【0121】

Racにおけるアミノ酸の置換は、DよりはむしろL形態を活用し、他の既知のアミノ酸類似体、例えば、 α 、 α -二置換アミノ酸などの非天然アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸等を活用する置換を含む。これらの類似体は、リン酸化セリン、リン酸化スレオニン、ホスホチロシン、ヒドロキシプロリン、 γ カルボキシグルタミン酸、馬尿酸、オクタヒドロインドール-2-カルボン酸、スタチン、1, 2, 3, 4, -テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、ペニシラミン、オルニチン、シトルリン、 α -メチルアラニン、パラベンゾイルフェニルアラニン、フェニルグリシン、プロパギルグリシン、サルコシン、 ϵ -N, N, N-トリメチルリジン、 ϵ -N-アセチルリジン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、 ω -N-メチルアルギニン、ならびに他の同様のアミノ酸とイミノ酸およびtert-ブチルグリシンを含む。

【0122】

保守的なアミノ酸置換が好ましく、つまり、例えば、酸性アミノ酸としてのアスパラギン-グルタミン、極性の塩基性アミノ酸としてのリジン/アルギニン/ヒスチジン、ロイシン/イソロイシン/メチオニン/バリン/アラニン/プロリン/グリシン無極性または疎水性アミノ酸、極性または親水性アミノ酸としてのセリン/スレオニンである。また、保守的なアミノ酸置換は、側鎖に基づく分類を含む。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり、脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群は、セリンおよびスレオニンであり、アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギンおよびグルタミンであり、芳香族側鎖を有する

アミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり、塩基性側鎖を有するアミノ酸の群は、リジン、アルギニン、およびヒスチジンであり、および硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システインおよびメチオニンである。例えば、イソロイシンまたはバリンとロイシンの置換、グルタミン酸とアスパラギン酸の置換、セリンとスレオニンの置換、または構造的に関連するアミノ酸とアミノ酸の同様の置換は、結果として得られるペプチド、ポリペプチドまたは融合ポリペプチドの特性に大きな影響を及ぼさないと予測することが妥当である。アミノ酸変化が機能的ペプチドに繋がろうとなかろうと、ポリペプチドまたは融合ポリペプチドは、ペプチド、ポリペプチドまたは融合ポリペプチドの特異的活性を分析することで用意に判断できる。

【0123】

本発明の範囲内のアミノ酸置換は、概して、(a) 置換の領域におけるペプチドバックボーンの構造 (b) 標的部位での分子の変化または疎水性、または (c) 大部分の側鎖を維持することへの影響の点で有意差のない置換を選択することによって実現される。自然発生的な残基は、一般的な側鎖特性に基づいて、

- (1) 疎水性：ノルロイシン、メチ、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンと、
- (2) 中性疎水性：システイン、セリン、スレオニンと、
- (3) 酸性：アスパラギン酸、グルタミン酸と、
- (4) 塩基性：アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニンと、
- (5) 鎖配向を左右する残基：グリシン、プロリンと、
- (6) 芳香族：トリプトファン、チロシン、フェニルアラニンと、の群に分割される。

【0124】

また、本発明は、非保守的な置換を有するペプチド、ポリペプチドまたは融合ポリペプチドも想定する。非保守的な置換は、上記のクラスのうちの1つのメンバの別のものへの交換を伴う。

【0125】

ペプチド、ポリペプチドまたは融合ポリペプチドの酸付加塩、またはペプチド、ポリペプチドまたは融合ポリペプチドのアミノ残基の酸付加塩は、例えば塩酸などの所望の無機酸または有機酸の1つ以上の等価物を有するポリペプチドまたはアミンを含有することによって調製されてもよい。また、ポリペプチドのカルボキシル基のエステルは、当業者には既知である任意の通常の方法によって調製されてもよい。

【0126】

本発明のペプチドまたはポリペプチドは、例えば、フルオロフォアもしくは他の検出可能な部分を用いて標識化されてもよく、および／またはRacおよびSOD結合の検出を容易にし得るGF P、RF P、BF PおよびYFPなどのペプチドまたはポリペプチドに融合してもよい。検出（または単離および精製）を容易にし得る標識およびペプチドは、核酸分子、つまり、例えばオリゴヌクレオチドなどのDNAまたはRNA、タンパク質、例えば発光タンパク質、ペプチド、例えば、リガンドによって認識可能なペプチド、例えばマルトースおよびマルトース結合タンパク質、ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジンならびにHisタグおよびコバルト、亜鉛、ニッケルまたは銅などの金属、キーホールリンベットヘモシアニン (keyhole limpet hemacyanin: KLH) などの免疫原性を増強させるのに有用な分子などのハプテン、例えば、光化学開裂可能なビオチン、フルオロフォア、発色団などの開裂可能な標識等に限定されないがそれらを含む。

【0127】

III. 本発明の治療方法において有用な例示的な化合物

A. 定義

本明細書において使用される「薬学的に許容可能な塩」は、開示した化合物の誘導体を言い、親化合物は、酸または基塩、その塩を作製することによって修飾される。薬学的に許容可能な塩の例は、アミンなどの塩基性残基のミネラルまたは有機酸塩、カルボン酸などの酸性残基のアルカリまたは有機酸塩等を含むが、これらに限定されない。薬学的に許

10

20

30

40

50

容可能な塩は、例えば、無毒性の無機または有機酸から形成された親化合物の従来の無毒性の塩または四級アンモニウム塩を含む。例えば、かかる従来の無毒性の塩は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸等などの無機酸に由来するもの、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パモン酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、スルファニル酸、2-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンジスルホン酸、シュウ酸、イセチオン酸などの有機酸から調製される塩等を含む。

【0128】

本発明において有用な化合物の薬学的に許容可能な塩は、従来の化学的方法によって、塩基性または酸性部分を含有する親化合物から合成することができる。概して、かかる塩は、水または有機溶媒、または2つの混合物において化学量論量の適切な塩基または酸を有する、これらの化合物の遊離酸または塩基形態と反応させることによって調節でき、概して、エーテル、エチルアセテート、エタノール、イソプロパノール、またはアセトニトリルなどの非水媒体が好ましい。適切な塩の一覧は、参照によりその開示全体が本願明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Sciences (1985) に記載される。

【0129】

本明細書において使用される語句「薬学的に許容可能な」は、過度の毒性、刺激作用、アレルギー反応または妥当な利点／リスク比に見合った他の問題や複雑性なく、健全な医療的判断の範囲内で、ヒトおよび動物の組織との接触用途に適するこれらの化合物、材料、組成物および／または剤形を言う。

【0130】

本明細書において開示される化合物の1つのジアステレオマーは、その他のものと比べて優れた活性を示してもよい。必要に応じて、ラセミ材料の分離は、キラルカラムを使用したHPLCによって、またはTuckerら(1994)において見られるような分割剤を使用した分割によって達成できる。また、式Iのキラル化合物は、例えばHuffmanら(1995)のキラル触媒またはキラルリガンドを使用して直接合成されてもよい。

【0131】

「治療上有効な量」は、本明細書において有用な化合物の量と、例えば、宿主における疾患または障害を治療または予防または疾患または障害の症状を治療すると主張される化合物の組み合わせの量とを含むことが意図される。化合物の組み合わせは、好ましくは相乗的組み合わせである。例えばChouおよびTallalay(1984)により記述されるような相乗作用は、組み合わせで投与された場合の化合物の効果が、単剤として単独で投与された場合の化合物の相加効果を上回る場合に発生する。概して、相乗効果は準最適濃度の化合物で最も明確に示される。相乗作用は、個々の成分と比べて、組み合わせのより低い細胞毒性、増加活性または何らかの他の有益な効果となり得る。

【0132】

本明細書において使用される「治療する」または「治療」は、(i)病態の発生を予防すること(例えば、予防法)、(ii)病態を抑制またはその進行を阻止すること、(iii)病態を軽減および／または病態に関連する症状を減少させることを含む。

【0133】

本明細書において使用される用語「患者」は、本発明の方法によって治療される生物を言う。かかる生物は、ヒトなどの哺乳類を含むがそれに限定されない。本発明との関連で、用語「対象」は、概して疾患または障害の治療のために、治療を受けるまたは受けた個人を言う。

【0134】

「安定化合物」および「安定構造」は、反応混合物から有用な純度への単離、および有効な治療剤への製剤に耐えるのに十分頑強な化合物を示すことを意味する。安定化合物の

みが本発明において意図される。

【0135】

「置換」は、指示された原子の通常の原子価を超えない場合、および置換が安定化合物をもたらす場合において、指示された群からの選択と置換された「置換」の表現を使用して表される原子上の1つ以上の水素を示すことが意図される。適切に指示された群は、例えば、アルキル、アルケニルアルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、ケト、チオキソ、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、 NR^xR^y および/または COOR^x を含み、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシである。置換がケト（つまり、 $=\text{O}$ ）またはチオキソ（つまり、 $=\text{S}$ ）基の場合、原子上の2つの水素が置換される。

10

【0136】

「分断化された」は、指示された原子の通常の原子価を超えない場合、および分断化によって安定化合物をもたらす場合において、指示された群からの選択と挿入された「分断化された」の表現を使用して表される2つ以上の隣接炭素原子と、それらが結合された水素原子（例えば、メチル（ CH_3 ）、メチレン（ CH_2 ）またはメチン（ CH ））との中間を示すことが意図される。かかる適切に指示された群は、例えば、非過酸化オキシ（ $-\text{O}-$ ）、チオ（ $-\text{S}-$ ）、カルボニル（ $-\text{C}(=\text{O})-$ ）、カルボキシ（ $-\text{C}(=\text{O})-$ ）、イミン（ $\text{C}=\text{NH}$ ）、スルホニル（ SO ）またはスルホキシド（ SO_2 ）を含む。

20

【0137】

ラジカル、置換基および範囲に対して下記に記載した特異的および好適な値は、例証にすぎず、ラジカルおよび置換基の定義範囲内における他の定義値または他の値を除外するものではない。

【0138】

「アルキル」は、通常の、第2、第3または環状炭素原子を含有する $\text{C}_{1}-\text{C}_{18}$ 炭化水素を言う。例として、メチル（ Me 、 $-\text{CH}_3$ ）、エチル（ Et 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ）、1-プロピル（ $\underline{n}\text{-Pr}$ 、 $\underline{n}$ -プロピル、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ）、2-プロピル（ $\underline{i}\text{-Pr}$ 、 $\underline{i}$ -プロピル、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ）、1-ブチル（ $\underline{n}\text{-Bu}$ 、 $\underline{n}$ -ブチル、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ）、2-メチル-1-プロピル（ $\underline{i}\text{-Bu}$ 、 $\underline{i}$ -ブチル、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ）、2-ブチル（ $\underline{s}\text{-Bu}$ 、 $\underline{s}$ -ブチル、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ ）、2-メチル-2-プロピル（ $\underline{t}\text{-Bu}$ 、 $\underline{t}$ -ブチル、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ）、1-ペンチル（ $\underline{n}\text{-ペンチル}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ）、2-ペンチル（ $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ）、3-ペンチル（ $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ）、2-メチル-2-ブチル（ $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ）、3-メチル-2-ブチル（ $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ）、3-メチル-1-ブチル（ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ）、2-メチル-1-ブチル（ $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ ）、1-ヘキシル（ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ）、2-ヘキシル（ $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ）、3-ヘキシル（ $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$ ）、2-メチル-2-ペンチル（ $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ）、3-メチル-2-ペンチル（ $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ ）、4-メチル-2-ペンチル（ $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ）、3-メチル-3-ペンチル（ $-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ）、2-メチル-3-ペンチル（ $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ）、2, 3-ジメチル-2-ブチル（ $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ）、3, 3-ジメチル-2-ブチル（ $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ）が挙げられる。

30

40

【0139】

アルキルは、任意に、1つ以上のアルケニルアルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アル

50

カノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、ケト、チオキソ、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、 NR^xR^y および／または COOR^x と置換でき、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシルである。アルキルは、任意に、1つ以上の非過酸化オキシ（ $-\text{O}-$ ）、チオ（ $-\text{S}-$ ）、カルボニル（ $-\text{C}(=\text{O})-$ ）、カルボキシ（ $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ）、スルホニル（ SO ）またはスルホキシド（ SO_2 ）で分断化されることができる。さらに、アルキルは、任意に、少なくとも部分的に不飽和であることができるため、アルケニルを提供する。

10

【0140】

「アルケニル」は、少なくとも1つの不飽和部位を有する通常の、第2、第3または環状炭素原子を含有する C_{2-18} 炭化水素を言い、つまり、炭素-炭素、 sp^2 二重結合などである。例として、エチレンまたはビニル（ $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ）、アリル（ $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ）、シクロペンテニル（ $-\text{C}_5\text{H}_7$ ）および5-ヘキセニル（ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ）を含むが、これらに限定されない。

【0141】

アルケニルは、任意に、1つ以上のアルキルアルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、ケト、チオキソ、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、 NR^xR^y および／または COOR^x と置換でき、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシルである。さらに、アルケニルは、任意に、1つ以上の非過酸化オキシ（ $-\text{O}-$ ）、チオ（ $-\text{S}-$ ）、カルボニル（ $-\text{C}(=\text{O})-$ ）、カルボキシ（ $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ）、スルホニル（ SO ）またはスルホキシド（ SO_2 ）で分断化されることができる。

20

【0142】

「アルキレン」は、親アルカンの同一または異なる炭素原子から2つの水素原子の除去により誘導される2つの1価ラジカルセンターを有する、1~18炭素原子の飽和、分枝もしくは直鎖または環状炭化水素ラジカルを言う。代表的なアルキレンラジカルは、メチレン（ $-\text{CH}_2-$ ）1, 2-エチル（ $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ）、1, 3-プロピル（ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ）、1, 4-ブチル（ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ）等を含むが、これらに限定されない。

30

【0143】

アルキレンは、任意に、1つ以上のアルキル、アルケニルアルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、ケト、チオキソ、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、 NR^xR^y および／または COOR^x で置換することができ、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシルである。さらに、アルキレンは、任意に、1つ以上の非過酸化オキシ（ $-\text{O}-$ ）、チオ（ $-\text{S}-$ ）、カルボニル（ $-\text{C}(=\text{O})-$ ）、カルボキシ（ $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ）、スルホニル（ SO ）またはスルホキシド（ SO_2 ）で分断化されることができる。さらに、アルキレンは、任意に、少なくとも部分的に不飽和であり得るため、アルケニレンを提供する。

40

【0144】

「アルケニレン」は、親アルカンの同一または2つの異なる炭素原子から2つの水素原子の除去により誘導される2つの1価ラジカルセンターを有する、2~18炭素原子の不

50

飽和、分枝もしくは直鎖または環状炭化水素ラジカルを言う。代表的なアルケニレンラジカル 1, 2-エチレン ($-\text{CH}=\text{CH}-$) を含むが、これに限定されない。

【0145】

アルケニレンは、任意に、1つ以上のアルキル、アルケニルアルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、ケト、チオキソ、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、 NR^xR^y および/または COOR^x で置換することができ、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシルである。さらに、アルケニレンは、任意に、1つ以上の非過酸化オキシ ($-\text{O}-$)、チオ ($-\text{S}-$)、カルボニル ($-\text{C}(=\text{O})-$)、カルボキシ ($-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$)、スルホニル (SO) またはスルホキシド (SO_2) で分断化されることができる。

10

【0146】

用語「アルコキシ」は、基アルキル- $\text{O}-$ を言い、アルキルは本明細書において定義される。好適なアルコキシ基は、例えば、メトキシ、エトキシ、 n -プロポキシ、 i so-プロポキシ、 n -ブトキシ、tert-ブトキシ、sec-ブトキシ、 n -ペントキシル、 n -ヘキソキシ、1, 2-ジメチルブトキシ等を含む。

20

【0147】

アルコキシは、任意に、1つ以上のアルキルハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、ケト、チオキソ、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、 NR^xR^y および COOR^x で置換することができ、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシルである。

【0148】

用語「アリール」は、単環（例えば、フェニル）または複数の縮合（融合）環を有する 6 から 20 の炭素原子の不飽和芳香族炭素環式基を言い、少なくとも 1 つの環が芳香族（例えば、ナフチル、ジヒドロフェナンチレニル、フルオレニル、またはアントリル）である。好適なアリールは、フェニル、ナフチル等を含む。

30

【0149】

アリールは、任意に、1つ以上のアルキル、アルケニル、アルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、ケト、チオキソ、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、 NR^xR^y および COOR^x で置換することができ、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシルである。

40

【0150】

用語「シクロアルキル」は、環状の単環または複数の縮合環を有する 3 から 20 の炭素原子の環状アルキル基を言う。かかるシクロアルキル基は、一例として、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロオクチル等などの単環構造、またはアダマンタニル等などの複数の環構造を含む。

【0151】

シクロアルキルは、任意に、1つ以上のアルキル、アルケニル、アルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、

50

ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、ケト、チオキソ、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、 NR^xR^y および COOR^x で置換することができ、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシルである。

【0152】

シクロアルキルは、任意に、少なくとも部分的に不飽和であり得るため、シクロアルケニルを提供する。

【0153】

用語「ハロ」は、フルオロ、クロロ、ブロモおよびヨードを言う。同様に、用語「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素を言う。

【0154】

「ハロアルキル」は、同一または異なってもよい、本明細書において定義されるような1～4のハロ基によって置換される、本明細書において定義されるようなアルキルを言う。代表的なハロアルキル基は、一例として、トリフルオロメチル、3-フルオロドデシル、1,2,1,2,1,2-トリフルオロドデシル、2-ブロモオクチル、3-ブロモ-6-クロロヘプチル等を含む。

【0155】

用語「ヘテロアリール」は、1つ、2つ、または3つの芳香族環を含有し、少なくとも1つの窒素、酸素または硫黄原子を含有する単環式、2環式または3環式環系として本明細書において定義され、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、ハロアルキル、ニトロ、アミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、アルキルチオ、アルキルスルフィニルおよびアルキルスルホニルなどの、例えば1つ以上の、具体的には1つから3つの置換基と非置換または置換されることができる。ヘテロアリール基の例は、2H-ピロリル、3H-インドリル、4H-キノリジニル、4nH-カルバゾリル、アクリジニル、ベンゾ[b]チエニル、ベンゾチアゾリル、 β -カルボリニル、カルバゾリル、クロメニル、シナノリニル、ジベンゾ[b, d]フラニル、フラザニル、フリル、イミダゾリル、イミジゾリル、インダゾリル、インドリシニル、インドリル、イソベンゾフラニル、イソインドリル、イソキノリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ナフチリジニル、ナフト[2, 3-b]、オキサゾリル、ペリミジニル、フェナントリジニル、フェナントロリニル、フェナルサジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキチイニル、フェノキサジニル、フタルアジニル、プテリジニル、プリニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリミジニル、ピロリル、キナゾリニル、キノリル、キノキサリニル、チアジアゾリル、チアントレニル、チアゾリル、チエニル、トリアゾリルおよびキサンテニルを含むが、これらに限定されない。一実施形態において、用語「ヘテロアリール」は、炭素を含有する5または6つの環原子または非過酸化酸素、硫黄およびN(Z)基から独立して選択された1、2、3または4個のヘテロ原子を含有する単環式芳香族環を示し、Zは存在しないか、H、O、アルキル、フェニルまたはベンジルである。別の実施形態において、ヘテロアリールは、特にベンズ誘導体またはプロピレンまたはテトラメチレンジラジカルをそこに融合することにより由来するものの、そこに由来する約8から10の環のオルト融合2環式複素環を示す。

【0156】

ヘテロアリールは、任意に、1つ以上のアルキル、アルケニル、アルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、ケト、チオキソ、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、 NR^xR^y および COOR^x で置換することができ、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキ

10

20

30

40

50

シルである。

【0157】

用語「複素環」は、酸素、窒素および硫黄基から選択され、任意にアルキルまたはC(=O)OR^bで置換された少なくとも1つのヘテロ原子を含有する、飽和または部分的に不飽和環系を言い、R^bは、水素またはアルキルである。一般的に、複素環は、酸素、窒素および硫黄基から選択された1つ以上のヘテロ原子を含有する単環式、2環式または3環式基である。また、複素環基は、環と結合されたオキシ基(=O)を含有できる。複素環基の非限定的な例として、1、3-ジヒドロベンゾフラン、1、3-ジオキサラン、1、4-ジオキサラン、1、4-ジチアン、2H-ピラン、2-ピラゾリン、4H-ピラン、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、インドリニル、イソクロマニル、イソインドリニル、モルホリン、ピペラジニル、ピペリジン、ピペリジル、ピラゾリジン、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピロリジン、ピロリン、キヌクリジンおよびチオモルホリンが挙げられる。

10

【0158】

複素環は、任意に、1つ以上のアルキル、アルケニル、アルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、ケト、チオキソ、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、NR^xR^yおよびCOOR^xで置換することができ、R^xおよびR^yはそれぞれ独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシシルである。

20

【0159】

窒素複素環およびヘテロアリールの例は、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、インドリジン、イソインドール、インドール、インダゾール、プリン、キノリジン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチルピリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、プテリジン、カルバゾール、カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、フェナントロリン、イソチアゾール、フェナジン、イソオキサゾール、フェノキサジン、フェノチアジン、イミダゾリドン、イミダゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドリン、モルホリン、ピペリジニル、テトラヒドロフラン等ならびにN-アルコキシ-窒素含有複素環を含むが、これらに限定されない。本発明の1つの特定の実施形態において、窒素複素環は、3-メチル-5, 6-ジヒドロ-4H-ピラジノ[3, 2, 1-jk]カルバゾール-3-イウムヨウ化物であることができる。

30

【0160】

複素環の別のクラスは、「クラウン化合物」として既知であり、式[−(CH₂)_aA−]の1つ以上の反復単位を有する複素環化合物の特定のクラスを言い、aは2と等しい、または2より大きく、それぞれ別々の発生のAは、O、N、SまたはPとなり得る。クラウン化合物の例は、ほんの一例として、[−(CH₂)₃−NH−]₃、[−((CH₂)₂−O)₄−((CH₂)₂−NH)₂]等を含む。一般的に、かかるクラウン化合物は、4から10個のヘテロ原子および8から40個の炭素原子を有することができる。

40

【0161】

用語「アルカノイル」は、C(=O)Rを言い、Rは、前述のようなアルキル基である。

用語「アシルオキシ」は、−O−C(=O)Rを言い、Rは、前述のようなアルキル基である。アシルオキシ基の例は、アセトキシ、プロパノイルオキシ、ブタノイルオキシおよびペンタノイルオキシを含むが、これらに限定されない。上記で定義したような任意のアルキル基は、アシルオキシ基を形成するために使用されることができる。

用語「アルコキシカルボニル」は、C(=O)ORを言い、Rは、前述のようなアルキ

50

ル基である。

用語「アミノ」は、 $-\text{NH}_2$ を言い、用語「アルキルアミノ」は、 $-\text{NR}_2$ を言い、少なくとも1つのRはアルキルであり、第2のRはアルキルまたは水素である。用語「アシルアミノ」は、 $\text{RC}(=\text{O})\text{N}$ を言い、Rはアルキルまたはアリールである。

用語「イミノ」は、 $-\text{C}=\text{NH}$ を言う。

用語「ニトロ」は、 $-\text{NO}_2$ を言う。

用語「トリフルオロメチル」は、 $-\text{CF}_3$ を言う。

用語「トリフルオロメトキシ」は、 $-\text{OCF}_3$ を言う。

用語「シアノ」は、 $-\text{CN}$ を言う。

用語「ヒドロキシ」または「ヒドロキシル」は、 $-\text{OH}$ を言う。

10

用語「オキシ」は、 $-\text{O}-$ を言う。

用語「チオ」は、 $-\text{S}-$ を言う。

用語「チオキソ」は、 $(=\text{S})$ を言う。

用語「ケト」は、 $(=\text{O})$ を言う。

用語「炭水化物」は、動物の生細胞およびエネルギー源の必須構造的成分を言い、小分子および巨大分子物質を有する単糖を含み、それらが含有する単糖類基の数に従って分類される。用語は、変数の水素および酸素原子と一体になるが、後者2つはブドウ糖 $\{\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\}$ としての水の形成に関しては常に比例している、6つ（または6の何らかの倍数）の炭素原子を含有する糖、澱粉および粘性物質を含む化合物の基のうちの1つを言う。用語は、比率 $2\text{H}:1\text{C}:1\text{O}$ の炭素、酸素および水素を含む化合物または分子を言う。炭水化物は、ショ糖および果糖などの単糖またはキチンおよび澱粉などの複合体多糖ポリマーであることができる。

20

【0162】

炭水化物は、任意に、1つ以上のアルキル、アルケニルアルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、ケト、チオキソ、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、 NR^xR^y および／または COOR^x で置換することができ、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシである。

30

【0163】

糖は、単糖類、2糖、オリゴ糖または多糖であることができる。糖は、ベータ(β)またはアルファ(α)立体化学を有することができ、(R)または(S)相対配置を有することができ、(+)または(-)異性体として存在することができ、およびDまたはL配置内に存在することができる。例えば、糖は、 β -Dグルコースであることができる。

【0164】

用語「糖類」は、任意の糖または他の炭水化物、特に単糖または炭水化物を言う。糖類は、生細胞の必須構造的成分であり、動物のエネルギー源である。用語は、小分子ならびに巨大分子物質を有する単糖を含む。糖類は、それらが含有する単糖類基の数に従って分類される。

40

【0165】

用語「多糖」は、化学的に、つまりグリコシド結合を介してともに連結される糖分子を含有する炭水化物の種類を言う。用語は、単糖の鎖で構成されている炭水化物である炭水化物の任意のクラスを言う。ポリ糖類は、単糖類(単糖)の複数単位で構成されているポリマーである。

【0166】

用語「オリゴ糖類」は、2から10の単糖類単位を含有する化合物を言う。

【0167】

適切な例示的な糖は、例えば、リボース、グルコース、果糖、マンノース、イドース、

50

グロース、ガラクトース、アルトロース、アロース、キシロース、アラビノース、トレオース、グリセルアルデヒドおよびエリトロースを含む。

【0168】

本明細書において使用される「澱粉」は、 α -(1, 4)-D-グルコース繰り返しサブユニットおよび α -(1, 6)-グルコシド結合から成る植物内に存在する複合体多糖を言う。

【0169】

本明細書において使用される「デキストリン」は、熱、酸、酸素またはそれらの組み合わせによる澱粉の部分的な分解によって生成される中間鎖長を有するグルコースのポリマーを言う。

10

【0170】

本明細書において使用される「マルトデキストリン」または「グルコースポリマー」は、主に α -(1, 4)結合によって連結されたD-グルコース単位から成り、20未満のDE（ブドウ糖等価物）を有する甘味のない栄養糖類ポリマーを言う。例えば、United States Food and Drug Administration（21 C. F. R. 項184.1444）を参照。マルトデキストリンは、部分的に加水分解された澱粉生成物である。澱粉加水分解生成物は、一般的に、乾燥重量ベースでブドウ糖として計算された糖減少のパーセンテージである、ブドウ糖等価物（glucose equivalent：DE）として表される加水分解の度合いによって特徴付けられる。

【0171】

20

1つ以上の置換基を含有する上記基のいずれかに関して、かかる基は、立体的に非実用的および／または合成的に不可能な任意の置換または置換パターンを含まないことを、当然理解されたい。さらに、本発明の化合物は、これらの化合物の置換により生じるすべての立体化学的異性体を含む。

【0172】

本明細書において記述される化合物内で選択された置換基は、再帰的な程度に存在する。これに関連して、「再帰的置換基」は、置換基がそれ自体の別の例を挙げてもよいことを意味する。かかる置換基の再帰的性質のため、理論上、大数が任意の請求項に存在する場合がある。医療化学の当業者は、かかる置換基の合計数は、対象とする化合物の所望された特性により制限されることを理解されたい。かかる特性は、一例としてであり限定されないが、分子量などの物理的特性、溶解度またはlog P、対象とする標的に対する活性などの適用性、および合成の容易さなどの実用的特性を含む。

30

【0173】

再帰的置換基は、本発明の対象とする側面である。医療および有機化学の当業者は、かかる置換基の多用途性を理解されたい。再帰的置換基が本発明の請求項に存在する範囲において、合計数は上記のように判断される。

【0174】

本明細書において記述される化合物は、親化合物、親化合物のプロドラッグ、または親化合物の活性代謝物であることができる。

【0175】

40

「プロドラッグ」は、かかるプロドラッグが対象哺乳類に投与された場合、活性親薬物もしくは体内の本発明の他の式または化合物を遊離する共有結合された任意の物質を含むことが意図される。本発明の化合物のプロドラッグは、修飾が、通常のいずれかの体内操作において親化合物に開裂するように、化合物内に存在する機能的基を修飾することによって調製される。プロドラッグは、本発明の化合物を含み、カルボニル、カルボン酸、ヒドロキシまたはアミノ基は、プロドラッグが哺乳類対象に投与された場合に遊離カルボニル、カルボン酸、ヒドロキシまたはアミノ基を形成するように開裂させる、任意の基に結合する。プロドラッグの例は、本発明の化合物におけるアルコールおよびアミン機能的基のアセテート、ギ酸および安息香酸誘導体等を含むが、これらに限定されない。

【0176】

50

「代謝物」は、活性親薬物もしくは本発明の他の式または化合物が、哺乳類対象に投与された場合に、かかる活性親薬物もしくは体内の本発明の他の式または化合物と、生細胞が相互作用する生化学的工工程から生じる任意の物質を言う。代謝物は、生成物または任意の代謝経路からの中間体を含む。

【0177】

「代謝経路」は、1つの化合物を別の化合物へ形質転換し、中間体および細胞機能へのエネルギーを提供する酵素媒介の反応物の配列を言う。代謝経路は、線状または環状であることができる。明白に、本発明の多数の修正および変形は、上記の教示を考慮して可能である。したがって、付属の特許請求の範囲内で、本発明は、本明細書において特に記述されない限り実施してもよいことを理解されたい。

10

【0178】

B. 例示的なN o x 阻害剤

本発明は、例えば、そのサブユニットを抑制することによってN o xを直接的に抑制する、またはR a cもしくは別のG T PアーゼのS O Dへの結合を抑制することによってN o xを間接的に抑制する1つ以上の薬剤を採用することによって、R O Sを抑制する方法を提供する。

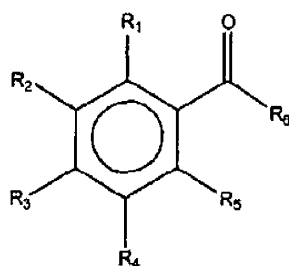
【0179】

式(I)の化合物は、N A D P Hオキシダーゼの適切な強力および選択可能な阻害剤であり、

【0180】

【化20】

20



(I)

30

【0181】

式中、

R¹ は、H、アルキル、アルケニル、アルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、NR^xR^yまたはCOOR^xであって、R^xおよびR^yはそれぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシであり、

40

R² は、H、アルキル、アルケニル、アルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、NR^xR^yまたはCOOR^xであって、R^xおよびR^yはそれぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシであり、

R³ は、H、アルキル、アルケニル、アルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、

50

トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、 $O-R^z$ 、 NR^xR^y または $COOR^x$ であって、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシであり、 R^z は、炭水化物の1価ラジカルである。

【0182】

R^4 は、H、アルキル、アルケニル、アルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、 NR^xR^y または $COOR^x$ であって、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシであり、

R^5 は、H、アルキル、アルケニル、アルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、イミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、シアノ、 NR^xR^y または $COOR^x$ であって、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシであり、

R^6 は、H、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、または NR^xR^y であって、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシであり、

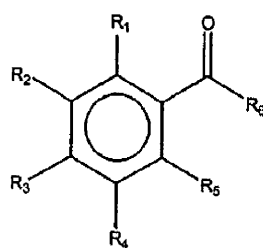
またはその薬学的に許容可能な塩である。

【0183】

式(Ia)の化合物は、NADPHオキシダーゼの適切な強力および選択可能な阻害剤であり、

【0184】

【化21】



(Ia)

【0185】

式中、

R^1 は、Hであり、

R^2 は、アルコキシであり、

R^3 は、ヒドロキシル、アルコキシまたは $O-R^z$ であって、 R^z は、炭水化物の1価ラジカルであり、

R^4 は、H、アルコキシまたはアルキルであり、

R^5 は、Hまたはヒドロキシルであり、

R^6 は、アルキル、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、

複素環、シクロアルキル、アミノ、アルキルアミノまたは NR^xR^y 、であって、 R^x および R^y はそれぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルまたはヒドロキシであり、

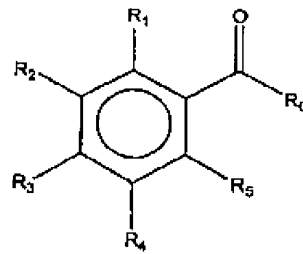
または、その薬学的に許容可能な塩である。

【0186】

式 (I b) の化合物は、NADPHオキシダーゼの適切な強力および選択可能な阻害剤であり、

【0187】

【化22】



(I b)

10

【0188】

式中、

R^1 は、Hであり、

R^2 は、アルコキシであり、

R^3 は、ヒドロキシル、アクロキシ $\text{O}-\text{R}^z$ であって、 R^z は、炭水化物の1価ラジカルであり、

R^4 は、H、アルキルまたはアルコキシであり、

R^5 は、Hまたはヒドロキシルであり、

R^6 は、アルキルであり、

または、その薬学的に許容可能な塩である。

【0189】

特定範囲および値：

式 (I) の化合物に関し、 R^1 の特定値はH、 R^2 の特定値はアルコキシ、 R^2 の別の特定値はメトキシ、 R^3 の特定値はヒドロキシル、 R^3 の別の特定値はヒドロキシルと置換されたアルコキシ、 R^3 の別の特定値は2-ヒドロキシル-エトキシ、 R^3 の別の特定値はヒドロキシル、 R^4 の特定値はH、 R^4 の別の特定値はアルコキシ、 R^4 の別の特定値はメトキシ、 R^4 の別の特定値はアルキル、 R^4 の別の特定値はメチル、 R^5 の特定値はH、 R^5 の別の特定値はヒドロキシル、 R^6 の特定値はアルキル、および R^6 の別の特定値はメチルである。

【0190】

式 (I a) の化合物に関して、 R^2 の特定値はアルコキシである。 R^2 の別の特定値はメトキシである。 R^6 の特定値はアルキルである。 R^6 の別の特定値はメチルである。

40

【0191】

式 (I b) の化合物に関して、 R^2 の特定値はアルコキシである。 R^2 の別の特定値はメトキシである。 R^6 の特定値はメチルである。

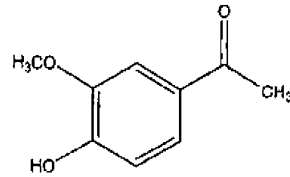
【0192】

式 (I)、(I a) および (I b) の特定の化合物は、アポシニンである。細胞透過性フェノールであるアポシニン (4-ヒドロキシ-3-メトキシアセトフェノン、アセトバニロン、式 I I の化合物) は、NADPHオキシダーゼの適切な強力および選択可能な阻害剤である。

【0193】

50

【化 2 3】



(I I)

【0194】

10

アポシニンは、乾燥根茎およびピクロルヒザ種の根において見られ、例えば、*P. kurroa* および *P. scrophulariiflora* であり、後者は、*Neopicrorhiza scrophulariiflora* としても知られる。また、アポシニンは、例えば、カナダの麻の根茎 (*Apocynum cannabinum*) または他の *Apocynum* 種 (例えば、*A. androsaemifolium*) から、または抽出物が多量の心臓性配糖体を含む場合において *Iris* 種の根茎からなど、他の源から得てもよい。ピクロルヒザ *kurroa* Royle ex Benth は、多年生木質薬草であり、その粗抽出物はアポシニンを含む。

【0195】

20

ピクロルヒザ抽出物は、ピクロルヒザ種の根茎を抽出し、抽出物をカラムクロマトグラフィーに晒すことによって得ることが出来る。あるいは、多量のフェノール化合物を有する抽出物は、配糖体をそれらの各アグリコンに変換するように、植物材料をミネラルで事前処置することによって得ることができる。所望に応じて、材料は、その後、ワックスおよび他の高度に脂溶性物質を除去するために脱脂されてもよい。材料は、例えば、エチルアセテートおよび／またはエタノールで抽出される。有機溶媒を除去し、水溶液を得る。抽出物の pH は、フェノール化合物を脱プロトン化し、水相内でそれらを保持するために、例えば水酸化ナトリウムを用いて 10 まで増加させる。その後、例えばジエチルエーテルを用いて水溶液を洗浄し、ククルビタシンを除去する。その後水相を、フェノール化合物を中和するために再酸性化し、例えばジエチルエーテルで再び抽出する。有機相を採取し、溶媒を除去する。

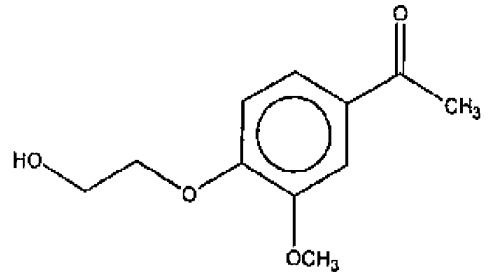
30

【0196】

式 (I) のさらなる適切な化合物は、例えば、以下の式の化合物を含む。

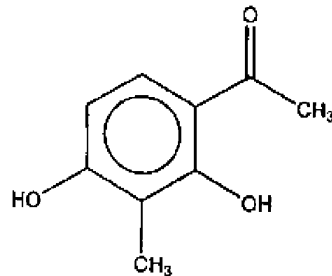
【0197】

【化 2 4】

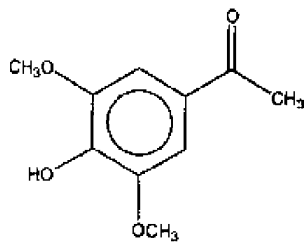


,

10



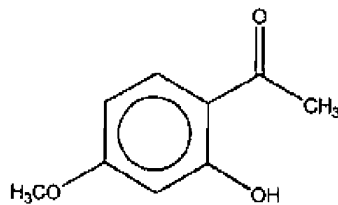
,



,

および

20



,

30

【0198】

R O Sを抑制する治療的または予防的方法において有用な他の化合物は、抗酸化物質、概して、アゼルニジピンまたは他のカルシウム拮抗薬、オルメサルタンまたは他のA T 1受容体遮断薬、コルチコステロイドまたはグルココルチコイド、例えば、デキサメタゾンまたはヒドロコルチゾン、β-アドレナリン受容体刺激薬、例えば、イソプロテレノール、リポコルチン、ピリジン、ポリフェノール、例えば、バニリン、4-ニトログアヤコール、葉酸およびその代謝拮抗物質、ならびにイミダゾール、また、RNA i（実施例2を参照、またはその組み合わせ）および4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリドを含むが、これらに限定されない。

【0199】

40

一実施形態において、薬剤は、スタチン、ACE阻害剤、エイコサノイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、食細胞フィラム属、抗菌ペプチド、例えばPR-39、または、参照によりその開示全体が本願明細書に組み込まれる、米国特許第6,713,605号、第6,184,203号、第6,090,851号、第5,990,137号、第5,939,460号、第5,902,831号、第5,763,496号、第5,726,551号、および第5,244,916号、米国公開出願第20060154856号、第20060135600号、第20040043934号、および第20040001818号、ならびにCifuentesらの(Curr. Op. Nephrol. & Hyperten., 15:179(2006))に開示されるもののうちの1つである。

【0200】

50

C. 製剤および投与量

本発明の薬剤は、薬学的組成物として製剤することができ、静脈、局所または皮下経路によって、選択された投与経路、つまり、経口または非経口に適応する種々の形態において、ヒト患者などの哺乳類宿主に投与できる。

【0201】

薬剤は、不活性希釈剤または吸収可能な可食キャリアなどの薬学的に許容可能な賦形剤を併用して、全身的に投与、例えば経口投与されてもよい。これらは、硬または軟シェルゼラチンカプセル内で封入されてもよく、錠剤内に圧縮されてもよく、患者の食事の食物に直接取り込んでもよい。経口投与では、活性薬剤は、1つ以上の賦形剤と組み合わせてもよく、摂取可能な錠剤、バッカル錠、トローチ、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウエハ等の形態で使用してもよい。かかる組成物および調製は、少なくとも0.1%の活性薬剤を含有すべきである。組成物および調製のパーセンテージは、当然異なってもよく、便宜的に、一定の単位剤形の重量の約2から約60%であってもよい。かかる有用な組成物における活性薬剤の量は、有効な投与量レベルが得られる量である。

【0202】

また、錠剤、トローチ、丸剤、カプセル剤等は、ゴムトラガカント、アカシア、コーンスターチまたはゼラチンなどの結合剤、第2リン酸カルシウムなどの賦形剤、コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸等などの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムなどの滑剤、およびショ糖、果糖、乳糖またはアスパルテムなどの甘味剤を含有してもよく、またはペパーミント、冬緑油、またはサクランボ香味などの香味料が加えられてもよい。単位剤形がカプセル剤の場合、上記種類の材料に加えて、植物油またはポリエチレングリコールなどの液体キャリアを含有してもよい。種々の他の材料は、コーティングとして、あるいは固体の単位剤形の物理的形態を修正するために存在してもよい。例えば、錠剤、丸剤またはカプセル剤は、ゼラチン、ワックス、セラックまたは糖等で皮膜されてもよい。シロップまたはエリキシル剤は、活性化合物、甘味剤としてのショ糖または果糖、保存剤としてのメチルおよびプロピルパラベン、色素およびサクランボまたはオレンジ香味などの香味料を含有してもよい。当然ながら、任意の単位剤形の調製に使用される任意の材料は、採用される量において薬学的に許容可能であり、実質的に無毒性であるべきである。さらに、活性化合物は、徐放性調製および装置に取り込まれてもよい。

【0203】

また、活性薬剤は、注入または注射により静脈内または腹腔内投与されてもよい。活性薬剤の溶液またはその塩は、任意に無毒性の界面活性物質と混合して、水中で調整されることができる。また、分散は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチンおよびその混合物内で、ならびに油内で調製されることができる。保存および使用の通常の条件下において、これらの調製は、微生物の増殖を防ぐための保存剤を含有する。

【0204】

注射または注入に適した薬学的剤形は、任意にリボソーム内に被包される、滅菌注射剤または注入可能な溶液または分散の即時調製に適した活性成分を含む、滅菌水溶液または分散もしくは滅菌粉末を含むことができる。すべての場合において、最終的な剤形は、製造および保存の条件下において、滅菌、液体および安定であるべきである。液体キャリアまたは賦形剤は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、植物油、無毒性のグリセリルエステルおよび適切なその混合物を含む溶媒または液体分散媒体であることができる。適した流動性は、例えばリボソームの製剤によって、分散の場合に必要な粒径の維持によって、または界面活性物質の使用によって維持できる。微生物作用の防止は、種々の抗細菌性および抗真菌性薬剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によってもたらされ得る。大抵の場合、例えば糖、緩衝液または塩化ナトリウムなどの等張剤を含むことが好ましい。注入可能な組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤の組成物、例えば、アルミニウム、モノステアレートおよびゼラチンの使用によってもたらされ得る。

【0205】

滅菌注射剤は、上記に挙げた種々の他の成分を有する適切な溶媒内に適切な量で活性薬剤を取り込むことによって、必要な場合は、その後のろ過滅菌により調製される。滅菌注射剤を調製するための滅菌粉末の場合において、好適な調製方法は、活性成分の粉末に加え、以前に滅菌ろ過された溶液内に存在する任意の付加的な所望成分を産出する、真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【0206】

局所性投与では、薬剤は、その物質だけを、つまり液体であるときに加えてもよい。しかし、固体または液体であり得る皮膚科学的に許容可能なキャリアを併用して、それらを組成物または製剤として肌に投与することが概して望ましい。

10

【0207】

有用な固体キャリアは、滑石、粘土、微結晶性セルロース、シリカ、アルミナ等などの微粉化した固体を含む。有用な液体キャリアは、任意に、無毒性の界面活性物質を活用して、本発明の化合物が有効なレベルで溶解または分散される、水、アルコールもしくはグリコールまたは水-アルコール/グリコール混合物を含む。芳香および付加的な抗菌薬剤などのアジュバントは、一定の使用の特性を最適化するために加えることができる。結果として得られる液体組成物は、包帯または他の包帯剤を含浸させるために使用される吸収性パッドから適用、またはポンプ型またはエアゾール噴霧器を使用して患部に噴霧することができる。

【0208】

20

また、合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩およびエステル、脂肪アルコール、修飾セルロースまたは修飾ミネラル材料などの増粘剤は、ユーザの肌に直接塗布するように、塗布可能な糊状剤、ゲル、軟膏剤、セッケン等を形成するために液体キャリアとともに用いることができる。

【0209】

薬剤の有用な投与量は、動物モデルにおける体外活性および体内活性を比較することによって判断できる。マウスおよび他の動物からヒトまでの、有効な投与量の外挿方法は、当業者には既知であり、例えば米国特許第4,938,949号を参照されたい。

【0210】

概して、水薬などの液体組成物における薬剤の濃度は、約0.1-25wt-%から、好ましくは約0.5-10wt-%からである。ゲルまたは粉末などの半固体または固体組成物における濃度は、約0.1-5wt-%であり、好ましくは約0.5-2.5wt-%である。

30

【0211】

単独使用または他の薬剤との併用に必要とされる薬剤、または活性塩もしくはその誘導体の量は、選択した特定の塩によってのみならず、投与経路、治療される状態の性質および患者の年齢および状態によって様々であり、最終的には付き添いの医師または臨床医の判断による。

【0212】

薬剤は、例えば、5から1000mg、便宜的には10から750mg、最も便宜的には50から500mgの単位剤形当りの活性成分を含有する、単位剤形で便宜的に投与されてもよい。

40

【0213】

しかし、概して、適切な用量は、約0.5から約100mg/kgの範囲であり、例えば、1日当たり受取人の体重のキログラム当たり3から約50mgなどの、1日当たり体重の約10から約75mg/kg、好ましくは6から90mg/kg/日の範囲、最も好ましくは15から60mg/kg/日の範囲である。アポシニン含有組成物は、日常摂取ベースで、少なくとも50μg、好ましくは少なくとも100μg、最大1000mgのアポシニンを含有してもよい。日常摂取の例は、1から100mgのアポシニン、好ましくは少なくとも15mg/日の投与量である。例えば、アポシニンは、植物の根のアルコール抽

50

出物の毎日の筋肉注射によって（40 mg / kg）、または合計 2 mg の 8 用量で投与されるエアロゾル送達によって、1 日 3 回 375 mg の投与量で根粉末として経口投与されてもよい。例示的な製剤および投与量は、300 から 500 mg の根粉末 b. i. d. / t. i. d を含む。さらに、アポシニンの類似体は、アポシニンの代わりに、またはアポシニンに加えて使用されてもよい。具体的には、かかる類似体は、特に 2-ヒドロキシエチル、2, 3-ジヒドロキシプロピルまたは糖部分などのヒドロキシル化アルキル基を用いて、4-ヒドロキシル基がエーテル化されたものである。糖部分が β -D-グルコースである後者の類似体は、一般的にアンドロシンとして既知である。これは、アポシニンが新鮮な植物に存在する通常の形態である。

【0214】

活性成分は、約 0.5 から約 75 μ M、好ましくは約 1 から 50 μ M、最も好ましくは約 2 から約 30 μ M の活性化合物のピーク血漿濃度を実現するために投与されてもよい。これは、活性成分の 0.05 から 5 % 溶液の静脈注射によって、任意に生理食塩水内で、または約 1 ~ 100 mg の活性成分を含有する急速投与としての経口投与によって実現されてもよい。所望の血液レベルは、約 0.01 ~ 5.0 mg / kg / 時間を提供するための継続注入によって、または活性成分の約 0.4 ~ 15 mg / kg を含有する間欠的注入によって維持されてもよい。

【0215】

所望の用量は、単回投与で、または例えば、1 日当り 2、3、4 回以上の副投与として適切な間隔で投与される分割量として、便宜的に示されてもよい。副投与自体は、例えば、吸入器からの複数吸入または複数回の点眼の適用によってなど、離散的に大まかに間隔を空けた投与にさらに分割されてもよい。

【0216】

本発明を以下の限定されない実施例によってさらに説明する。

【実施例 1】

【0217】

SOD1 は、Rac1 媒介の NADPH オキシダーゼ活性化のための酸化還元センサである

材料および方法

材料。 シトクロム C、ホルボールミリスチン酸アセテート（phorbol myristate acetate : PMA）、GTP、GDP、キサンチン、キサンチンオキシダーゼ、イミダゾールセルロース PEI 充填材 TLC プレート、ルシゲニン、 β -NADPH および大腸菌スーパーオキシドジスムターゼを、Sigma-Aldrich corporation (St. Louis, MO) から購入した。ダルベッコ修飾イーグル培地（Dulbecco's modified Eagle's medium : DMEM）、ペニシリン／ストレプトマイシン（penicillin/streptomycin : P/S）、0.25 % トリプシン-EDTA、ウシ胎仔血清（fetal bovine serum : FBS）、アンフォテリシン B およびコラゲナーゼを、Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA) から購入した。放射性ヌクレオチド、液体シンチレーション流体、Dextran 500 およびニトロセルロースタンパク質転写膜を、Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) から購入した。プロテアーゼ阻害剤カクテル（Protease inhibitor cocktail : PIC）、EDTA を含まない PIC、GTP γ S および GDP β S を、Roche Applied Science (Indianapolis, IN) から購入した。ヒスチジンタグ付き Rac1 (His-Rac1)、His-Cdc42、グルタチオン トランスフェラーゼタグ付き（Glutathione transferase-tagged : GST）p50-Rho-GAP 触媒ドメイン（p29-GAP）、GST タグ付き野生型 Rac1、V12 Rac1 および N17 Rac1 変異体融合タンパク質を、Cytoskeleton Inc. (Denver, CO) から購入した。ウシ銅／亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ（SOD1）を、Oxi

10

20

30

40

50

s Research (Portland, OR) から購入した。ダイナビーズタロン、ダイナビーズタンパク質-A およびタンパク質-G を、Dyna l biotech (Lake Success, NY) から購入した。イオジキサノールおよび Nycoprep 1.077 を、Accurate Chemical & Scientific Corp. Westbury, NY) から購入した。

【0218】

免疫沈降 (immunoprecipitation: IP) およびウエスタンブロット法。 SOD1 ヌルマウス (Sod1^{tm1Leb}) を、Jackson Laboratories (Matzuk et al., 1998) から購入した。すべての動物実験は、実験動物の注意および使用の NIH ガイドラインにおいて概説される原則および手順に従って行われた。野生型および SOD1 ノックアウト同腹子からの組織溶解物は、氷冷 PBS において均質化により生成し、その後、40 mM Tris-HCl pH 7.4、300 mM NaCl、2% Triton X-100、100 mM NaF、80 mM β -グリセロリン酸、10 mM EDTA およびプロテアーゼ阻害剤カクテル錠剤を含有する同量の 2X 溶解緩衝液を追加した。タンパク質濃度を、ブラッドフォード分析で測定した。500 μ l の溶解緩衝液において、600 μ g の総タンパク質を 4 μ g の 1 次抗 Rac1 抗体 (Upstate Cell Signaling Solutions Lake Placid, NY) とともにインキュベートすることによって、Rac1 タンパク質の IP を行った。IP 反応物を 4°C で 2 時間回転させた。(溶解緩衝液で 2 回洗浄) したタンパク質 A ダイナビーズを加え、4°C で一晚回転させ、その後、沈降した複合体を磁気除去した。ビーズを溶解緩衝液で 4 回洗浄した。その後、ローディング緩衝液を減少させる SDS-PAGE において、沈殿物を再懸濁し、SDS-PAGE による分離前に 5 分間 98°C でインキュベートした。分離ゲル内の 10% (w/v) アクリルアミドおよび積層ゲル内の 4% アクリルアミドを含有する 0.75 mm ゲルスラブで Mini Protean II Bio-Rad 単位を使用して、0.1% (w/v) SDS、25 mM Tris-HCl-グリシン緩衝液 (pH 8.3) 内で電気泳動を行った。転写タンパク質を有するニトロセルロース膜を、4% w/v 無脂肪粉乳および PBS 内の 0.3% Tween 20 を含有する遮断緩衝液内で 4°C で一晚遮断し、その後、SOD1 (The Binding Site Limited Birmingham, UK) および Rac1 (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA) に対する 1 次抗体とともに、その後、赤外色素共役第 2 抗体とともにインキュベートした。タンパク質バンドを、Odyssey 赤外イメージングシステム (LI-COR Biotechnology Lincoln, Nebraska) で検出した。

【0219】

GST および His タグ付きタンパク質でのプルダウンアッセイ。 スチジンタグ付きタンパク質へのダイナビーズタロンを、100 mM KH_2PO_4 、10 mM NaCl、0.25 mM MgCl_2 および 100 nM CaCl_2 を含有するリン酸カリウム緩衝液 (PPHB) で洗浄した。25 ピコモルの His-Rac1 または His-Cdc42 を、穏やかな断続的攪拌で、30 分間室温で PHB 中のビーズとともにインキュベートした。GTP アーゼを、GTP γ S または GDP β S のいずれか一方を直接使用または負荷して洗浄した。その後 250 ピコモルの SOD1 を、PPHB 中の各チューブに加えた。試料を、穏やかな断続的攪拌で、30 分間室温 (RT) でインキュベートした。その後、非結合の SOD1 を除去するためにビーズを PHB で 3 回洗浄した。4 回目の洗浄は、50 mM Tris pH 6.8 中で行った。タンパク質を 20 μ l の 125 mM イミダゾールを使用して溶出し、その後試料を、ローディング緩衝液を減少させる SDS-PAGE と混合して、ウエスタンブロット法のために SDS-PAGE で分離した。GST-Rac1、GST-V12 Rac1 および GST-N17 Rac1 プルダウンアッセイでは、抗 GST 抗体と共役したダイナビーズタンパク質 G (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) を用いて、同様の

工程を使用した。

【0220】

Rac1 活性化アッセイ。 Rac1 活性化アッセイを、Sanliogluら (2001) に記述される変更を加えて前述の手順を使用して行った。簡単に言えば、このアッセイは、GTP Rac1 (PBDが Pak1 の p21 結合ドメインをコード化する) を特異的に結合するために、PAKのGST-PBD結合ドメイン (細胞骨格) を活用する。脳組織溶解物を、野生型およびSODヌル同腹子マウスから生成し、ブラッドフォード分析を使用してタンパク質濃度のために規準化した。抗GST抗体と共役したダイナビーズタンパク質Gを使用して、GTP結合Rac1を、2mgの脳組織溶解物からGST-PBDで沈殿させた。免疫沈降したペレットを、Rac1およびGSTへのウエスタンブロット法で評価した。Rac1免疫反応性の強度は、試料のGTP結合Rac1レベルと相関する。赤外色素共役第2抗体およびOdyssey赤外イメージングシステム (LI-COR Biotechnology, Lincoln, Nebraska) を使用して、GTP-Racへのウエスタンブロットの定量化を13ヘテロ接合体および7SODヌル動物に行った。

10

【0221】

グアニンヌクレオチド交換 (Guanine Nucleotide Exchange : GEF) アッセイ。 GEF活性は、精製されたHisタグ付きRac1への35S-GTPγSの取り込みを測定することによって、Mansarら (1998) において前述したように分析した。簡単に言えば、750ピコモルの精製されたウシSOD1の有無にかかわらず、1μCiの35S-GTPγSを、25mM Tris-HCl、pH8.0、1mM ジチオスレイトール、5mM EDTAおよび10mM MgCl₂を含有するGEF緩衝液中の250ピコモルのHisタグ付きRac1とともに、穏やかな攪拌で30分間30℃でインキュベートした。試料を、ニトロセルロース膜でろ過し、25mM Tris-HCl、pH8.0、100mM NaCl、および30mM MgCl₂を含有する洗浄緩衝液で4回洗浄した。Rac1上に取り込まれた35S-GTPγSを、液体シンチレーション分光を用いて測定した。

20

【0222】

Rac1 GTPアーゼアッセイ。 Rac1 GTPアーゼアッセイを、変更 (Kwon et al., 2000) を加えて前述のように行った。25ピコモルのHis-Rac1またはHis-Cdc42を、50mM HEPES pH7.6、150mM NaClおよび0.1mM EDTAを含有するGTP結合緩衝液中の25ピコモルのGTPおよび2.5ピコモルのP32標識付きγ-GTPとともに、室温で10分間インキュベートし、その後氷水中に置いた。1μlの一定分量を、このGTPアーゼ反応物の時間0として薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography : TLC) のために摂取した。3つのタンパク質を、種々の組み合わせで、ウシSOD1、大腸菌SOD1および/またはp29-GAPを含有する各反応物に加えた。p29-GAPに対するRac1またはCdc42の比率は、1:1であった。SOD1に対するRac1またはCdc42の比率は、1:10であった。GTPアーゼ反応を開始するため、50mM HEPES pH7.6、150mM NaCl、10mM EDTAおよび10mM MgCl₂を含有する等容量の2X GTPアーゼ緩衝液を、各条件に15℃で加えた。指示された場合、100mUのキサンチンオキシダーゼを、反応混合物内で100μMの最終キサンチン濃度とともにインキュベートした。1μlの一定分量を、異なる時点で各試料からTLCプレート上に滴下した。TLCを、0.8M LiCl泳動用緩衝液を用いて、1M 酢酸において室温で90分間行った。GTP加水分解を定量化するため、遊離リン酸塩 (Pi) バンドを、対応するGTPバンドに沿って取り除いた。それぞれを液体シンチレーション流体内に入れ、液体シンチレーション分光で数えた。加水分解されたGTPのパーセンテージを方程式 $Pi / (Pi + GTP) \times 100$ で計算した。

30

40

【0223】

50

Construction of GST-Rac1 and GST-SOD1 融合タンパク質の構成。 GST-Rac1 および／または GST-SOD1 の野生型、欠失変異体および／または点突然変異体に対する細菌発現コンストラクトを、pGex-2T ベクター (Amersham Biosciences) への PCR 媒介クローニングによって生成した。すべての細菌融合コンストラクトを、完全配列決定により確認した。ALS 変異 L8Q (Bereznaï et al., 1997) および G10V (Kim et al., 2003) を、Gene Editor 体外部位特異的変異誘発システム (Promega Madison, WI) を使用して GST-SOD1 内に導入した。L8Q 変異体の生成に使用されたプライマー配列は、5'-AAGGCCGTGTGCTG CAG AAGGGCGACGGGCCCA-3' (SEQ ID NO: 1) であった。G10V 変異体の生成に使用されたプライマー配列は、5'-AAGGCCGTGTGCTGCTGAAGGTTGACGGGCCCA-3' (SEQ ID NO: 2) であった。

10

【0224】

細菌 GST タグ付きタンパク質の発現および精製。 GST タグ付き発現コンストラクトを、アンピシリン選択を使用して大腸菌に形質転換した。野生型および変異体コンストラクトを宿す細菌集落を、1 リットルフラスコ内の 100 μ g/mL アンピシリンを含有する LB 培地内で、37℃で $A_{600} = 0.6$ の細胞密度まで成長させた。その後、GST タグ付きタンパク質の発現を誘発させるため、イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド (isopropyl-D-thiogalactopyranoside: IPTG) を 1 mM まで加え、培養物を 37℃で 6 時間成長させた。細菌を 4℃で 15 分間の 4000 x g スピンにより採集し、氷上の PBS において再懸濁した。その後細菌を、Virsonic 細胞破壊器 (VirTis Gardiner, NY) を使用して、5 回の 30 秒ソニケーターパルスにより氷上で溶解した。その後、細菌溶解物を、ペレット細片までに 30,000 x g で 30 分間遠心分離した。融合タンパク質を、製造業者の仕様に従いグルタチオン-セファロースビーズ (Amersham Biosciences) を使用して、細胞抽出物から精製し、GST-融合タンパク質を 10 mM グルタチオン、50 mM Tris-HCl、pH 7.5 および 120 mM NaCl で溶出した。融合タンパク質の純度をクーマシー染色 SDS-PAGE で評価し、タンパク質濃度を、ブラッドフォード方法を使用して標準化した。Rac1 の N-末端の 88 または 116 アミノ酸を含有する GST-Rac1 融合タンパク質は、SDS-PAGE 中のその予測分子量よりも一貫して高速に移動し、これらの欠失変異体内に含有されるドメインの変化した折り畳み特性によるものである可能性が高いことに留意すべきである。GST タグ付き SOD1 タンパク質は、トロンビン開裂捕獲キット (EMD Biosciences San Diego, CA) を使用して GST から開裂した。開裂後、FPLC グルタチオン-セファロースカラムを使用して、SOD1 タンパク質を、開裂した GST タグから分離した。

20

30

【0225】

SOD1 の脱メタル化。 精製されたウシ SOD1 の脱メタル化を、変更 (McCord et al., 1969) を加えて上述のように行った。銅および亜鉛は、精製されたウシ SOD1 を pH 3.0 の PBS、2 mM の EDTA に晒し、4℃で 60 分間攪拌することによって除去した。その後タンパク質を、50 mM リン酸カリウム pH 7.4 に対して一晩透析した。Zn の 40 倍モル過剰、それに続く Cu の 4 倍モル過剰が存在する場合、脱メタル化されたウシ SOD1 の分画を、100 mM 酢酸ナトリウム pH 5.5 に対する透析によって再メタル化した。その後、非結合金属を除去するため、SOD タンパク質を PBS pH 7.4 に対して数回透析した。未変性の、脱メタル化および再メタル化されたウシ SOD1 の Cu/Zn 含量を、Ghezzi-Schoneich ら (2001) において記述するように判断した。簡単に言えば、10 μ g SOD1 を、100 mM ホウ酸ナトリウム、pH 7.8、2% SDS および 100 μ M PAR を含有する 1 mL アッセイ緩衝液と混合した。反応混合物を 100℃で 20 分間加熱した。0.8 mM NT

40

50

AおよびEDTAをそれぞれ添加した後、ZnおよびCuレベルを、Shimadzu UV-160分光光度計で測定した500nm読みの減少として計算した。SOD1におけるZnまたはCu含量は、SOD1へのZnまたはCuのモル比で報告される。SOD1酵素活性ゲルを、Zwackaら(1998)において記述したように行った。簡単に言えば、10 μ gの未変性の、脱メタル化または再メタル化されたSOD1を、未変性の12%ポリアクリルアミドゲル上で作用させた。SOD1活性を、ニトロブルーテトラゾリウム還元を使用して判断した。酵素活性を、黒色沈殿物の背景におけるクリアランスゾーンとして定義した。

【0226】

細胞下分画。浮遊密度遠心分離法を、Nox2活性を含有するエンドソームの細胞成分分別および単離に使用した。細胞を、氷冷PBSで2回洗浄し、同一の緩衝液を使用して1.5mlマイクロチューブ内に擦り入れた。0.25Mのショ糖、20mMのHEPES pH7.4、1mMのEDTAおよびEDTAを含まないプロテアーゼ阻害剤カクテルを含有する細胞を均質化緩衝液(homogenization buffer:HMB)内でペレットして再懸濁した。細胞を、細胞破壊高圧チャンバ(Parr instruments、Moline、IL)内で窒素キャビテーションを使用して均質化した。圧力を5分間650-psiまで上昇させて突然解放させた。未破壊細胞、核および重ミトコンドリアをペレットするために、ホモジネートを3000xgで15分間遠心分離した。重ミトコンドリア浮遊物(heavy mitochondrial supernatant:HMS)を、前述の方法を使用して変更(Xia et al., 1998、Graham et al., 1994)を加え、12.5ml SW41Ti超遠心分離チューブにおけるイオジキサノール不連続勾配へ底面負荷した。不連続勾配は、EDTAを有さない1.25ml HMBと、続いて1.0ml 2.5%、1.0ml 5%、1.5ml 9%、1.5ml 14%、2.5ml 19%、1.5ml 26%のイオジキサノールステップの連続な底面負荷と、最後に2ml 32%におけるHMSとで構成される。イオジキサノール濃度は、EDTAを有さないHMBで希釈された50%イオジキサノール希釈標準溶液(working solution:WS)を使用して新たに調製した。0.25Mショ糖および120mM HEPES pH7.4を含有する1分割緩衝液を、5分割のイオジキサノール60%原液に加えて、WSを調製した。SW41Tiスウィングローターを使用して、勾配を100,000xgで一晩4℃で遠心分離した。分画を、氷上の500 μ l画分における分画コレクタ(Labconco, Kansas City, MO)を使用して、チューブ上部から収集した。密度勾配は、過去の研究(Graham et al., 1994、Billington et al., 1998、Graham et al., 1996、Graham et al., 2002、Florine et al., 1999)に基づいて以下の区画を最適に分離するように設計された。画分番号1~5原形質膜(密度1.03~1.05g/ml)、画分番号7~13エンドソーム区画(密度1.055~1.11g/ml)、画分番号8~10ゴルジ体(密度1.06~1.09g/ml)、画分番号10~13軽小胞体(密度1.09~1.11g/ml)、画分番号13~18リソゾーム(密度1.11~1.13g/ml)、画分番号18~21軽ミトコンドリア(密度1.13~1.15g/ml)、画分番号19~20重小胞体(密度1.145g/ml)、画分番号21~24ペルオキシソーム(密度1.18~1.2g/ml)および画分番号22~24細胞質タンパク質(密度1.26g/ml)。

【0227】

NADPH依存性のスーパーオキシド($\cdot O_2$)生成のためのルシゲニン化学発光(lucigenin chemiluminescence:LCL)アッセイ。NADPHオキシダーゼ活性を、ルシゲニンベース系である化学発光(Liet al., 1998)を使用して

【0228】

【化 25】



【0229】

の比率を測定することにより分析した。各細胞成分分画の50 μl 中の5 μM ルシゲニンを、15分間室温で暗所においてインキュベートした。LCLを、単一チューブLuminometer TD20-20 (Turner Designs Sunnyvale, CA) を使用して測定した。適応があれば、DPIおよび／またはSOD有りまたは無しで、 β -NADPHを100 μM の最終濃度まで加えて反応を開始させた。LCLを5分間に及び測定した。発光曲線 (RLU/分) の最初の勾配は、発光正生物形成の比率を計算するために使用され、NADPHオキシダーゼ活性の指標として試料が比較された。NADPHが存在しない場合、発光はごく僅かで、経時的に変化しなかった。

10

【0230】

1次マウス皮膚線維芽細胞 (Primary mouse dermal fibroblast: PMDF) 単離。 PMDFをgp91phox (Nox2) KOヘテロ接合体つがい (Pollack et al., 1995) から単離した。1日齢の子を安楽死させ、滅菌PBSで清潔にして、それらの皮膚を早急に除去した。各子の皮膚を、皮膚を下にして滅菌35mmペトリ皿内に別々に置き、0.25%トリプシン-EDTA上で4℃で一晩浮遊させた。翌日、表皮を真皮から剥がした。その後、真皮をDMEM中の0.2%コラゲナーゼ中で1時間37℃でインキュベートした。線維芽細胞を遊離するために真皮を振盪させ、この混合された細胞集団をペレットし、10%FBS、1%P/S、2.5単位/mlアンフォテリシンBおよび2mM L-グルタミンを有するDMEM内に蒔いた。カルシウム依存性の分化および混入ケラチノサイトの脱離を誘発するために、カルシウムを6mMまで上昇させた。PMDFの増大後、Nox2遺伝子型同定のために、各分離株からの細胞のサブセットでゲノムDNAを生成した。

20

【0231】

1次マウス胎児線維芽細胞 (Primary mouse embryonic fibroblast: PMEF) 単離。 PMEFを、SOD1 KOヘテロ接合体つがい (Matzuk et al., 1998) から単離した。胎児を、性交後14日齢の妊娠中の雌性マウスから回収した。頭部および内部器官の除去後、胎児をPBS内ですすぎ、分割して0.25%トリプシン-EDTA内で一晩4℃でインキュベートした。10%FBS、1%P/S、2mM L-グルタミンおよび55 μM β -メルカプトエタノールを有するDMEMを加えることによって、トリプシンを不活性化させた。細胞を洗浄し、同一の媒体内に蒔いた。PMEFの増大後、SOD1遺伝子型同定のために、各分離株からの細胞のサブセットでゲノムDNAを生成した。

30

【0232】

マウス血液からの多形核白血球 (polymorphonuclear leukocyte: PMN) の単離。 PMNを、Freemanら (1991) において記述したように単離した。簡単に言えば、0.85% (w/v) NaCl、1mM EDTA、10mMヘプス-NaOH pH7.4を含有する1mlの血液希釈緩衝液を前負荷したシリンジにおける心穿刺によって、1mlの血液をマウスから採取した。0.85% (w/v) NaCl、10mMヘプス-NaOH、pH7.4中の0.75容積の20% (w/v) ポリスクロス (デキストラン500) を用いて、30分間室温で希釈血液をインキュベートすることにより、デキストラン凝集を使用して赤血球を沈降させた。その後、白血球に富む浮遊物を除去し、0.5容積のNycoprep 1.077上で層状にし、600x gで20分間遠心分離した。浮遊物を処分し、PMNを血液希釈緩衝液内で再懸濁して早急に使用した。

40

【0233】

マウス多形核白血球 (polymorphonuclear leukocyte: PMN) による $\cdot\text{O}_2$ 産出のための呼吸バーストアッセイ。 無傷PMNによる $\cdot\text{O}_2$ 産出を

50

、変更 (Clark et al., 1987) を加えて前述のように測定した。簡単に言えば、PMNを 10^6 細胞/mlへ調節した。 $125\mu\text{M}$ フェリシトクロムcが存在する場合において、細胞を 500nM ホルボールミリスチン酸アセテート (PMA) または賦形剤 (血液希釈緩衝液内のDMSO最終濃度 0.005%) で、1時間 37°C で処置した。

【0234】

【化26】



【0235】

産出を、フェリシトクロムcのSOD抑制可能な還元として、1時間にわたり経時的に即時測定した。各実験試料に対して2つのウェル ($30\mu\text{g}$ 細菌SODを有する1つのウェルおよびSODを有さない1つのウェル) を有する96ウェルプレートでアッセイを行った。フェリシトクロムcのSOD抑制可能な還元を計算するために基準ウェルを使用した。フェリシトクロムcの還元を、 550nm での吸光度変化によって検出した。曲線の線状部分をは、すべての試料に対し、 0.90 を超えるR-二乗値で線状回帰分析することによって反応率を計算するために使用された。

【0236】

結果

NADPHオキシダーゼによる細胞ROSの調節に重要なRac1結合パターンを特定するための試行において、マウスの肝臓から異所的に発現したHAタグ付きRac1を免疫沈降し、SDS-PAGEにおいて見られる特異的なバンドにMALDI-TOF分析を行った。意外にも、SOD1は、Rac1への潜在的な結合パートナーとして特定された。Rac1/SOD1相互作用が体内で発生したことを確認するため、脳、肝臓、腎臓および心臓を含む幾つかのマウス器官から、同時免疫沈降実験を行った。実際、Rac1の免疫沈降は、sod1-/-マウスの器官からではなく、sod1+/+マウスのこれらの各器官からSOD1を破壊した (図1A)。Rac1に付随するSOD1の量は、脳で著しく最も高く、心臓で最も低かった。この相互作用が直接的なものかどうかをテストするため、精製されたタンパク質を用いる体外プルダウンアッセイを活用した。Rac1がGTPγSを前負荷した場合ではなく、Rac1がGDPβSを前負荷した場合、またはヌクレオチドが存在しない場合に、固定化したHisタグ付きRac1は明らかにSOD1を結合させた (図1B)。対照的に、遊離されたRho GTPアーゼ、Cdc42は、SOD1を結合させなかった (図1B)。これらの結果により、Rac1のGDP結合形態がSOD1を結合させることが示唆される。

【0237】

潜在的なヌクレオチド結合立体配座状態がSOD1との結合に影響したかをさらに検討するため、GTP (Rac1G12V) またはGDP (Rac1T17N) 結合立体配座においてRac1を固定する2つのRac1変異体を評価した。しかし、GST-Rac1G12VまたはGST-Rac1T17Nは、SOD1を弱くのみ結合させ、SOD1のいずれかの変異体への結合は、Rac1へ負荷されたヌクレオチドの種類によって影響を受けなかった (図1C)。対照的に、Hisタグ付きwt-Rac1で上記に示したように、GSTwt-Rac1は、Rac1がGTPγSではなくGDPβSを負荷した場合に、強力にSOD1を結合させる。

【0238】

Rac1がNADPHオキシダーゼを介して

【0239】

【化27】

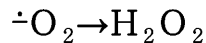


【0240】

生成を調節し (Iranian et al., 1997、Abo et al., 1991)、SOD1が

【0241】

【化28】



【0242】

を不均化させることを考慮すると、SOD1酵素活性は、Rac1との相互作用のために根本的に重要であり得ることが仮定された。SOD1の活性部位で結合する銅(Cu)は、その酵素活性に必要であり、特異的Cuシャペロン(CCS)は、体内においてSOD1に銅を負荷するために必要とされる(Rae et al., 1999)。体外プルダウンアッセイを使用して、Rac1とSOD1との相互作用の酸化還元調節、およびこの相互作用へのSOD1の金属含有の影響を調査した。興味深いことに、Rac1の還元は、SOD1への結合に必要なヌクレオチド優先度を切り替えた(図1D)。非還元の細菌で発現されたRac1は、GDPβSが存在する場合において最も効果的にSOD1に結合する。対照的に、還元したRac1は、GDPβSではなくGTPγSを負荷した場合にSOD1に結合した。さらに、SOD1の未変性の(メタル化された)および再メタル化された形態のみがRac1に結合し、一方で、脱メタル化された(酵素的に不活性)SOD1は、Rac1の結合に失敗した(図1Dおよび図5A)。対照的に、還元されたCdc42-GTPγSまたはCdc42-GDPβSのいずれもSOD1を結合しなかった(図5B)。これらの所見により、還元条件下においてSOD1が実際にRac1-GTPを結合できることを示し、Rac1の酸化還元状態が、GTP対GDP結合状態においてSOD1のその親和性に影響を及ぼすことが示唆される。

【0243】

これらの結果から興味深いことに、GTP結合Rac1の逐次還元および酸化は、Rac1をSOD1結合および非結合状態にそれぞれ循環し得るかどうかを決定した。このため、Rac1(DTTおよび前負荷されたGTPγSで還元)を、H₂O₂の異なる濃度に晒し、過剰H₂O₂をした後、SOD1を結合させるその能力を評価した。これらの研究結果は、50pMほどに低いH₂O₂濃度が、SOD1に対するRac1の結合親和性を有意に増加させたことを実証した(図1E)。Rac1タンパク質に対するH₂O₂媒介の不可逆的な損傷の可能性を除外するため、異なる濃度のDTTを、300pM H₂O₂へ晒された酸化Rac1に戻し入れ、同一の実験を繰り返した。実際、Rac1/SOD1結合のH₂O₂媒介の抑制は、50-300μM DTTでのRac1の処置によって逆転した(図1F)。これらの体外結合データは、Rac1/SOD1結合は、酸化還元抑制され、Rac1の酸化還元状態に応じて結合および非結合状態を循環できることを実証した。

【0244】

SOD1に付随するRac1のドメインを判断するため、Rac1のGSTタグ付き欠失変異体(図2A)を構築し、体外プルダウンアッセイを行った。SOD1は、アミノ酸35から70(図2B)内に含有されるRac1の領域を最も効果的に結合した。このRac1の領域は、ヌクレオチド結合に重要な幾つかのドメイン(つまり、スイッチI、G2、スイッチIIおよびG3ドメイン)(Hirshberg et al., 1997、Ito et al., 1997、Sprang et al., 1997)に及ぶ(図5C)。また、Rac1上のSOD1のこの領域への結合は、SOD1およびGTPγS対GDPβS結合Rac1との結合において観察された差異と、Rac1T17NおよびRac1G12V変異体(どちらもRac1のヌクレオチド結合ドメインに変異を有する)のSOD1を結合させるための能力の低下と一致する(図1C)。

【0245】

興味深いことに、Rac1グアニンヌクレオチド交換因子(guanine nucleotide exchange factor:GEF)Tiam1は、SOD1との

相互作用ドメインに及ぶRac1の領域に結合する(Worthy et al., 2000)。その上、2つの関連Rho GTPアーゼ(RhoAおよびCdc42)上スイッチ領域は、RhoGAPへの結合に関与する(Rittinger et al., 1997a、Rittinger et al., 1997b)。したがって、SOD1は、GEFまたはGAPとして作用することによってRac1活性に影響を及ぼし得ると仮定した。この仮説をテストするため、まず、SOD1が存在しない場合にGTP-Rac1レベルが変化するかどうかを判断した。この目的のために、GST-PDB(GTP-Rac1に結合するPAKドメイン)プルダウンアッセイを行い、sod1+/-およびsod1-/-マウスにおけるGTP-Rac1の程度を評価した。脳組織が体内のSOD1およびRac1間で最も結合を示したため(図1A)、これらのRac1活性化アッセイを脳組織溶解物において行った。これらの実験結果は、GTP結合(活性)Rac1のレベルが、sod1-/-よりもsod1+/-マウス脳組織で有意に高かったことを実証した(図2CおよびD)。しかし、脳内のRac1の合計レベルは、SOD1の有無に影響されなかった(図2C)。これらの所見は、GTP結合Rac1のレベルを増強させることによって、SOD1発現が体内のRac1活性化に影響を及ぼすことを実証した。予想外にも、SOD1は、体外のRac1にかかるGTP負荷に有意に影響しなかった(図6A)。したがって、SOD1は、GTP結合Rac1のレベルを増加させるように従来のGEFとして機能しないようであった。

【0246】

Rac1が、異例に高い内因性GTPアーゼ活性を有するため(Menard et al., 1992)、SOD1がRac1によるGTP加水分解を抑制するかどうかを判断した。図2Eに示すように、これは実際にそのようになった。SOD1は、Rac1の内因性GTPアーゼを有意に抑制し、また、p29Rho-GAPがRac1によるGTP加水分解を活性化することも防いだ。しかし、Rac1 GTPアーゼ活性の抑制は、体外のRac1(データ図示されず)を結合させない細菌SODでは見られなかった(図2F)。また、GTP加水分解を抑制するSOD1の能力は、Rac1に特異的であり、密接に関連する小さなGTPアーゼCdc42では見られなかった(図2G)。さらに、Rac1を結合させない(図1D)脱メタル化された(酵素的に不活性)SOD1も、Rac1 GTPアーゼ活性を抑制しなかった(図6B)。これらの所見は、そのGTPアーゼ活性を抑制することによって、SOD1がRac1-GTPを特に安定化させるように作用することを実証した。

【0247】

Rac1のSOD1への結合が、Rac1の酸化還元状態により制御されるのであれば、Rac1 GTPアーゼ活性の調節も酸化還元調節される場合がある。ROSがRac1によるGTP加水分解を抑制するSOD1の能力を変化させるかどうかを直接評価するため、キサンチン/キサンチンオキシダーゼ(X/XO)

【0248】

【化29】



【0249】

遺伝子評価体系が存在する場合にGTPアーゼアッセイを行った。Rac1が特定のNADPHオキシダーゼによる

【0250】

【化30】



【0251】

生成を調節するのであれば、かかる問題は、体内のROS生成を調節する工程に関連する可能性があった。興味深いことに、SOD1は、このROS遺伝子評価体系が存在する場

合においてR a c 1によるG T P加水分解を抑制するその能力を失った（図2 H）。しかし、実験的条件下で生じたR O Sのレベルは、S O D 1が存在しない場合における内因性R a c 1 G T Pアーゼ活性に影響しなかった（図2 H）。G T Pアーゼアッセイ条件を使用したR a c 1-G T P γ S / S O D 1複合体の免疫沈降は、X / X O由来のR O Sへの暴露が、R a c 1からS O D 1を解離させることを実証した（図2 I）。これらの所見は、これらの2つのタンパク質間の物理的相互作用を制御することによって、R O SがR a c 1 G T Pアーゼ活性を調節するS O D 1の能力を変化させることを実証した。これらの所見は、S O D 1 / R a c 1相互作用を分裂させるH₂O₂の能力と一致する（図1 E）。

【0252】

R a c 1は、N A D P HオキシダーゼN o x 2 g p 9 1 p h o xとのその相互作用を介した細胞

【0253】

【化31】



【0254】

を抑制するその能力がよく知られている（L a m b e t h e t a l . , 2004）。この相互作用は、

【0255】

【化32】



【0256】

および／またはH₂O₂（

【0257】

【化33】



【0258】

の不均化生成物）によって制御される、R O S調節した細胞過程のメンバーの中心にR a c 1を位置付けた。（S u l c i n e r e t a l . , 1996、K h e r a d m a n d e t a l . , 1998、Y a m a o k a - T o j o e t a l . , 2004、I r a n i e t a l . , 1997、P u c e a t e t a l . , 2003）。興味深いことに、S O D 1は、I L - 1 β 活性化後にN o x 2依存性の

【0259】

【化34】



【0260】

を生成するエンドソームの表面へ補充される（実施例2）。これは、R a c 1のG T Pアーゼ活性を抑制することによって、

【0261】

【化35】



【0262】

を生成するためにエンドソーム区画においてR a c 1 / N o x 2複合体をS O D 1が活性化させ得るという仮説をもたらした。この目的のために、エンドソームを含有する未刺激のN o x 2を、1次マウス皮膚線維芽細胞（p r i m a r y m o u s e d e r m a l

10

20

30

40

50

f i b r o b l a s t : P M D F) から単離し、S O D 1 補充がこの区画によるN A D P H依存性の

【0 2 6 3】

【化 3 6】



【0 2 6 4】

産出を活性化させるかどうかを判断した。エンドソーム

【0 2 6 5】

【化 3 7】



10

【0 2 6 6】

が実際にN o x 2 に由来したかどうかを確認するため、N o x 2 g p 9 1 p h o x K O (ー／ー) マウスまたは野生型対照同腹子から単離されたP M D Fを使用した。野生型重ミトコンドリア浮遊物からの小胞分画のイオジキサノール密度勾配分離は、N A D P H依存性の

【0 2 6 7】

【化 3 8】



20

【0 2 6 8】

生成および初期エンドソームマーカーE E A 1で重畳する、N o x 2 g p 9 1 p h o x 、R a c 1およびS O D 1タンパク質(分画番号1 0および1 2)を含有する2つの主なピーク分画を示した(図3 A)。興味深いことに、N o x 2 g p 9 1 p h o x K O細胞は、これらの分画へS O D 1を補充できず(図3 B)、N o x 2は、S O D 1の補充を容易にするようにエンドソーム内に存在する必要があることが示唆された。これらの単離されたエンドソームへの精製されたウシS O D 1の添加は、N A D P H依存性の

【0 2 6 9】

【化 3 9】



30

【0 2 7 0】

を生成するためのそれらの能力を著しく向上させた(図3 C)。このエンドソーム

【0 2 7 1】

【化 4 0】



【0 2 7 2】

の向上は、D P I (N A D P Hオキシダーゼ阻害剤)に対して感受性があり、N o x 2 g p 9 1 p h o x K O P M D Fでは見られなかったため(図3 C)、

40

【0 2 7 3】

【化 4 1】



【0 2 7 4】

は実際にN o x 2 に由来することが示唆された。第2の野生型細胞型、1次マウス胎児線維芽細胞(primary mouse embryonic fibroblast : P M E F)を使用して、外因性ウシS O D 1の単離されたエンドソームへの追加が、N A D P H依存性の

50

【0275】

【化42】



【0276】

を生成する能力を向上させることを確認した（図3D）。このPMEFエンドソームによる

【0277】

【化43】



10

【0278】

の誘導は、

【0279】

【化44】



【0280】

を不均化させる両酵素の同等の能力（図3E）にもかかわらず、大腸菌SODではなく、ウシSOD1で見られた（図3D）。

20

【0281】

内膜のNox2によるその基質

【0282】

【化45】



【0283】

の生成を向上させるSOD1の能力に関心を持ち、生細胞内で同様の機能的効果が見られるかどうかを判断した。Nox2依存性の

【0284】

30

【化46】



【0285】

生成のモデルとして、多形核白血球（polymorphonuclear leukocyte：PMN）のホルボールミリスチン酸アセテート（phorbol myristate acetate：PMA）刺激後に見られる、よく特性化された呼吸バーストを使用した。SOD1は、PMA刺激を受けてNox2活性化および

【0286】

【化47】



40

【0287】

呼吸バーストの減少をもたらすことが仮定された。この目的のため、末梢血PMNをsod1+/+、sod1+/-またはsod1-/-マウスから単離し、それらの呼吸バーストの大きさを評価した。SOD1欠乏は、PMNによるPMA誘導の

【0288】

【化48】



50

【0289】

産出を実際に有意に抑制した（図3F）。さらに、sod1+/-マウス由来のPMNは、sod1+/+およびsod1-/-PMNと比較して、PMA誘導のスーパーオキシド産出において中間還元を示した（図3F）。総体的に、これらの結果は、SOD1が体内のNox2活性化を調節し、Racを調節するSOD1の能力に対する機能的背景を提供できることを実証する。Rac2は、PMNにおけるRacの主なアイソフォームであり、また免疫沈降したRac2も、SOD1に効果的に結合することに留意すべきである（データ図示せず）。

【0290】

SOD1における変異は、遺伝性の筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis：ALS）の優性型、運動ニューロンの進行性消失に関連する致命的な神経変性障害、ならびにその後の筋衰弱および麻痺をもたらす可能性がある（Cleveland et al., 1999）。SOD1変異に起因する優性ALSの特定の家族型は、依然として不明のことが多い機能の中毒性獲得を介して疾患を促進させると考えられる。この目的のため、SOD1変異体によるRac1調節を評価した。野生型ヒトSOD1および2つのヒトALS変異体SOD1タンパク質（L8QおよびG10V）が細菌内に発現および細菌から精製された（図4A）。興味深いことに、ヒトSOD1変異体タンパク質のどちらもが、ヒト野生型SOD1と比べて、Rac1を結合する能力を増強させた（図4B）。ヒト野生型SOD1とは異なり、これらのSOD1変異体のRac1への結合は、X/XO由来のROSによって分裂されなかったため（図4B）、SOD1/Rac1相互作用の酸化還元調節は、SOD1におけるL8QおよびG10V変異によって変化することが示唆された。重要なことに、L8QおよびG10VヒトSOD1変異体タンパク質も、ヒト野生型SOD1と比べてRac1-GTP加水分解を抑制する能力向上を実証した（図4C）。細菌由来のヒト野生型SOD1のメタル化減少（図4A）は、精製されたウシSOD1（図4C）と比べてRac1-GTPアーゼ活性を抑制する効果を減少させ、これは図1Dに示すように、Rac1に対する結合親和性の減少に起因する可能性があった。しかし、メタル化の程度は、Rac1を結合し、GTPアーゼ活性を抑制する細菌由来のヒト変異体SOD1タンパク質の能力にあまり影響を及ぼさないように思われた。

【0291】

上記の結果により、SOD1における特定のALS変異は、Rac1のそれらのより永続性の酸化還元非感受性活性化のために、エンドソーム区画におけるNox2活性化を調節しない場合があると仮定した。この目的のため、ヒト野生型SOD1またはL8Q-SOD1タンパク質の追加後に、NADPH依存性の

【0292】

【化49】



【0293】

生成の経時変化を単離されたエンドソーム分画において評価した。上記で観察されたように（図3D）、野生型SOD1は、単離されたPMEFエンドソームによるNADPH依存性の

【0294】

【化50】



【0295】

の生成を活性化させた（図4D）。この

【0296】

【化 5 1】



【0 2 9 7】

生成における活性化は 15 分でピークとなり、1 時間で基準に戻った。かかる過渡の活性化は、SOD1/Rac1 相互作用を抑制し、Rac1 による GTP 加水分解を活性化させる Nox 由来の ROS と一致し、Nox 活性化において自己調節式還元をもたらした。対照的に、PMEF エンドソームに L8Q-SOD1 を加えることは、持続的な NADPH 依存性の

【0 2 9 8】

10

【化 5 2】



【0 2 9 9】

生成を 1 時間まで上昇させた (図 4 D)。総体的に、これらの結果により、SOD1 の特定の ALS 変異体は、Rac1 との相互作用に敏感な変化した酸化還元のために、Nox2 を活性化させる能力を調節しないことが示唆される。

【0 3 0 0】

また、通常 ALS に付随する SOD1 の変異が、体内の NADPH オキシダーゼ活性向上をもたらすことを確認するため、後肢麻痺および約週齢 18~19 週齢での死亡を生じる、よく特性化された G93A-SOD1 遺伝子導入マウスが使用された。L8Q-および G10V-SOD1 変異体への体外結合データから予測されるように (図 4 B)、G93A-SOD1 遺伝子導入マウスからの SOD1 は、導入遺伝子陰性同腹子と比べて、脳溶解物からの免疫沈降した Rac1 をより強力に結合させた (図 4 E)。興味深いことに、G93A-SOD1 遺伝子導入マウスにおける Rac1 と SOD1 との結合は、年齢とともに増加し、麻痺発症時 (約 18 週) で最大となった。G93A-SOD1 遺伝子導入マウスで見られたこの Rac1/SOD1 相互作用における増加は、脳および肝臓から単離された総内膜内の NADPH 依存性のスーパーオキシド生成における有意な年齢依存性の増加と類似した (図 4 F、G)。G93A-SOD1 遺伝子導入マウスにおける Nox 活性化の向上を示すこれらの体内データは、他の ALS 結合 SOD1 変異体が存在する場合における、Rac1/Nox 活性化向上の体外所見を具体化する (図 4 B~D)。

20

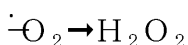
30

【0 3 0 1】

本明細書における所見は、細胞内の

【0 3 0 2】

【化 5 3】



【0 3 0 3】

変換を遍在的に方向付ける酵素である SOD1 が、酸化還元依存の方法において、Rac1 との物理的相互作用を介して Rac1/Nox2 活性化を制御する能力を有することを

40

【0 3 0 4】

【化 5 4】



【0 3 0 5】

生成を調節してもよい (図 7)。刺激後、活性化された Rac-GTP は、SOD1 とともに集合膜結合された Nox2 複合体に補充される。細胞質の還元条件下において、SO

50

D 1 は、R a c - G T P に効果的に結合し、その内因性ならびに G A P 促進された G T P アーゼ活性を抑制する。この効果は、活性状態での R a c 維持および N o x 2 由来の

【0306】

【化55】



【0307】

の生成増加をもたらす。H₂O₂ の局所的蓄積（自発的または

【0308】

【化56】



10

【0309】

の S O D 1 促進された不均化による）は、S O D 1 の R a c - G T P からの解離および G T P 加水分解を介した R a c の不活性化をもたらす。R a c - G D P は、N o x 2 活性化を支持できないため、この現象は、N o x 2 複合体の不活性化および R O S 生成の現象をもたらす。これは、内膜による N o x 由来の

【0310】

【化57】



20

【0311】

の活性化過剰に繋がる、S O D 1 の特定の A L S 変異体における機能障害であるように思われる、R a c からの S O D 1 の酸化還元感受性の未結合である。S O D 1 を R a c - G T P から遊離させ、G T P 加水分解を発生させる H₂O₂ の p M 量の能力により、体内の調節機構が、細胞 R O S の小さな変化に極めて敏感な場合があることが示唆される。この機構は、H₂O₂ への S O D 1 酵素的変換を介する細胞

【0312】

【化58】



30

【0313】

の空間的に関連した変化を、R a c 1 に感じさせることが可能である。

【0314】

また、これらの所見は、R a c 1 / N o x 2 活性化の異常調節が A L S 疾患の発症に起因し得るため、A L S などの神経細胞変性疾患において特に重要である。また、興味深いことに、R a c 1 に対して最近特定された G E F (T o p p e t a l . , 2 0 0 4) である A l s i n 遺伝子の変異は、A L S の劣性型 (Y a n g e t a l . , 2 0 0 1) をもたらすことも示している。故に、A L S の家族型として現れる観察された表現型に関与する、S O D 1 と A l s i n 変異との機能的連結があってもよい。

40

【実施例2】

【0315】

材料および方法

組み換え型発現ベクターおよび s i R N A 。 M C F - 7 細胞を、前述のように、組み換えアデノウイルス (5 0 0 粒子 / 細胞) に感染させ、細胞を感染後 4 8 時間での実験に活用した。L i p o f e c t a m i n e ^{T M} 2 0 0 0 (I n v i t r o g e n) を、すべてのプラスミド形質移入に使用し、細胞を形質移入後 4 8 時間での実験に活用した。下記の E 1 除去された組み換えアデノウイルスベクターを使用した。1) グルタチオンペルオキシダーゼ 1 をコードし、細胞質の H₂O₂ を分解させる A d . G P x - 1 (D u a n e t a l . , 1 9 9 9) 、 2) ダイナミンのドミナントネガティブ変異体 (K 4 4 A) を

50

コードし、エンドサイトーシスを抑制する Ad. Dyn (DN) (Li et al., 2001)、3) ルシフェラーゼ発現を促進する NFκB 反応性プロモーターをコードし、体内の NFκB 転写活性化を評価するために使用される Ad. NFκB Luc (Sanglioglu et al., 2001)、および 4) 挿入断片のない空ベクターである Ad. Bgl II を、ウイルス感染症の対照として使用した (Li et al., 2001)。2つの組み換えアデノウイルスの感染を活用する NFκB 転写アッセイには、僅かに変更された連続感染方法を使用した (Sanglioglu et al., 2001)。この事例において、細胞を、Ad. NFκB Luc の感染 24 時間前の実験的ベクター (つまり、Ad. Dyn (DN) または Ad. GPx1) に感染させ、細胞を、初回感染後 48 時間の実験に活用した。Ad. CMV-GFP レポーター遺伝子発現で評価した場合、組み換えアデノウイルスとの形質導入効果は通常 80~90% であった。

10

【0316】

下記のプラスミドを過渡の形質移入実験に使用した。1) 初期エンドソームの免疫親和性単離のための PCR 増幅によって生成された、Rab5 の N 末端 HA-融合をコードする組み換えプラスミド、および 2) Dr. J. D. Lambeth (Emory University) からの贈呈品である、Nox2 cDNA をコードする発現プラスミド。

【0317】

MyD88、Rac1 および Nox2 に対する siRNA を、Santa Cruz Biotech から取得し、製造会社の説明する方法および試薬を使用して、形質移入を行った。siRNA に使用された配列は独占的であり、企業から提供されなかった。

20

【0318】

サイトカイン処置および小胞単離。 MCF-7 細胞を、すべての小胞単離前に、指示された濃度で 20 分間組み換え IL-1β で処置した。エンドソーム負荷実験には、精製されたウシ Cu/Zn SOD (Oxis Research) および/またはカタラーゼ (Sigma-Aldrich) タンパク質を、新鮮な培地 (0.1 から 1 mg タンパク質/ml) に加えて、SOD および/またはカタラーゼが継続的に存在する場合に、サイトカイン処置前に 10 分間細胞へ適用させた。細胞を洗浄し、氷冷 PBS 内へ削り入れた。その後、細胞ペレットを、0.5 ml の均質化緩衝液 (0.25 M ショ糖、10 mM トリエタノールアミン、1 mM EDTA、1 mM PMSF および 100 μg/ml アプロチニン) 内で再懸濁し、Dall 組織粉碎器 (Dall) において均質化して、2000 x g で 4℃ で 10 分間遠心分離した。浮遊物を核後の浮遊物 (post-nuclear supernatant: PNS) と名付けた。その後、32% の最終濃度を得るため、PNS を 60% イオジキサノール (OptiPrepTM, Axis-Shield) 溶液と組み合わせ、sw55Ti 遠心分離機チューブ内に負荷した。その後、PNS を、均質化緩衝液内の 24% と 20% イオジキサノールの 2 段階勾配下で底面負荷した。試料を、30、500 rpm で 2 時間 4℃ で遠心分離した。分画を、4℃ で遠心分離機チューブの上部から下部まで採取し (分画当たり約 300 μl)、NADPH オキシダーゼ活性、免疫単離または凍結に即座に活用してウエスタンブロット分析を行った。

30

【0319】

NFκB および NADPH オキシダーゼ活性アッセイ。 前述の NFκB-誘導性のルシフェラーゼレポーターベクター (Ad. NFκB Luc) を使用して、NFκB 転写活性を評価した (Sanglioglu et al., 2001)。5 μg の細胞可溶化物を使用して、ルシフェラーゼ活性をサイトカイン処置後 6 時間で評価した。ルシゲニンベース系である化学発光を使用して、

40

【0320】

【化59】



【0321】

50

産出率を測定することによりNADPHオキシダーゼ活性を分析した(Liet al., 2001)。アッセイ開始前に、5 μgの小胞のタンパク質をPBS中の5 μMのルシゲニン(Sigma-Aldrich)と組み合わせ、10分間室温暗所でインキュベートした。100 μMのNADPH(Sigma-Aldrich)を加えて反応を開始し、3分間(5読み/秒)にわたって発光の変化を測定した。発光カーブ(分当りの相対光単位[RLU])($r > 0.95$)の傾斜を、NADPHオキシダーゼ活性の指標として

【0322】

【化60】



10

【0323】

形成率を計算するために使用した(RLU/分μgタンパク質)。NADPHが存在しない場合において、ルシゲニン依存性の発光の背景レベルは、常に、NADPHが存在する場合の最大誘導値未満の > 1000 倍だった。さらに、NADPHが存在しない場合の発光の背景レベルは、試料間で有意に異ならず、変化率は無かった。

【0324】

電子スピン共鳴分光法(Electron spin resonance spectroscopy: ESR)を、単離されたエンドソームによるNADPH依存性の

【0325】

【化61】



20

【0326】

生成を確認するために使用した。BrukerモデルEMX ESRスペクトロメータ(Bruker)を使用して、ESRアッセイを室温で行った。各試料からの小胞分画を、総質量500 μlのPBS、pH7.4中50 mMのDMPO(5, 5-ジメチル1-ピロリンN-オキシド)のスピントラップと混合した。この溶液は、イミノ2酢酸-キレート樹脂(10 ml/l)(Sigma-Aldrich)を含有した。100 μMまでNADPHを加えて反応を開始し、早急にESRスペクトロメータ内へ配置した。DMPO-ヒドロキシルラジカル付加体形成を10分間分析した。機器設定は、受信機獲得： 1×10^6 、変調周波数：100 kHz、マイクロ波電力：40.14 mW、振幅変調：1.0 G、および掃引速度：1 G/sであった。

【0327】

小胞の免疫単離。Rab5含有のエンドソームを、前述の方法(Trischler et al., 1999)に従って単離した。細胞に、IL-1β処置前48時間のHA-Rab5aまたはGFP発現プラスミドを形質移入した。細胞内小胞のイオジキサノール単離後、組み合わされたピーク小胞分画の一方の半分を、生化学的分析に直接使用し、他方の半分を、抗HA抗体で被覆されたDynaビーズM-500(Dynal Bioscience)を用いて、免疫親和性単離に使用した。使用前にビーズを下記の通りに抗体で被覆した。第2抗体(抗ラット)を、0.1 Mのホウ酸塩緩衝液(pH9.5)中のDynaビーズ(4×10^8 ビーズ/ml)に、遅い振動で24時間25℃で共役させた。その後、ビーズを3分間磁石中に置き、0.1% (w/v)のBSA/PBS中において5分間4℃で洗浄した。0.2 MのTris(pH8.5)/BSA中で最終洗浄を24時間行った。最後に、ビーズをBSA/PBS中で再懸濁し、 10^7 ビーズにつき4 μgの1次抗HA抗体に一晩4℃で共役させ、その後、BSA/PBS中で洗浄した。小胞分画を、2 mMのEDTA、5%のBSAおよびプロテアーゼ阻害剤を含有するPBS中の700 μlの被覆したビーズと混合した。混合物を、遅い振動で6時間4℃でインキュベートし、続いて磁気捕捉を行い、同一チューブ内で3回(各15分)洗浄した。その後、HA濃縮エンドソームを有するビーズをPBS中で再懸濁し、浮遊物を分析用に保存

30

40

50

した。

【0328】

ウエスタンブロット法、免疫沈降および体外キナーゼアッセイ。一般的な手順を使用してウエスタンブロット法を行い (Goligan, 1991)、BioRadタンパク質定量化キットを使用してタンパク質の濃度を判断した。免疫反応性タンパク質を、向上した化学発光ECL (Amersham) を使用して検出し、X線フィルムに曝露した。ウエスタンブロット法に使用した抗体は以下の通りである。抗EEA1、抗HA、抗Rab5および抗Rab11抗体 (Transduction Laboratories)、抗p47phox、抗TRAF6、抗IKK α 、抗Na⁺/K⁺ ATPase (α 3)、抗MyD88および抗GST抗体 (Santa Cruz Biotech)、抗IL-1R1 (QED Bioscience, Inc.)、抗Cu/ZnSODおよび抗カタラーゼ抗体 (Binding Site, Inc.) ならびに、抗mtHSP70 (Affinity Bioreagents)。Nox2抗体は、Dr. A. Jesaitis (Montana State University) からの贈呈品であった (Burritt et al., 1995)。

10

【0329】

免疫沈降では、細胞を氷冷PBSで洗浄し、RIPA緩衝液中において4℃で30分間溶解させた。500 μ gの細胞タンパク質および5 μ lの1次抗体を、1mlのRIPA緩衝液と4℃で1時間混合させた。その後、50 μ lのタンパク質Aアガロースビーズ (Santa Cruz Biotech) を混合物に加え、4時間回転させた。実験的分析に先立って、ビーズを氷冷PBSで洗浄した。基質としてのGST-I κ B α を使用して、免疫沈降されたIKK α および/または単離された小胞を用いて体外キナーゼアッセイを行った。1 μ gのGST-I κ B α 、0.3mMの冷ATPおよび10 μ lのキナーゼ緩衝液 (40mMのヘプス、1mMの β -グリセロリン酸、1mMのニトロフェノールフォスフェイト、1mMのNa₃VO₄、10mMのMgCl₂ および2mMのDTT) 中の10 μ lのCi [γ -³²P] ATPを用いて、キナーゼ反応を行った。その後、反応物を30℃で30分間インキュベートした。SDS-PAGEタンパク質負荷緩衝液を加えて反応を終了させ、98℃で5分間沸騰させた。SDS-PAGE後、ゲルをニトロセルロース膜に移動させ、抗GST抗体を用いたプローブ前にX線フィルムに曝露した。

20

【0330】

酸化還元活性エンドソームの体内局所化およびROS生成。OxyBURST Green H₂HFF-BSA (Molecular Probes) を使用して、エンドソーム内スーパーオキシドの体内局所化を行った。原液 (1mg/ml) を、窒素下でPBS中にH₂HFF-BSAを溶解することにより使用直前に生成し、光から保護した。細胞を、50 μ g/mlのOxyBurst Green H₂HFF-BSAが存在する場合に2分間37℃でインキュベートし、その後、IL-1 β (1ng/ml) を加えて刺激した。刺激後の異なる時間 (1~10分) で、細胞を4%のパラホルムアルデヒド中に固定し、蛍光顕微鏡法で評価した。種々の化合物 (1mg/ml SODまたは10 μ MのDPI) をIL-1 β 刺激時に加えた。抗EEA1モノクローナル抗体 (Transduction Laboratories) およびTexas Red-Conjugated Goat Anti-Mouse Antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を使用して、H₂HFF-BSAおよびEEA1の共局所化を、固定後試料において免疫蛍光局所化により行った。H₂DCFDA (Molecular Probes) を使用して、総細胞ROS (主に、H₂O₂) の体内局所化を行った。H₂DCFDAの原液を、使用直前に濃度50 μ g/mlでDMSO中に生成した。H₂DCFDA (10 μ M) およびIL-1 β (1ng/ml) を、暗所においてPBS中37℃で20分間同時処置する前に、細胞をPBSで3回洗浄した。アデノウイルスベクターに感染した試料では、これは、IL-1 β での刺激前48時間で行われた。SOD/カタラーゼタンパク質を培地に加えた場合、これは、IL-1 β 刺激時に1mg/mlの濃度で行われた。4%パラホルムアルデヒドにおける10

30

40

50

分間の洗浄および固定後、アンチフェードントを含有する D A P I 中に細胞を載せ、D C F シグナルのための蛍光顕微鏡法で検査した。

【0331】

結果

エンドサイトーシスおよびエンドソーム R O S は、I L - 1 β 媒介の N F κ B 活性化において重要な役割を担う。酸化還元感受性のシグナル変換を研究するため、N F κ B の I L - 1 β 誘導を、モデルとしての上皮株化細胞 (M C F - 7) において評価した。このモデルは、転写 N F κ B ルシフェラーゼレポータの I L - 1 β 誘導が、組み換えアデノウイルス媒介の G P x 1 (細胞質中 H₂ O₂ → H₂ O 分解する) の過剰発現によって有意に抑制 (約 50%) されたことを実証した。これらの研究において、G F P レポーターを使用 10
して判断された組み換えアデノウイルスで、約 85% の細胞を形質導入した。同様に、ドミナントネガティブダイナミン K 4 4 A (A d . D y n (D N)) の過剰発現によるエンドサイトーシスの部分的抑制 (C o n n e r e t a l . , 2003) も、同様の程度まで N F κ B を抑制した。これらの所見は、R O S 生成およびエンドサイトーシスが、I L - 1 β によるかなりの割合の N F κ B 活性化を等価に必要としたことを示唆した。

【0332】

リガンド結合受容体のエンドサイトーシスは、細胞内シグナルの処理および伝播と複雑に連結することが多い (S o r k i n e t a l . , 2002)。しかし、エンドソーム内の受容体処理と酸化還元依存の活性化との連結の可能性は、過去に検討されていない。この結果に基づき、I L - 1 β 後のエンドソーム由来の R O S 生成は、酸化還元依存の 20
工程を介して受容体/エフェクタ活性化を増幅させる原因となる場合があることを仮定された。この目的のため、エンドソーム区画からの R O S クリアランスが N F κ B 活性化に影響を及ぼし得るかどうかを検討した。精製された C u / Z n S O D およびカタラーゼタンパク質を、1 m g / m l 濃度で培地に加えた際に M C F - 7 細胞により効果的に取り込んだ。実際に、M C F - 7 細胞による C u / Z n S O D およびカタラーゼの細胞の取り込みは、用量依存性の方法において、I L - 1 β による I K K および N F κ B 活性化のどちらをも有意に減少させた。どちらかの単独よりもより効果的に、I K K および N F κ B 活性化をとともに抑制するための C u / Z n S O D およびカタラーゼの相乗的能力により、エンドソーム

【0333】

【化62】



【0334】

および H₂ O₂ の両方が I L - 1 R 1 複合体活性化に関与した可能性が示唆された。さらに、細胞質 i c G P x - 1 の過剰発現も N F κ B 活性化を抑制し、H₂ O₂ が N F κ B 経路の酸化還元 - 2 次メッセンジャーであった可能性を示した。G P x - 1 発現および C u / Z n S O D / カタラーゼの細胞負荷の両方により I L - 1 β 処置後の細胞 R O S が減少したことを確認するため、R O S - 感受性色素 (H₂ D C F D A) を使用して、種々の 40
処置条件下で細胞 R O S のレベルを評価した。I L - 1 β 処置は、細胞 R O S を刺激し、G P x - 1 の発現または C u / Z n S O D / カタラーゼの細胞負荷はどちらも D C F 蛍光を抑制した。これらの所見は、エンドソーム区画内の R O S 産出の機構の検討、および I L - 1 R 1 複合体が I K K 複合体活性化に適任となるように、かかる R O S がどのように影響を及ぼし得たかを導いた。

【0335】

I L - 1 β は、T R A F 6 補充に必要なエンドソーム N A D P H 依存性の

【0336】

【化63】



10

20

30

40

50

【0337】

生成を刺激する。リガンド活性されたエンドソーム内のN o x複合体は、I L-1 β媒介のN F κ B活性化に必要なR O Sの源として機能する場合があることが仮定された。この目的のため、I L-1 βがM C F-7細胞の小胞分画において、N A D P H依存性の

【0338】

【化64】



【0339】

生成を刺激し得るかどうかを判断した。イオジキサノール密度勾配遠心分離によって単離されたピーク小胞分画は、それぞれ初期および回収エンドソームの小胞マーカーであるR a b 5およびR a b 1を発現させた(Z e r i a l e t a l., 2001)。また、これらは、この区画に対して予期されたような内在的ビオチントランスフェリンも含有した。しかし、小胞分画には、もしあれば、これらの区画からの少量の混入を示すミトコンドリアm t H S P 70、原形質膜N a⁺/K⁺-A T Pアーゼまたはペルオキシソームカタラーゼがない。対照的に、ピークR a b 5/11小胞分画は、この単離戦略から予期されるようなE R、ゴルジおよびリソソーム酵素との著しい重畳を示した。

10

【0340】

種々のイオジキサノール分画における

【0341】

【化65】



20

【0342】

生成を検出するためにルシゲニンベースの化学発光アッセイを使用して、N A D P H依存性の

【0343】

【化66】



30

【0344】

生成率をN o x活性の指標として評価した。仮定されたように、I L-1 β刺激は、ピーク小胞分画番号3~4におけるN A D P H依存性の

【0345】

【化67】



【0346】

生成を有意に増加させた。I L-1 βが、N A D P Hオキシダーゼ活性エンドソームの形成を誘発することを確認し、次に、I K K/N F κ B活性化を抑制するための取り込まれたR O S除去酵素の能力によって予測されるように、

40

【0347】

【化68】



【0348】

が単離されたI L-1 β活性化されたエンドソームの管腔内で生成されたかどうかを確認することを目指した。この疑問に対応するため、エンドソーム内に取り込まれ、単離されたエンドソーム内部から

【0349】

50

【化 6 9】



【0 3 5 0】

を分解させる培地中 Cu / Zn SOD タンパク質の能力を評価した。Cu / Zn SOD タンパク質ではなく、ルシニゲンが膜透過性であるため、エンドソーム内部で

【0 3 5 1】

【化 7 0】



10

【0 3 5 2】

が生成された程度をルシゲニンベースの化学発光アッセイを使用して判断することができた。生化学的研究により、Cu / Zn SOD タンパク質を培地 [SOD (m)] に加えた場合、実際に単離されたエンドソーム内に取り込まれ、プロナーゼ消化に依然として抵抗性を有することが確認された。対照的に、無負荷の単離されたエンドソーム [SOD (v)] の外部に加えられた Cu / Zn SOD は、プロナーゼによって効果的に分解された。予期されたように、T r i t o n - X - 1 0 0 を用いたエンドソーム膜の破壊は、管腔内 Cu / Zn SOD [SOD (m)] をプロナーゼ分解に対して感作にさせた。したがって、培地中の Cu / Zn SOD タンパク質は、実際にエンドソーム区画内に取り込まれた。このウシ Cu / Zn SOD (b SOD) エンドソーム負荷実験からの予期されない所見は、内因性細胞ヒト Cu / Zn SOD (h SOD) タンパク質の小胞膜への I L - 1 β 依存性の補充であった。この細胞ヒト Cu / Zn SOD は、T r i t o n - X - 1 0 0 が存在しない場合にプロナーゼ消化に対して感受性があり、エンドソーム表面上に存在したことを示した。これらの所見により、Cu / Zn SOD は、I L - 1 β 刺激後の ROS 代謝においてエンドソームレベルで積極的役割を担う場合があるという興味深い可能性が示唆される。

20

【0 3 5 3】

単離された小胞による I L - 1 β 誘導の

【0 3 5 4】

【化 7 1】



30

【0 3 5 5】

生成を抑制する管腔内 Cu / Zn SOD の能力により、

【0 3 5 6】

【化 7 2】



【0 3 5 7】

の大部分が、単離されたエンドソーム内部で生成されたことが示唆された。ルシゲニン反応物への K C N (Cu / Zn SOD 阻害剤) の添加は、この抑制を完全に逆転させ、抑制効果が酵素的 Cu / Zn SOD 活性に特に起因したことを実証した。また、I L - 1 β 活性化されたエンドソームによる

40

【0 3 5 8】

【化 7 3】



【0 3 5 9】

の N A D P H 依存性の生成向上も、電子スピン共鳴分光法 (e l e c t r o n s p i n r e s o n a n c e s p e c t r o s c o p y : E S R) を用いて確認した。このよ

50

うな状況において、D M P O 付加体形成は、小胞の単離および E S R 分析前に、カタラーゼではなく C u / Z n S O D のエンドソーム負荷によって完全に抑制された。この所見は、 H_2O_2 ではなく

【0360】

【化74】



【0361】

が E S R シグナルをもたらす優性 R O S であったことが実証した。また、ピーク小胞分画における N A D P H 依存性の

10

【0362】

【化75】



【0363】

生成は、ジフェニレンヨードニウム (d i p h e n y l e n e i o d o n i u m : D P I) (N A D P H オキシダーゼ阻害剤) に対して感受性があったが、ロテノンまたはアンチマイシン A (それぞれ、ミトコンドリア電子伝達鎖状錯体 I または I I I の特異的阻害剤) に対しては感受性がなかった。これらの所見は、小胞分画における R O S 産出源としての著しいミトコンドリア混入は除外した。また、エンドソーム

20

【0364】

【化76】



【0365】

の I L - 1 β 刺激は、後の空ベクター制御アデノウイルスとの感染ではなく、A d . D y n (D N) 感染の存在を 75% 減少させることによって示されるように、エンドサイトーシスに依存した。かかる減少は、A d . D y n (D N) 感染後のランスフェリン取り込みの抑制程度を密接に反映した。累積的に、これらの研究および C u / Z n S O D / カタラーゼのエンドソーム負荷により、I L - 1 β 刺激された D C F 蛍光が有意に減少されたため、I L - 1 β は、受容体エンドサイトーシス後に、主にエンドソーム区画内の M C F - 7 細胞において

30

【0366】

【化77】



【0367】

および H_2O_2 生成を誘発することが示唆される。

【0368】

I L - 1 β による I K K および N F κ B 活性化を抑制するための、エンドソーム区画内部からの R O S クリアランスの能力を考慮すると、酸化還元活性エンドソームは、I L - 1 R 複合体の空間的に制御された酸化還元依存の活性化に対する細胞内フレームワークを提供し得ることが仮定された。M y D 8 8 は、リガンド結合後に I L - 1 R 1 へ補充される第 1 のエフェクタのうちの 1 つとして認識されている。この工程は、エフェクタおよびアダプターの順序付けられた補充 (I L - 1 R 1 $\rightarrow$ M y D 8 8 $\rightarrow$ I R A K $\rightarrow$ T R A F 6) を刺激し、最終的に、N F κ B を活性化させることが可能な活性 I K K キナーゼ複合体の形成をもたらす (G h o s h e t a l . , 2002)。S O D およびカタラーゼのエンドソーム負荷を使用して、M y D 8 8 の酸化還元依存性および I L - 1 β 刺激後のエンドソーム区画への T R A F 6 補充を、精製された小胞分画において評価した。これらの実験結果は、I L - 1 β 刺激後のエンドソーム区画への T R A F 6 補充が、S O D / カタラ

40

50

ーゼのエンドソーム負荷によって約50%減少されたことを示し、その所見は同様の条件下における総細胞I K Kキナーゼ活性の減少を密接に反映した。対照的に、R O Sクリアランス酵素のエンドソーム負荷は、I L - 1 β 刺激後のエンドソーム区画へのM y D 8 8補充を変化させなかった。これらの所見により、T R A F 6のI L - 1 R 1への補充は、酸化還元依存の方法においてエンドソームレベルで発生し得ることが示唆された。

【0369】

I L - 1 β は、エンドソーム区画におけるN o x 2複合体活性化を誘発する。 I L - 1 β が、N A D P H依存性においてエンドソーム区画による

【0370】

【化78】

10



【0371】

生成を誘発することを確認し、エンドソーム

【0372】

【化79】



【0373】

生成に関与する場合のある候補N o x酵素を特定した。エンドソーム区画におけるN o x活性化は、概してエンドサイトーシスに依存するため、N A D P Hオキシダーゼ複合体の特異的サブユニットは、リガンド刺激後にエンドソーム内へ補充される可能性が仮定された。M C F - 7細胞におけるN o x 1、2、3、4、5 m R N AのR T - P C R分析は、N o x 2およびN o x 5 m R N A発現のみがこの株化細胞内で検出可能であったことを実証した。精製されたエンドソームのその後の分析は、I L - 1 β 刺激が、3つの既知のN o x 2活性化因子(R a c 1、p 6 7 p h o xおよびp 4 7 p h o x)の内膜への補充を促進したことを実証した。さらに、ダイナミン(K 4 4 A)の発現を介してエンドサイトーシスを抑制することは[つまり、A d . D y n (D N) 感染後]、小胞分画へのR a c 1、p 6 7 p h o xおよびp 4 7 p h o xのI L - 1 β 媒介の補充を有意に軽減させた。これらの所見は、I L - 1 β 刺激後の膜内在化が活性エンドソームN o x複合体の形成

20

30

【0374】

【化80】



【0375】

のI L - 1 β 誘導に必要であるという以前の所見も立証した。

【0376】

次に、リガンド刺激後のエンドソーム区画への種々のI L - 1 R 1 (M y D 8 8、T R A F 6) またはN o x (R a c 1、p 6 7 p h o x、p 4 7 p h o x) エフェクタの補充に、どのようにエンドソーム

40

【0377】

【化81】



【0378】

および／またはH₂O₂が影響を及ぼし得るかを評価した。この目的のため、S O DまたはS O D／カタラーゼを培地に加えることによって、I L - 1 β 刺激時にエンドソームを負荷し、これらの種々のエフェクタの単離されたエンドソームへの補充を評価した。これ

50

らの実験結果は、SOD／カタラーゼの組み合わせのみが、IL-1 β 刺激後にTRAF6のエンドソームへの補充を抑制したことを実証した。SOD負荷単独での機能的効果の欠如により、H₂O₂は、TRAF6のエンドソームへの補充に必要な1次ROSエフェクタであることが示唆された。対照的に、IL-1 β 活性化されたエンドソームへのMyD88、Rac1、p67phoxまたはp47phoxの補充は、SODまたはSOD／カタラーゼ負荷による影響を受けないままだった。エンドソーム内へのIL-1R1、Nox2、MyD88およびTRAF6補充の動態解析は、MyD88補充と一致し、最大エンドサイトーシスがIL-1処置後15～30分までに発生したことを実証した。Nox2由来のROSがIL-1R1エンドソーム複合体への結合を容易にするために必要であるかどうか予想されたとおり、エンドソームへのTRAF6補充は、エンドソーム区画におけるNox2の最大レベルを遅延させた。興味深いことに、Nox2は、IL-1R1よりもエンドソーム区画からより早急に排除され、TRAF6の最大補充が行われた後に、エンドソーム処理はNox2を除去することが示唆された。SOD／カタラーゼの負荷は、すべての時点において、エンドソームへのTRAF6補充を減少させたが、エンドソームにおけるIL-1R1、Nox2またはMyD88レベルには影響を与えなかった。累積的に、これらの研究により、IL-1 β 刺激後のエンドソームNox複合体の活性化は、原形質膜からのエンドサイトーシスに依存し、またこの工程は、そのエンドソームリガンド活性化された受容体複合体へのTRAF6の酸化還元依存の補充に影響を及ぼすことが示唆される。

10

【0379】

20

Rac1、p67phoxおよびp47phoxはすべて、Nox3、4または5ではなくNox1および2の活性化補助因子として結合している(Lambeth et al., 2004、Park et al., 2004)。Nox5およびNox2 mRNA発現のみがMCF-7細胞内で検出されたとすれば、Nox2は、IL-1 β 刺激後のエンドソーム区画によるROS生成に関与する場合がある。この仮説に対応するために2つのアプローチを使用した。第1のアプローチは、過渡の形質移入を用いてNox2を異所的に過剰発現させることにより、エンドソームROS生成を調節する試みを含んだ。不適切なpcDNAプラスミドの形質移入と比べて、Nox2の異所性発現は、単離されたIL-1 β 刺激されたエンドソームによるNADPH依存性の

【0380】

30

【化82】



【0381】

生成を有意に向上させた。さらに、Nox2の過剰発現は、IL-1 β 刺激後のみにエンドソーム内へのNox2の取り込みを有意に向上させた。内因性Nox2のレベルは、MCF-7細胞において極めて低かったが、またこれらの研究は、IL-1 β 刺激後のみに内因性Nox2のエンドソームへの補充を向上させたことも実証した。第2のアプローチを使用して、不適切なスクランブルsiRNAではなく、Nox2 siRNAが、MCF-7細胞におけるNox2タンパク質発現と、単離されたIL-1 β 刺激されたエンドソームによるNADPH依存性の

40

【0382】

【化83】



【0383】

生成とを有意に抑制したことを実証した。さらに、Nox2 siRNAは、IL-1 β 刺激後のエンドソームへの異所的に発現された、および内因性Nox2の両方の補充を有意に減少させた。また、スクランブルsiRNAではなくNox2 siRNAは、IL-1 β 誘導のNF κ B転写活性化およびエンドソームNADPH依存性のスーパーオキシ

50

ド生成も同様の程度まで軽減させた。累積的に、これらの研究は、N o x 2 複合体が L - 1 β 刺激されたエンドソームにおいて活性化されるという、強力な分子および機能的立証を提供する。

【0384】

I L - 1 β は、初期エンドソームにおいて N o x 2 複合体活性化を誘発する。リガンド刺激されたエンドサイトーシスが、エンドソーム区画における N o x 2 活性化に必要とされたという所見に基づいて、次に、これらの酸化還元活性エンドソームの形成が初期エンドソームのレベルで開始した可能性が仮定された。この仮説を検討するため、膜不浸透性の B S A 共役された蛍光色素ジヒドロ - 2 ' , 4 , 5 , 6 , 7 , 7 ' - ヘキサフルオロフルオレセイン (H ₂ H F F - B S A) を使用して、初期エンドソーム区画における R O S 生成をプローブした。H ₂ H F F - B S A が存在する場合に細胞をインキュベートすることにより、エンドソーム区画に、この色素および緑色蛍光シグナルによって検出された

10

【0385】

【化84】



【0386】

を負荷させた。この研究は、10分間の I L - 1 β 処置後に H ₂ H F F - B S A エンドソーム蛍光が飛躍的に増加したことを実証した。I L - 1 β 誘導の H ₂ H F F - B S A 蛍光は、D P I で細胞を負荷することにより、またはエンドソーム区画内へ精製された C u / Z n S O D タンパク質を負荷することにより有意に抑制された。これらの所見により、N o x 由来の

20

【0387】

【化85】



【0388】

は、エンドソーム区画において H ₂ H F F - B S A により検出された主要な R O S であったことが確認された。H ₂ H F F - B S A および E a r l y E n d o s o m a l A n t i g e n - 1 (E E A 1) を用いた共局所化研究は、刺激されていない細胞と比較すると、I L - 1 β が、E E A 1 および H ₂ H F F - B S A 共陽性エンドソームの存在量を有意に増加させたことを実証した。さらに、I L - 1 β 刺激は、E E A 1 を含有しなかった H ₂ H F F - B S A 陽性エンドソームの増加をもたらした。しかし、この集団は、刺激後の初期時点ではあまり豊富ではなく、時間とともに増加した。これらの所見は、リガンド刺激された

30

【0389】

【化86】



【0390】

を生成する酸化還元活性エンドソームが E E A 1 区画内で生じ、その一方で、下流エンドソーム区画内へ処理された後に

40

【0391】

【化87】



【0392】

を生成する何らかの能力を保持する概念と一致する。

【0393】

I L - 1 β 刺激後の初期エンドソーム区画における酸化還元活性エンドソーム形成に対

50

して、さらなる生化学的立証を提供するため、免疫親和性単離手順を用いて初期 R a b 5 陽性エンドソームを精製した。初期エンドソーム特異的 G T P アーゼである R a b 5 は、初期エンドソームの輸送および膜融合において重要な役割を担う。この区画の精製は、D y n a ビーズに連結した抗 H A 抗体を使用して、組み換え H A タグ付き R a b 5 の過剰発現と、イオジキサノール単離されたエンドソームからの免疫親和性単離とにより促進された。これらの免疫親和性単離実験の結果は、N o x 活性（つまり、N A D P H 依存性の

【0394】

【化88】



10

【0395】

生成)の大部分が、I L - 1 β 刺激後に H A - R a b 5 区画 (D y n a b e a d p e l l e t) に付随したことを実証した。この活性は、開始分画における総 N A D P H オキシダーゼ活性の約 1 / 3 を表した。この単離工程の特異性は、幾つかの基準により確認された。まず、精製された R a b 5 エンドソーム分画において、R a b 1 1 回収エンドソームの有意な混入は見られなかった。次に、第 2 の抗体単独で被覆された、または 1 ° および 2 ° 抗体で対照の G F P 形質移入された細胞から単離された D y n a ビーズは、ビーズに付随した低背景レベルの N o x 活性のみを示した。また、R a b 5 単離されたエンドソームの完全性も、I L - 1 β 処置時に負荷された小胞内ビオチントランスフェリンの保持率によって確認された。H A 親和性一単離 (約 75%) の有効性を考えると、これらの結果により、少なくとも半分の酸化還元活性エンドソームは、評価された時点 (20 分) で R a b 5 と付随した初期エンドソームであったことが示唆された。R a b 5 区画が、その後の受容体エンドサイトーシスを形成するための最も早いエンドソーム区画であることを考慮すると、これらの研究は、N o x 2 が原形質膜から酸化還元活性エンドソーム内へ補充されるという仮説も支持する。

20

【0396】

R a c 1 および M y D 8 8 はどちらも、酸化還元活性エンドソームの形成、I L - 1 R 1 への T R A F 6 補充、および I L - 1 β 刺激後の N F κ B 活性化を制御する。これまでのデータは、I L - 1 β 刺激が N o x 2 複合体サブユニット (N o x 2、R a c 1、p 4 7 p h o x および p 6 7 p h o x) を含有する酸化還元活性エンドソームの形成をもたらすことを実証している。これらの N o x 2 活性エンドソームによる R O S 産出は、M y D 8 8 ではなく T R A F 6 の小胞膜への補充に重要であった。エンドソーム区画における N o x 2 活性化が、活性エンドサイトーシスを必要としたことを考慮すると、I L - 1 R 1 を結合した I L - 1 β の内部移行は、N o x 2 触媒サブユニットのエンドソーム内への補充を調整することが推論された。しかし、現在、リガンド結合後の I L - 1 R 1 内部移行のための分子決定要因を説明する報告はない。例えば、M y D 8 8 は、リガンド結合後に I L - 1 R 1 へ補充するための第 1 のエフェクタのうちの 1 つとして知られ、I L - 1 R 1 による N F κ B 活性化に必須であるが (A k i r a e t a l. , 2003)、M y D 8 8 がリガンド結合後の受容体内部移行に必須であるかどうかは不明である。さらに、過去の研究により、R a c 1 は、M y D 8 8 との相互作用を介して I L - 1 R 1 複合体と付随することが示されている (J e f f r i e s e t a l. , 2001)。R a c 1 は、活性 N o x 2 複合体の一部であることが既知であるため、R a c 1 は、原形質膜で受容体複合体とのその相互作用を介して、エンドソームを含有する I L - 1 R 1 内へ N o x 2 を補充し得ることが推論された。I L - 1 β 刺激が E E A 1 / R a b 5 陽性初期エンドソームにおける

30

40

【0397】

【化89】



【0398】

50

生成を促進させることを実証する本発明の所見は、また、Nox2（内在性膜タンパク質）が原形質膜から非常に初期にエンドソーム区画に介入する仮説も支持する。

【0399】

IL-1R1の内部移行および酸化還元活性エンドソームの形成におけるMyD88およびRac1の貢献を検討するため、MyD88およびRac1発現のどちらも抑制するためのRNA抑制（RNAi）戦略を探索した。MyD88またはRac1のいずれか一方を標的にするsiRNAの形質移入は、それらの発現をタンパク質レベルで効果的に抑制した。かかる抑制は、スクランブルsiRNA対照では観察されなかった。MyD88欠損細胞における過去の研究から予測されるように（Akira et al., 2003）、NFκB活性化は、MyD88 siRNAによって有意に抑制された。興味深いことに、Rac1 siRNAも、MyD88 siRNAで見られるものと同様の程度までNFκB活性化を抑制した。しかし、MyD88およびRac1 siRNA両方の同時形質移入は、いずれかのsiRNA単独と比較してNFκBの付加的な抑制を提供しなかったため、2つの要因は、IL-1βによりNFκBを活性化させるために同一の経路で作用することが示唆された。さらに、MyD88またはRac1 siRNAは、IL-1β接種後にエンドソーム区画による

10

【0400】

【化90】



20

【0401】

生成を抑制したが、Rac1 siRNAは僅かに大きなレベルの抑制を提供した。これらの所見により、MyD88およびRac1はどちらも、IL-1β刺激後のエンドソーム区画におけるNFκB活性化およびNox2活性化にとって重要であったことが示唆された。

【0402】

次に、Rac1が実際にIL-1R1と結合したかどうか、またその場合、この相互作用がMyD88に依存したかどうかを検討した。実際に、Rac1は、リガンドシミュレーション後の免疫沈降したIL-1R1と付随することが観察された。しかし、IL-1R1複合体と結合するRac1がMyD88に依存したことを示す過去の報告とは対照的に（Jeffries et al., 2001）、MyD88レベルがRNAiによって有意に減少した場合に、IL-1R1と付随するRac1の非常に僅かな減少が観察された。同様に、Rac1 siRNAは、IL-1R1と付随する、MyD88ではなくRac1を減少させた。これらの所見により、MyD88およびRac1は、リガンド刺激後に独立にIL-1R1と付随することが示唆される。しかし、MyD88またはRac1のいずれか一方のRNAi抑制は、受容体複合体へのTRAF6補充を抑制した。この所見は、MyD88またはRac1に対するRNAiが、酸化還元活性エンドソームの形成およびNFκB活性化を抑制した事実と一致する。エンドソームROSがIL-1β刺激後のエンドソームへのTRAF6補充にとって重要であったことを考慮すると、これらの研究により、MyD88およびRac1が、酸化還元活性エンドソームの形成、IL-1R1へのTRAF6の酸化還元依存の補充、およびNFκB活性化に関与する2つの重要な要因であることが示される。

30

40

【0403】

酸化還元活性エンドソームの形成においてMyD88およびRac1が担う役割を判断するため、これら2つの要因の、酸化還元活性エンドソームへの受容体およびNox2の内部移行に関する貢献を分析した。MyD88は、リガンド結合後に受容体のエンドサイトーシスを開始するための主要な役割を担い、一方で、Rac1は、リガンド結合受容体を内部に持っているエンドソーム内へのNox2の補充に関与していたことが推論された。MCF-7細胞にMyD88またはRac1を形質移入し、内膜画分へのIL-1R1、MyD88、TRAF6、Rac1およびNox2の補充をウエスタンブロット法で評

50

価した。これらの研究からの所見により、RNAiによるMyD88抑制は、IL-1R1の内部移行および内膜へのMyD88、TRAF6、Rac1およびNox2の補充を有意に減弱させたことが実証された。これらの所見は、エンドソーム区画へのRac1/Nox2複合体の受容体媒介のエンドサイトーシスを抑制することによって、ダイナミンK44Aと同様の方法でIL-1β刺激後に酸化還元活性エンドソームの形成を、MyD88の抑制が抑止することを実証する。MyD88 siRNAとは対照的に、Rac1 siRNAは、リガンド刺激後にIL-1R1/MyD88内部移行を抑制しなかったが、むしろエンドソーム区画へのRac1、Nox2およびTRAF6の補充を有意に抑制した。エンドソーム区画へのTRAF6補充の酸化還元依存性ととともに、これらの所見により、Rac1が、エンドソーム区画におけるNox2の補充/活性化を促進することによって、エンドソームリガンド活性化されたIL-1R1へTRAF6補充するための重要な役割を担うことが示唆される。累積的に、これらの研究は、MyD88およびRac1がどちらも、受容体のエンドサイトーシスおよびNox2の補充をそれぞれ調整することによって、酸化還元活性エンドソームの形成を確立するために重要な役割を担うことを示す。両工程は、IL-1β刺激後のエンドソーム区画におけるリガンド活性化されたIL-1R1へのTRAF6の効果的な補充およびIKK/NFκB活性化にとって重要である。

【0404】

MyD88は、原形質膜でIL-1R1に結合し、一方、TRAF6は、H₂O₂依存性の方法でエンドソームIL-1R1へ補充される。これらの所見により、MyD88はエンドソーム区画内へのIL-1R1内部移行にとって必須であることが初めて実証され、また、MyD88は、リガンド結合後および受容体内部移行前に原形質膜へ補充されることが示唆される。さらに、IL-1β活性化されたエンドソームへのMyD88の補充は、エンドソーム酸化還元状態に依存しなかった。対照的に、本発明の研究は、IL-1β活性化されたエンドソームへのTRAF6補充が、エンドソーム区画によるROS生成に依存したことを実証する。これらの所見により、TRAF6のIL-1R1補充が、酸化還元依存の方法においてエンドソームレベルで発生する可能性が示唆された。さらに、カタラーゼおよびSODエンドソーム負荷は、IL-1β媒介のTRAF6エンドソーム補充およびIKK活性化を効果的に阻止するために必要であったため、Nox2由来のH₂O₂は、TRAF6のエンドソームへの補充に必要であったことが仮定された。この仮説を検討するため、MyD88およびTRAF6が、リガンド結合後に原形質膜およびエンドソーム区画においてIL-1R1へ補充される程度、およびこれらの工程がH₂O₂依存した程度を評価した。

【0405】

原形質膜におけるIL-1R1へのMyD88およびTRAF6の補充を評価するため、エンドサイトーシスが阻止された(4℃)またはダイナミン(K44A)発現により有意に抑制された条件下で実験を行った。これらの実験結果は、エンドサイトーシスを抑制することにより、免疫沈降したリガンド活性化されたIL-1R1へのMyD88ではなくTRAF6の補充が有意に損なったことを立証した。例えば、4℃でエンドサイトーシスが存在しない場合において、TRAF6は、IL-1β刺激後にIL-1R1に結合することができず、一方で、MyD88結合は37℃で見られたものと同様であった。興味深いことに、TRAF6→IL-1R1の酸化還元依存の補充は、外因性H₂O₂の添加によってエンドサイトーシスが存在しない場合に原形質膜で再構成されることができた。500 μMのH₂O₂は、4℃の原形質膜でリガンド活性化されたIL-1R1へのみ、TRAF6の補充を促進した。そのような所見は、IL-1R1活性化の幾つかの側面に新しい見識を提供する。まず、リガンド活性化されたIL-1R1へのTRAF6エフェクタ補充は、エンドソームレベルで主に発生することを実証する。次に、H₂O₂は、リガンド活性化されたIL-1R1へのTRAF6補充を容易にするROSであり得ることを実証する。最後に、この補充工程へのH₂O₂の源としての、エンドソームにおけるNox2活性化の生理学的フレームワークを提供する。

10

20

30

40

50

【0406】

エンドソーム ROS は、エンドソーム区画による IKK の IL-1 β 依存性の活性化を増強させる。IL-1R1 のリガンド活性化は、その受容体と付随したエフェクタ複合体への少なくとも2つの潜在的な IKK キナーゼ (TAK1 および / または NIK) を介して IKK 活性化を促進する (Ghosh et al., 2002)。IKK 複合体が、活性化された受容体複合体によってリン酸化されると、IKK は、IKB α / β をリン酸化するように活性化され、NF κ B は核に動員される。酸化還元活性エンドソームがどのように NF κ B 活性化を機能的に調節するかをより理解するため、次に、単離された IL-1 β 刺激されたエンドソームが直接的に IKK 複合体を活性化できるかどうかを検討した。この体外再構成アッセイは、キナーゼ活性化源としての単離された小胞分画および免疫沈降された IKK 複合体と、IKK 活性化の分子マーカーとしての GST-IKB α のリン酸化とを活用した。まず、IL-1 β 処置された細胞から単離されたエンドソームは、自然細胞からの免疫沈降された IKK 複合体を活性化できることが立証された。IL-1 β 処置されていない細胞からの免疫沈降された IKK 複合体は、IL-1 β 活性化されたエンドソームが存在する場合に GST-IKB α をリン酸化するように活性化された。刺激されていないエンドソームが存在する場合において活性化は見られなかった。さらに、IL-1 β 活性化されたエンドソームへの両 SOD およびカタラーゼの負荷は、IKK を活性化させる能力を有意に抑制し、一方、単独の SOD 負荷はあまり影響を及ぼさなかった。これらの所見は、IKK の活性化におけるエンドソーム由来の ROS の重要性に対する直接的な確証を提供し、H₂O₂ が受容体複合体への TRAF6 補充に必要とされる1次 ROS であることと一致する。同様に、ダイナミン (K44A) が酸化還元活性エンドソームの形成および IL-1R1 への TRAF6 の補充を抑制したことから予想されるように、ダイナミン (K44A) の発現も、小胞の IKK 活性化を抑制した。興味深いことに、低レベルの GST-IKB α リン酸化は、免疫沈降された自然 IKK 複合体が存在しない場合に IL-1 β 活性化されたエンドソームで観察された。この所見により、IKK 複合体が、酸化還元活性エンドソーム上の活性化された受容体複合体を過渡的にのみ付随させる可能性が示唆される。かかる所見は、IKB α が、S42 / S46 上でリン酸化されると、IKK 複合体から解離することを実証する、IKB α / IKK 複合体相互作用と同様である (Regnier et al., 1997)。

【0407】

考察

エンドサイトーシスは、原形質膜で受容体媒介のシグナル伝達を下方調節する伝統的な機構として長い間みなされている。しかし、増大する確証により、エンドサイトーシスはまた、膜開始された受容体シグナルの活性化、増幅および分類において重要な役割を担うことが指摘されている (Sorkin et al., 2002)。ここで、Nox2 活性化に連結した受容体活性化および初期エンドソーム区画による ROS 生成の新しい酸化還元依存の機構を説明する。IL-1 β 刺激後の Nox2 活性エンドソームの特定は、ROS がどのように NF κ B の受容体活性化に影響を及ぼすことができるかを理解するためのフレームワークを提供した。NF κ B の活性化における ROS 関与の概念は依然として議論の余地があるが、(Hayakawa et al., 2003)、幾つかの報告は、過剰発現したグルタチオンペルオキシダーゼでの抑制を実証することにより、IL-1 β および NF κ B の TNF α 活性化における主要なメディエーターとしての H₂O₂ を含意している (Kretz-Remy et al., 1996、Li et al., 2001)。本発明の研究からの所見は、リガンド結合後の IL-1R1 エンドサイトーシスと、それに続く、エンドソーム区画における MyD88 / IL-1R1 複合体への TRAF6 の H₂O₂ 依存性の補充とを制御する一連の諸現象を明らかにしている。この酸化還元依存の工程は、IKK 複合体および NF κ B の効率的な活性化に必要であった。

【0408】

研究は、IL-1 β 刺激後にエンドソーム区画において Nox2 活性化を制御する分子諸現象を判断することに焦点を当てている。これに関連して、リガンド活性化された IL

IL-1R1のエンドサイトーシスは、効率的なNox2複合体活性化およびエンドソーム区画によるROSの生成に必要であった。この工程は、リガンド活性化されたエンドソームIL-1R1エフェクタ複合体へのTRAF6の酸化還元依存の補充およびその後のIKK活性化に關与する主要な制御諸現象であった。IL-1R1に結合するRac1は、IL-1β刺激後のエンドソーム区画内へのNox2補充を媒介するための中心的役割を担うようであった。Rac1は、Nox複合体へp67phoxを補充することによるNox2活性化において必須の役割を担うと主に考えられている(Diekman et al., 1994)。これらの研究は、Rac1が、リガンド活性化された受容体を用いてNox2を適切な細胞区画へ局在化させるように機能することもできることを初めて実証する。MyD88とは対照的に、Rac1は、リガンド結合後のエンドサイトーシスに必要であるとは考えられなかった。しかし、両エフェクタは、エンドソーム区画におけるNox活性化に貢献し、したがって、IL-1R1へのTRAF6の酸化還元依存の補充に貢献した。要約すれば、MyD88の抑制は、リガンド活性化されたIL-1R1のエンドサイトーシスを抑制することによって、エンドソーム区画におけるNox2活性化およびTRAF6補充を減少させた(ダイナミンK44Aと同様の方法で)。対照的に、Rac1抑制は、リガンド活性化されたIL-1R1に繫留するNox2を阻止することによって、エンドソーム区画におけるNox2活性化を恐らく減少させた。しかし、Rac1が受容体に直接結合するのか、または第2の不明エフェクタ(MyD88以外)を介して結合するかどうかは現在のところ明らかではない。

【0409】

チオール基の酸化は、タンパク質機能の酸化還元依存的变化を誘発する機構として把握されている(Georgiou, 2002, Kamata et al., 2005)。原形質膜(4℃で)でリガンド活性化されたIL-1R1へのTRAF6補充を直接的に促進し、酸化還元活性エンドソームのエンドサイトーシス形成の必要性を本質的に回避するH₂O₂の能力を考慮すれば、TRAF6、またはIRAKなどの上流エフェクタにおけるチオール基の酸化は、IL-1R1/MyD88複合体へのエフェクタ補充を可能にするタンパク質構造の酸化還元依存的变化をもたらし得る。IRAK/TRAF6複合体の効率的なドッキングを容易にするMyD88および/またはIL-1R1の酸化還元依存的变化など、他のシナリオも可能である。あるいは、IL-1R1と付随するIRAK/TRAF6も、キナーゼまたは触媒的システインを有するホスファターゼのROS調節を介して間接的に制御され得る。この後者の仮説を支持して、PKCによるIRAKリン酸化が、IRAK自動リン酸化およびIL-1βによるNFκB活性化にとって重要であることが示されている(Mamidipudi et al., 2004)。

【0410】

Noxタンパク質は、種々の環境刺激後の細胞内におけるROSの主な源であることが既知である(Lambeth, 2004)が、細胞のシグナル伝達を調節するそれらの機能は、最近になってようやく把握されている。例えば、Nox4は、ROS媒介のインスリンシグナル伝達において重要であるように思え(Mahader et al., 2004)、Nox1は、アンジオテンシンII酸化還元-感受性シグナル伝達経路を媒介する(Hanna et al., 2002, Lasseque et al., 2001)。ここで、初めて、Nox2がIL-1βシグナル伝達を調節できることが示され、NFκB活性化との関係におけるこの酸化還元依存の調節に關与する機構を説明する。また、本発明の所見は、Nox活性化が発生し、エンドソーム区画においてH₂O₂依存性の受容体活性化に選択的に影響を及ぼす、細胞内構成に新しい見解も提供する。また、エンドソームNox由来のROSのIL-1R1活性化に対する影響を定義する、現在研究されている機構は、他の酸化還元依存の受容体シグナル伝達経路と重複する性質を有する場合もあると妥当に思われる。例えば、PDGFシグナル伝達は、H₂O₂と、受容体の部位としてH₂O₂を除去し、PDGFRホスファターゼに影響を及ぼすように作用するペルオキシレドキシニンIIを付随した受容体とによって制御される(Choi et al., 2005)。また、PDGF刺激後のROS生成は、Rac1によって制御され、N

A D P H オキシダーゼに伴って生じることが示唆されている (B a l e t a l . , 2000)。したがって、乳房上皮細胞における本発明の研究は、I L - 1 β シグナル伝達におけるエンドソーム N o x 2 を含意しているが、R a c 1 依存性の N o x アイソフォームとともに、他の酸化還元調節されたシグナル変換経路のために、他の細胞型がこの機構を活用することも可能である。

【実施例 3】

【0411】

運動ニューロンおよびミクログリアにおける変異体 S O D 1 の制御された発現を用いた最近の研究は、2つの細胞型が、A L S 疾患進行の異なる段階、発病開始の初期段階における運動ニューロンおよび後期段階疾患進行におけるミクログリアに役立つことを実証している (B o i l l e e e t a l . , 2006)。これらの所見は、変異体 S O D 1 発現の結果としてのミクログリア機能における1次欠陥を含意する。したがって、A L S 中の増加した脊髄ミクログリアは、酸化還元媒介の炎症性損傷の可能性を恐らく増強させるが、変異体 S O D 1 がミクログリアの機能を変化させ、この炎症過程に役立つ機構は依然として不明である。

【0412】

変異体 S O D 1 は、R O S を生成するミクログリアの能力に直接的に影響を与えることが仮定された。N o x 2 g p ⁹¹ p h o x が、A L S のマウスモデルにおいて脊髄酸化還元ストレスに貢献することが示されていることを考慮すれば、(W u e t a l . , 2006)、A L S S O D 1 変異体は、N o x 由来のスーパーオキシドの異常調節を直接的にもたらし場合がある。実際、W T - S O D 1 または G 9 3 A - S O D を過剰発現させる遺伝子導入マウスの分析は、S O D 1 の突然変異型のみが脳および脊髄内膜における N A D P H 依存性のスーパーオキシドを増強させ (図 15 A - B)、これは、フラビンタンパク質阻害剤ジフェニレンイオジオニウムクロライド (d i p h e n y l e n e i o d i o n i u m c h l o r i d e : D P I) で抑制されたが、ミトコンドリア複合体 I 阻害剤ロテノンでは抑制されなかった (図 16) ことを実証した。興味深いことに、A L S で顕著な病変を示さない臓器の肝臓 (図 15 A) も、N o x 活性において同様の S O D 1 変異体付随した増加を示した。対照的に、脊髄および脳内の W T - S O D 1 過剰発現は、内膜における N A D P H 依存性のスーパーオキシドを変化させなかった。興味深いことに、肝臓における W T - S O D 1 発現は、9 および 18 週齢で肝臓中の N o x 活性を有意に増加させたが、G 9 3 A - S O D 1 よりははるかに少ない程度であった。

【0413】

A L S マウスにおいて体内で見られる疾患関連炎症過程が存在しない場合に、変異体 S O D 1 タンパク質が直接的に N o x 活性を増強できるかどうかを評価するため、組み換えアデノウイルスを使用して、S O D 1 の W T、L 8 Q および G 9 3 C 形態を、M O 5 9 J グリア細胞および S H - S Y 神経細胞の両方に発現させた。変異体 S O D 1 タンパク質の過剰発現のみが、グリアおよび神経細胞型の両方から内膜における N A D P H 依存性の

【0414】

【化 9 1】



【0415】

生成を向上させ (図 15 C)、細胞死を有意に増加させた (図 15 D)。これらの所見は、向上した N o x 活性化および細胞障害をもたらす S O D 1 変異体における機能の上昇を含意する。p 4 7 p h o x 調節された N A D P H オキシダーの既知の阻害剤であるアポニン (Z h a n g e t a l . , 2006; F u k u k a w a e t a l . , 2004) は、細胞生存における対応する増加を有するグリア細胞においてのみ N A D P H 依存性の

【0416】

10

20

30

40

【化 9 2】



【0 4 1 7】

生成が促進された S O D 1 変異体を抑止した (図 1 5 E)。対照的に、アポシニン、S H - S Y 神経細胞の N o x 活性を抑制できず、また、変異体 S O D 1 媒介の細胞障害のための保護を行わなかった。

【0 4 1 8】

アポシニンは、N o x 複合体への p 4 7 p h o x の補充を妨げることによって N A D P H オキシダーゼを抑制する (S t o l k e t a l . , 1 9 9 4)。3つの既知の N o x 触媒サブユニットは、(N o x 1、N o x 2 および N o x 3) によって調節され (U e y a m a e t a l . , 2 0 0 5 ; L a m b e t h , 2 0 0 4)、これらの N o x アイソフォームも小 G T P アーゼ R a c によって調節される (L i e t a l . , 2 0 0 5)。実際、S O D 1 - G 9 3 A 変異体を過剰発現する A L S 遺伝子導入マウスの両脊髄は、P a k 1 プルダウンアッセイで判断されたとおり、向上した R a c 1 - G T P レベル (つまり、活性化された R a c 1) を示した (図 1 5 F)。S O D 1 変異体発現による向上した R a c 1 活性化のこれらの所見は、この複合体からの活性化された形態を安定させるために、S O D 1 が R a c 1 および / または他の N o x 複合体成分と直接的に相互作用し得るという仮説をもたらした。この仮説を支持して、S O D 1 および R a c 1 はどちらもサイトカイン刺激後に N o x 2 活性初期エンドソームに補充される (実施例 2)。

【0 4 1 9】

N o x 活性化の 1 次欠陥に繋がる、S O D 1 変異を付随した特定の A L S における機能上昇の可能性は、この疾患における潜在的な病理学的機構に対して新しい見解を与える。最近の研究により、N o x 2 の欠失は、A L S マウスの生存を延長させることが示唆されている (W u e t a l . , 2 0 0 6)。しかし、他の R a c 調節された N o x 複合体 (N o x 1 および N o x 3 など) もまた、A L S における R O S 生成の変化に貢献し得るかどうかは未だ不明である。A L S 疾患の病態進行に対して直接的な N o x 抑制を行う治療的可能性をテストするため、体内のアポシニン抑制研究を G 9 3 A - A L S マウスに行った。実際、2 週齢からの飲用水へのアポシニン投与は、用量依存性的方法において G 9 3 A - S O D 1 マウスを延命させた。最も高い用量 (3 0 0 m g / k g) で、5 0 % 生存時間が 1 2 5 日から 2 3 9 日に増加した (図 1 7 A)。また、この用量は、腰髄における運動ニューロン数も 1 2 0 日で有意に増加させた (図 1 9)。

【0 4 2 0】

5 % の体重減少 (図 1 7 C ~ D) および歩行運動 (データ図示せず) で判断されたとおり、発病開始の年齢および生存指標 (症状の最初の兆候から死亡までの時間) において明確な用量反応があった。アポシニン処置が体内の N A D P H オキシダーゼ活性を有意に抑制したことを確認するため、最終段階の A L S マウスを水中のアポシニンで 5 日間処置し、ルシゲニンおよび D H E アッセイで N o x 活性を評価した。これらの研究は、ミクログリオシスおよび N o x 2 発現増加を伴う疾患の後期段階で体内の N o x 由来のスーパーオキシド生成 (図 1 7 E ~ F) を効果的に抑制したことを実証した (W u e t a l . , 2 0 0 6)。

【0 4 2 1】

興味深い一発見は、延命された A L S マウスは、未処置のままの場合、眼感染症を発症し、通例の運動異常なく急死したことであった。全身性抗生物質を用いた眼感染症の処置により、約 5 0 % の事例が解決された (図 1 7 B)。重要なことには、抗生物質を用いた A L S マウスの処置は、アポシニンが存在しない場合に生存を増加させず、アポシニンで処置されなかった A L S マウスは眼疾患を発達させなかった。したがって、G 9 3 A - S O D 1 マウスモデルにおける眼疾患は、後年にのみ発症するこのモデルに関連する以前は観察されなかった特性のようである。この眼疾患の病理学的特性は、黄色ブドウ球菌を含む浸出液増加を含む。しかし、組織切片において炎症の兆候は観察されず、死の病因

論の判断を困難にさせた（データ図示せず）。

【0422】

酸化還元依存の方法でNADPHオキシダーゼによるRac1依存性のスーパーオキシド生成を調節するようにSOD1が機能するという所見は、ALSと、アポシニンなどの標的された抗酸化物質治療の発達とにおいて重要な意味を持つ。Rac-GTPからSOD1を遊離させ、GTP加水分解を発生させるためのpM量のH₂O₂能力により、Noxの体内調節機構は、細胞ROSの小さな変化に対して極めて高い感受性があり得ることが示唆される。この機構は、H₂O₂へのSOD1の酸素的変換を介して、Rac1が細胞

【0423】

【化93】



【0424】

の変化を感知および調節でき得るようにする。かかる空間的調節は、酸化還元センサとしてのSOD1機能の主要な側面であってもよく、無調節のNox複合体を直接的に抑制するようにアポシニンの治療的効果であってもよい。さらに、5、8および12週齢のALSマウスに対してアポシニン処置を開始する研究は、疾患の初期段階中のNOXの抑制がアポシニンの治療的効果において重要であることを実証する（図18）。かかる疾患の初期段階は、変異体SOD1の運動ニューロン発現によって最も有意に影響を受けるようである（Boillee et al., 2006）。グリア細胞中のNox2発現（Wu et al., 2006）および変異体SOD1発現（Boillee et al., 2006）の抑制は、炎症性ミクログリオシスに関連する疾患の後期状態に影響を及ぼすようであるため、他のRac1調節されたNoxタンパク質は、さらなる酸化還元ストレスをもたらす炎症性ミクログリオシスの後期段階を開始させる、運動ニューロンにおける酸化還元初期状態の発達に対する鍵となり得る。

【0425】

参考文献

- Abid et al., FEBS Lett., 486:252 (2000).
- Abo et al., Nature, 353:668 (1991).
- Akira et al., J. Infect. Dis., 187:S356 (2003).
- Albrich et al., FEBS Lett., 144:157 (1982).
- Aniansson et al., Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C, 92:357 (1984).
- Antunes et al., FEBS Lett., 475:121 (2000).
- Babior et al., J. Clin. Invest., 58:989 (1976).
- Babior et al., J. Lab. Clin. Med., 85:235 (1975).
- Babior, N. Engl. J. Med., 298:659 (1978).
- Bae et al., J. Biol. Chem., 272:217 (1997).
- Bae et al., J. Biol. Chem., 275:10527 (2000).
- Bereznoi et al., Neuromuscul. Disord., 7:113 (1997).
- Billington et al., Anal. Biochem., 258:251 (1998).

10

20

30

40

50

- Boillee et al., Science, 312:1389 (2006).
- Borreagaard et al., Blood, 89:3503 (1997).
- Burns et al., Nat. Cell Biol., 2:346 (2000).
- Burritt et al., J. Biol. Chem., 270:16974 (1995).
- Choi et al., Nature, 435:347 (2005).
- Chou and Talalay, Adv. Enzyme Regul., 22:27 (1984).
- Clark et al., J. Biol. Chem., 262:4065 (1987) 10
- Clark et al., J. Clin. Invest., 85:714 (1990).
- Clark, J. Infect. Dis., 161:1140 (1990).
- Cleveland, Neuron, 24:515 (1999).
- Coligan, Current protocols in immunology. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York (1991).
- Conner et al., Nature, 422:37 (2003).
- Dahlgren et al., Biolumin. Chemilumin., 4:263 (1989). 20
- Dahlgren et al., Infect. Immun., 47:326 (1985).
- DeLeo et al., J. Leukoc. Biol., 60:677 (1996).
- DeLeo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7110 (1995).
- Deshpande et al., Faseb. J., 14:1705 (2000).
- Diekmann et al., Science, 265:531 (1994). 30
- Dinauer et al., Nature, 327:717 (1987).
- Dinauer, et al., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 30:329 (1993).
- Dorseuil et al., J. Leukocyte Biol., 58:108 (1995).
- Duan et al., J. Virol., 73:10371 (1999).
- Engelhardt, Antioxid. Redox. Signal, 1:5 (1999).
- Enyedi et al., Cell, 70:879 (1992).
- Fantone, et al., Hum. Pathol., 16:973 (1985) 40
- Faulkner et al., Free Radic. Biol. Med., 15:447 (1993).
- Fearon et al., Science, 272:50 (1996).
- Finan et al., J. Biol. Chem., 269:13752 (1994).
- Freeman et al., J. Immunol. Methods, 139:241 (1991).
- Frey et al., Circ. Res., 90:1012 (2002).
- Furukawa et al., J. Clin. Invest., 114:1752 50

(2004).

Gabig et al., Blood, 85:804 (1995).

Georgiou, Cell, 111:607 (2002).

Ghezzi-Schoneich et al., Free Radic. Biol Med., 30:858 (2001).

Ghosh et al., Cell, 109:S81 (2002).

Graham et al., Anal. Biochem., 220:367 (1994).

Graham et al., Z. Gastroenterol., 34:76 (1996).

Graham, ScientificWorld Journal, 2:1400 (2002).

Gu et al., J. Biol. Chem., 278:17210 (2003).

Gurney et al., Science, 264:1772 (1994).

Halliwell et al., Free radicals in biology and medicine, Third Edition; Oxford Science Publications, Oxford, UK., p. 388 (1998).

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. Free radicals in biology and medicine, Third Edition; Oxford Science Publications, pp 33-34 (1998).

Halliwell, Cell. Biol. Int. Rep., 2:113 (1978).

Hampton, Blood, 92:3007 (1998).

Hanna et al., Antioxid. Redox. Signal, 4:899 (2002).

Harrison et al., J. Biol. Chem., 251:1371 (1976).

Hayakawa et al., Embo J., 22:3356 (2003).

Heyworth et al., J. Biol. Chem., 269:30749 (1994).

Heyworth et al., J. Clin. Invest., 87:352 (1991).

Hirshberg et al., Nat. Struct. Biol., 4:147 (1997).

Hoffmann et al., Science, 284:1313 (1999).

Hordijk, Circ. Res., 98:453 (2006).

Huang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:12829 (1997).

Huffman et al., J. Org. Chem., 60:1590 (1995).

Hyslop et al., Free Radic. Biol. Med., 19:31 (1995).

Irani et al., Science, 275:1649 (1997).

Ito et al., Biochemistry, 36:9109 (1997).

Iyer et al., J. Biol. Chem., 269:22405 (1994).

Jackson et al., Hematol. Oncol. Clin. North Am., 2:317 (1988).

10

20

30

40

50

- Janeway et al., Cell, 76:275 (1994).
- Jefferies et al., Mol. Cell Biol., 21:4544 (2001).
- Kamata et al., Cell, 120:649 (2005).
- Kanai et al., Nat. Cell Biol., 3:675 (2001).
- Kang et al., J. Biol. Chem., 279:2535 (2004).
- Kettle et al., Redox Rep., 3:3 (1997).
- Kheradmand et al., Science, 280:898 (1998) 10
- Kim et al., J. Neurol. Sci., 206:65 (2003).
- Klebanoff, J. Bacteriol., 95:2131 (1968).
- Klebanoff, Proc. Assoc. Am. Physicians, 111:383 (1999).
- Kleinberg et al., J. Biol. Chem., 265:15577 (1990).
- Kretz-Remy et al., J. Cell Biol., 133:1083 (1996).
- Kwon et al., J. Biol. Chem., 275:423 (2000). 20
- Lambeth, Nat. Rev. Immunol., 4:181 (2004).
- Laperre et al., FEBS Lett., 443:235 (1999).
- Lassegue et al., Circ. Res., 88:888 (2001).
- Leto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91:10650 (1994).
- Leusen et al., J. Clin. Invest., 93:2120 (1994).
- Leusen et al., J. Exp. Med., 180:2329 (1994) 30
- Li et al., Antioxid. Redox. Signal, 3:415 (2001).
- Li et al., Circ. Res., 90:143 (2002).
- Li et al., J. Biol. Chem., 273:2015 (1998).
- Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:5567 (2002).
- Liochev et al., Arch. Biochem. Biophys., 337:115 (1997).
- Lomax et al., Science, 245:409 (1989).
- Lomax et al., Science, 246:987 (1989). 40
- Mahadev et al., Mol. Cell Biol., 24:1844 (2004).
- Mamidipudi et al., J. Biol. Chem., 279:4161 (2004).
- Manser et al., Mol. Cell, 1:183 (1998).
- Matzuk et al., Endocrinology, 139:4008 (1998).
- McCord et al., J. Biol. Chem., 244:6049 (1969).
- McNally et al., J. Biolumin. Chemilumin., 11 50

: 99 (1996).

Medicinal Plants of Nepal, p. 37, H. M. G. Press, Kathmandu (1970).

Menard et al., Eur. J. Biochem., 206: 537 (1992).

Muijsers et al., Br. J. Pharmacol., 130: 932 (2000).

Muzio et al., Science, 278: 1612 (1997).

Nakanishi et al., J. Biol. Chem., 267: 19072 (1992).

10

Nauseef et al., Mandell, G. L., Bennett, J. E. and Dolin, R. (Eds.); Fifth Edition, Churchill Livingstone, Philadelphia, USA., Chapter 8: Granulocytic Phagocytes (2000).

Nauseef, Hematol. Oncol. Clin. North Am., 2: 135 (1988).

Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48: 443 (1970).

Ogle et al., J. Immunol. Methods, 115: 17 (1988).

20

O'Neill et al., J. Leukoc. Biol., 63: 650 (1998).

Pagano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 14483 (1997).

Pandey et al., Abst. 15th Annual Conference, Indian Pharmacological Society.

Pandey et al., J. Res. Ind. Med., 5: 11 (1970).

Park et al., J. Biol. Chem., 267: 17327 (1992).

30

Park et al., Mol. Cell Biol., 24: 4384 (2004).

Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444 (1988).

Plonne et al., Anal. Biochem., 276: 88 (1999).

Pollock et al., Nat. Genet., 9: 202 (1995).

Puceat et al., Mol. Biol. Cell, 14: 2781 (2003).

Qian et al., J. Biol. Chem., 276: 41661 (2001).

40

Quinn et al., J. Biol. Chem., 268: 20983 (1993).

Quinn et al., Nature, 342: 198 (1989).

Rae et al., Science, 284: 805 (1999).

Regnier et al., Cell, 90: 373 (1997).

Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p. 1418 (1985),

Rhee et al., J. Am. Soc. Nephrol., 14: S211 (2

50

003).

Rhee et al., Sci. STKE, 53:1 (2000).

Rittinger et al., Nature, 388:693 (1997).

Rittinger et al., Nature, 389:758 (1997).

Roos et al., J. Biol. Chem., 259:1770 (1984).

.

Rosen et al., J. Exp. Med., 149:27 (1979).

Rothwarf et al., Sci. STKE, 1999:RE1 (1999).

.

Rotrosen et al., Science, 256:1459 (1992).

Samuni et al., J. Biol. Chem., 263:13797 (1988).

Sanlioglu et al., J. Biol. Chem., 276:30188 (2001).

Schettler et al., Eur. J. Biochem., 197:197 (1991).

Schnitzler et al., Adv. Exp. Med. Biol., 418:897 (1997).

Segal et al., Biochem. J., 284:781 (1992).

Segal et al., Trends Biochem. Sci., 18:43 (1993).

Segal, Nature, 326:88 (1987).

Smith et al., Blood, 77:673 (1991).

Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482 (1981).

Sorkin et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3:600 (2002).

Sprang, Annu. Rev. Biochem., 66:639 (1997).

Stolk et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 11:95 (1994).

Sulciner et al., Mol. Cell Biol., 16:7115 (1996).

Sumimoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5345 (1994).

Sundaresan et al., Science, 270:296 (1995).

.

Supinski et al., J. Appl. Physiol., 87:776 (1999).

Topp et al., J. Biol. Chem., 279:24612 (2004).

Trischler et al., J. Cell Sci., 112:4773 (1999).

Tucker et al., J. Med. Chem., 37:2437 (1994).

.

Ueyama et al., Mol. Cell Biol., 26:2160 (2006).

Vaidya et al., Ass. Phys. Ind. Conf. Abstracts (1981).

Van Buul et al., Antioxid. Redox. Signal, 7:308 (2005).

Van Dalen et al., Biochem. J., 327:487 (1997).

Vliet et al., J. Biol. Chem., 272:7617 (1997).

Volpp et al., Science, 242:1295 (1988).

Wang et al., Nature, 412:346 (2001).

Weinbaum et al., Nature, 286:725 (1980).

Weiss, N. Engl. J. Med., 320:365 (1989).

Wesche et al., Immunity, 7:837 (1997).

Whitin et al., Blood, 66:1182 (1985).

Wientjes et al., Biochem. J., 296:557 (1993).

Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:1204 (1977).

Worthylake et al., Nature, 408:682 (2000).

Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:12132 (2006).

Xia et al., Biochemistry, 37:16465 (1998).

Xiao et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol., 282:C926 (2002).

Yamaoka-Tojo et al., Circ. Res., 95:276 (2004).

Yang et al., Nat. Genet., 29:160 (2001).

Zerial et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2:107 (2001).

Zipfel et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 232:209 (1997).

Zwacka et al., Nat. Med., 4:698 (1998).

Zhang et al., J. Clin. Invest., 116:3050 (2006).

【0426】

すべての公報、特許および特許出願は、参照により本願明細書に組み込まれる。前述の本明細書において、本発明は、その特定の好適な実施形態に関連して記述され、多くの詳細は例証目的のために説明されているが、本発明は、追加の実施形態を受け入れる余地があり、本明細書において記述される特定の詳細は、本発明の基本原則から逸脱することなく大幅に変更できることが当業者には明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0427】

【図1A-F】Rac1は、酸化還元依存的にSOD1に結合する。A) Rac1は、sod1+/+またはsod1-/-マウスの心臓、腎臓、肝臓および/または脳組織から免疫沈降し、続いてSOD1およびRac1に対してウェスタンブロット法(Western blotting: WB)を行った。B) 精製されたウシSOD1が存在する場合における、精製されたHisタグ付きRac1およびCdc42の体外IPに続いて、SOD1、Rac1およびCdc42に対してWBを行った。Hisタグ付きGTPアーゼは、SOD1とのインキュベーションに先立って、指示されたヌクレオチド類似体を前負荷した。C) 精製されたSOD1が存在する場合における、指示されたヌクレオチド負荷のGSTタグ付きRac1変異体(または遊離GST)の体外IPと、それに続くSOD1およびGSTに対するWB。D) 精製された、未変性の、脱メタル化された、または再メタル化されたウシSOD1が存在する場合における、精製されたHisタグ付きRac1の体外IPと、それに続く、SOD1およびRac1に対するWB。Hisタグ付きR

a c 1 は、S O D 1 とのインキュベーションに先立って、指示されたヌクレオチド類似体を前負荷した。さらに、未処置の H i s タグ付き R a c 1 および 3 0 0 μ M D T T 前還元 H i s - R a c 1 は、S O D 1 の各 3 つの形状を用いて体外プルダウンアッセイに使用した。E) H i s - R a c 1 を前還元し (3 0 0 μ M D T T)、G T P γ S を負荷し、その後、S O D 1 を用いてプルダウンアッセイを行う前に指示濃度の過酸化水素 (H₂O₂) で処置した。F) D T T の指示濃度を、(E) に示すように、3 0 0 p M の H₂O₂ 処置した H i s - R a c 1 試料に加え、S O D 1 でプルダウンアッセイを行った。

【図 2 A - H】S O D 1 は、酸化還元依存の物理的相互作用を介して、R a c 1 活性化を調節する。A) S O D 1 結合ドメインを画定するために使用された G S T - R a c 1 欠失変異体の模式図。B) 精製されたウシ S O D 1 が存在する場合における、種々の G S T 1 1 タグ付き R a c 1 欠失変異体の体外 I P。各レーン上部の数は、パネル A の G S T - R a c 1 融合構成の数に対応する。上部パネルは、G S T の I P に続く S O D 1 に対する W B であり、下部パネルは、I P に使用した精製された融合ペプチドのクーマシー染色されたゲルである。C) G S T タグ付き P A K 結合ドメイン (G S T - P B D) は、s o d 1 + / - または s o d 1 - / - マウス脳溶解物において G T P - R a c 1 を定量化するために、プルダウンアッセイにおいて使用された。ウェスタンブロットは、G T P - R a c 1 および G S T - P B D 後のグルタチオン沈殿と、粗溶解物における S O D 1 および R a c 1 の合計レベルを示す。D) 1 3 s o d 1 + / - および 7 s o d 1 - / - マウス脳からの G T P - R a c 1 レベルの定量化は、有意差 (p < 0. 0 0 1、スチューデント t 検定) を示した。E、F) R a c 1 G T P アーゼアッセイは、(E) ウシ S O D 1 または (F) 大腸菌 S O D および / または G S T タグ付き p 2 9 - G A P が存在する場合に行われた。H i s タグ付き R a c 1 は、γ P 3 2 - G T P で前付加し、反応物の一定分量は、R a c 1 から遊離した % 3 2 P i を評価することによって、薄層クロマトグラフィーを用いて様々な時点で G T P 加水分解を分析した。G) S O D 1 および / または p 2 9 - G A P が存在しない場合における、R a c 1 および C d c 4 2 に対する G T P アーゼアッセイ。γ P 3 2 - G T P からの 3 2 P i 遊離率がプロットされる。H) S O D 1 および / または 1 0 0 μ M のキサンチン / 1 0 0 m U のキサンチンオキシダーゼ (X / X O) が存在する場合、または存在しない場合における、R a c 1 G T P アーゼアッセイ。I) 1 5 分の X / X O 由来の R O S への暴露の有無にかかわらず、S O D 1 が存在する場合における G T P γ S 負荷された H i s - R a c 1 のプルダウンアッセイ。本アッセイで使用された条件は、(H) に示される G T P アーゼアッセイと同一であった。(H) すべてのパネルにおけるデータは、少なくとも 3 つの独立した実験の代表的なものである。

【図 3 A - E】S O D 1 は、エンドソーム区画において N A D P H オキシダーゼによる【化 9 4】



生成を活性化する。A) エンドソームは、イオジキサノール密度勾配分画を使用して 1 次マウス皮膚線維芽細胞 (p r i m a r y m o u s e d e r m a l f i b r o b l a s t : P M D F) から単離させ、画分は、ルシゲニンベースの発光アッセイ (上部パネル) を使用して、また N o x 2 g p 9 1 p h o x、R a c 1、S O D 1 および E E A 1 に対するウェスタンブロット (下部パネル) によって、N A D P H 依存性のスーパーオキシド生成を評価した。B) N o x 2 g p 9 1 p h o x 野生型およびノックアウト (K O) P M D F からの指示された細胞成分分画における、S O D 1 に対するウェスタンブロット。C) ルシゲニンアッセイは、S O D 1 および / または D P I (一般的な N o x 阻害剤) が存在する場合または存在しない場合の、N o x 2 野生型および K O P M D F からの分画番号 1 0 小胞における N A D P H 依存性の

【化 9 5】



生成率を評価するために使用された (n = 6)。D) ウシ S O D 1 (B o v. S O D

1) または大腸菌 SOD (Bac. SOD) が存在する場合または存在しない場合における、1 次マウス胎児線維芽細胞 (primary mouse embryonic fibroblasts: PMEF) からの小胞の分画の NADPH 依存性の
【化 9 6】

$\cdot\text{O}_2$

産出率を評価した ($n = 3$)。E) ルシゲニンベースのアッセイにおいて、X/XO 由来の

【化 9 7】

$\cdot\text{O}_2$

10

を分解するための Bov. SOD1 および Bac. SOD の能力。F) sod1+/+, sod1+/- または sod1-/- マウスから単離した PMN による PMA 誘導の

【化 9 8】

$\cdot\text{O}_2$

産出を、シトクロム c 還元アッセイを使用して評価した。* sod1+/+ マウス ($p < 0.05$ 、スチューデント t-検定) と比べると有意差が見られた。

【図 4 A-G】ALS に関連する SOD1 変異体は、向上した酸化還元非感受性、Rac1 との結合および Rac1-GTP 加水分解を抑制するための向上した能力を示し、エンドソーム NADPH 依存性の

20

【化 9 9】

$\cdot\text{O}_2$

生成を活性化する。A) 精製され、細菌で発現された SOD1 タンパク質のクーマシー染色された SDS-PAGE。ウシ SOD1 を基準対照として使用した。これはヒト SOD1 よりも通常早く移動する (データ図示せず)。各 SOD1 タンパク質の Cu/Zn 含有量はゲルを下回る。B) 1:10 モル比 (Rac1:SOD1) で指示されたヒト SOD1 タンパク質 (wt、L8Q または G10V) が存在する場合における、精製された前還元の His タグ付き Rac1-GTP γ S の体外 IP。その後、Rac1/SOD1 複合体を、2つの部分に分割し、半分を、His タグの IP に先立って室温で 15 分間 X/XO 由来の ROS で処置した。X/XO 条件は、100 μ M の最終キサンチン濃度を有する 100m 単位のキサンチンオキシダーゼ酵素を含んだ。IP に続いて、SOD1 および Rac1 に対してウエスタンブロットを行った。SOD1 ブロットの長いおよび短い暴露は、SOD1 から Rac1 への各突然変異型の向上した結合を明らかにすることを示す。C) 未変性のウシ SOD1 または指示された細菌で発現および精製されたヒト SOD1 タンパク質 (wt、L8Q または G10V) を使用して、Rac1 GTP アーゼアッセイを行った。Rac1:SOD1 のモル比が示される。His タグ付き Rac1 を γ P32-GTP を前負荷した。各型の SOD1 の増加濃度が存在する場合において、 γ P32-GTP からの 32P i 遊離率がプロットされる。D) 単離された PMEF エンドソームによる NADPH 依存性の

30

40

【化 100】

$\cdot\text{O}_2$

産出の経時変化を、ヒト WT-SOD1 または L8Q-SOD1 が存在する場合または存在しない場合において測定した。パネル C および D の結果は、3つの実験の代表的なものである。E) Rac1 を G93A-SOD1 遺伝子導入マウスまたは対照同腹子の脳組織から免疫沈降 (immunoprecipitate: IP) し、その

50

後 S O D 1 および R a c 1 に対してウェスタンブロット法 (w e s t e r n b l o t t i n g : W B) を行った。F および G) G 9 3 A - S O D 1 または対照遺伝子導入同腹子の指定された年齢での、F) 脳および (G) 肝臓組織に由来する全内膜による N A D P H 依存性の

【化 1 0 1】



生成である (各実験点に対して $N = 3$) 。

【図 5 A - C】A) 未変性のウシ S O D 1 に対する S O D 1 活性ゲル (レーン 1)、脱メタル化されたウシ S O D 1 (レーン 2) および再メタル化されたウシ S O D 1 (レーン 3) 。ウシ S O D 1 の各型の Z n および C u 含有量は、タンパク質のモル毎の金属のモルにおいてゲルを上回る。B) H i s 沈殿と R a c 1、S O D 1 および C d c 4 2 に対するウェスタンブロット法とに先立って、 $300\text{ }\mu\text{M}$ D T T で前還元し、G T P γ S を前負荷し、その後ウシ S O D 1 とともにインキュベートした H i s - R a c 1 または H i s - C d c 4 2 の体外プルダウンアッセイ。C) R a c 1 ポリペプチドバックボーンの 3 次元構造の略画 (H i r s h b e r g e t a l . , 1997)。左パネルは、スイッチ I 領域 (青)、スイッチ I I 領域 (赤)、G 2 領域 (赤紫) および G 3 領域 (緑) を示す。右パネルは、スイッチ I、スイッチ I I、G 2 および G 3 領域に及ぶ、強力に S O D 1 (赤) を結合する最小 R a c 1 ペプチドを示す。

【図 6 A - B】S O D 1 は、R a c 1 の G T P 負荷に影響せず、R a c 1 G T P アーゼ活性に酵素的に活性でなければならない。A) H i s タグ付き R a c 1 を、S O D 1 が存在する場合または存在しない場合において、 35S -G T P γ S を負荷した。タンパク質をニトロセルロース膜に結合し、過剰な非結合放射性ヌクレオチドを洗浄して除去した。残存する (結合) 35S -G T P γ S を液体シンチレーション分光で定量化した。結果は、 $N = 3$ の独立した実験に対する平均 $\pm$ S E M を示す。B) 精製され、未変性の、脱メタル化または再メタル化されたウシ S O D 1 が存在する場合において、R a c 1 G T P アーゼアッセイを行った。H i s タグ付き R a c 1 を γ P 3 2 - G T P を前負荷した。 γ P 3 2 - G T P からの 32P i 遊離率はプロットされる。結果は 2 つの実験の代表的なものである。

【図 7】R a c を介する N o x 2 R O S 生成の S O D 1 媒介の調節に対する酸化還元センサモデル。還元条件下において、S O D 1 を R a c - G T P に結合し、内因性および G A P 媒介の G T P 加水分解を抑制することで R a c 活性化を安定化させる。増加した R a c - G T P レベルは、N o x 2 の活性化および

【化 1 0 2】



の生成をもたらす。N o x 2 複合体によって産出された

【化 1 0 3】



は、S O D 1 により、または自発的不均化を介して H_2O_2 に変換される。 H_2O_2 の局所濃度が上昇するため、R a c の酸化は S O D 1 の解離をもたらす。R a c - G T P ともはや結合しない S O D 1 では、R a c - G D P への加水分解がより早急に発生し、N o x 2 複合体の不活性化に繋がる。その後、R a c / N o x 2 が再活性化すると、S O D 1 は工程を繰り返すように再循環できる。この機構を通じて、S O D 1 は、R a c / N o x 2 複合体活性化の部位において R O S の局所濃度を検知でき、複合体の活性を制御できることを提案する。

【図 8】種々の指示された遺伝子型の回転棒の失敗までの時間。回転棒の失敗後、通常 1 週間以内に死亡する。動物は、あおむけに置かれた後 20 秒間以内に直立できなかった場合に、臨床的に死亡および安楽死したと見なされる。

【図 9】指示された遺伝子型の同年齢の同胞の脊髄中の運動ニューロン。各グループには 3 匹の動物があり、動物は、A L S + / N o x 2 + / + グループの臨床死時に安楽死した。これは約 1 2 5 ~ 1 3 5 日の範囲で、4 つの遺伝子型それぞれからの 1 匹のマウスは同日に採取された。

【図 1 0】S O D 1 は体外 G T P および G D P を結合する。A) S³⁵ 放射性標識 G T P γ S は、異なる濃度の塩化マグネシウム (M g C l₂) を用いて、室温で 2 時間 S O D 1 とともにインキュベートした。結合反応物は、S D S 含有緩衝液内で 5 分間沸騰させて中止した。試料を S D S - P A G E で走行させ、その後ニトロセルロース膜に移動した。オートラジオグラフィーを使用して、S O D 1 と結合した放射性標識ヌクレオチドを示した。B) S O D 1 グアニンヌクレオチド結合 (G T P および G D P が示される) の表面プラズモン共鳴 (s u r f a c e p l a s m o n r e s o n a n c e : S P R) 分析。S P R チップ表面をウシ S O D 1 タンパク質で被覆する。G T P または G D P (5 m M) を含有する試料は表面を流れ、ヌクレオチドタンパク質結合キネティクスは監視される。

【図 1 1】S O D 1 における保存グアニンヌクレオチド結合モチーフ。カンジダアルビカンスからホモサピエンスまでの異なる生物からの S O D 1 の配列が配置される。グアニンヌクレオチドを結合する保存された潜在配列を標識化する。S O D 1 上の配列は、1 つのみのアミノ酸でグアニンヌクレオチドにおけるグアニジンカ輪結合モチーフのコンセンサス N / T K x D から逸脱する。また、S O D 1 上の配列 G D N x x G C T も保存され、1 つのアミノ酸でリン酸塩結合ループコンセンサス G x x x x G K T / S から逸脱する。両モチーフは、S O D 1 結晶構造および利用可能な溶質の表面に露出する。

【図 1 2 A - B】R a c 1、R a c 2、R h o A および C d c 4 2 配列間の比較と R a c 1 および R h o A の S O D 1 への異なる結合。A) R a c 2、R h o A および C d c 4 2 と比較した、R a c 1 上の S O D 1 結合領域のアミノ酸配列アラインメント。R a c 2 は、S O D 1 結合領域の R a c 1 と比べて 9 7 % より高い同一のアミノ酸配列を有する。一方、R h o A は、7 7 . 7 % の同一配列を有し、C d c 4 2 はその領域で R a c 1 と 7 5 % の同一配列を有する。B) R a c 1、R h o A または C d c 4 2 を電磁ビーズ上で固定化し、その後、グアニンヌクレオチド (標識化したように) を負荷し、または負荷せずに、S O D 1 に結合した。非結合タンパク質の洗浄後、試料を S D S - P A G E 上で分離し、S O D 1 に対して免疫ブロット法を行った。R a c 1 は、G D P β S 結合状態でのみ S O D 1 を結合し、一方、C d c 4 2 は負荷したヌクレオチドにかかわらず、S O D 1 を結合しなかった。その一方、R h o A は、G T P γ S 結合状態でのみ S O D 1 を結合した。

【図 1 2 C】ヒト R a c 1 のアミノ酸配列 (S E Q I D N O : 1)、ヒト R a c 2 (S E Q I D N O : 3)、ヒト R h o A (S E Q I D N O : 4 および 5)、ヒト S O D 1 (S E Q I D N O : 6)、ヒト S O D 2 (S E Q I D N O : 7)、およびヒト a l s i n (S E Q I D N O : 8)。

【図 1 3】S O D 1 - G 9 3 A マウスの生存に関する N o x 1 および N o x 2 遺伝子ノックアウト (K O) の比較。A) N o x 1 を欠く A L S マウス (N = 6) は、その N o x 1 含有同腹子 (1 2 7 日、N = 8) よりも長く生存した (1 6 3 日)。* * p < 0 . 0 0 3 9。B) N o x 2 K O 背景での A L S マウスの生存は、N o x 1 K O 背景での生存よりもさらに顕著だった。

【図 1 4】S O D 1 - G 9 3 A マウスにおける生存および疾患進行のアポシニン (3 0 m g / K g) 効果。A) アポシニン処置 (1 8 5 日) マウス (* * * p < 0 . 0 0 0 1) と比較した、無処置 (1 2 5 日) での生存の可能性。B) アポシニン処置マウスと比較した未処置での歩行分析。1 1 4 日齢で、未処置のマウスは歩行障害を呈示し、一方、アポシニン処置マウスは正常歩行であった。C) アポシニン処置 (1 5 6 . 5 日、n = 6) マウスと比較した、未処置 (1 1 7 . 5 日、n = 2 0) での後肢衰弱の初観察によって判断される発病開始の平均年齢。D) 生存指標は、発病開始から臨床死までの時間であり、疾患進行のマーカである。疾患進行は、アポシニン処置マウス (3 2 日、n = 6) の方が未処置のマウス (1 1 日、n = 2 0) よりも遅かった。

10

20

30

40

50

【図15】野生型 (wild type: WT) SOD1ではないSOD1変異体の発現は、細胞Nox活性の活性化をもたらす。A) WT-SOD1またはG93A-SOD1を過剰に発現する非遺伝子導入または遺伝子導入マウスの脳、脊髄および肝臓からの全内膜におけるNADPH依存性のスーパーオキシド生成 (各グループにおいてN=3動物)。B) WT-SOD1またはG93A-SOD1を過剰に発現する120日の非遺伝子導入または遺伝子導入マウスからの腰髄切片におけるスーパーオキシドのジヒドロエチジウム (Dihydroethidium: DHE) 蛍光検出。DAPI染色は、下部パネルにおいて核を画定する。C、D) スーパーオキシド生成の尺度 (C) または、細胞死の尺度としてのトリパンブルー排除であり、(D) LacZ、WT-SOD1または指示された変異体SOD1を発現させるアデノウイルスベクターに感染したSH-SY (神経細胞) またはMO59J (グリア) 細胞におけるもの。E) 指示されたアデノウイルスベクターに感染し、その後アポシニン (100 μ M) を用いて、または用いず72時間処置した後のSH-SYまたはMO59J細胞におけるスーパーオキシド生成および細胞死の割合。F) 120日齢の非遺伝子導入 (対照) またはG93A-SOD1遺伝子導入マウスからの脊髄細胞可溶化物を使用し、GST-Pak1との関連によって判断されたRac-GTP活性化。対照は、Pak1プルダウンアッセイに先立って、GTP γ S (+) またはGDP β S (-) とともにインキュベートされた対照マウスからの溶解物を含む。

10

【図16】半接合体のG93A-SOD1遺伝子導入マウスのALS脳および脊髄組織のNADPH依存性スーパーオキシド生成の増加。スーパーオキシド生成は、DPI (10 μ M) で抑制されたが、ロテノン (100 μ M) では抑制されず、Noxが向上したROS生成に参与することを示す。

20

【図17】NADPHオキシダーゼ阻害剤アポシニンでの処置は、G93A-SOD1導入遺伝子に対して半接合体であるマウスにおいて、寿命を増加させ、疾患進行を遅らせる。A) 14日齢から開始する、水中の異なる投与量のアポシニンで処置したマウスの生存曲線。各処置グループのマウスの数 (N) は、日数のメディアン生存時間とともに示される。B) アポシニンの各一定投与量に対する雄性および雌性マウスの生存データ。抗生物質を使用して眼感染症の処置を受けたマウスを四角形でマークする。処置に失敗および眼感染症により死亡したマウスは、四角形内にX印を付ける。円形は、眼感染症に一度もかからなかった動物を表す。各グループにおけるマウスの数 (N) は、各投与量のアポシニンに対する平均生存日数を上回る。C) 発病開始の年齢 (1週間の間に5%の体重減少で判断) とアポシニン投与量との関係。D) 生存指標は、各一定量のアポシニンに対し、発病開始から動物が臨床死に至るまでの時間として測定した。E) 分析前に5日間アポシニン (300 mg/kg) で処置または処置されていない、最終段階G93A-SOD1遺伝子導入マウス (約120日齢) からの腰髄の全膜において、NADPH依存性のスーパーオキシド生成を測定した (各グループにおいてN=5)。F) 同一のマウスの腰髄におけるジヒドロエチジウム蛍光を (E) に示す。

30

【図18】出生後異なる年齢における、アポシニン (300 mg/kg) を用いた半接合体のG93A-SOD1遺伝子導入マウスの処置。14、60および80日齢で、飲料水にアポシニンを加えたマウスの生存時間 (各グループに対してN=6)。すべてのマウスは、3匹の導入遺伝子陰性同胞雌と1匹のG93A-SOD1半接合体の雄から派生した。各雌からの2匹の連続同腹仔を分析した。

40

【図19】異なる濃度のアポシニンを用いたG93A-SOD1遺伝子導入マウスの処置および120日目の腰髄における運動ニューロンの数。

【図 1 A】

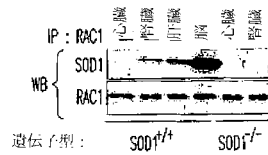


図 1 A

【図 1 B】

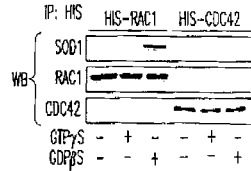


図 1 B

【図 1 C】

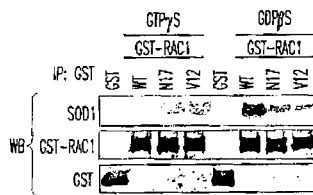


図 1 C

【図 1 D】

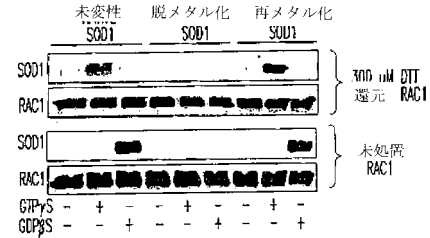


図 1 D

【図 1 E】

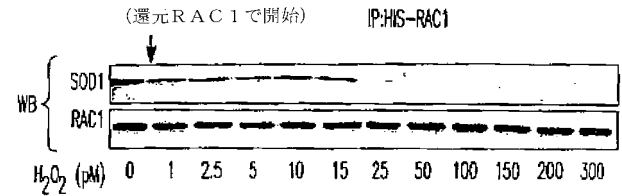


図 1 E

【図 1 F】

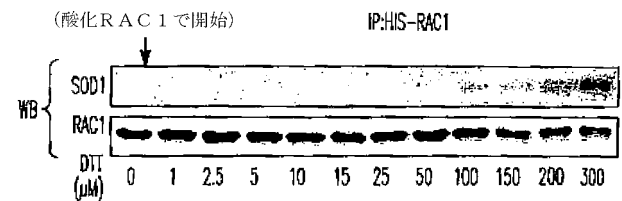


図 1 F

【図 2 A】

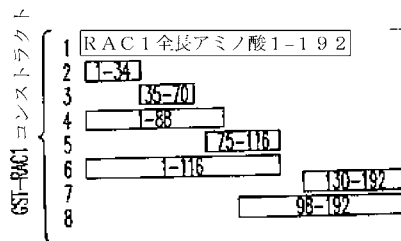


図 2 A

【図 2 D】

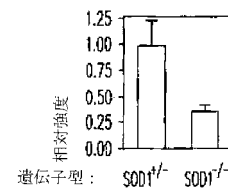


図 2 D

【図 2 B】

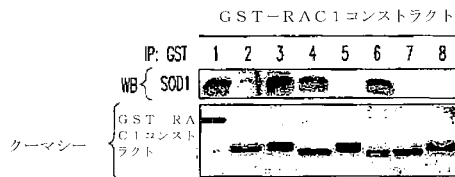


図 2 B

【図 2 C】

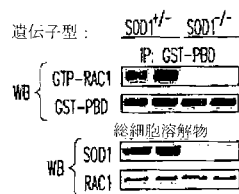


図 2 C

【図 2 E】

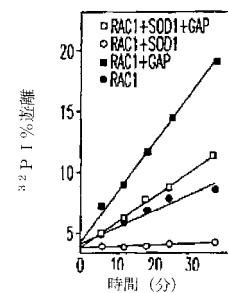


図 2 E

【図 2 F】

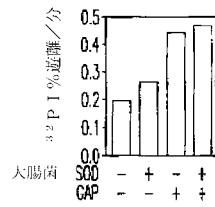


図 2 F

【図 2 G】

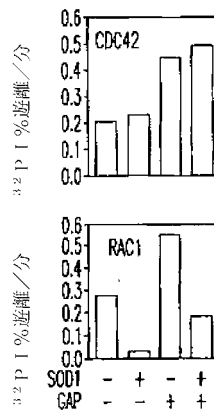


図 2 G

【図 2 H】

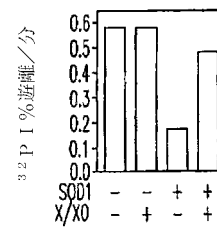


図 2 H

【図 2 I】

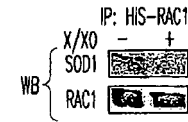


図 2 I

【図 3 A】

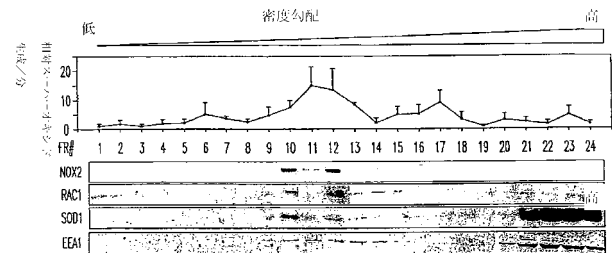


図 3 A

【図 3 B】

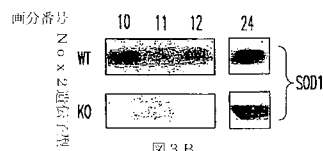


図 3 B

【図 3 E】

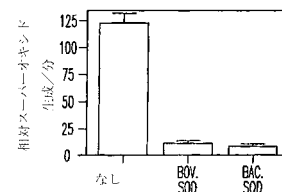


図 3 E

【図 3 C】

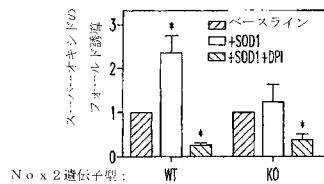


図 3 C

【図 3 F】

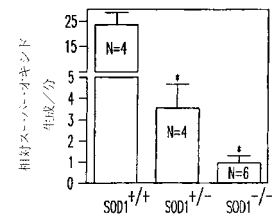


図 3 F

【図 3 D】

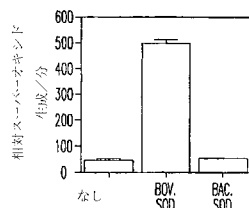


図 3 D

【図 4 A】

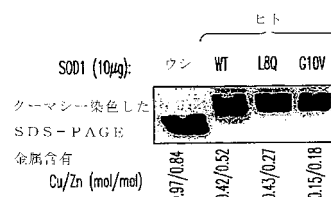
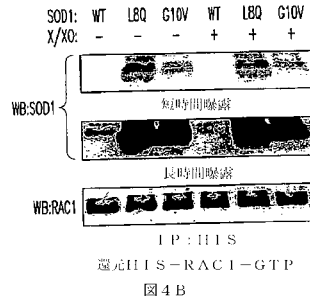
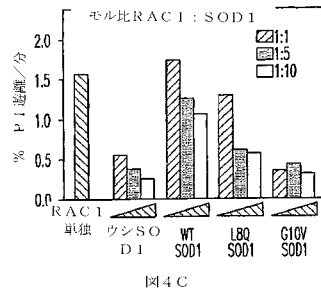


図 4 A

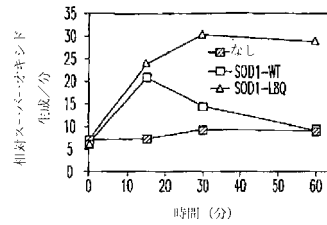
【図 4 B】



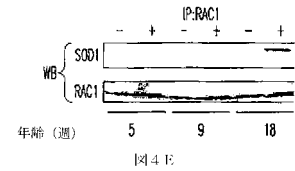
【図 4 C】



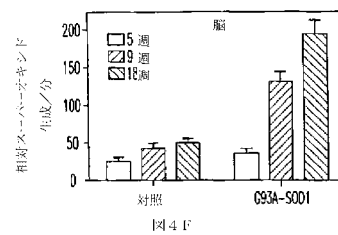
【図 4 D】



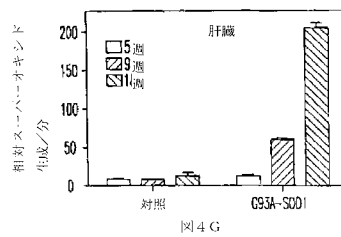
【図 4 E】



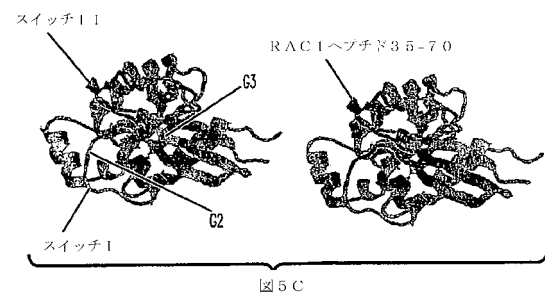
【図 4 F】



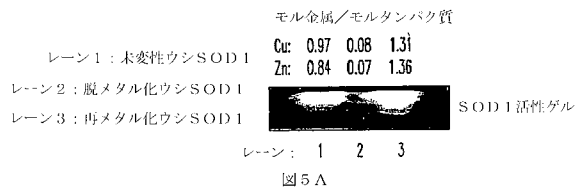
【図 4 G】



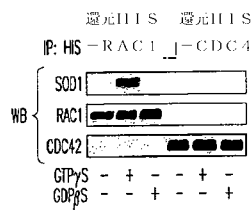
【図 5 C】



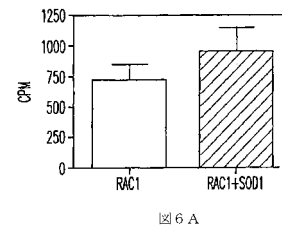
【図 5 A】



【図 5 B】



【図 6 A】



【図 6 B】

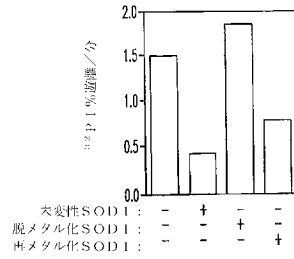


図 6 B

【図 7】

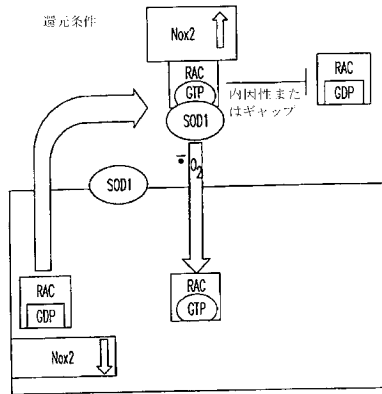


図 7

【図 8 A】

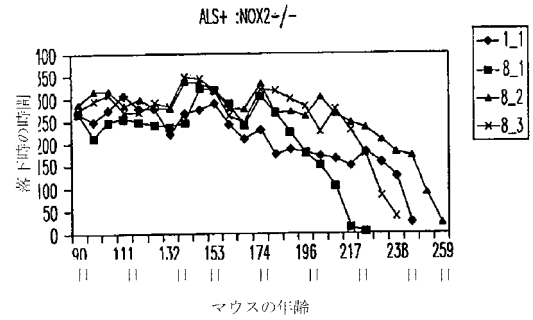


図 8 A

【図 8 B】

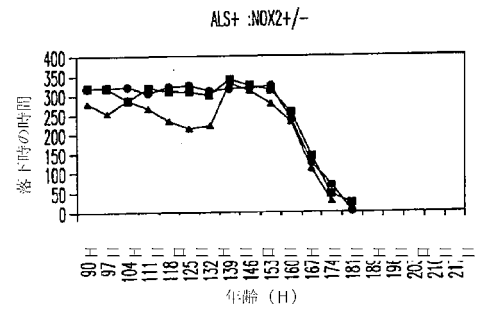


図 8 B

【図 8 C】

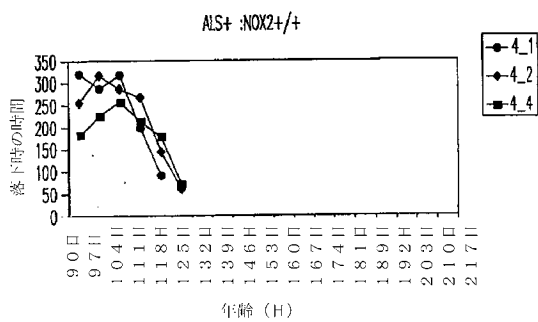


図 8 C

【図 9】

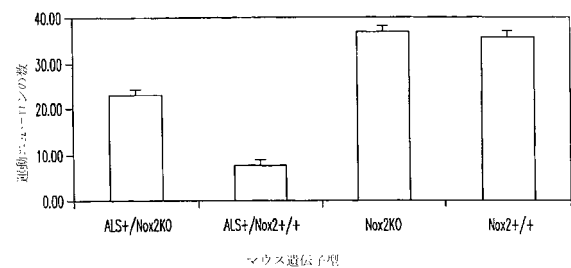


図 9

【図 8 D】

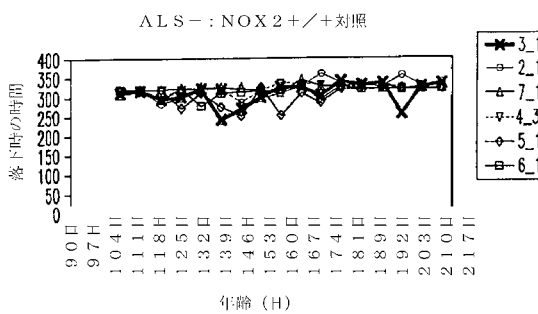


図 8 D

【図 10 A】

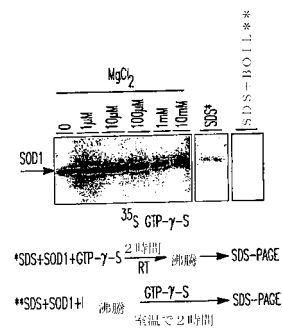
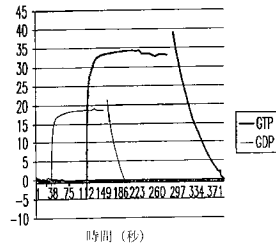


図 10 A

【 図 1 0 B 】



☒ 10 B

【 図 1 1 】

[illegible]

【図 1 2 A】

RAC1	T	V	F	D	N	Y	S	A	N	V	M	V	D	G	K	F	V	N	L	G	L	W	D	T	A	G	Q	E	Y	D	R	L	R	P	L
RAC2	T	V	F	D	N	Y	S	A	N	V	M	V	D	S	K	F	V	N	L	G	L	W	D	T	A	G	Q	E	Y	D	R	L	R	P	L
RHOA	T	V	F	E	N	Y	A	D	I	E	V	D	G	K	Q	V	E	L	A	L	W	D	T	A	G	Q	E	Y	D	R	L	R	P	L	
CDC42	T	V	F	D	N	Y	A	V	T	V	N	I	G	G	E	P	T	L	G	L	F	D	T	A	G	Q	E	Y	D	R	L	R	P	L	

图 1 2A

【図 1 2 B】

IP:	RAC1			RHOA			CDC42		
WB: SOD1									
GTPγS	-	+	-	-	+	-	-	+	-
GDPβS	-	-	+	-	-	+	-	-	+

[※] 1 2 B

【図 1 2 C A】

1	WQAKQVWG	DGAVGTCLL	ISYTNAPFC	EYPTVFDNY	SANWVQXKP	VNLGKWTAG
61	QEDYDRLRL	SYPTDVFJL	QSLVSPASF	ENWRKKNPFE	VRHHCPNPTI	ILVGTKLDR
121	DDKDTIEKLK	EKKLAPITYP	QGLAMAKEIG	AWNYLECSAL	TQRLGKTVFD	EARAVLCPP
181	PWKQRKRKCL	LL	(SEQ ID NO: 1)			
1	WQAKQVWG	DGAVGTCLL	ISYTNAPFC	EYPTVFDNY	SANWVQXKP	VNLGKWTAG
61	QEDYDRLRL	SYPTDVFJL	QSLVSPASY	ENWRKKNPFE	VRHHCPNPTI	ILVGTKLDR
121	DDKDTIEKLK	EKKLAPITYP	QGLAKEED	SNKYLECSAL	TQRLGKTVFD	EARAVLCPP
181	PTIRQQRKACS	LL	(SEQ ID NO: 3)			
1	MAAIRKKLM	VGDGAGCKTC	LLVFSKQDF	PEYVYPTVFE	NYVADIEVDC	KQVELALNWT
61	AGQEDYDRLR	PLSYPTDVI	LMCFSDSPD	SLENPEKWT	PEVKHFCPW	PIILVGNKKD
121	LRNDEHTRRE	LAKMKQEPVK	PEEGROMANR	KAFYMECS	AKTKDGWREV	FEMATRAALQ
181	ARRGKKKSGC	LVL	(SEQ ID NO: 4)			
1	MAAIRKKLM	VGDGAGCKTC	LLVFSKQDF	PEYVYPTVFE	NYVADIEVDC	KQVELALNWT
61	AGQEDYDRLR	PLSYPTDVI	LMCFSDSPD	SLENPEKWT	PEVKHFCPW	PIILVGNKKD
121	LRNDEHTRRE	LAKMKQEPVK	PEEGROMANR	KAFYMECS	AKTKDGWREV	FEMATRAALQ
181	ARRGKKKSGC	LVL	(SEQ ID NO: 5)			
1	WATKAVCYLK	GDGPVQGIN	FEQKESNGPV	KWVSGSKGLT	EGLGHFVHDE	FCDTGTAGTS
61	AGPHFNLPSR	XHGSGPKDEE	HVGLGNVTA	DKDGDVADSI	EDSVSLSGD	HCLGRITLW
121	HEKADDLGKG	ONEESTKIGN	AGSLRACMI	QMK	(SEQ ID NO: 6)	
1	MLSRVQVGS	RQLAPYLGL	GSRQKHSLPD	LPYDGALEP	HINAGIMQLH	HSKHHAAAYN
61	NLWVTEEKYQ	EALAKGDVTA	QALQPALMF	NGGCHINHSI	FATNLSPNCG	CEPKGELLEA
121	IKRDFSFDFK	FKEKLTAASY	GVGSGGWGL	GFNKERGHQLQ	IWNCNPDPL	OGTGLUPLL
181	GDGDEHAYY	LOYKNRNPYD	LKANNMNVW	ENFTERYAAC	KK	(SEQ ID NO: 7)

图 12 CA

【図 1 2 C B】

1	MDSKKRSSTE	AEGSKERGLV	HWQAGSFPI	TPERLPQWGG	KTVLQALGV	KHGVLLTDC
61	EYVSFGILPW	RSQPEVCPS	SPILENALVG	QYMTVATGS	FHSGAVTDNG	VAYMGENSA
121	GQCAVANOQY	VPENPVVIA	DSEAPLLAV	RILQACGEE	HTLALSIRE	HWNGTCCQL
181	GLITTAFFVT	KPKQKVEHAG	RVLQVACGA	FHSLALVQCL	PSQDLKVPPE	RQNCQSLLI
241	TMTDKEDHWI	ISDSHCCPLG	VLTESQAEI	HASTALPST	ETLDRQEEVF	ENTLYANDQS
301	VATELNAVSA	QITSSDAMSS	QQNVAGTTEI	SSARNIPSP	DTQAVNEYLR	KLSDHVSRED
361	SEHGEKPVPS	QPLLEAIPN	LHSPPTTST	ALNSLWSCA	SAVGVRVAAT	YEAGALSLLK
421	VANFYSTIPC	ETGAQAGSSA	IGPEGLKDSR	EEQVKQESMQ	GKSSSLVDI	REEETECCSR
481	RLSLPGLLSQ	VSPRLLRKAA	RVKTRTWT	PTYSCEADAL	LPSLRTEVWT	WGKKEGQQLG
541	HGDVLPRLQP	LCVKCLDGKE	VHLEAGGYH	SLALTAKSQV	YSNGSNFTQG	LGHSDPFTTV
601	PRLAKISSEN	GVWSIAAGRD	YSLFLVDIED	FQPGLYSGR	QDPTGDNLP	ENHSGSKTPV
661	LLSCSKLGYI	SRVTAGKDSY	LALVDKNIMG	YASLHELAT	TERRFYSKLS	DIKSILRPL
721	LSLENLGTIT	TVQLLQEVAS	RFSKLCYLIG	QHGASLSFL	HGVKEARSLV	ILKHSLSFLD
781	SYTEYCTSI	NFLVMGGFQL	LAKPAIDFLN	KNQELLQDLS	EVNDENTQLM	EILNTLFFLP
841	IRRLHINYAKV	LUKLATCFEV	ASPEYQKLQD	SSSCYECIAL	HLGRKRKEAE	YTLGFNKTTP
901	GKMTDSLRKP	BRRLCESSN	RALSQIAGHR	FSVNWIFLN	DALVHAQFST	HNWFLPLTLW
961	AELPSEEGAG	VNGLKITPPE	EQFTLISSTP	QEKTKWLRAI	SQAVDQALRG	MSDLPYPYCSG
1021	SSVQRQEPPI	SRSACYTFYK	DPRUKDAIYD	GRWLSGKPHG	RGVLKWPIDGK	MYSGMFRNGL
1081	EDGYGEYRIP	NKAMNKEDHY	VGHMKCKMNC	GGGYVSASG	EVFEGCFQDN	WRHGHGLIRS
1141	GKLTSSSPSM	FIGQWMDKK	AGYGVDDIT	RGEKYMGMGW	DDVQCGNGWV	VTFQGLYYEG
1201	NFHUNKMGMN	GVLSEDOTI	YEGEFSDDWT	LSGKGTILMP	NGDYIEGYFS	GENGSGKTI
1261	GTFFKPSLYE	SDKDRPKVFR	KLGALAVPAD	EKWKAVFDEC	WRQLGCEGPG	QGEVAKAWDN
1321	IWALTSSRR	QHRDSPEILS	RSQDTLES	EFIPQHWCAF	SVEKYDORIK	YUKACDTPL
1381	HPLGRIVETL	VAVYRMTYVG	VGANRRLLQE	AWKEKSYLK	RIFQLVRFLF	PELPEEGSTI
1441	PLSAPLPTER	KSFCTGKSDS	RSESPEPGYV	VTSGLLLPV	LLPRLYPPLF	MLYALNDRE
1501	EDYWEVCLUR	LAKQPDIAL	GFLGVRKRFW	PATLSILGES	KKVLPTTKDA	CFASAVECLO
1561	QISTTFPSD	KLKMQQITE	EQSQVLAAL	HEDFLWSMD	LTPVFLYWL	RARIRNLGSE
1621	VHLIEDLMDP	YLQHGEQGM	FTLKACYIQ	IQREKLN	(SEQ ID NO: 8)	

図 1 2 C B

【図 1 3 A】

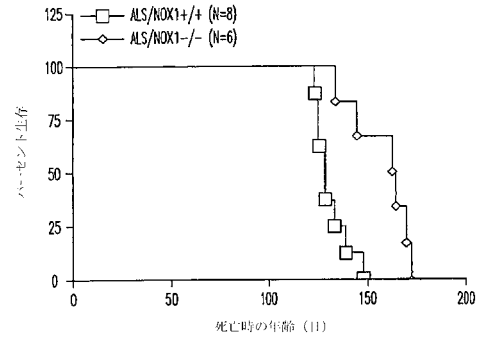


図 1 3 A

【図 1 3 B】

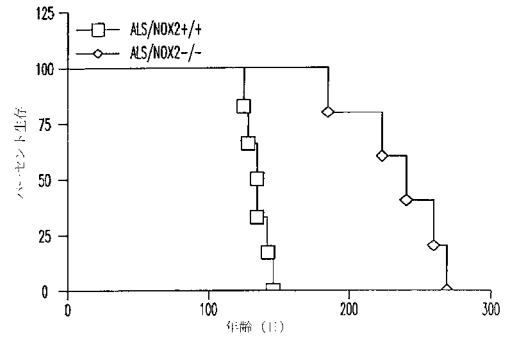


図 1 3 B

【図 1 4 A】

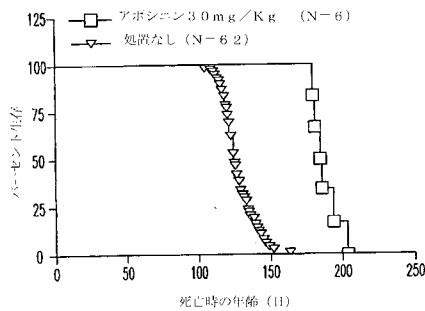


図 1 4 A

【図 1 4 C】

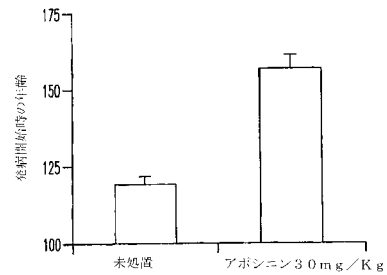


図 1 4 C

【図 1 4 B】

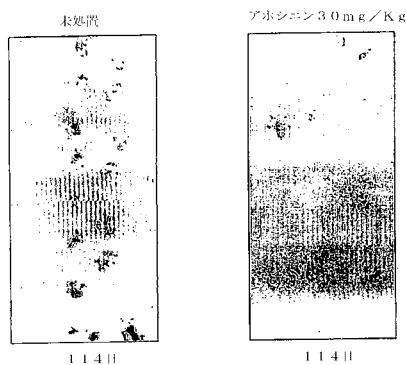


図 1 4 B

【図 1 4 D】

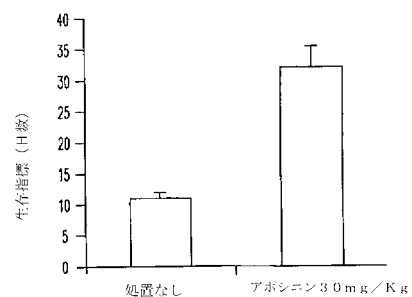
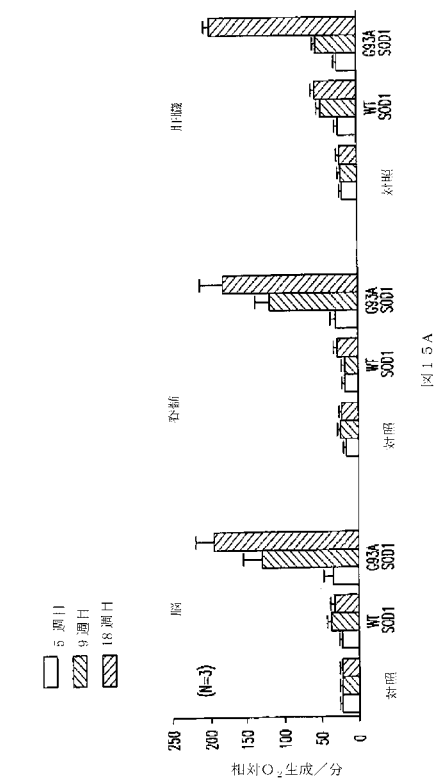
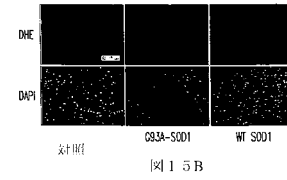


図 1 4 D

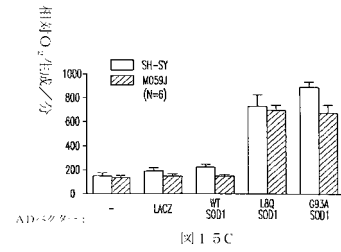
【図 1 5 A】



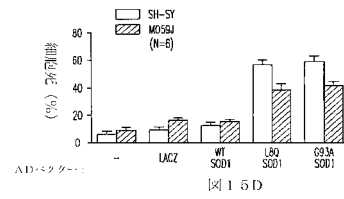
【図 1 5 B】



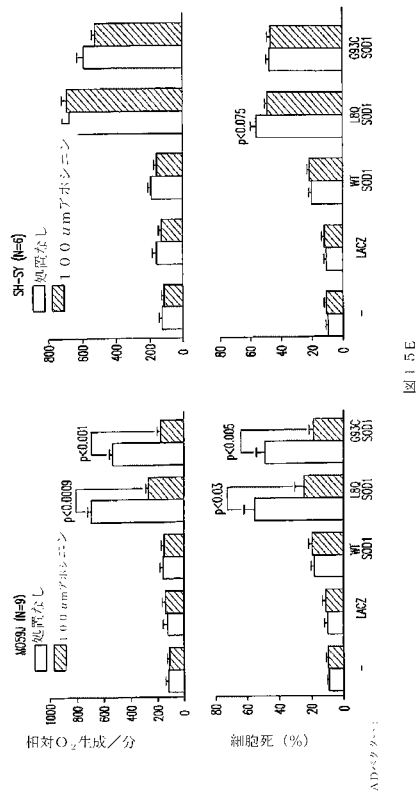
【図 1 5 C】



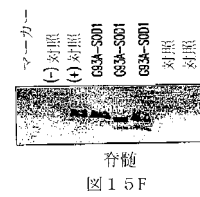
【図 1 5 D】



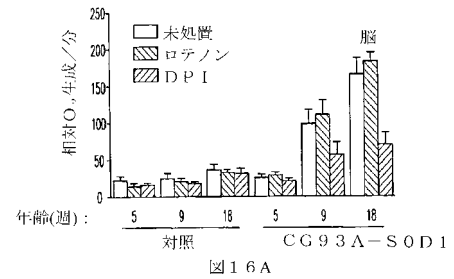
【図 1 5 E】



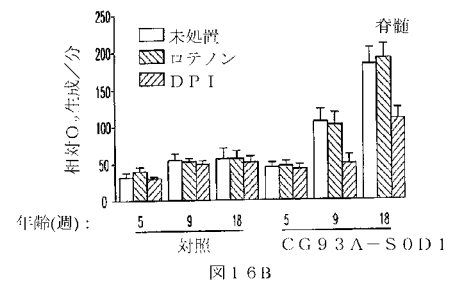
【図 1 5 F】



【図 1 6 A】



【図 1 6 B】



【図 17 A】

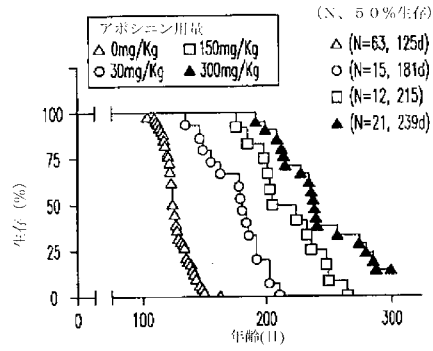


図 17 A

【図 17 C】

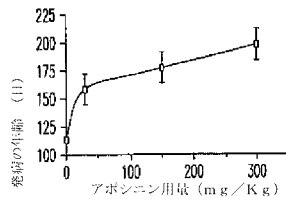


図 17 C

【図 17 D】

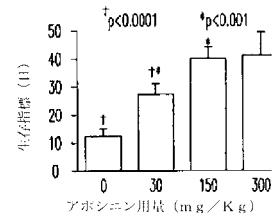


図 17 D

【図 17 E】

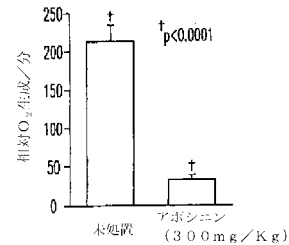


図 17 E

【図 17 F】

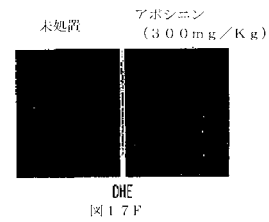


図 17 F

【図 18】

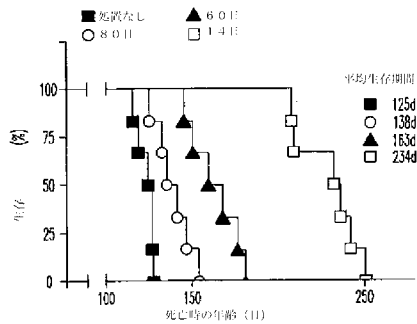


図 18

【図 19】

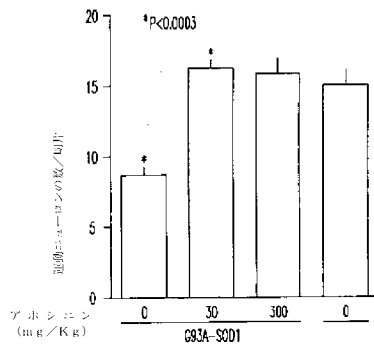


図 19

【図 1 7 B】

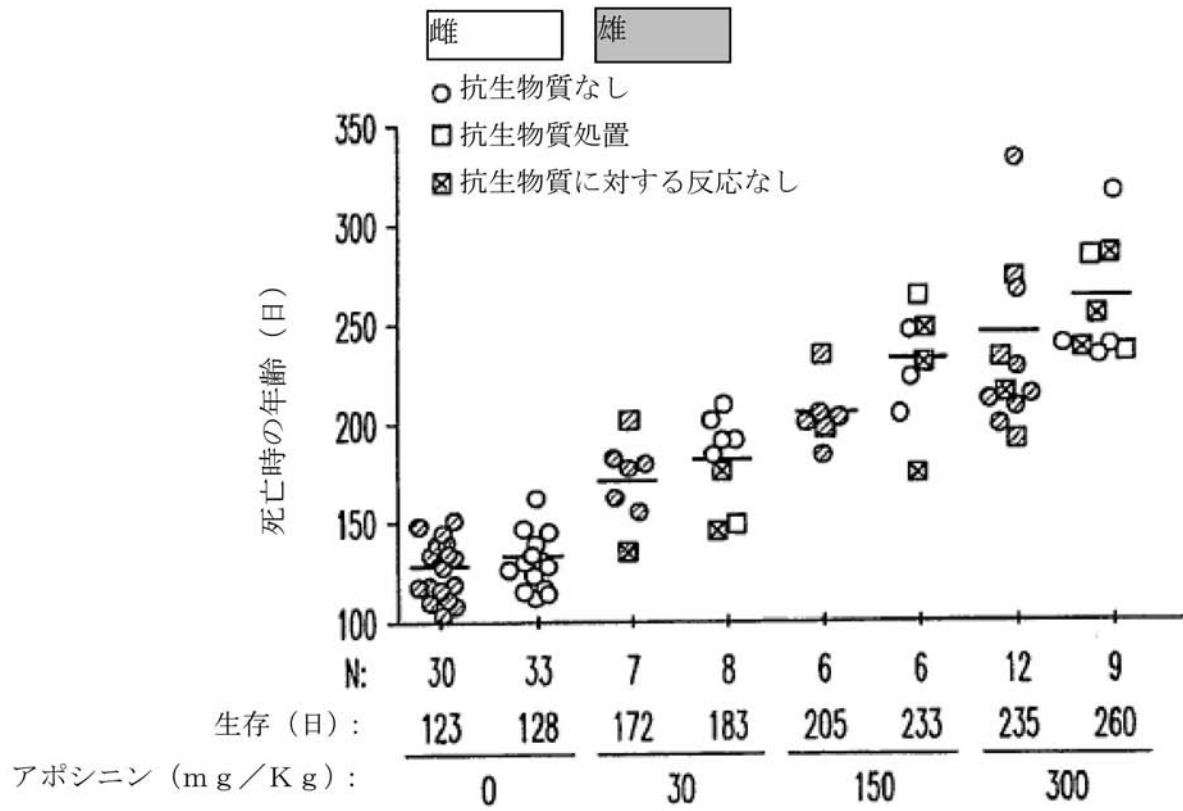


図 1 7 B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/049424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 A61K31/00 A61K31/085 A61K31/09		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPENDEX, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FURST ROBERT ET AL: "Atrial natriuretic peptide induces mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human endothelial cells via Rac1 and NAD(P)H oxidase/Nox2-activation" CIRCULATION RESEARCH, vol. 96, no. 1, 7 January 2005 (2005-01-07), pages 43-53, XP002450607 ISSN: 0009-7330 Relevant for non unity abstract figure 3 ----- -/--	1
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 November 2007		26/11/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer VAN DER KOOIJ, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/049424

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TOUYZ RHIAN M ET AL: "Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: Regulation by angiotensin II" CIRCULATION RESEARCH, vol. 90, no. 11, 14 June 2002 (2002-06-14), pages 1205-1213, XP002450608 ISSN: 0009-7330 Relevant for non unity abstract figure 8	1
X	WO 03/006990 A (EXELIXIS INC [US]; FRIEDMAN LORI [US]; PLOWMAN GREGORY D [US]; BELVIN) 23 January 2003 (2003-01-23) page 76 - page 77; sequence 38	30-32
X	US 2002/137017 A1 (ARONHEIM AMI [IL]) 26 September 2002 (2002-09-26) sequence 24	30-35
X	US 6 083 713 A (MANLY SUSAN P [US] ET AL) 4 July 2000 (2000-07-04) column 30, line 20 - line 51 column 31, line 7 - line 19	36-40
A	WO 2005/119251 A (UNIV GENEVE [CH]; KRAUSE KARL-HEINZ [CH]; BANFI BOTOND [US]) 15 December 2005 (2005-12-15) claims 1-3,6-9,14	1-40
A	WO 03/087399 A (BIOVITRUM AB [SE]; GROENBERG ALVAR [SE]; WIKSTROEM PER [SE]) 23 October 2003 (2003-10-23) claims 1,2,5,8 page 8, line 26 - line 28 page 8, line 29 - page 9, line 19 page 10, line 13 - line 16	1-40
X	WU D ET AL: "NADPH - oxidase in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis." SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACT VIEWER AND ITINERARY PLANNER, vol. 2003, 2003, pages Abstract No. 528.13 URL-http://sf, XP008085727 & 33RD ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY OF NEUROSCIENCE; NEW ORLEANS, LA, USA; NOVEMBER 08-12, 2003 abstract	41,43

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/049424

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GAO HUI-MING ET AL: "Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease." THE FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY OCT 2003, vol. 17, no. 13, October 2003 (2003-10), pages 1954-1956, XP002458040 ISSN: 1530-6860 abstract conclusions and significance	41
X	GAO H-M ET AL: "Critical Role for Microglial NADPH Oxidase in Rotenone-Induced Degeneration of Dopaminergic Neurons" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 15, 16 July 2003 (2003-07-16), pages 6181-6187, XP003005597 ISSN: 0270-6474 abstract page 6183, column 2, paragraph 3 - page 6184, column 1, paragraph 1 figures 4,5 page 6185, column 2	41,42
A	VAN DEN WORM EDWIN ET AL: "Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 433, no. 2-3, 21 December 2001 (2001-12-21), pages 225-230, XP002458041 ISSN: 0014-2999 abstract table 1 page 228, column 2, paragraph 5	41-50
A	US 2004/235947 A1 (PAQUIN JOANNE [CA] ET AL) 25 November 2004 (2004-11-25) paragraphs [0010], [0016]	41-50
A	WO 2004/064844 A (NEUROTECH CO LTD [KR]; GWAG BYOUNG-JOO [KR]; YOON SUNG-HWA [KR]; KIM S) 5 August 2004 (2004-08-05) claims 1,2,9	41-50

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/049424

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2006/009975 A (MAXIM PHARM INC [US]; GEHLSSEN KURT R [US]) 26 January 2006 (2006-01-26) example 6 claims 1,2,4-7	41-50
P,X	WU DU-CHU ET AL: "The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 8 AUG 2006, vol. 103, no. 32, 8 August 2006 (2006-08-08), pages 12132-12137, XP002458042 ISSN: 0027-8424 the whole document	41

International Application No. PCT/US2006/049424

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 41-50 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 29 and 41-50 (partially)

The present claim 29 encompasses compounds defined only by their desired function, i.e. compounds that inhibit the binding of as GTPase to SOD (see claim 1), contrary to the requirements of clarity of Article 6 PCT, because the result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed, except for the compounds disclosed in the description, namely the compounds according to formula (I). However, nowhere in the description or in the examples is indicated that said compounds truly inhibit GTPase-SOD binding. Only general references to NADPH oxidase inhibition or Nox inhibition are given (see page 5, lines 12-13 and lines 18-25 and see examples)

Undue experimentation would be required to screen compounds randomly. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that no search can be performed

Present claim 41 and 43-50 relate to compounds which has a given desired property or effect, namely "an NADPH oxidase inhibiting activity" (claims 41, 43-45, 47 and 49-50) or "an inhibiting activity on the binding of SOD to a GTPase" (claim 46) or "p47phox inhibiting activity" (claim 48). The description does not provide support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT for any such compound having the said property or effect and there is no common general knowledge of this kind available to the person skilled in the art. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of the claim (PCT Guidelines 9.19 and 9.20).

In addition, the present claim 42 relates to an extremely large number of possible compounds. Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however for only a very small proportion of the compounds claimed, see page 44 referring to formula (Ia) and in particular page 46 referring to compound according to formula (II) and page 47 referring to the specified compounds on that page. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claim 42 (PCT Guidelines 9.19 and 9.23).

The search of claim 41-50 was consequently restricted to the

International Application No. PCT/US2006 /049424

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

specifically disclosed compounds having the desired property or effect, see description page 44 referring to formula (Ia) and in particular page 46 referring to compound according to formula (II) and page 47 referring to the specified compounds on that page, and to the broad concept of a having the desired property or effect.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/049424

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 41-50 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 29 and 41-50 (partially)
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006 /049424

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-40

Method of screening for compounds that interferes with the GTPase-SOD interaction. An isolated peptide having 90% identity with SEQ.ID.No:1 which binds SOD. Kit comprising fusion protein comprising a GTPase having a SOD binding region or a fusion protein comprising SOD having a GTPase binding region or combinations thereof.

2. claims: 41-50

Method of treating or preventing a neuronal degenerative disease comprising administering an inhibitor of NADPH oxidase.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/049424

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03006990	A	23-01-2003	CA 2453871 A1 EP 1412746 A1 JP 2004534955 T WO 03006614 A2 WO 03006991 A1	23-01-2003 28-04-2004 18-11-2004 23-01-2003 23-01-2003
US 2002137017	A1	26-09-2002	AU 4927499 A DE 69918123 D1 DE 69918123 T2 EP 1098967 A2 WO 0005410 A2	14-02-2000 22-07-2004 20-01-2005 16-05-2001 03-02-2000
US 6083713	A	04-07-2000	AT 252636 T CA 2143325 A1 DE 69333261 D1 DE 69333261 T2 EP 0659217 A1 ES 2208643 T3 FI 950883 A HU 70456 A2 JP 8500491 T NZ 256188 A	15-11-2003 17-03-1994 27-11-2003 05-08-2004 28-06-1995 16-06-2004 28-04-1995 30-10-1995 23-01-1996 29-01-1997
WO 2005119251	A	15-12-2005	EP 1602926 A1	07-12-2005
WO 03087399	A	23-10-2003	AU 2003224549 A1 EP 1499742 A1 JP 2005523004 T	27-10-2003 26-01-2005 04-08-2005
US 2004235947	A1	25-11-2004	NONE	
WO 2004064844	A	05-08-2004	AU 2004206187 A1 CA 2518888 A1 EP 1592429 A1	05-08-2004 05-08-2004 09-11-2005
WO 2006009975	A	26-01-2006	NONE	

フロントページの続き

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

(72)発明者 ゾウ, ウエイホング

アメリカ合衆国アイオワ州 5 2 2 4 6 - 2 8 3 7 アイオワシテイ・キラニーロード 3 4 1 4

(72)発明者 ハーラズ, マジエド・エム

アメリカ合衆国アイオワ州 5 2 2 4 6 - 2 6 1 1 アイオワシテイ・ホーキードライブ 4 5 6

(72)発明者 マーデン, ジェニファー・ジェイ

アメリカ合衆国アイオワ州 5 2 2 4 6 - 3 4 1 2 アイオワシテイ・アパートメント 1 2・オークク
レストストリート 8 0 1

Fターム(参考) 2G045 AA29 AA40 BB01 CB01 CB17 CB20 DA20 FB01 FB03 FB07

FB12

4B063 QA05 QQ27 QQ33 QQ79 QQ91 QR07 QR13 QR48 QS15 QS26

QX01

4H045 AA10 AA30 BA10 BA18 BA41 CA40 DA83 EA50 FA20