



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117279657 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 22

(21) 申请号 202280033165.1

水岛彻 田中健一郎

(22) 申请日 2022.05.17

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

(30) 优先权数据

2021-083610 2021.05.18 JP

专利代理师 龙淳 王磊

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.06

(51) Int. Cl.

A61K 38/44 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/020473 2022.05.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/244757 JA 2022.11.24

(71) 申请人 日本株式会社LTT生物医药

地址 日本东京都

申请人 学校法人武藏野大学

(72) 发明人 乔志伟 本田爱美 秋元匠太

佐佐木友树 梶纪子 福田耕一郎

权利要求书3页 说明书20页

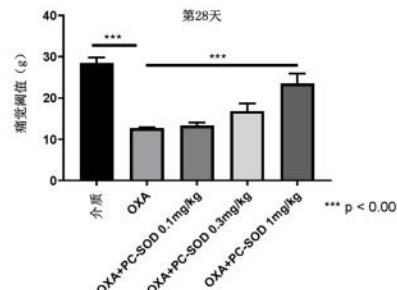
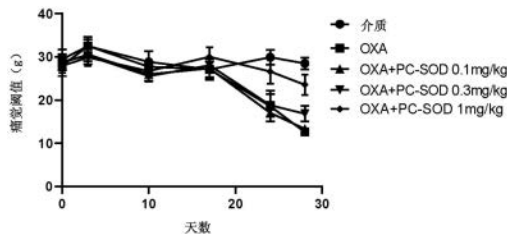
序列表1页 附图22页

(54) 发明名称

用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍的医药组合物

(57) 摘要

本发明提供一种用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍的医药组合物。本发明涉及一种用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍的医药组合物,该医药组合物包含卵磷脂化超氧化物歧化酶。



1. 一种医药组合物,其用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍,所述医药组合物的特征在于:

包含卵磷脂化超氧化物歧化酶。

2. 如权利要求1所述的医药组合物,其特征在於:

所述伴随抗癌剂给药的障碍为选自神经障碍、肝障碍、药物性耳聋、肾障碍、骨髓抑制和它们的1种以上的组合中的障碍。

3. 如权利要求2所述的医药组合物,其特征在於:

所述神经障碍为周围神经病变、神经病变、神经病理性疼痛、痛觉超敏、痛觉过敏或痛觉减退、或者温度觉障碍。

4. 如权利要求2所述的医药组合物,其特征在於:

所述神经障碍因神经纤维密度的减少、神经突的减少或消退、或者脊髓背根神经节(DRG)神经元的损伤而产生。

5. 如权利要求1所述的医药组合物,其特征在於:

所述伴随抗癌剂给药的障碍为化疗诱发性周围神经病变(CIPN)。

6. 如权利要求1或2所述的医药组合物,其特征在於:

所述伴随抗癌剂给药的障碍为肝障碍,所述抗癌剂为铂制剂。

7. 如权利要求1或2所述的医药组合物,其特征在於:

所述伴随抗癌剂给药的障碍为药物性耳聋,所述抗癌剂为铂制剂。

8. 如权利要求1或2所述的医药组合物,其特征在於:

所述伴随抗癌剂给药的障碍为肾障碍,所述抗癌剂为铂制剂。

9. 如权利要求8所述的医药组合物,其特征在於:

所述肾障碍为顺铂肾病,所述抗癌剂为顺铂。

10. 如权利要求8或9所述的医药组合物,其特征在於:

所述肾障碍为伴有少尿的肾障碍。

11. 如权利要求8~10中任一项所述的医药组合物,其特征在於:

所述肾障碍处于从急性肾障碍向慢性肾障碍的过渡期。

12. 如权利要求1或2所述的医药组合物,其特征在於:

所述伴随抗癌剂给药的障碍为骨髓抑制,所述抗癌剂为铂制剂或代谢拮抗剂。

13. 如权利要求1~11中任一项所述的医药组合物,其特征在於:

所述抗癌剂为选自铂制剂、代谢拮抗剂、紫杉烷系制剂、长春花属生物碱系制剂和蛋白酶体抑制剂中的至少1种。

14. 如权利要求13所述的医药组合物,其特征在於:

所述抗癌剂为铂制剂。

15. 如权利要求13或14所述的医药组合物,其特征在於:

所述抗癌剂为奥沙利铂或顺铂。

16. 如权利要求13~15中任一项所述的医药组合物,其特征在於:

所述抗癌剂通过FOLFOX疗法或XELOX疗法(CapeOX疗法)给药。

17. 如权利要求1~16中任一项所述的医药组合物,其特征在於:

所述抗癌剂对患有选自以下癌症中的1种以上的癌症的癌症患者给药:卵巢癌、非小细

m=3的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基(a3)10~20摩尔%、和

m=4的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基(a4)5~15摩尔%。

22.如权利要求1~21中任一项所述的医药组合物,其特征在于:

所述卵磷脂化超氧化物歧化酶中,卵磷脂PC按以下结合比例结合于超氧化物歧化酶SOD:

(1)结合部位K3、N端和T2处的PC的结合比例以左边所列氨基酸残基的合计计,为1~10%;

(2)结合部位K9处的PC的结合比例为10~30%;

(3)结合部位K23处的PC的结合比例为50~75%;

(4)结合部位K36处的PC的结合比例为30~55%;

(5)结合部位K70或K75处的PC的结合比例以左边所列氨基酸残基的合计计,为10~80%;

(6)结合部位K122或K128处的PC的结合比例以左边所列氨基酸残基的合计计,为10~45%;

(7)结合部位K136处的PC的结合比例为10~60%,

以所述(1)~(7)的合计计,PC-SOD中,以平均结合数计结合有1~8个PC。

23.如权利要求1~22中任一项所述的医药组合物,其特征在于:

所述卵磷脂化超氧化物歧化酶的超氧化物歧化酶具有序列编号1所记载的氨基酸序列。

24.一种卵磷脂化超氧化物歧化酶的用途,其用以制造用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍的医药组合物。

25.如权利要求24所述的用途,其特征在于:

所述伴随抗癌剂给药的障碍为选自神经障碍、肝障碍、药物性耳聋、肾障碍、骨髓抑制和它们的1种以上的组合中的障碍。

26.一种卵磷脂化超氧化物歧化酶,其特征在于:

用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍。

27.如权利要求26所述的卵磷脂化超氧化物歧化酶,其特征在于:

所述伴随抗癌剂给药的障碍为选自神经障碍、肝障碍、药物性耳聋、肾障碍、骨髓抑制和它们的1种以上的组合中的障碍。

28.一种伴随抗癌剂给药的障碍的治疗或预防方法,其特征在于:

进行卵磷脂化超氧化物歧化酶的给药。

29.如权利要求28所述的治疗或预防方法,其特征在于:

所述伴随抗癌剂给药的障碍为选自神经障碍、肝障碍、药物性耳聋、肾障碍、骨髓抑制和它们的1种以上的组合中的障碍。

用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍的医药组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍的医药组合物。

背景技术

[0002] 随着许多抗癌剂的开发,癌症药物治疗的效果取得飞跃性进展。但是,抗癌剂的给药所引起的副作用也日益明显。尤其是,随着抗癌剂给药,会产生神经障碍、听觉障碍、肝脏或肾脏等器官障碍、骨髓抑制等各种障碍早已为人所知,障碍的出现或加重会导致患者的QOL(Quality of Life,生活质量)显著下降,影响日常生活。

[0003] 作为针对这些障碍中的神经障碍的治疗或缓解药物,报告有血液葡萄糖调节剂(专利文献1)、运动神经营养因子肽类似物(专利文献2)、谷氨酸脱氢酶基因(专利文献3)、CYP2J2拮抗剂(专利文献4)、CXCR2拮抗剂(专利文献5)、选择性有机阳离子转运体(专利文献6)、神经元生长锚定蛋白(neuroplastin)(专利文献7)、GLP-1类似物衍生物(专利文献8)、钙锰福地吡(calmangafodipir)(专利文献9)等。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本特表2003-532691号公报

[0007] 专利文献2:日本特表2006-516287号公报

[0008] 专利文献3:日本特表2008-518599号公报

[0009] 专利文献4:日本特表2017-524696号公报

[0010] 专利文献5:日本特表2017-527542号公报

[0011] 专利文献6:日本特表2018-521133号公报

[0012] 专利文献7:日本专利第3738008号公报

[0013] 专利文献8:日本专利第6231386号公报

[0014] 专利文献9:日本专利第6131271号公报

[0015] 专利文献10:日本特开2006-169128号公报

[0016] 专利文献11:日本特开2008-75706号公报

[0017] 专利文献12:日本特开2010-215527号公报

[0018] 专利文献13:日本特开2017-73255号公报

[0019] 专利文献14:日本特开2001-64199号公报

[0020] 专利文献15:日本特开平6-199895号公报

[0021] 专利文献16:W02006-040980号公报

发明内容

[0022] 发明所要解决的技术问题

[0023] 然而,没有任何治疗或缓解药物被确认到具有充分的效果,或者因副作用等问题导致开发停止,因此迫切需求开发一种新的治疗或预防药物。

[0024] 因此,本发明的技术问题在于提供一种用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍的医药组合物。

[0025] 用于解决技术问题的技术方案

[0026] 因此,本发明的发明人着眼于卵磷脂化超氧化物歧化酶(PC-SOD),基于各种观点对其药理作用进行了研究,结果发现:其对由抗癌剂的给药所引起的神经障碍、例如化疗诱发性周围神经病变(CIPN)、神经病理性疼痛、痛觉超敏、温度觉障碍等有效,并且对由抗癌剂的给药所引起的肝障碍、药物性耳聋、肾障碍和骨髓抑制也有效,而且安全性也较高,从而完成了本发明。

[0027] 即,本发明提供以下的发明[1]~[29]。

[0028] [1]一种用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍的医药组合物,其包含卵磷脂化超氧化物歧化酶。

[0029] [2]如[1]所记载的医药组合物,其中,上述伴随抗癌剂给药的障碍为选自神经障碍、肝障碍、药物性耳聋、肾障碍、骨髓抑制和它们的1种以上的组合中的障碍。

[0030] [3]如[2]所记载的医药组合物,其中,上述神经障碍为周围神经病变、神经病变(neuropathy)、神经病理性疼痛、痛觉超敏(allodynia)、痛觉过敏或痛觉减退、或者温度觉障碍。

[0031] [4]如[2]所记载的医药组合物,其中,上述神经障碍因神经纤维密度的减少、神经突的减少或消退、或者脊髓背根神经节(DRG)神经元的损伤而产生的神经障碍。

[0032] [5]如[1]所记载的医药组合物,其中,上述伴随抗癌剂给药的障碍为化疗诱发性周围神经病变(CIPN)。

[0033] [6]如[1]或[2]所记载的医药组合物,其中,上述伴随抗癌剂给药的障碍为肝障碍,上述抗癌剂为铂制剂。

[0034] [7]如[1]或[2]所记载的医药组合物,其中,上述伴随抗癌剂给药的障碍为药物性耳聋,上述抗癌剂为铂制剂。

[0035] [8]如[1]或[2]所记载的医药组合物,其中,上述伴随抗癌剂给药的障碍为肾障碍,上述抗癌剂为铂制剂。

[0036] [9]如[8]所记载的医药组合物,其中,上述肾障碍为顺铂肾病,上述抗癌剂为顺铂。

[0037] [10]如[8]或[9]所记载的医药组合物,其中,上述肾障碍为伴有少尿的肾障碍。

[0038] [11]如[8]至[10]中任一项所记载的医药组合物,其中,上述肾障碍处于从急性肾障碍向慢性肾障碍的过渡期。

[0039] [12]如[1]或[2]所记载的医药组合物,其中,上述伴随抗癌剂给药的障碍为骨髓抑制,上述抗癌剂为铂制剂或代谢拮抗剂。

[0040] [13]如[1]至[5]中任一项所记载的医药组合物,其中,上述抗癌剂为选自铂制剂、代谢拮抗剂、紫杉烷系制剂、长春花属生物碱系制剂、和蛋白酶体抑制剂中的至少1种。

[0041] [14]如[13]所记载的医药组合物,其中,上述抗癌剂为铂制剂。

[0042] [15]如[13]或[14]所记载的医药组合物,其中,上述抗癌剂为奥沙利铂或顺铂。

[0043] [16]如[1]至[15]中任一项所记载的医药组合物,其中,上述抗癌剂通过FOLFOX疗法或XELOX疗法(CapeOX疗法)给药。

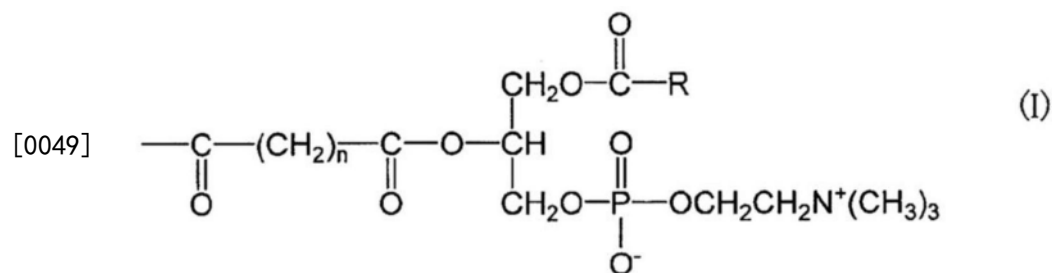
[0044] [17]如[1]至[16]中任一项所记载的医药组合物,其中,上述抗癌剂对患有选自以下癌症中的1种以上的癌症的癌症患者给药:卵巢癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、子宫体癌、头颈部癌、食管癌、白血病、恶性淋巴瘤、儿童肿瘤、多发性骨髓瘤、恶性星形细胞瘤、神经胶质瘤、绒毛膜疾病、生殖细胞肿瘤、肺癌、睾丸肿瘤、膀胱癌、肾盂肿瘤、尿道肿瘤、前列腺癌、子宫颈癌、神经母细胞瘤、小细胞肺癌、骨肉瘤、恶性胸膜间皮瘤、恶性骨肿瘤、肾癌、阴茎癌、骨与软组织肿瘤、肝癌、甲状腺癌、腹膜后肿瘤、骨转移、睾丸癌、胆囊癌、胆道癌、胆管癌、肾上腺癌、神经母细胞瘤、肝母细胞瘤、肝原发恶性肿瘤、髓母细胞瘤、胃癌、胰腺癌、尿路上皮癌、生殖腺外肿瘤、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、套细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、小肠癌、结肠癌、直肠癌、和大肠癌。

[0045] [18]如[1]至[16]中任一项所记载的医药组合物,其中,上述抗癌剂为对有选自以下癌症中的1种以上的癌症的既往史且该癌已切除的患者给药:卵巢癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、子宫体癌、头颈部癌、食管癌、白血病、恶性淋巴瘤、儿童肿瘤、多发性骨髓瘤、恶性星形细胞瘤、神经胶质瘤、绒毛膜疾病、生殖细胞肿瘤、肺癌、睾丸肿瘤、膀胱癌、肾盂肿瘤、尿道肿瘤、前列腺癌、子宫颈癌、神经母细胞瘤、小细胞肺癌、骨肉瘤、恶性胸膜间皮瘤、恶性骨肿瘤、肾癌、阴茎癌、骨与软组织肿瘤、肝癌、甲状腺癌、腹膜后肿瘤、骨转移、睾丸癌、胆囊癌、胆道癌、胆管癌、肾上腺癌、神经母细胞瘤、肝母细胞瘤、肝原发恶性肿瘤、髓母细胞瘤、胃癌、胰腺癌、尿路上皮癌、生殖腺外肿瘤、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、套细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、小肠癌、结肠癌、直肠癌、和大肠癌。

[0046] [19]如[1]至[18]中任一项所记载的医药组合物,其与抗癌剂联合给药。

[0047] [20]如[1]至[19]中任一项所记载的医药组合物,其中,上述卵磷脂化超氧化物歧化酶被冷冻干燥。

[0048] [21]如[1]至[20]中任一项所记载的医药组合物,其中,上述卵磷脂化超氧化物歧化酶包含如下的修饰卵磷脂化超氧化物歧化酶,该修饰卵磷脂化超氧化物歧化酶的特征在于,配位有铜和/或锌且第111位半胱氨酸的巯基经羟乙基硫化的来自人类的超氧化物歧化酶亚基的、1个以上的氨基由下述通式(I)所表示的卵磷脂残基直接或经由接头进行了修饰,



[0050] [式中,R为碳原子数8~30的烷基,n为2~10的整数]

[0051] 该修饰卵磷脂化超氧化物歧化酶以卵磷脂化超氧化物歧化酶(A)作为主要成分,该卵磷脂化超氧化物歧化酶(A)由该超氧化物歧化酶分子的各亚基上m个氨基[m为1~4的整数,卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基中的m的平均值为1.5~2.4]独立地被上述卵磷脂残基取代的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基构成,

[0052] 构成该卵磷脂化超氧化物歧化酶(A)的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基包含:

[0053] m=1的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基(a1)25~40摩尔%、

- [0054] m=2的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基(a2)35~50摩尔%、
- [0055] m=3的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基(a3)10~20摩尔%、和
- [0056] m=4的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基(a4)5~15摩尔%。
- [0057] [22]如[1]至[21]中任一项所记载的医药组合物,其中,上述卵磷脂化超氧化物歧化酶中,卵磷脂PC按以下结合比例结合于SOD:
- [0058] (1)结合部位K3、N端和T2处的PC的结合比例以左边所列氨基酸残基的合计计,为1~10%;
- [0059] (2)结合部位K9处的PC的结合比例为10~30%;
- [0060] (3)结合部位K23处的PC的结合比例为50~75%;
- [0061] (4)结合部位K36处的PC的结合比例为30~55%;
- [0062] (5)结合部位K70或K75处的PC的结合比例以左边所列氨基酸残基的合计计,为10~80%;
- [0063] (6)结合部位K122或K128处的PC的结合比例以左边所列氨基酸残基的合计计,为10~45%;
- [0064] (7)结合部位K136处的PC的结合比例为10~60%;
- [0065] 以上述(1)~(7)的合计计,PC-SOD中,以平均结合数计结合有1~8个PC。
- [0066] [23]如[1]至[22]中任一项所记载的医药组合物,其中,上述卵磷脂化超氧化物歧化酶的超氧化物歧化酶具有序列编号1所记载的氨基酸序列。
- [0067] [24]一种卵磷脂化超氧化物歧化酶的用途,其用以制造用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍的医药组合物。
- [0068] [25]如[24]所记载的用途,其中,上述伴随抗癌剂给药的障碍为选自神经障碍、肝障碍、药物性耳聋、肾障碍、骨髓抑制和它们的1种以上的组合中的障碍。
- [0069] [26]一种卵磷脂化超氧化物歧化酶,其用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍。
- [0070] [27]如[26]所记载的卵磷脂化超氧化物歧化酶,其中,上述伴随抗癌剂给药的障碍为选自神经障碍、肝障碍、药物性耳聋、肾障碍、骨髓抑制和它们的1种以上的组合中的障碍。
- [0071] [28]一种伴随抗癌剂给药的障碍的治疗或预防方法,其特征在于,进行卵磷脂化超氧化物歧化酶的给药。
- [0072] [29]如[28]所记载的治疗或预防方法,其中,上述伴随抗癌剂给药的障碍为选自神经障碍、肝障碍、药物性耳聋、肾障碍、骨髓抑制和它们的1种以上的组合中的障碍。
- [0073] 发明的效果
- [0074] 本发明所使用的PC-SOD可用于预防或治疗伴随抗癌剂给药的各种障碍、即神经障碍、肝障碍、药物性耳聋、肾障碍、骨髓抑制和它们的1种以上的组合、特别优选为CIPN等,安全性也较高。

附图说明

[0075] 图1表示PC-SOD(OXA+PC-SOD)对奥沙利铂(OXA)给药而诱发异常性疼痛的模型大鼠的预防性给药的浓度依赖性结果。

[0076] 图2表示PC-SOD(OXA+PC-SOD)对因奥沙利铂(OXA)所引起的冷感异常性疼痛的预

防性效果。

[0077] 图3表示PC-SOD (OXA+PC-SOD) 对因奥沙利铂 (OXA) 所引起的表皮内神经纤维密度减少的给药结果。

[0078] 图4表示PC-SOD (OXA+PC-SOD) 对因奥沙利铂 (OXA) 所引起的脊髓背根神经节 (DRG) 神经元的病理损伤的给药结果。

[0079] 图5表示PC-SOD (OXA+PC-SOD) 对因奥沙利铂 (OXA) 所引起的肝脏的病理损伤的给药结果。

[0080] 图6表示PC-SOD (PC-SOD) 的给药对因奥沙利铂 (OXA) 所带来的大肠癌细胞的增殖抑制效果的影响。

[0081] 图7-1表示PC-SOD (PC-SOD) 对因添加铂制剂 (顺铂 (+NGF+CP) 或奥沙利铂 (+NGF+OXA)) 所引起的神经突消退的给药作用。

[0082] 图7-2表示PC-SOD (PC-SOD) 对因添加铂制剂 (卡铂) 所引起的神经突消退的给药作用。

[0083] 图7-3表示PC-SOD (PC-SOD) 对因添加紫杉醇 (+NGF+PTX) 所引起的神经突消退的给药作用。

[0084] 图8表示对因添加奥沙利铂 (+NGF+OXA) 所引起的神经突消退的、PC-SOD (PC-SOD) 的给药作用和锰福地吡 (Mangafojipir) 的给药作用。

[0085] 图9表示奥沙利铂的存在下和不存在下的PC-SOD (PC-SOD) 和锰福地吡 (Mangafojipir) 的神经细胞毒性。

[0086] 图10-1表示PC-SOD (PC-SOD) 对因顺铂 (CIS) 所引起的肾障碍的效果 (肾脏的照片)。

[0087] 图10-2表示PC-SOD (PC-SOD) 对因顺铂 (CIS) 所引起的肾障碍的效果 (肾脏重量的变化)。

[0088] 图11-1表示PC-SOD (PC-SOD) 对因顺铂 (CIS) 所引起的肾障碍 (肾脏的病理损伤) 的效果。

[0089] 图11-2表示PC-SOD (PC-SOD) 对因顺铂 (CIS) 所引起的肾障碍 (肾纤维化) 的效果 (天狼星红染色)。

[0090] 图11-3表示PC-SOD (PC-SOD) 对因顺铂 (CIS) 所引起的肾障碍 (肾纤维化) 的效果 (α -SMA染色)。

[0091] 图12-1表示因抗癌剂 (吉西他滨、奥沙利铂、顺铂、卡铂) 所引起的RAW细胞毒性。

[0092] 图12-2表示PC-SOD对因抗癌剂 (吉西他滨、奥沙利铂、顺铂、卡铂) 所引起的RAW细胞毒性的效果。

[0093] 图13-1表示因抗癌剂 (吉西他滨、奥沙利铂、顺铂、卡铂) 所引起的RAW细胞的活性氧产生作用。

[0094] 图13-2表示PC-SOD对因抗癌剂 (吉西他滨、奥沙利铂、顺铂、卡铂) 所引起的RAW细胞的活性氧产生的效果。

[0095] 图14表示PC-SOD (PC-SOD) 对因顺铂 (CIS) 所引起的骨髓抑制 (外周血中血细胞的变化) 的效果。

[0096] 图15表示通过PC-SOD的酶消化和LC/MS分析所获得的PC-SOD的PC化部位和PC化比

例。

具体实施方式

[0097] 本发明的用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍的医药组合物的有效成分为卵磷脂化超氧化物歧化酶(PC-SOD)。

[0098] 在本说明书中,术语“卵磷脂化超氧化物歧化酶”与“PC-SOD”同义,可互换使用。

[0099] 在本说明书中,术语“超氧化物歧化酶”与“SOD”同义,可互换使用。

[0100] 在本说明书中,术语“磷脂酰胆碱”、“PC”和“卵磷脂”同义,可互换使用,可用于集合体,也可用于各分子。

[0101] 在本说明书中,术语“PC-SOD”意指PC-SOD分子的集合体。此处,关于构成“PC-SOD”的各PC-SOD分子中所结合的PC的数量和结合部位,在PC-SOD分子之间可以相同,或者也可以不同。因此,“PC-SOD”中所结合的PC的个数可以由平均结合数表示。另外,“PC-SOD”中,PC的结合部位可以通过SOD中的氨基酸残基来规定,PC的结合比例可以由PC与SOD中的氨基酸残基结合的比例表示。

[0102] 在本说明书中,术语“PC-SOD亚基”意指PC-SOD分子亚基的集合体。

[0103] 在本说明书中,术语“SOD”意指SOD分子的集合体。

[0104] 在本说明书中,术语“SOD亚基”意指SOD分子亚基的集合体。

[0105] 在本说明书中,术语“PC-SOD分子”意指PC-SOD分子亚基经二聚物化的分子,术语“PC-SOD分子亚基”意指构成PC-SOD分子的二聚物中的单体。此处,关于构成各PC-SOD分子的二聚物的PC-SOD分子亚基中所结合的PC的数量和结合部位,在构成该二聚物的PC-SOD分子亚基之间可以相同,或者也可以不同。

[0106] 在本说明书中,术语“SOD分子”意指SOD分子亚基经二聚物化的分子,术语“SOD分子亚基”意指构成SOD分子的二聚物中的单体。

[0107] PC-SOD是通过卵磷脂对SOD进行了修饰得到的物质,迄今为止,虽然本发明的申请人报告了其对于灼伤(专利文献10)、间质性肺炎(专利文献11)、慢性阻塞性肺病综合征(专利文献12)、急性呼吸窘迫综合征(专利文献13)等有效,但其对于伴随抗癌剂给药的障碍的作用完全未知。

[0108] PC-SOD是通过卵磷脂对SOD进行了修饰得到的物质,优选为通过磷脂酰胆碱(PC)直接或经由接头对SOD的1个以上的氨基酸残基、优选为包含氨基的氨基酸残基或N端氨基酸残基、更优选为赖氨酸残基进行了修饰得到的物质。

[0109] 作为PC-SOD中的SOD,优选为人类SOD(序列编号1),特别优选为活性中心含有铜和锌的人类SOD(人类Cu/ZnSOD)。该SOD有由人类组织制造的天然人类Cu/ZnSOD、利用基因工程方法制造的人类Cu/ZnSOD、具有与天然人类Cu/ZnSOD实质上相同的氨基酸序列的重组人类Cu/ZnSOD、这些人类Cu/ZnSOD的氨基酸序列中的一部分氨基酸经化学修饰或改型的SOD等,可以为任意人类Cu/ZnSOD。PC-SOD中的SOD优选为人类SOD1,更优选为第111位半胱氨酸的巯基经保护的人类SOD1,进而优选为第111位半胱氨酸的巯基经羟乙基硫化的人类SOD1。

[0110] 另外,PC-SOD中,PC直接或经由接头结合于构成SOD的氨基酸残基中的1个以上的游离氨基或羟基(优选为氨基)。作为PC所结合的氨基酸残基,可以列举:SOD分子的N端的Ala、以及Lys、Gln、Asn、Arg、Ser、Thr和Tyr,优选为N端的Ala、Lys和Thr,更优选为N端的Ala

和Lys,进而优选为Lys。

[0111] PC优选为与SOD分子亚基的各者独立地结合有1~12个,更优选为结合有1~8个,进而优选为结合有1~4个,进而更优选为结合有2~3个,进而优选为结合有2个。

[0112] 因此,PC-SOD分子中PC优选为结合有2~24个,更优选为结合有2~16个,进而优选为结合有2~8个,进而更优选为结合有4~6个,进而优选为结合有4个。

[0113] 在PC-SOD的情况下,PC的结合数可以由与作为集合体的SOD结合的PC的平均结合数来表示。因此,PC-SOD中,PC以平均结合数计为2~24个、优选为2~16个、更优选为2~8个、进而优选为4~6个、最优选为4个结合于SOD。

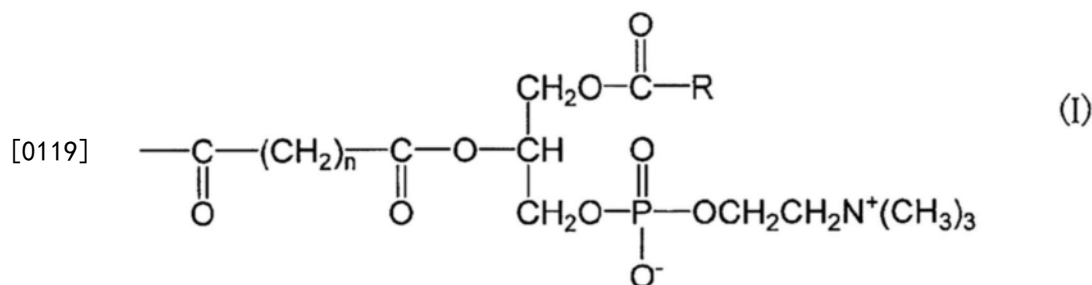
[0114] PC可直接结合于构成SOD的氨基酸残基,但优选为经由接头结合。

[0115] 作为接头,优选为二羧酸,特别优选为 $-C(=O)(CH_2)_nC(=O)-$ (其中,n为2以上的整数,优选为2~10,更优选为2~6,进而优选为2~4,特别优选为3)。此外,该接头将PC的甘油基的羟基与氨基酸残基的氨基或羟基(优选为氨基)连结。

[0116] 另外,PC的脂肪酸残基的碳原子数优选为8~31,更优选为10~28,进而优选为14~22,特别优选为16(来自棕榈酸)。

[0117] PC-SOD例如可以利用专利文献14、15和16中所记载的方法、优选为专利文献16中所记载的方法来制造。

[0118] 特别优选的PC-SOD的例子为如下卵磷脂化超氧化物歧化酶,其特征在于:包含配位有铜和/或锌且第111位半胱氨酸的巯基经羟乙基硫化的、来自人类的超氧化物歧化酶亚基的1个以上的氨基通过下述通式(I)所表示的卵磷脂残基直接或经由接头进行了修饰的修饰卵磷脂化超氧化物歧化酶,



[0120] [式中,R为碳原子数8~30的烷基,n为2~10的整数],

[0121] 该修饰卵磷脂化超氧化物歧化酶以卵磷脂化超氧化物歧化酶(A)作为主要成分,该卵磷脂化超氧化物歧化酶(A)由该超氧化物歧化酶分子的各亚基上m个氨基[m为1~4的整数,卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基中的m的平均值为1.5~2.4]独立地被上述卵磷脂残基取代的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基构成,

[0122] 构成该卵磷脂化超氧化物歧化酶(A)的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基包含:

[0123] m=1的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基(a1)25~40摩尔%、

[0124] m=2的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基(a2)35~50摩尔%、

[0125] m=3的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基(a3)10~20摩尔%、和

[0126] m=4的卵磷脂化超氧化物歧化酶亚基(a4)5~15摩尔%。

[0127] 本发明的PC-SOD中,PC结合于SOD的结合部位及其结合比例优选为如下所述。此外,用单字母表示的氨基酸后的数字表示从SOD分子中的N端起的残基数。

[0128] (1) 在结合部位为K3、N端或T2的情况下,PC的结合比例以左边所列的氨基酸残基

的合计计,优选为1~10%,更优选为2~8%,进而优选为5%。

[0129] (2) 在结合部位为K9的情况下,PC的结合比例优选为10~30%,更优选为15~26%,进而优选为23%。

[0130] (3) 在结合部位为K23的情况下,PC的结合比例优选为50~75%,更优选为55~70%,进而优选为63%。

[0131] (4) 在结合部位为K36的情况下,PC的结合比例优选为30~55%,更优选为35~50%,进而优选为43%。

[0132] (5) 在结合部位为K70或K75的情况下,PC的结合比例以左边所列的氨基酸残基的合计计,优选为10~80%,更优选为30~65%,进而优选为53%。

[0133] (6) 在结合部位为K122或K128的情况下,PC的结合比例以左边所列的氨基酸残基的合计计,优选为10~45%,更优选为20~35%,进而优选为27%。

[0134] (7) 在结合部位为K136的情况下,PC的结合比例优选为10~60%,更优选为20~45%,进而优选为33%。

[0135] 优选为以上述(1)~(7)的合计计,PC-SOD中,以平均结合数计,结合有1~8个、优选为2~6个、更优选为3~5个、最优选为4个PC。

[0136] 如下述实施例所记载,上述PC-SOD具有治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍的效果。此处,作为伴随抗癌剂给药的障碍,可以列举:神经障碍、肝障碍、药物性耳聋、肾障碍、骨髓抑制和它们的1种以上的任意组合。

[0137] 由于授予了抗癌剂、尤其是铂制剂的患者多数情况下会发生神经障碍,因此本发明对作为伴随抗癌剂给药的障碍的神经障碍有效表明有益于提高授予了抗癌剂的患者们的QOL。

[0138] 由于授予了抗癌剂的患者多数情况下会发生由抗癌剂所引起的肝障碍,因此本发明对肝障碍有效表明有益于提高授予了抗癌剂的患者们的QOL。

[0139] 另外,由于授予了抗癌剂、尤其是铂制剂的患者多数情况下会发生药物性耳聋,因此本发明对作为伴随抗癌剂给药的障碍的药物性耳聋有效表明有益于提高授予了抗癌剂的患者们的QOL。

[0140] 进而,由于授予了抗癌剂、尤其是铂制剂、更优选为顺铂的患者多数情况下会发生肾障碍,因此本发明对作为伴随抗癌剂给药的障碍的肾障碍有效表明有益于提高授予了抗癌剂的患者们的QOL。

[0141] 进而,由于授予了抗癌剂、尤其是铂制剂或代谢拮抗剂、更优选为顺铂、奥沙利铂、卡铂、吉西他滨等的患者多数情况下会发生骨髓抑制,因此本发明对作为伴随抗癌剂给药的障碍的骨髓抑制有效表明有益于提高授予了抗癌剂的患者们的QOL。

[0142] 本发明的医药组合物可用于伴随抗癌剂的给药的神经障碍中的周围神经病变、神经病变、神经病理性疼痛、痛觉超敏、痛觉过敏或痛觉减退、或者温度觉障碍,尤其可用于CIPN。此处,痛觉超敏与异常性疼痛同义。

[0143] 作为上述神经病理性疼痛或痛觉超敏的具体症状,可以列举选自四肢麻木、四肢疼痛、深腱反射减弱、肌力下降、和运动功能障碍中的1种以上。

[0144] 另外,上述温度觉障碍包括选自冷觉过敏、冷觉减退、热觉过敏、和热觉减退中的1种以上。

[0145] 这些症状是伴随抗癌剂的给药所产生的障碍,尤其是被视为化疗诱发性周围神经病变(CIPN)的障碍,是会使癌症患者的QOL下降的障碍。因此,本发明的医药组合物能够治疗或预防这些症状对于进行癌症化疗而言极为重要。

[0146] 本发明的医药组合物对因抗癌剂的给药所产生的表皮内神经纤维密度减少表现出预防效果,另外,对由抗癌剂的给药所引起的脊髓背根神经节(DRG)神经元的病理损伤表现出预防效果。进而,具有保护因抗癌剂的给药所产生的神经突损伤的作用。

[0147] 因此,本发明的医药组合物对因神经纤维密度的减少所产生的神经障碍、因神经突的减少或消退所产生的神经障碍、因脊髓背根神经节(DRG)神经元的损伤所产生的神经障碍具有治疗或预防效果。

[0148] 另外,本发明的医药组合物具有治疗或预防伴随抗癌剂给药的肝障碍的效果。

[0149] 本发明的医药组合物具有治疗或预防伴随抗癌剂给药、尤其是铂制剂给药、更优选为奥沙利铂、卡铂或顺铂给药的药物性耳聋的效果。

[0150] 本发明的医药组合物具有治疗或预防伴随抗癌剂给药、尤其是铂制剂给药、更优选为顺铂给药的肾障碍的效果。伴随抗癌剂给药的肾障碍优选为伴有少尿的肾障碍、或顺铂肾病。伴随抗癌剂给药的肾障碍优选为处于从急性肾障碍向慢性肾障碍的过渡期。

[0151] 本发明的医药组合物具有治疗或预防伴随抗癌剂给药、尤其是铂制剂给药、代谢拮抗剂给药、更优选为奥沙利铂、卡铂、顺铂、吉西他滨等给药的骨髓抑制的效果。

[0152] 进而,本发明的医药组合物也具有如下特征:不会影响因抗癌剂所带来的抗肿瘤效果,相较于专利文献9中所记载的钙锰福地吡,细胞毒性较低,且神经保护作用较高。

[0153] 如上所述,本发明的医药组合物对伴随抗癌剂给药的障碍具有治疗或预防效果,作为该抗癌剂,优选为化疗剂,进而优选为选自铂制剂、代谢拮抗剂、紫杉烷系制剂、长春花属生物碱系制剂、和蛋白酶体抑制剂中的至少1种,特别优选为铂制剂。

[0154] 作为铂制剂的具体例,例如可以列举:顺铂、卡铂、和奥沙利铂。

[0155] 作为紫杉烷系制剂的具体例,例如可以列举:紫杉醇或多西他赛(Docetaxel)。

[0156] 作为长春花属生物碱系制剂的具体例,例如可以列举:长春新碱或长春瑞滨。

[0157] 作为蛋白酶体抑制剂的具体例,例如可以列举:硼替佐米或卡非佐米。

[0158] 作为代谢拮抗剂的具体例,可以列举:吉西他滨、阿糖胞苷、卡莫氟、替加氟、5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、卡培他滨。

[0159] 另外,作为具体的抗癌剂,优选为包含选自多柔比星、表柔比星、奥沙利铂、卡铂、顺铂、吉西他滨、5-氟尿嘧啶、卡培他滨、多西他赛、紫杉醇、长春新碱、长春花碱、长春瑞滨、硼替佐米、和沙利度胺中的至少1种,特别优选为奥沙利铂。

[0160] 本发明中的伴随抗癌剂给药的障碍与抗癌剂的优选的组合如下。

[0161] (1) 在伴随抗癌剂给药的障碍为神经障碍的情况下,抗癌剂优选为铂制剂或紫杉烷系制剂,抗癌剂进而更优选为奥沙利铂、顺铂或紫杉醇。尤其是,在伴随抗癌剂给药的障碍为CIPN的情况下,抗癌剂优选为铂制剂,进而更优选为奥沙利铂。

[0162] (2) 在伴随抗癌剂给药的障碍为肝障碍的情况下,抗癌剂优选为铂制剂,特别优选为奥沙利铂。

[0163] (3) 在伴随抗癌剂给药的障碍为药物性耳聋的情况下,抗癌剂优选为铂制剂,特别优选为顺铂。

[0164] (4) 在伴随抗癌剂给药的障碍为肾障碍的情况下,抗癌剂优选为铂制剂,尤其是在伴随抗癌剂给药的障碍为顺铂肾病的情况下,抗癌剂优选为顺铂。

[0165] (5) 在伴随抗癌剂给药的障碍为骨髓抑制的情况下,抗癌剂优选为铂制剂或代谢拮抗剂,特别优选为顺铂、卡铂、奥沙利铂、吉西他滨。

[0166] 另外,本发明的医药组合物优选在癌症化疗法、例如FOLFOX疗法、或XELOX疗法(CapeOX疗法)中给药,更优选在mFOLFOX疗法中给药。

[0167] FOLFOX是联用亚叶酸、氟尿嘧啶、和奥沙利铂的癌症化疗法。在FOLFOX中,根据各药剂的给药量的不同等,存在包括FOLFOX1~FOLFOX7、和mFOLFOX6的改良方法的变化,优选为FOLFOX4、FOLFOX6、或mFOLFOX6,尤其在日本优选为mFOLFOX6。

[0168] XELOX疗法(CapeOX疗法)是联用希罗达和奥沙利铂(卡培他滨和奥沙利铂)的癌症化疗法。

[0169] 本发明的医药组合物优选为对患有选自卵巢癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、子宫体癌、头颈部癌、食管癌、白血病、恶性淋巴瘤、儿童肿瘤、多发性骨髓瘤、恶性星形细胞瘤、神经胶质瘤、绒毛膜疾病、生殖细胞肿瘤、肺癌、睾丸肿瘤、膀胱癌、肾盂肿瘤、尿道肿瘤、前列腺癌、子宫颈癌、神经母细胞瘤、小细胞肺癌、骨肉瘤、恶性胸膜间皮瘤、恶性骨肿瘤、肾癌、阴茎癌、骨与软组织肿瘤、肝癌、甲状腺癌、腹膜后肿瘤、骨转移、睾丸癌、胆囊癌、胆道癌、胆管癌、肾上腺癌、神经母细胞瘤、肝母细胞瘤、肝原发恶性肿瘤、髓母细胞瘤、胃癌、胰腺癌、尿路上皮癌、生殖腺外肿瘤、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、套细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、小肠癌、结肠癌、直肠癌、和大肠癌中的1种以上癌症的癌症患者给药,更优选为对患有选自胃癌、胰腺癌、小肠癌、结肠癌、直肠癌、和大肠癌中的1种以上癌症的癌症患者给药,进而优选为对患有选自结肠癌、直肠癌、和大肠癌中的1种以上癌症的癌症患者给药。

[0170] 另外,本发明中,抗癌剂也可以作为癌已切除的患者的术后辅助化疗或防止复发措施而对患者给药。即,抗癌剂优选为对有选自卵巢癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、子宫体癌、头颈部癌、食管癌、白血病、恶性淋巴瘤、儿童肿瘤、多发性骨髓瘤、恶性星形细胞瘤、神经胶质瘤、绒毛膜疾病、生殖细胞肿瘤、肺癌、睾丸肿瘤、膀胱癌、肾盂肿瘤、尿道肿瘤、前列腺癌、子宫颈癌、神经母细胞瘤、小细胞肺癌、骨肉瘤、恶性胸膜间皮瘤、恶性骨肿瘤、肾癌、阴茎癌、骨与软组织肿瘤、肝癌、甲状腺癌、腹膜后肿瘤、骨转移、睾丸癌、胆囊癌、胆道癌、胆管癌、肾上腺癌、神经母细胞瘤、肝母细胞瘤、肝原发恶性肿瘤、髓母细胞瘤、胃癌、胰腺癌、尿路上皮癌、生殖腺外肿瘤、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、套细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、小肠癌、结肠癌、直肠癌、和大肠癌中的1种以上癌症的既往史且该癌已切除的患者给药,更优选为对有选自胃癌、胰腺癌、小肠癌、结肠癌、直肠癌、和大肠癌中的1种以上癌症的既往史且该癌已切除的患者给药,进而优选为对有选自结肠癌、直肠癌、和大肠癌中的1种以上癌症的既往史且该癌已切除的患者给药。

[0171] 由于本发明的医药组合物不仅对伴随抗癌剂给药的神经障碍具有治疗或预防效果,对肝障碍、药物性耳聋和/或肾障碍也具有治疗或预防效果,因此也可以对神经障碍、肝障碍、药物性耳聋、肾障碍和骨髓抑制的1种以上以任意组合并发的患者给药。

[0172] 由于本发明的医药组合物具有治疗或预防伴随抗癌剂的给药所产生的神经障碍、肝障碍、药物性耳聋、肾脏障碍、骨髓抑制或它们的1种以上的组合的效果,因此优选为与抗癌剂组合来给药。

[0173] 本发明的医药组合物只要含有PC-SOD即可,优选为向其中配合药学上可接受的载体而制成各种给药方式的医药组合物。

[0174] 作为这样的医药组合物的给药方式,优选为注射(优选为静脉内注射或局部注射)、或点滴。

[0175] 在制成注射剂的情况下,使用水、助溶剂、或木糖醇水溶液(优选为5w/w%、10w/w%、或20w/w%,更优选为5w/w%)等。作为注射剂,优选为静脉内给药剂、局部注射剂、皮下注射剂、肌内给药剂。

[0176] 作为本发明的医药组合物的制剂形态,可以列举:冷冻干燥制剂、粉末填充剂的形态,优选为冷冻干燥制剂。为了制成冷冻干燥制剂,优选配合蔗糖等稳定剂。能够通过利用该技术领域中公知的方法对包含PC-SOD和蔗糖的水溶液进行冷冻干燥而制剂化。PC-SOD:蔗糖的重量比优选为1:1~1:5,更优选为1:1~1:2。另外,在PC-SOD为40mg的情况下,蔗糖优选为40mg~200mg,更优选为40mg~80mg,进而优选为67mg。

[0177] 本发明的医药组合物中的PC-SOD的含量并无特别限定,相对于组合物总量,通常为1~100质量%,优选为10~80质量%,更优选为25~50质量%。

[0178] 本发明的医药组合物的给药量根据授予抗癌剂的症状和年龄等而不同,以上述PC-SOD计,成人每天的给药量优选为20~160mg,更优选为20~80mg,进而优选为40~80mg。另外,该给药量也可分成1周1~4次、2周1~4次、或3周1~4次来给药,该给药周期可以分别反复进行1~20次。优选为本发明的医药组合物能够按照FOLFOX或XELOX的给药方案来给药。在按照FOLFOX的情况下,本发明的医药组合物优选为2周给药1次,将该操作进行12次循环。另外,在按照XELOX的情况下,本发明的医药组合物优选为3周给药1次,将该操作进行8次循环。

[0179] 本发明的优选的另一实施方式为PC-SOD,其用于预防或治疗伴随抗癌剂给药的障碍。

[0180] 本发明的优选的另一实施方式为PC-SOD的用于制造伴随抗癌剂给药的障碍的预防或治疗用医药组合物的用途。

[0181] 本发明的优选的另一实施方式为预防或治疗伴随抗癌剂给药的障碍的方法,其特征在于,进行PC-SOD的给药。

[0182] 实施例

[0183] 接下来,举出实施例,对本发明更详细地进行说明,但本发明并不受这些实施例限定。

[0184] 本实施例中所使用的PC-SOD按照专利文献16中所记载的方法来制造。

[0185] [试验例1]对因奥沙利铂所引起的大鼠异常性疼痛(痛觉超敏)的作用

[0186] “概要”

[0187] 为了确认PC-SOD对因抗癌剂所引起的异常性疼痛的效果,调查PC-SOD对向大鼠授予了作为抗癌剂的奥沙利铂时所产生的机械刺激所引起的异常性疼痛的作用。对大鼠尾静脉授予PC-SOD作为受试药,进行以下的试验。

[0188] “方法”

[0189] (1) 授予奥沙利铂而诱发异常性疼痛的模型大鼠的制作:

[0190] 使用6~8周龄的SD系雄性大鼠(200~400g),向大鼠的腹腔内授予4mg/kg奥沙利

铂(以下,有时简称为OXA)。授予持续4周每周实施2次,共计8次(第1、2、7、8、13、14、19、20天)。以相同的方式向对照组授予OXA的溶剂即5%葡萄糖溶液。OXA使用ELPLAT注射用100mg(株式会社Yakult本社)。

[0191] (2)对受试药的给药预防效果进行评价的实验:

[0192] 将实验动物分成对照组、OXA给药组、OXA和PC-SOD 0.1mg/kg给药组、OXA和PC-SOD 0.3mg/kg给药组或OXA和PC-SOD 1mg/kg给药组(OXA+PC-SOD给药组)这5个组(各组n=8)。预防实验中,向OXA+PC-SOD给药组授予OXA 5分钟~15分钟后,对尾静脉授予PC-SOD。授予持续4周每周实施2次,共计8次(第1、2、7、8、13、14、19、20天)。以相同的方式向对照组和OXA给药组授予PC-SOD的溶剂。

[0193] (3) von Frey试验(von Frey test)

[0194] 针对上述大鼠,通过von Frey细丝对大鼠的后肢足施加压力刺激,在无限制的状态下进行痛觉测试。压力刺激的强度设定为50g。

[0195] (4) 统计处理

[0196] 数据以平均±标准误差(Mean±SEM)来表示。关于成绩(结果)的统计处理,2组间的比较使用学生t检验来进行,3组以上的组间的比较使用单因素方差分析检验(post-hoc Tukey's test)来进行,将风险率为5%以下的情况评价为存在显著差异(图中的*、**、***: $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$)。

[0197] “结果与解释”

[0198] 将上述试验结果中PC-SOD的预防性给药的浓度依赖性结果示于图1。OXA给药组中,相较于对照组,痛觉阈值(Threshold)显著下降。与此相对,在OXA+PC-SOD(0.1、0.3、1mg/kg)给药组中,显示PC-SOD呈浓度依赖性地抑制因OXA所引起的痛觉阈值下降。进而,1mg/kg的PC-SOD组中,显著抑制了OXA给药组中观察到的阈值下降。

[0199] 根据以上的结果,确认到PC-SOD对因OXA所引起的机械性异常性疼痛具有预防效果。

[0200] [试验例2]低温刺激试验

[0201] “概要”

[0202] 利用以下所示的方法对因低温刺激所引起的异常性疼痛进行观察,由此能够确认本发明对因抗癌剂所引起的周围神经病理性疼痛的效果。

[0203] “方法”

[0204] (1) 授予OXA而诱发异常性疼痛的模型大鼠的制作

[0205] 使用5周龄的SD系雄性大鼠(200g~400g)作为实验动物,向大鼠的腹腔内授予10mg/kg OXA。授予共计实施2次(第1、2天)。以相同的方式向对照组授予OXA的溶剂即5%葡萄糖溶液。

[0206] (2) 受试药的给药

[0207] 将实验动物分成对照组、OXA给药组、OXA和PC-SOD 1mg/kg给药组(OXA+PC-SOD给药组)这3个组(各组n=8)。OXA+PC-SOD给药组中,作为预防性给药,在授予OXA 15分钟后,对尾静脉授予PC-SOD。授予共计实施2次(第1、2天)。以相同的方式向对照组和OXA给药组授予PC-SOD的溶剂。

[0208] (3) 丙酮测试(acetone test)

[0209] 将大鼠放入底部为金属丝网的容器中使其适应30分钟后,使用有机溶剂用喷雾器(NO.3530,FURUPLA株式会社制造),对后足喷雾0.1mL丙酮,利用丙酮气化时的冷却作用来施加冷刺激。从喷雾开始起观察大鼠的回避反应40秒,通过得分法进行评价。具体而言,得分法分成4个等级(得分0、1、2、3)来评价。得分0是指动物等同于安静状态,无反应。得分1是指动物的后足反应迅速如活动等,但不包括反复反应或反应时间变长等情况。得分2是指动物的后足反应迅速如活动等,且包括反复反应或反应时间变长等。得分3是指得分2的情况,且动物出现舔后足的动作。

[0210] (4) 统计处理

[0211] 数据以平均±标准误差(Mean±SEM)来表示。关于成绩的统计处理,2组间的比较使用学生t检验来进行,3组以上的组间的比较使用单因素方差分析(post-hoc Tukey's test)检验来进行,将风险率为5%以下的情况评价为存在显著差异(图中的*、**、***: $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$)。

[0212] “结果与解释”

[0213] 将PC-SOD对因OXA所引起的冷感性异常性疼痛预防性给药的结果示于图2。OXA给药组中,相较于对照组,冷感刺激的得分显著增加。与其相对,1mg/kg的PC-SOD组中,显著抑制了OXA给药组中观察到的得分增加。

[0214] 根据以上的结果,确认到PC-SOD对因OXA所引起的冷感性异常性疼痛具有预防效果。

[0215] [试验例3] 表皮内神经纤维密度变化的评价

[0216] “概要”

[0217] 利用以下所示的方法对因奥沙利铂所引起的表皮内神经纤维密度变化进行观察,由此能够确认本发明对因抗癌剂所引起的周围神经的病理损伤的效果。

[0218] “方法”

[0219] (1) 表皮内神经密度的评价方法

[0220] 对于由4%多聚甲醛固定液固定的大鼠表皮组织,24小时后通过PBS(Phosphate Buffered Saline,磷酸盐缓冲盐水)进行清洗,制作冷冻块。所制作的块通过低温恒温器(CM3050S,Leica公司制造)制作厚度50 μ m的冷冻切片,作为透化处理添加0.2%Triton-X溶液,使其反应10分钟。神经纤维与抗PGP9.5抗体(Ultraclone Ltd.)在4 $^{\circ}$ C下反应过夜后,通过PBSt(Phosphate Buffered Saline with Tween-20,含Tween-20的磷酸盐缓冲盐水)进行清洗,与荧光二抗(Alexa Fluor 488山羊抗兔,IgG Invitrogen)反应。在室温下反应1小时后,进行清洗、冲洗、VECTASHIELD with DAPI H-1200(Vector公司)滴加、封片,通过BZ-X800荧光显微镜(Keyence公司制造),以倍率:200倍保存各样品的2~3张图像(比例尺=100 μ m)。

[0221] “结果与解释”

[0222] 将PC-SOD对因OXA所引起的表皮内神经纤维密度减少的给药结果示于图3。OXA给药组中,相较于对照组,表皮内神经纤维密度减少(箭头)。与其相对,OXA+PC-SOD(1mg/kg)给药组中表现出对因OXA所引起的表皮内神经纤维密度减少的抑制效果。

[0223] 根据以上的结果,确认到PC-SOD对因OXA所引起的周围神经病变的病理损伤具有预防效果。

[0224] [试验例4]DRG的病理损伤的评价

[0225] “概要”

[0226] 利用以下所示的方法对因奥沙利铂所引起的DRG的形态变化进行观察,由此能够确认本发明对因抗癌剂所引起的DRG神经元的病理损伤的效果。

[0227] “方法”

[0228] 将所采集的L5的DRG神经元组织用10%中性缓冲福尔马林液保存,固定后实施PBS清洗、70%乙醇置换处理,进行石蜡块的制作、切片、HE (hematoxylin-eosin,苏木精-伊红)染色。样品块的切片样品的厚度被切成2~3 μm 。所制作的病理样品切片通过一体化荧光显微镜(BZ-X800,Keyence公司制造)的光学显微镜功能,以倍率:200、400倍拍摄各样品1~3张。关于评价方法,对作为DRG神经元损伤的指标的DRG神经元的核仁(nucleolus)的多核化、及核仁的形态异常进行评价(比例尺=50 μm)。

[0229] “结果与解释”

[0230] 将PC-SOD对因OXA所引起的DRG的病理损伤的给药结果示于图4。OXA给药组中,相较于对照组,观察到病理损伤的现象(箭头,DRG神经元的核仁的多核化与形态异常)。与其相对,OXA+PC-SOD(1mg/kg)给药组中表现出对因OXA所引起的DRG的病理损伤的抑制效果。

[0231] 根据以上的结果,确认到PC-SOD对因OXA所引起的DRG神经元的病理损伤具有预防效果。

[0232] [试验例5]因奥沙利铂所引起的肝障碍的病理评价

[0233] “概要”

[0234] 利用以下所示的方法对因奥沙利铂所引起的肝障碍的病理图像进行观察,由此能够确认本发明对因抗癌剂所引起的肝障碍的效果,另外,能够确认与锰福地吡的区别。

[0235] “方法”

[0236] 针对所采集的肝脏,用10%中性缓冲福尔马林液固定组织,使用Histos 5 (Milestone)与包埋机(embedding center,EG1160,Leica),制作石蜡块。样品块使用切片机(MR2245,Leica),以3 μm 的厚度进行切片而制作载玻片。所制作的载玻片使用HE染色法进行染色、封片,通过一体化荧光显微镜(BZ-X800,Keyence公司)的光学显微镜功能,以倍率:200、400倍进行观察。关于观察、评价,对整个切片进行观察,随机选取2~4张代表性组织图像,对炎症、坏死等组织结构的变异进行观察、评价(比例尺=200 μm)。

[0237] “结果与解释”

[0238] 将PC-SOD对因OXA所引起的肝脏的病理损伤的给药结果、与锰福地吡的区别的结果示于图5。OXA给药组中,相较于对照组,确认到肝脏病理损伤(箭头,肝细胞的坏死)。与其相对,OXA+PC-SOD(1mg/kg)给药组中表现出因OXA所引起的肝细胞的坏死的抑制效果。

[0239] 另一方面,锰福地吡的给药组中没有显示出因OXA所引起的肝细胞的坏死的抑制效果。

[0240] 此外,由于锰福地吡是以CIPN作为对象疾病进行医药开发的钙锰福地吡的类似物,能够以试剂的形式获取,因此用作本实施例的比较对照。

[0241] 根据以上的结果,可知PC-SOD对因OXA所引起的肝障碍具有预防效果。另外,可确认相较于锰福地吡,PC-SOD针对作为OXA的严重副作用之一的肝障碍具有减轻副作用的预防效果。

[0242] [试验例6]PC-SOD对奥沙利铂的抗肿瘤效果的影响

[0243] “概要”

[0244] 利用以下所示的方法对因奥沙利铂所引起的癌细胞的增殖变化进行观察,由此能够确认本发明对抗癌剂的抗肿瘤效果的影响。

[0245] “方法”

[0246] (1) 细胞的培养

[0247] 大肠癌细胞 (co1o320, HCT116) 使用含有10%胎牛血清、100单位/mL青霉素-链霉素 (Gibco BRL公司制造) 的RPM1640培养基 (Thermo Fisher Scientific公司), 在37°C、5% CO₂培养箱内培养。

[0248] (2) 药物的处理和细胞增殖的测定

[0249] 将细胞以10,000个细胞/孔接种于96孔板,24小时后进行受试液的处理。在仅OXA的受试液中,将OXA从100μM起稀释3倍(10个阶段),添加于96孔板。OXA+PC-SOD的受试液中, OXA中以相同浓度添加PC-SOD(50μg/mL)(各组n=3)。在培养72小时后,加入各孔的溶液的1/10量的CCK-8溶液,测定吸光度(490nm)(Tecan, Tecan Japan)。数据以平均±标准误差 (Mean±SEM)表示。此外,实验条件可适当变更。

[0250] “结果与解释”

[0251] 确认到因OXA所引起的大肠癌细胞的增殖抑制。相较于OXA单独给药组, OXA+PC-SOD组以相同程度抑制细胞增殖,由此能够确认本发明不影响奥沙利铂的抗肿瘤效果(图6)。

[0252] [试验例7]PC-SOD在因抗癌剂所引起的神经突损伤中的神经保护效果

[0253] “概要”

[0254] 已知来自大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤的PC12细胞通过神经生长因子(NGF)而分化为具有神经突的神经样细胞,广泛被用作神经细胞模型。为了对PC-SOD的神经突保护作用进行评价,使用通过NGF进行了分化的PC12细胞,对PC-SOD在因各种抗癌剂所引起的神经突损伤中的效果进行分析。

[0255] [试验例7-1]PC-SOD在因铂制剂(奥沙利铂或顺铂)所引起的神经突损伤中的神经保护效果

[0256] “方法”

[0257] 将PC12细胞以5000个细胞/孔接种于包被胶原蛋白的24孔板。24小时后将培养基更换为分化培养基(含有100ng/mL NGF和0.5%FBS(Fetal Bovine Serum,胎牛血清)的RPMI-1640),进而培养96小时。在神经突伸长后,单独用奥沙利铂(最终浓度20μM)、单独用顺铂(结果图中简写为CP,最终浓度33μM)来培养24小时,以及用含有奥沙利铂或顺铂与PC-SOD(最终浓度10、50、100μg/mL)的分化培养基的组合来培养24小时。通过显微镜(Keyence BZ-X800)获取细胞的图像,使用图像解析软件ImageJ(NIH)来测量神经突的长度。各组设置三次重复,每孔分析30个细胞。图表表示各组的平均值,通过Tukey检验进行多重比较(*:p<0.05)。

[0258] “结果”

[0259] 通过添加奥沙利铂而神经突消退,但通过同时添加PC-SOD,呈PC-SOD浓度依赖性地显著地抑制神经突消退,抑制至与未添加奥沙利铂时相同的水平。对于因顺铂所引起的

神经突消退,相较于单独添加顺铂,显著抑制神经突消退。根据这些结果,显示PC-SOD保护神经突免受因奥沙利铂和顺铂所引起的神经突损伤。另外,关于因PC-SOD所引起的神经突消退抑制作用,相较于因顺铂所引起的神经突消退,对因奥沙利铂所引起的神经突消退更强烈地发挥作用(图7-1)。

[0260] [试验例7-2]PC-SOD在因卡铂所引起的神经突损伤中的神经保护效果

[0261] “方法”

[0262] 将PC12细胞以5000个细胞/孔接种于包被胶原蛋白的24孔板。24小时后将培养基更换为分化培养基(含有100ng/mL NGF和0.5%FBS的RPMI-1640),进而培养96小时。在神经突伸长后,单独用卡铂(最终浓度50 μ M)来培养24小时,或用含有卡铂与PC-SOD(最终浓度10、20、50、100 μ g/mL)的分化培养基的组合来培养24小时。通过显微镜(Keyence BZ-X800)获取细胞的图像,使用图像解析软件ImageJ(NIH)来测量神经突的长度。各组设置三次重复,每孔分析30个细胞。图表表示各组的平均值,通过Tukey检验来进行多重比较(*:p<0.05)。

[0263] “结果与解释”

[0264] 通过添加卡铂而神经突消退,但通过同时添加PC-SOD,呈PC-SOD浓度依赖性地抑制神经突消退。提示PC-SOD保护神经突免受因卡铂所引起的神经突损伤(图7-2)。

[0265] [试验例7-3]PC-SOD在因紫杉醇所引起的神经突损伤中的神经保护效果

[0266] “方法”

[0267] 将PC12细胞以5000个细胞/孔接种于包被胶原蛋白的24孔板。24小时后将培养基更换为分化培养基(含有100ng/mL NGF和0.5%FBS的RPMI-1640),进而培养96小时。在神经突伸长后,单独用紫杉醇(结果图中简写为PTX,最终浓度0.1 μ M)来培养24小时,或者用含有紫杉醇与PC-SOD(最终浓度10、50、100 μ g/mL)的分化培养基的组合来培养24小时。通过显微镜(Keyence BZ-X800)获取细胞的图像,使用图像解析软件ImageJ(NIH)来测量神经突的长度。各组设置三次重复,每孔分析30个细胞。图表表示各组的平均值,通过Tukey检验来进行多重比较(*:p<0.05)。

[0268] “结果”

[0269] 通过添加紫杉醇而神经突消退,但通过同时添加PC-SOD,呈PC-SOD浓度依赖性地抑制神经突消退。显示PC-SOD也保护神经突免受因紫杉醇所引起的神经突损伤(图7-3)。

[0270] [试验例8]PC-SOD与锰福地吡在因奥沙利铂所引起的神经突损伤中的神经保护效果的比较

[0271] “概要”

[0272] 使用PC12细胞,对因奥沙利铂所引起的神经突损伤中的PC-SOD的神经保护效果与具有SOD样活性的锰福地吡的效果进行比较。

[0273] “方法”

[0274] 将PC12细胞以5000个细胞/孔接种于包被胶原蛋白的24孔板。24小时后将培养基更换为分化培养基(含有100ng/mL NGF和0.5%FBS的RPMI-1640),进而培养96小时。在神经突伸长后,单独用奥沙利铂(最终浓度20 μ M)来培养24小时,或者用含有奥沙利铂与PC-SOD(最终浓度50 μ g/mL)或锰福地吡(最终浓度1、5、10、20、50 μ g/mL)的分化培养基来培养24小时。通过显微镜(Keyence BZ-X800)获取细胞的图像,使用图像解析软件ImageJ(NIH)来测

量神经突的长度。各组设置三次重复,每孔分析30个细胞。图表表示各组的平均值,通过Tukey检验来进行多重比较(*:p<0.05)。

[0275] “结果与解释”

[0276] 关于因添加奥沙利铂所引起的神经突消退,通过同时添加50 μ g/mL的PC-SOD而几乎完全得到抑制。另一方面,当同时添加锰福地吡时,在5 μ g/mL的浓度下可见较弱的抑制倾向,但即便以高浓度添加,也无法确认到进一步的消退抑制效果。根据该结果,显示相较于锰福地吡,PC-SOD具有更强的神经保护效果(图8)。

[0277] [试验例9]PC-SOD与锰福地吡的细胞毒性浓度的比较

[0278] “概要”

[0279] 使用通过NGF进行了分化的PC12细胞,对在奥沙利铂的存在下/不存在下因PC-SOD和锰福地吡而产生细胞毒性的浓度进行研究。

[0280] “方法”

[0281] 将PC12细胞以10000个细胞/孔接种于包被胶原蛋白的96孔板,24小时后将培养基更换为分化培养基(含有100ng/mL NGF和0.5%FBS的RPMI-1640),进而培养72小时。在奥沙利铂(最终浓度20 μ M)的存在下/不存在下,添加PC-SOD(最终浓度10、50、100、200、500 μ g/mL)或锰福地吡(最终浓度1、5、10、20、50 μ g/mL),培养24小时。细胞的存活率通过中性红检测来进行分析(*:p<0.05)。各组设置三次重复,图表表示各组的平均值。通过Tukey检验来进行多重比较(*:p<0.05)。

[0282] “结果与解释”

[0283] 显示在奥沙利铂的存在下/不存在下,在添加PC-SOD而表现出神经保护效果的浓度下,均不会影响细胞的存活率,表现出药效的浓度与产生细胞毒性的浓度存在差异。另一方面,可知添加锰福地吡会使细胞存活率呈浓度依赖性地降低,在低于可以观察到较弱的神经保护效果的浓度的浓度下也产生细胞毒性。根据这些结果,显示出了相较于锰福地吡,PC-SOD的细胞毒性更低且安全性更高的可能性(图9)。

[0284] [试验例10]因顺铂所引起的肾障碍的评价

[0285] “概要”

[0286] 利用以下所示的方法测定因顺铂的投予所引起的肾脏的形态和重量的变化,由此能够确认本发明对因抗癌剂所引起的肾障碍的效果。

[0287] “方法”

[0288] 使用6~8周龄的SD系雄性大鼠(200~400g),向大鼠腹腔内投予3mg/kg顺铂(以下,有时简称为CIS)。投予持续4周每周实施2次,共计8次(第1、2、7、8、13、14、19、20天)。以相同的方式向对照组投予CIS的溶剂即生理盐水。CIS使用顺铂注射液50mg(日医工)。实验动物分成对照组、CIS给药组、CIS与PC-SOD 1mg/kg给药组(CIS+PC-SOD给药组)这3个组(各组n=6)。

[0289] 预防实验中,在CIS+PC-SOD给药组中,在投予CIS 5分钟~15分钟后向尾静脉投予PC-SOD。投予持续4周每周实施2次,共计8次(第1、2、7、8、13、14、19、20天)。以相同的方式向对照组和CIS给药组投予PC-SOD的溶剂。测定大鼠的肾脏的重量,用体重来修正肾脏重量的变化。另外,为了确认肾脏的大小和形态的变化,拍摄肾脏的照片(比例尺=10mm)。

[0290] 关于病理解析,将所采集的肾脏在矢状面上进行切割,通过10%福尔马林固定后,

使用Histos5 (Milestone) 和包埋机 (EG1160, Leica), 制作石蜡块。样品块使用切片机 (MR2245, Leica), 以 $3\mu\text{m}$ 的厚度进行切片而制作载玻片。对于所制作的载玻片, 在病情评价中进行过碘酸希夫 (Periodic acid Schiff, PAS) 染色法, 在纤维化的评价中进行天狼星红染色, 通过免疫染色法对作为纤维化标记的 α -SMA进行染色, 通过显微镜 (BZ-X800, Keyence 公司) 的光学显微镜功能, 以倍率: 40、100倍进行观察。关于观察、评价, 对整个切片进行观察, 随机选取4~9张引起障碍的皮质侧的组织图像, 在病情变化中对炎症、肾小管坏死、或肾小管中的蛋白凝集、液泡化、坏死进行评价, 在纤维化的评价中对皮质侧的纤维素、或抗体阳性部分进行观察、评价。比例尺=500 μm (图11-1), 比例尺=200 μm (图11-2、图11-3)。

[0291] “结果与解释”

[0292] PC-SOD对因CIS所引起的肾障碍的效果以肾脏重量的变化作为指标来评价。结果示于图10-1和图10-2。将各组的肾脏的照片示于图10-1。CIS给药组中, 相较于对照组, 确认到肾脏重量增加和肿大。与其相对, CIS+PC-SOD (1mg/kg) 给药组中, 确认到抑制因CIS所引起的肾脏重量增加和肾脏肿大的效果 (图10-2)。

[0293] 将PC-SOD对因CIS所引起的肾脏的病理损伤的给药结果示于图11-1。CIS给药组中, 相较于对照组, 确认到液泡化、肾小管中的蛋白质凝集、炎症细胞的凝集等病理损伤现象 (箭头, 液泡化、肾小管中的蛋白质凝集、炎症细胞的浸润等)。与其相对, 在投予了CIS+PC-SOD (1mg/kg) 的组中, 对因CIS所引起的肾脏的病理损伤表现出抑制效果。其次, 将PC-SOD对因CIS所引起的肾纤维化的给药结果示于图11-2、图11-3。在天狼星红染色和 α -SMA染色的结果中, CIS给药组中, 相较于对照组, 确认到在肾小管间质部高表达纤维蛋白 (箭头表示纤维化、纤维蛋白阳性部分)。与其相对, 在投予了CIS+PC-SOD (1mg/kg) 的组中, 确认到所检测出的因CIS所引起的肾脏的纤维化阳性部分减少。

[0294] 根据以上的结果, 可知PC-SOD对于因CIS所引起的肾脏的肿大、纤维化具有抑制效果, 能够确认到PC-SOD针对作为CIS的严重副作用之一的肾障碍具有减轻副作用的预防效果。

[0295] 尤其是, 认为伴随抗癌剂的给药的肾脏肿大与因少尿所引起的水分滞留密切相关, 因此提示PC-SOD对伴随抗癌剂的给药的肾障碍中伴有少尿的肾障碍有效。

[0296] 另外, 正式试验中, 顺铂持续4周每周投予2次。由此, 可以认为在正式试验体系中会发生顺铂肾病。一般而言, 急性肾障碍是指在数小时~数天之间发生的肾障碍, 且慢性肾障碍 (慢性肾病) 是指“肾脏的损伤”或“肾功能下降”持续3个月以上的状态, 因此提示了如下可能性: PC-SOD抑制肾脏肿大和纤维化的效果在从急性肾障碍向慢性肾障碍的过渡期、优选为从急性顺铂肾病向慢性顺铂肾病的过渡期发挥作用。

[0297] [试验例11] PC-SOD对因抗癌剂所引起的RAW细胞毒性的效果

[0298] “概要”

[0299] 抗癌剂对RAW细胞表现出毒性。对此, 对PC-SOD是否表现出抑制作用进行试验。

[0300] “方法”

[0301] 将RAW细胞以20000个细胞/孔 (含有10%灭活FBS的D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 达尔伯克改良伊格尔培养基) 高糖培养基) 接种于96孔板。24小时后单独添加吉西他滨、单独添加奥沙利铂、单独添加顺铂、且单独添加卡铂, 或者添加吉西他滨与PC-SOD、奥沙利铂与PC-SOD、顺铂与PC-SOD、卡铂与PC-SOD。24小时后, 使用CellTiter-Glo™

2.0Cell Viability Assay (CellTiter-Glo™ 2.0细胞存活率分析, Promega)、和酶标仪 (Tecan, Infinite M Plex) 来测定化学发光, 由此算出活细胞数。各组分析4孔的细胞。图表表示各组的平均值, 通过Dunnett检验来进行多重比较 (* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ vs 对照组、#: $p < 0.05$ 、##: $p < 0.01$ vs 单独抗癌剂)。

[0302] “结果与评价”

[0303] 观察到通过单独吉西他滨、单独奥沙利铂、单独顺铂、和单独卡铂的处理, 活细胞数呈抗癌剂的浓度依赖性地下降 (图12-1)。另一方面, 通过同时添加PC-SOD, 呈PC-SOD浓度依赖性显著抑制依赖于抗癌剂的活细胞数下降。根据这些结果, 显示PC-SOD保护血细胞免受因抗癌剂所引起的细胞毒性 (图12-2)。

[0304] [试验例12] PC-SOD对因抗癌剂所引起的RAW细胞的活性氧产生的效果

[0305] “概要”

[0306] 抗癌剂促进RAW细胞的活性氧产生。对此, 对PC-SOD是否表现出活性氧产生抑制作用进行试验。

[0307] “方法”

[0308] 将RAW细胞以20000个细胞/孔 (含有10%灭活FBS的D-MEM高葡萄糖培养基) 接种于荧光用96孔板。24小时后单独添加吉西他滨、单独添加奥沙利铂、单独添加顺铂、且单独添加卡铂, 或者添加吉西他滨与PC-SOD、奥沙利铂与PC-SOD、顺铂与PC-SOD、卡铂与PC-SOD。16小时后, 用溶解有MitoSOX™红色线粒体超氧化物指示剂 (MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator, Invitrogen™) 的HBSS溶液 (Hank's Balanced Salt Solution, 汉克氏平衡盐溶液) 进行30分钟处理, 然后更换为含有1%灭活FBS的D-MEM高葡萄糖培养基。使用酶标仪 (Tecan, Infinite M Plex) 来测定荧光 (Ex 510nm, Em 580nm), 由此算出线粒体中的活性氧产生。各组分析4孔的细胞。图表表示各组的平均值, 通过Dunnett检验来进行多重比较 (* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ vs 对照组、#: $p < 0.05$ 、##: $p < 0.01$ vs 单独抗癌剂)。

[0309] “结果与评价”

[0310] 观察到通过单独吉西他滨、单独奥沙利铂、单独顺铂和单独卡铂的处理, 活性氧呈抗癌剂的浓度依赖性产生 (图13-1)。另一方面, 通过同时添加PC-SOD, 呈PC-SOD浓度依赖性显著抑制依赖于抗癌剂的活性氧产生 (图13-2)。根据这些结果, 显示PC-SOD抑制因抗癌剂所引起的线粒体中的活性氧产生。另外, 如果结合活细胞数分析的结果进行探讨, 则显示PC-SOD通过抗氧化作用保护血细胞免受因抗癌剂所引起的细胞毒性 (图13)。

[0311] [试验例13] 因顺铂所引起的骨髓抑制的评价

[0312] “概要”

[0313] 利用以下所示的方法对因顺铂的授予所引起的外周血的血细胞的变化进行分析, 由此能够确认本发明对因抗癌剂所引起的骨髓抑制的效果。

[0314] “方法”

[0315] 使用6~8周龄的SD系雄性大鼠 (200~400g), 向大鼠腹腔内授予顺铂 (以下, 有时简称为CIS) 3mg/kg。授予持续4周每周实施2次, 共计8次 (第1、2、7、8、13、14、19、20天)。以相同的方式向对照组授予CIS的溶剂即生理盐水。CIS使用顺铂注射液50mg (日医工)。实验动物分成对照组、CIS给药组、CIS与PC-SOD 1mg/kg给药组 (CIS+PC-SOD给药组) 这3个组 (各组 $n=6$)。预防实验中, 在CIS+PC-SOD给药组中, 授予CIS 5分钟~15分钟后向尾静脉授予PC-

SOD。授予持续4周每周实施2次,共计8次(第1、2、7、8、13、14、19、20天)。以相同的方式向对照组和CIS给药组授予PC-SOD的溶剂。外周血在第3天从大鼠的尾静脉采集,通过自动血细胞计数器(MEK-6458,日本光电)实施外周血分析。

[0316] “结果与解释”

[0317] 确认到通过授予CIS而白血细胞(WBC)、血小板(PLT)下降,但在同时授予PC-SOD的组中,白血细胞、血小板的下降得到抑制。

[0318] 根据以上的结果,提示PC-SOD保护因CIS所引起的骨髓抑制(图14)。

[0319] [试验例14]PC-SOD的PC化部位的鉴定

[0320] PC-SOD典型地按照专利文献14、15或专利文献16中所记载的方法、更优选为专利文献16中所记载的方法制造。根据这些文献可理解,当制造PC-SOD时,在溶剂的存在下使PC结合于SOD,因此PC所结合的SOD的氨基酸残基实质上无法对所有SOD分子严格地规定相同的部位。因此,本发明的PC-SOD是包含PC以各种个数和结合部位结合于SOD分子的PC-SOD分子的异质集合体。

[0321] 因此,关于“PC-SOD”的结构、尤其是PC-SOD中的PC的结合部位及其结合个数,在一定程度的范围内规定PC能够结合的SOD的氨基酸残基、及其结合比例,可谓最大限度地明确记载PC-SOD的结构。

[0322] 根据上述观点,认为最佳方法是对PC-SOD的结构来分析PC实际结合的SOD的氨基酸残基、及它们的结合比例。

[0323] 因此,为了鉴定PC-SOD的PC化部位,进行PC-SOD的酶消化和LC/MS分析。将所获得的PC-SOD的PC化部位和PC化比例示于图15。此外,用单字母表示的氨基酸后的数字表示从SOD分子中的N端起的残基数。

[0324] 将上述进行了2次的分析的结果的平均值示于下表。

[0325] [表1]

| SOD修饰部位 | 修饰率(平均) |
|-----------|---------|
| K3、N端或T2 | 5% |
| K9 | 23% |
| K23 | 63% |
| K36 | 43% |
| K70或K75 | 53% |
| K91 | 0% |
| K122或K128 | 27% |
| K136 | 33% |

[0327] 结果显示,存在PC具有选择性或定向性而优先结合的SOD分子内的氨基酸残基,且存在PC不结合的SOD分子内的氨基酸残基。

序列表

<110> 日本株式会社LTT生物医药
 <120> 用于治疗或预防伴随抗癌剂给药的障碍的医药组合物
 <130> LTT0013
 <150> JP 2021-083610
 <151> 2021-05-18
 <160> 1
 <210> 1
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Thr | Lys | Ala | Val | Cys | Val | Leu | Lys | Gly | Asp | Gly | Pro | Val | Gln | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ile | Ile | Asn | Phe | Glu | Gln | Lys | Glu | Ser | Asn | Gly | Pro | Val | Lys | Val | Trp |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Gly | Ser | Ile | Lys | Gly | Leu | Thr | Glu | Gly | Leu | His | Gly | Phe | His | Val | His |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Glu | Phe | Gly | Asp | Asn | Thr | Ala | Gly | Cys | Thr | Ser | Ala | Gly | Pro | His | Phe |
| | | 50 | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Asn | Pro | Leu | Ser | Arg | Lys | His | Gly | Gly | Pro | Lys | Asp | Glu | Glu | Arg | His |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | |
| Val | Gly | Asp | Leu | Gly | Asn | Val | Thr | Ala | Asp | Lys | Asp | Gly | Val | Ala | Asp |
| | | | | | 85 | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Val | Ser | Ile | Glu | Asp | Ser | Val | Ile | Ser | Leu | Ser | Gly | Asp | His | Cys | Ile |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | 110 | | |
| Ile | Gly | Arg | Thr | Leu | Val | Val | His | Glu | Lys | Ala | Asp | Asp | Leu | Gly | Lys |
| | | | 115 | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Gly | Gly | Asn | Glu | Glu | Ser | Thr | Lys | Thr | Gly | Asn | Ala | Gly | Ser | Arg | Leu |
| | | | 130 | | | | 135 | | | | | 140 | | | |
| Ala | Cys | Gly | Val | Ile | Gly | Ile | Ala | Gln | | | | | | | |
| 145 | | | | | | 150 | | | | | | | | | |

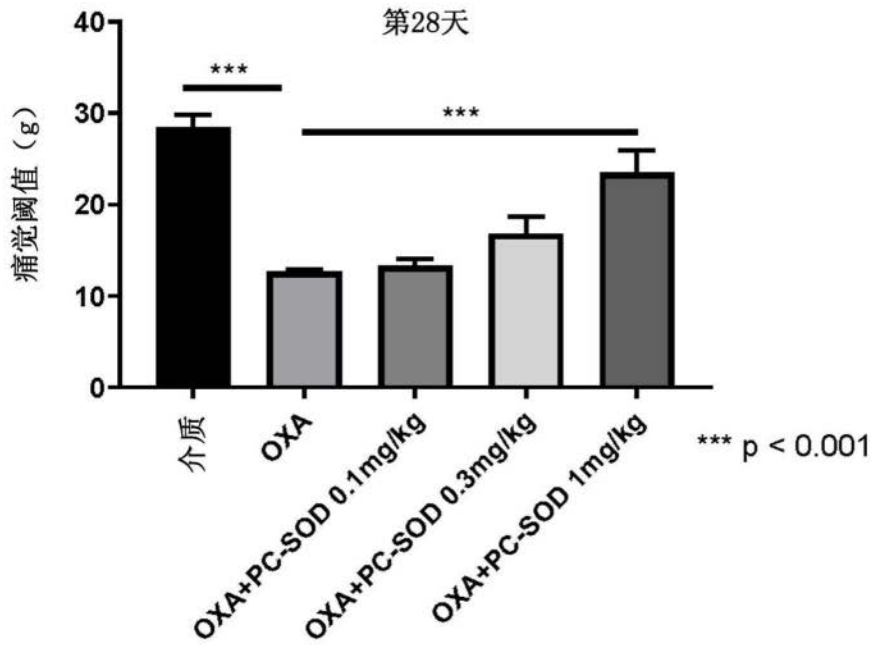
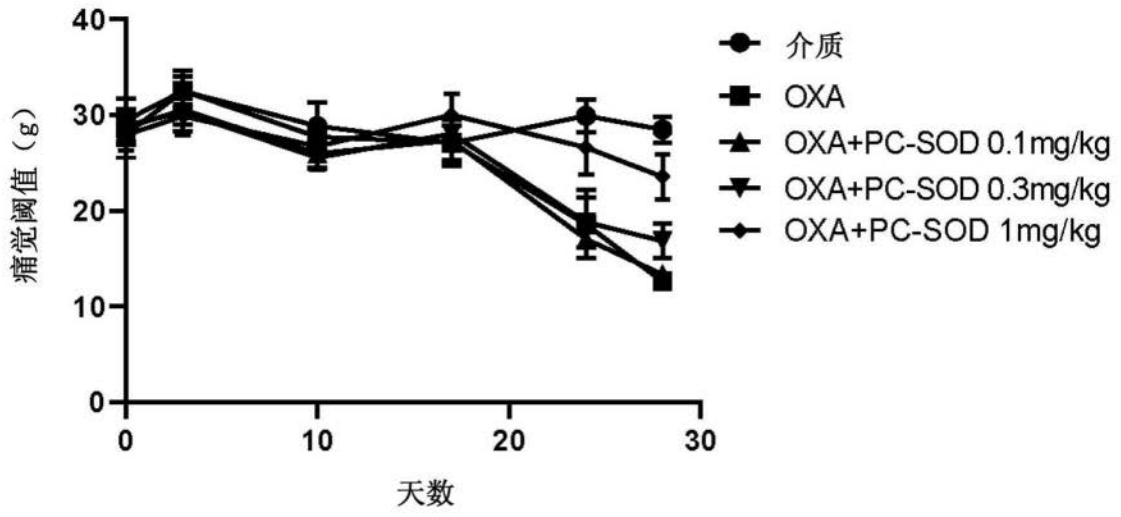


图1

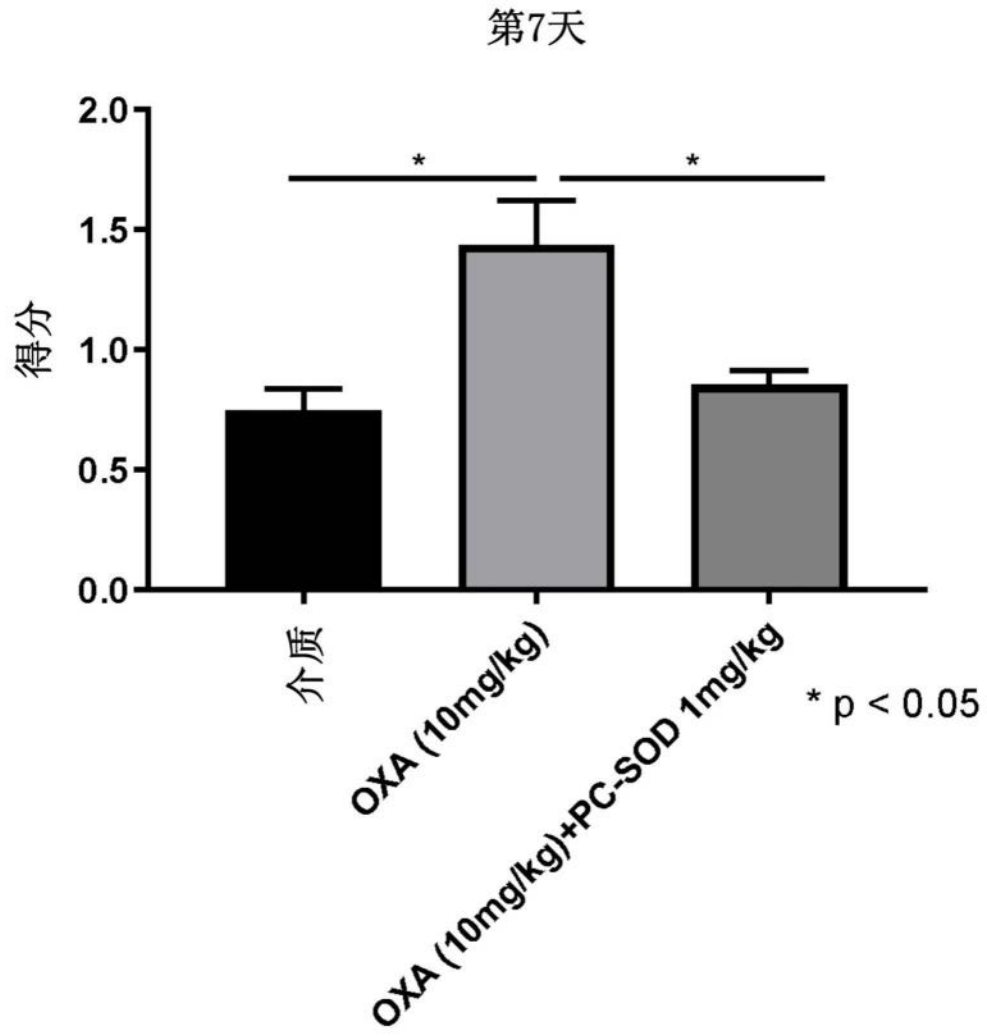
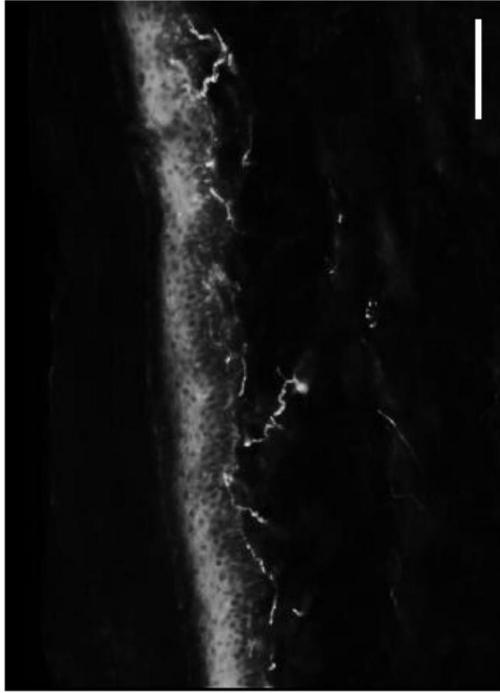
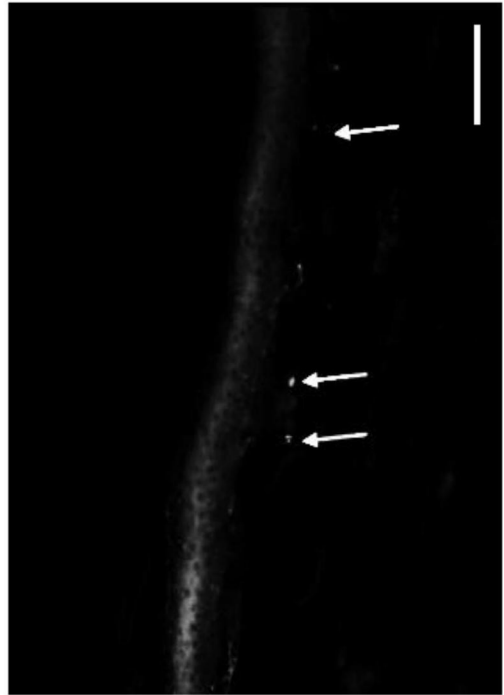


图2

介质



OXA



OXA+PC-SOD 1mg/kg

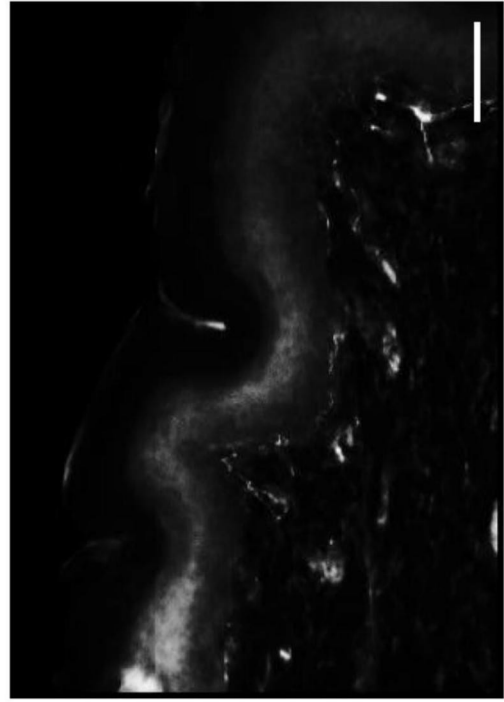
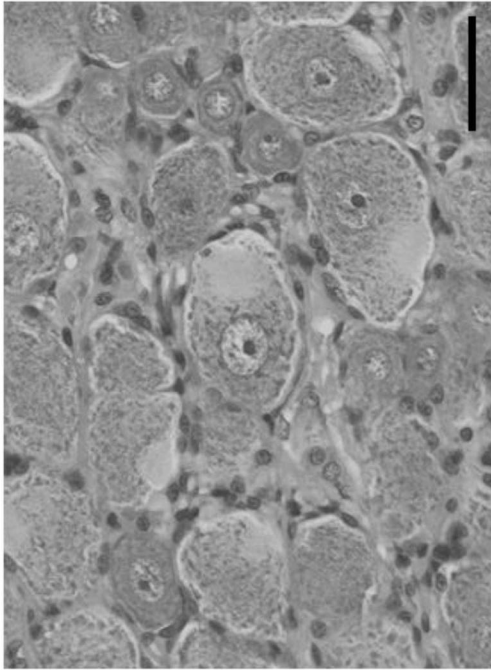
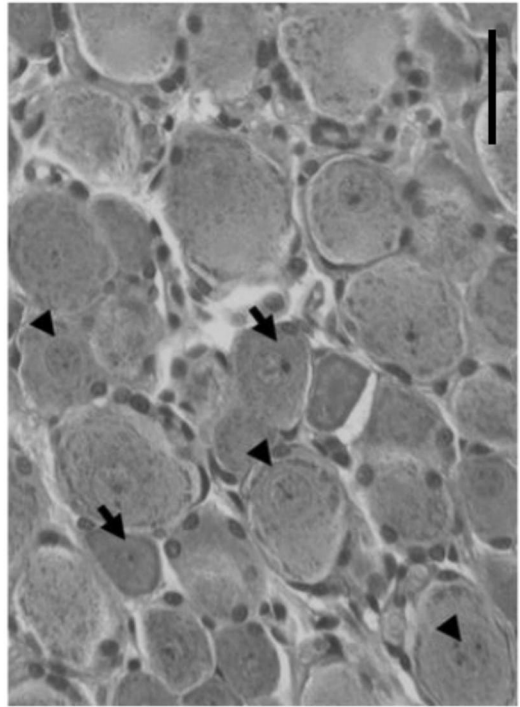


图3

介质



OXA



OXA+PC-SOD 1mg/kg

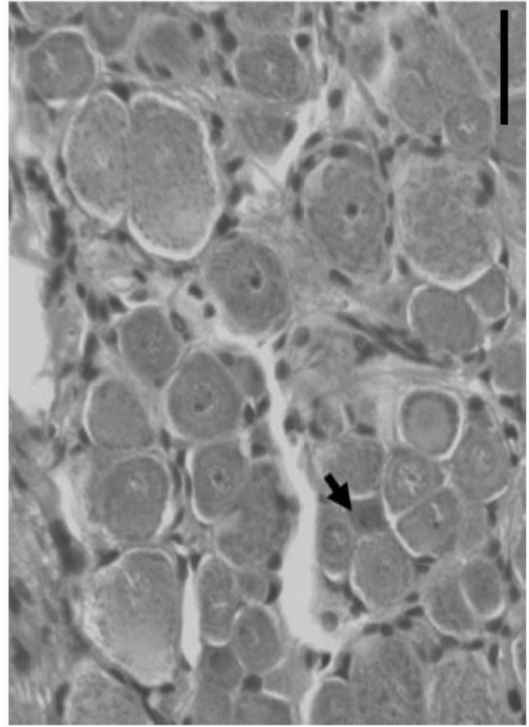


图4

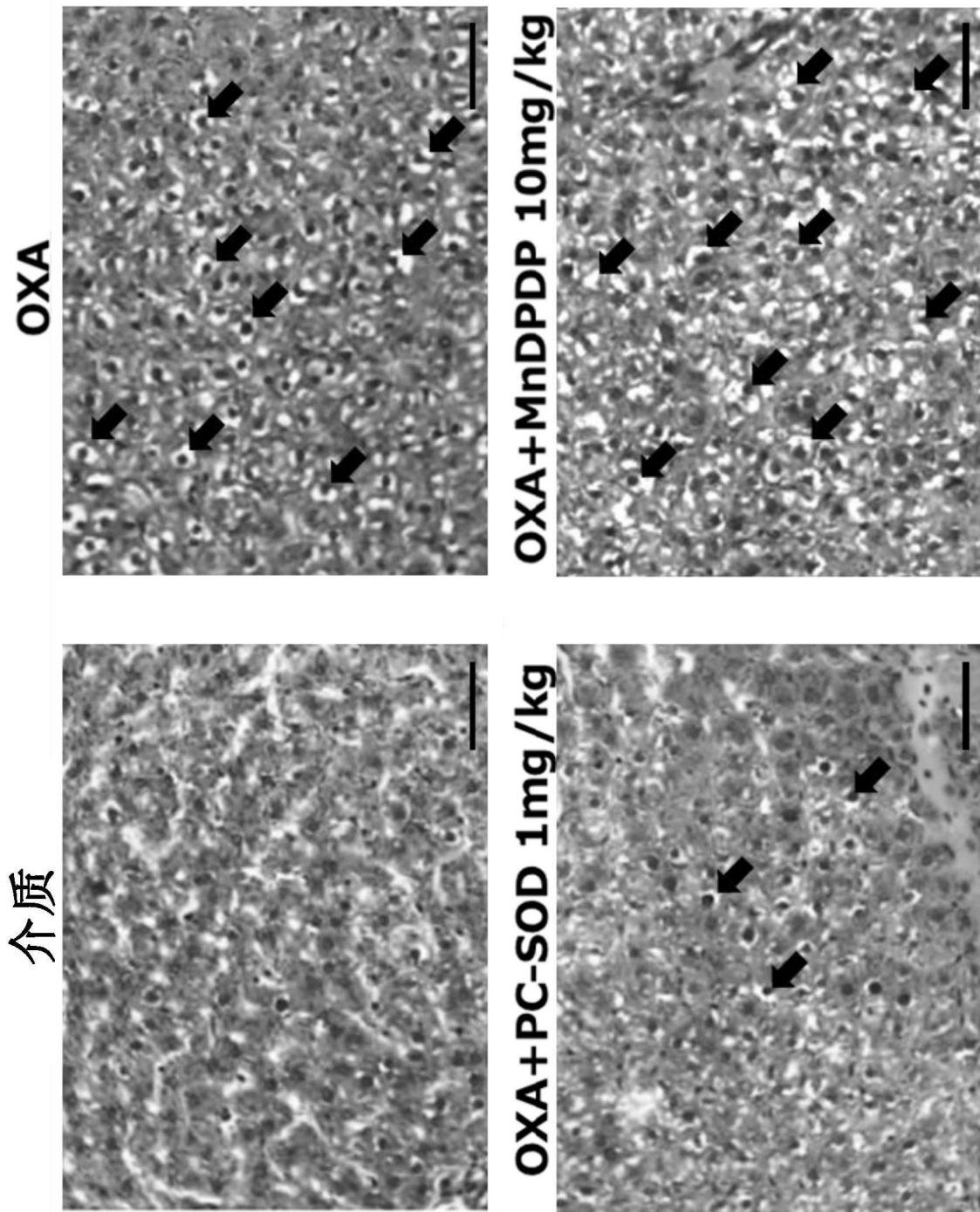


图5

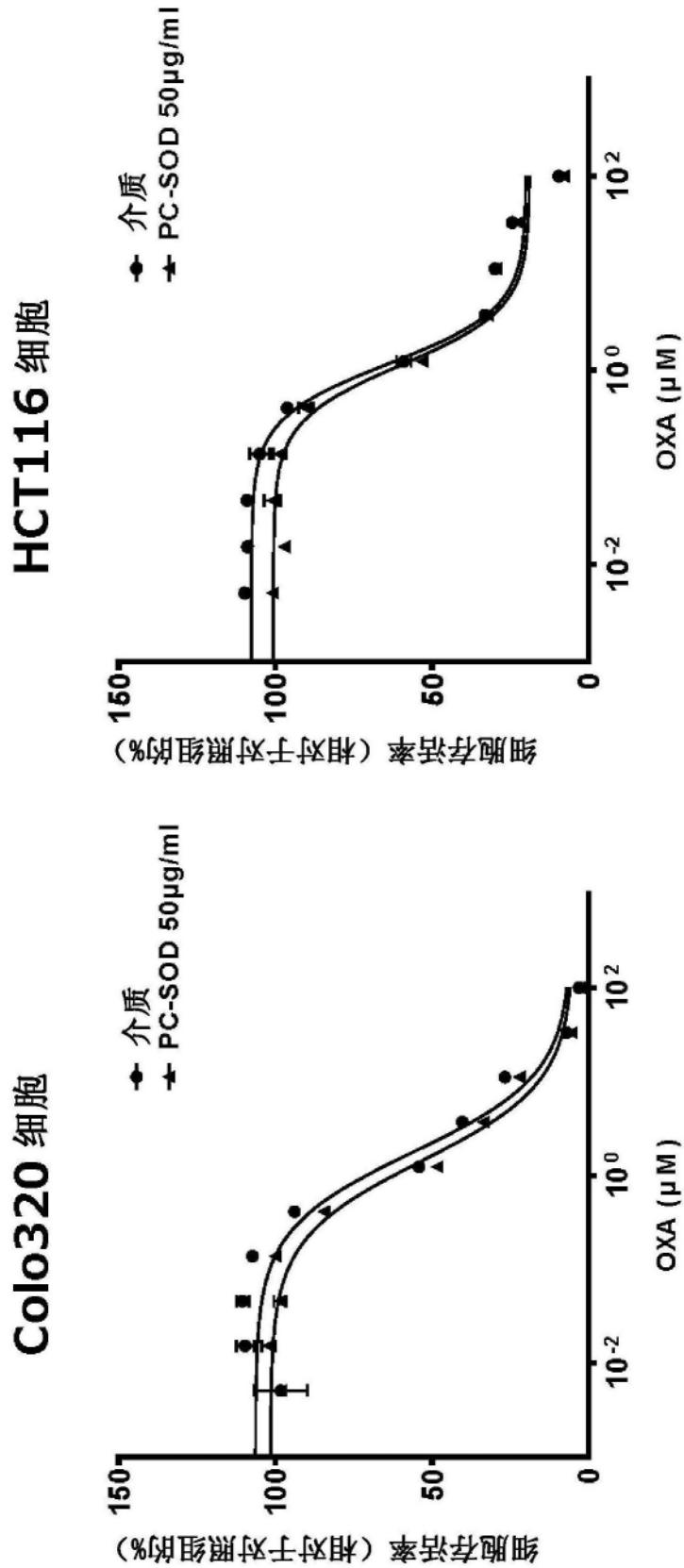


图6

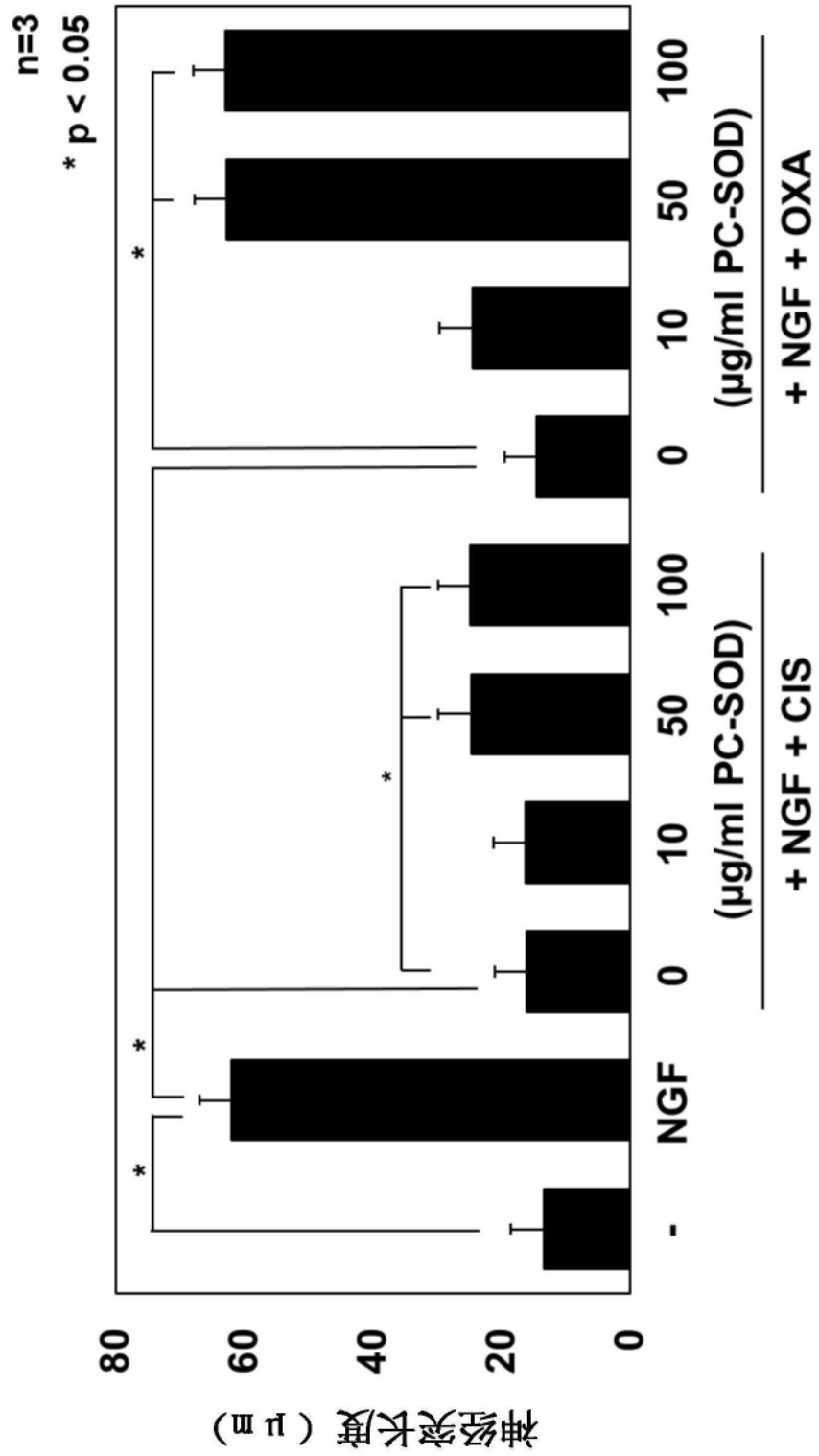


图7-1

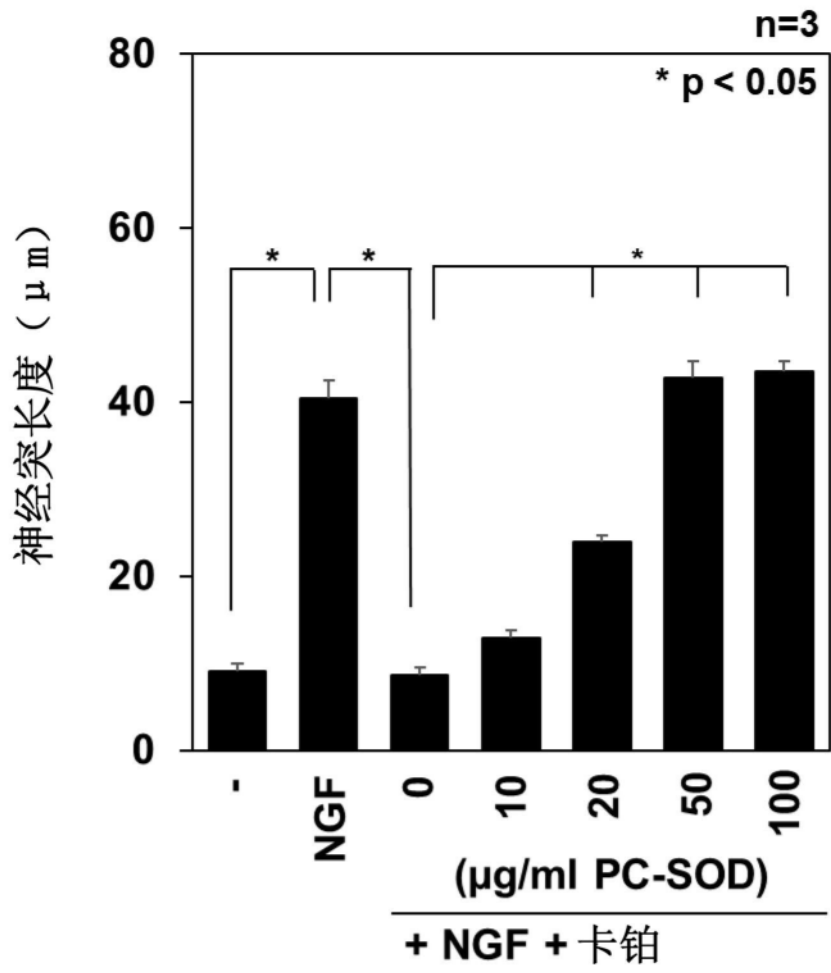


图7-2

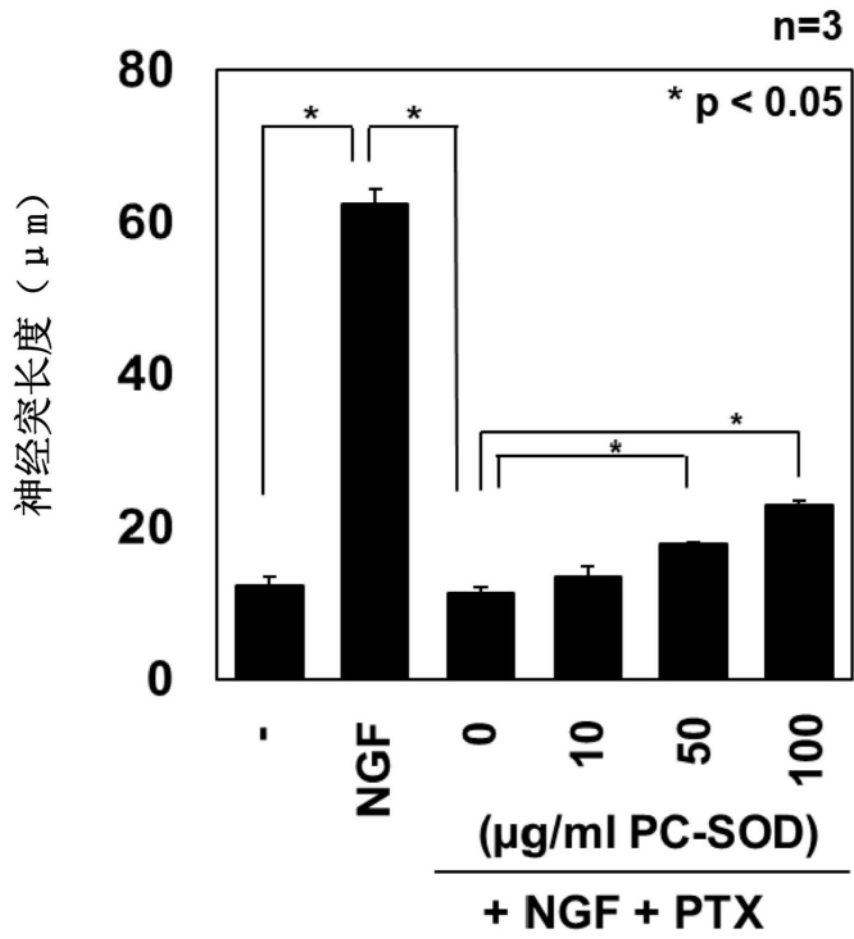


图7-3

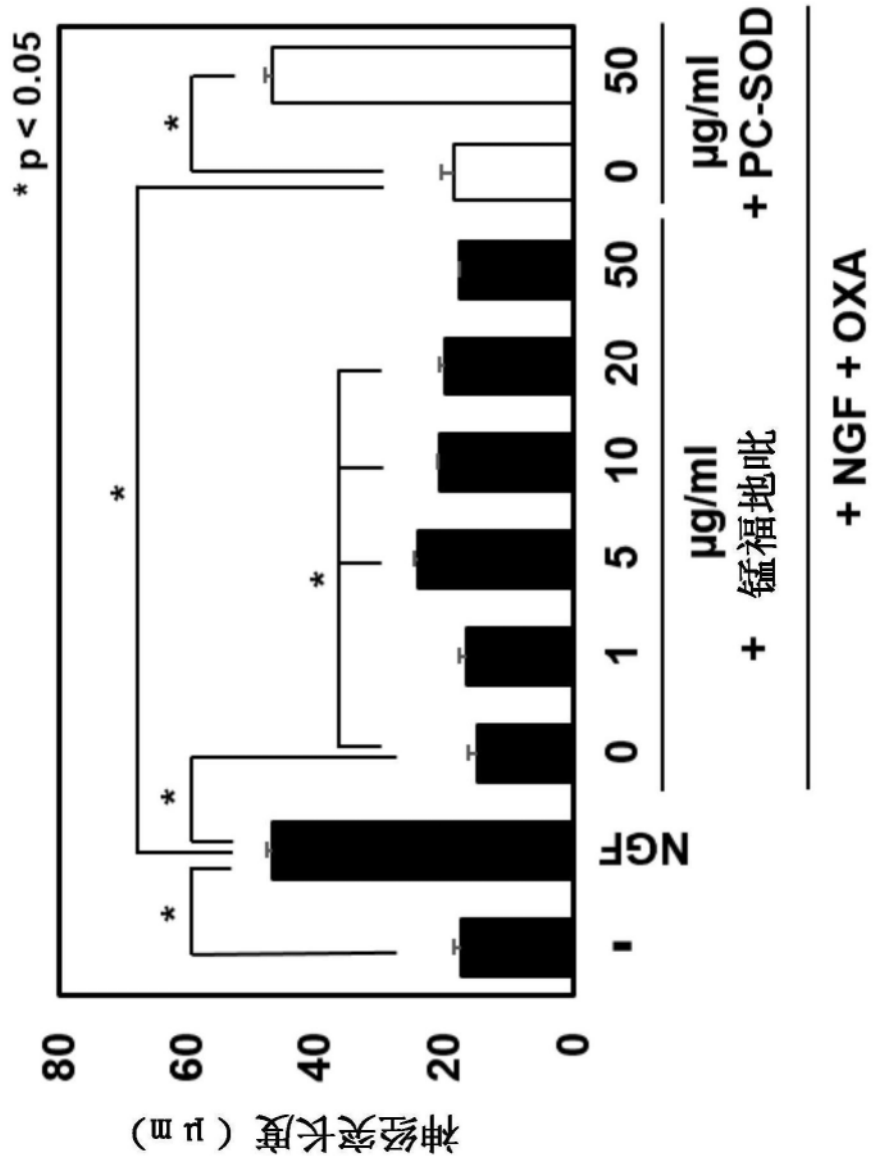


图8

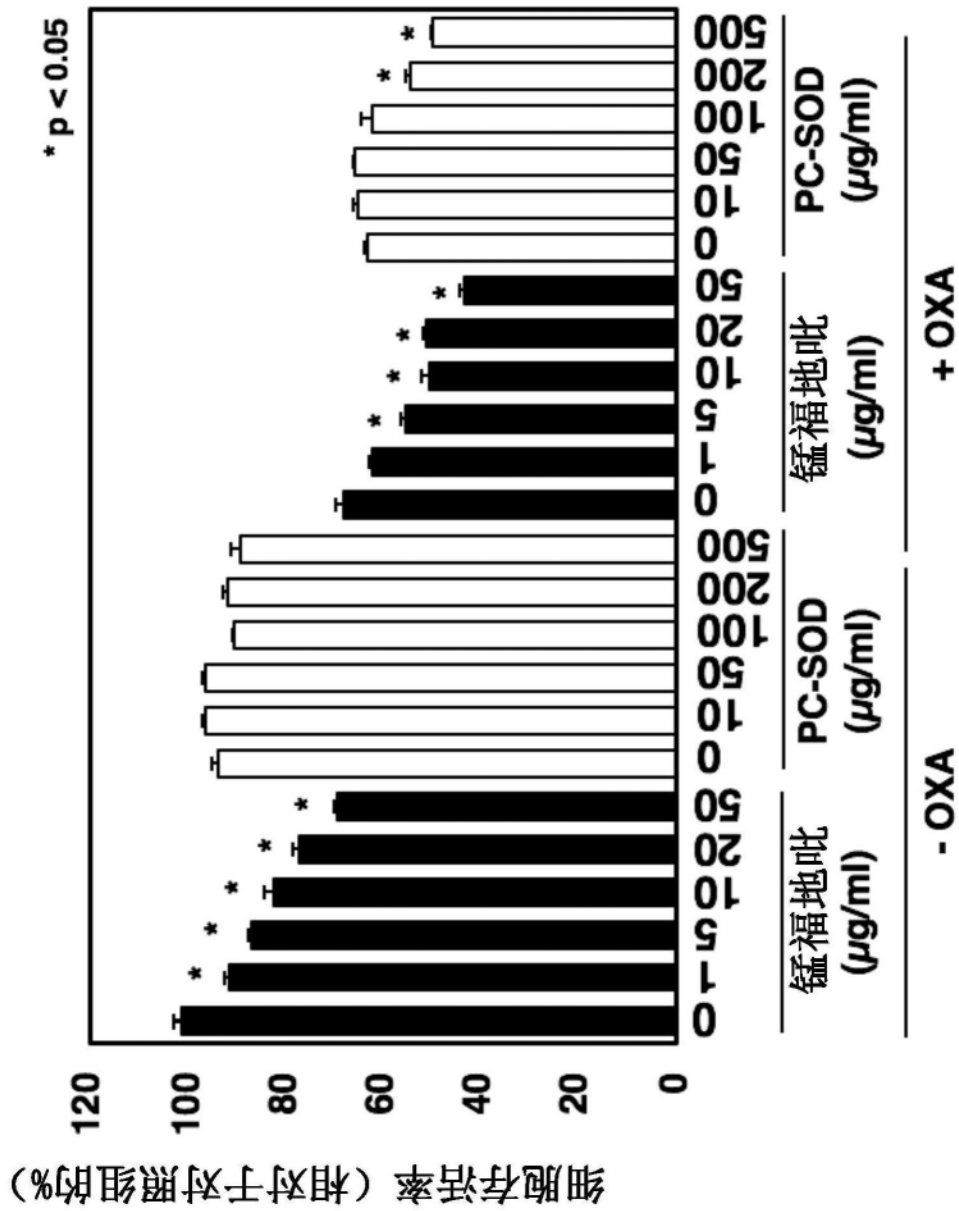


图9

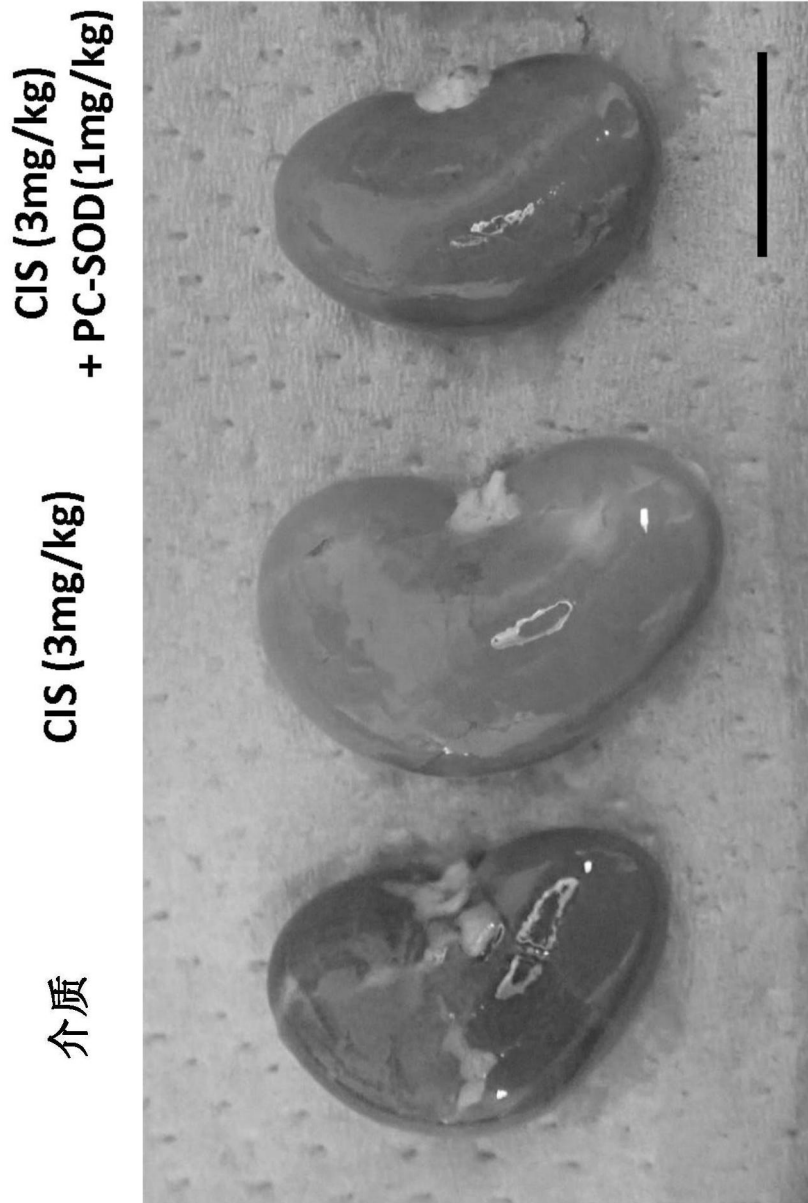


图10-1

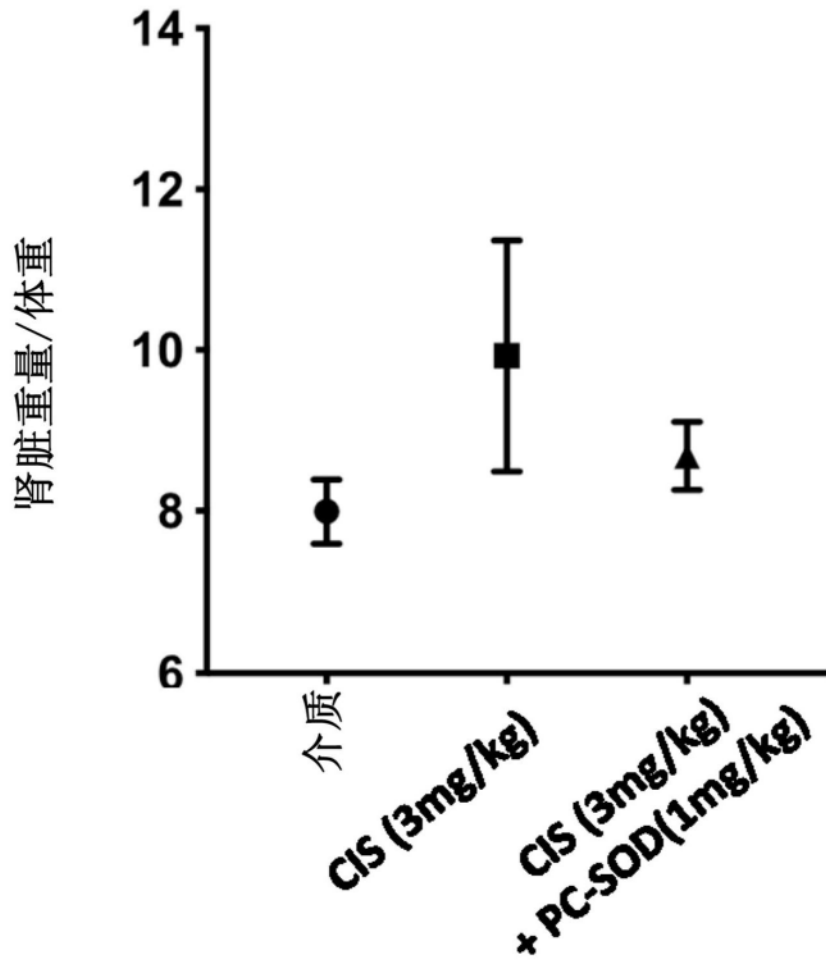


图10-2

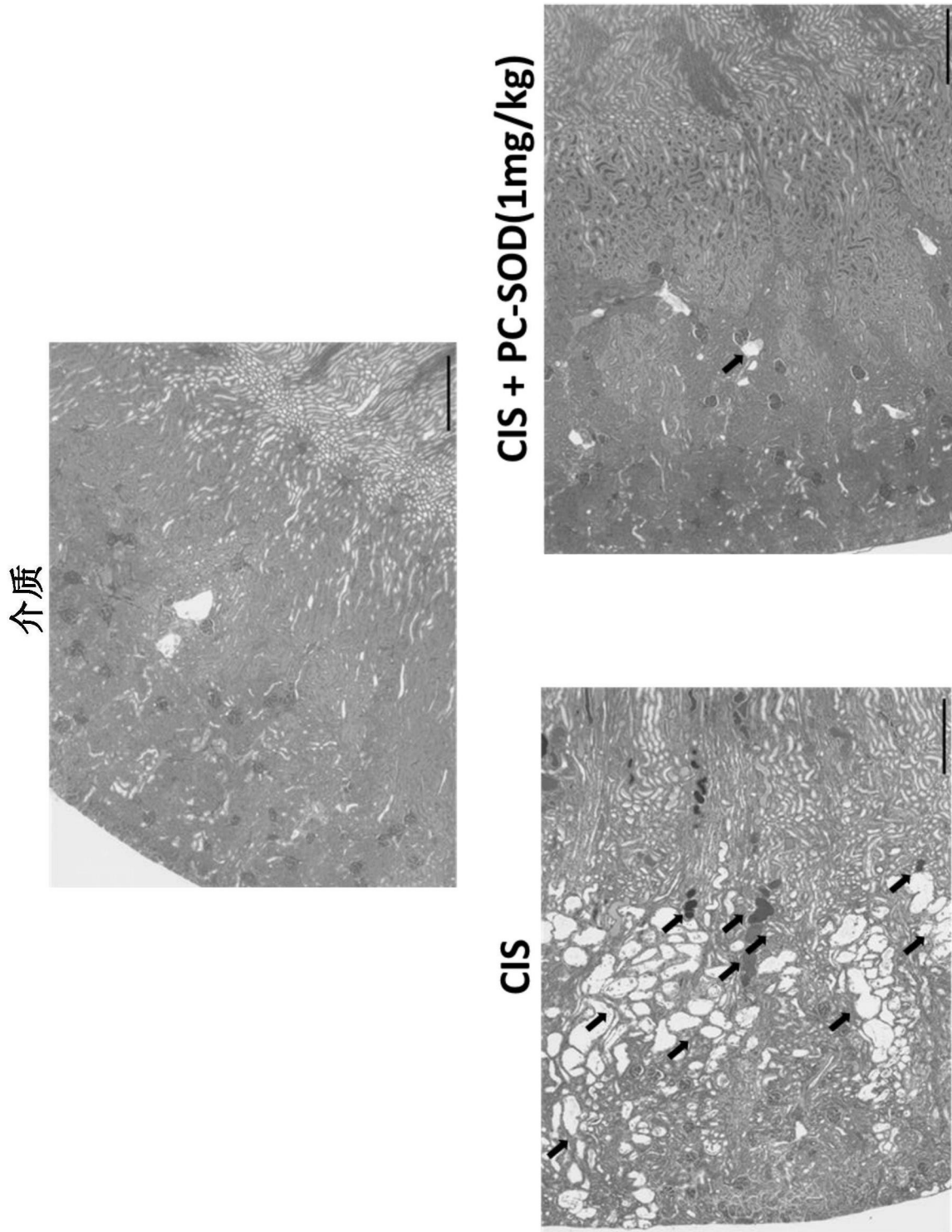
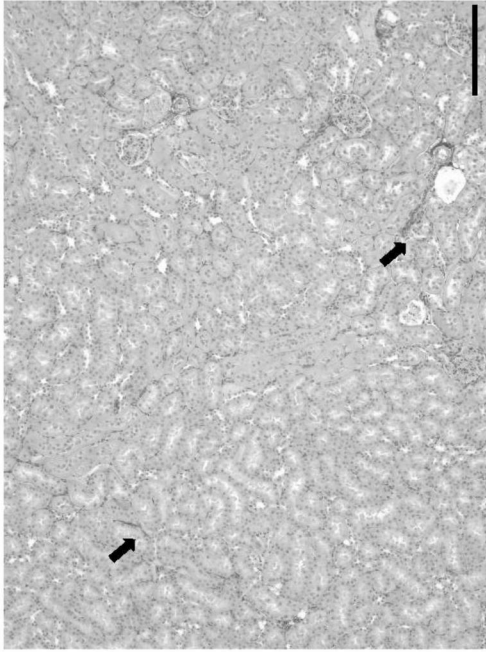
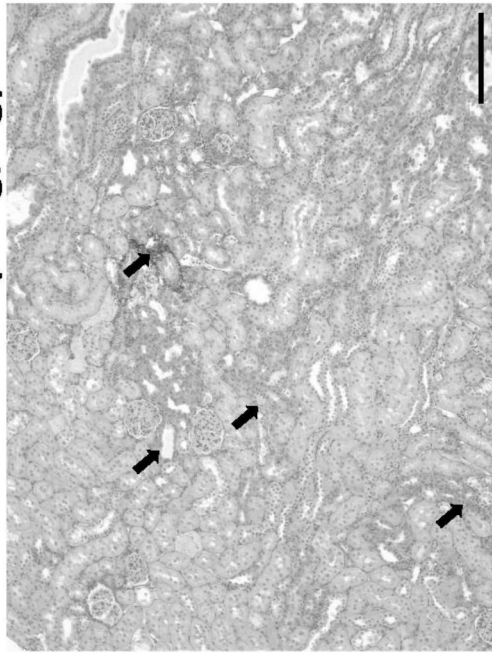


图11-1

介质



CIS + PC-SOD(1mg/kg)



CIS

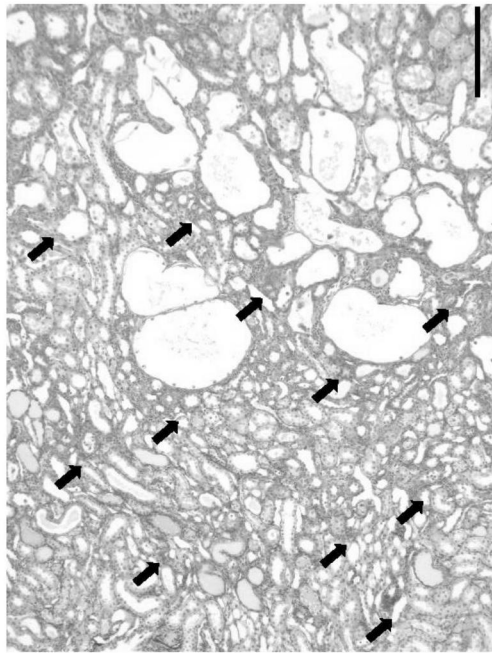


图11-2

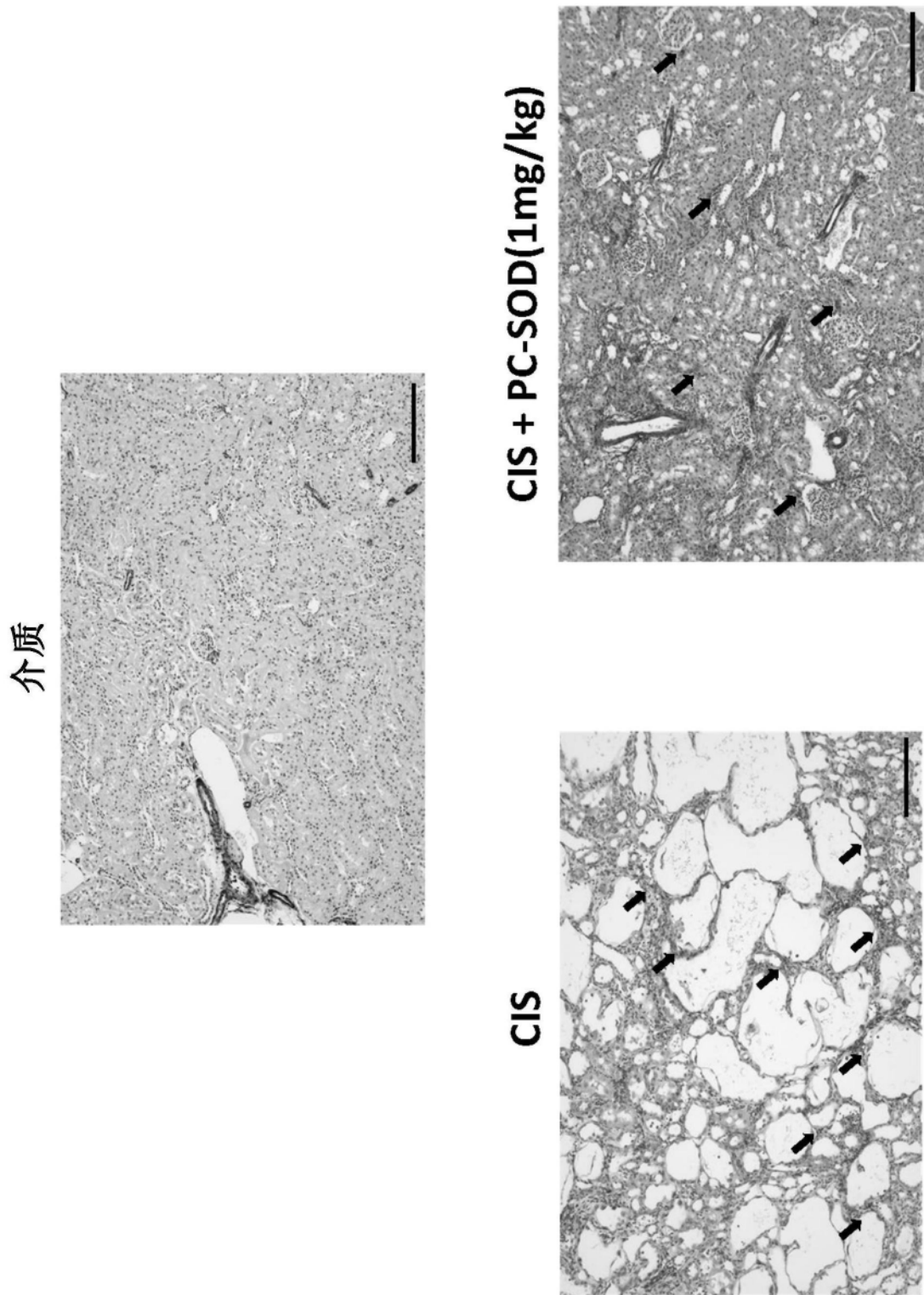


图11-3

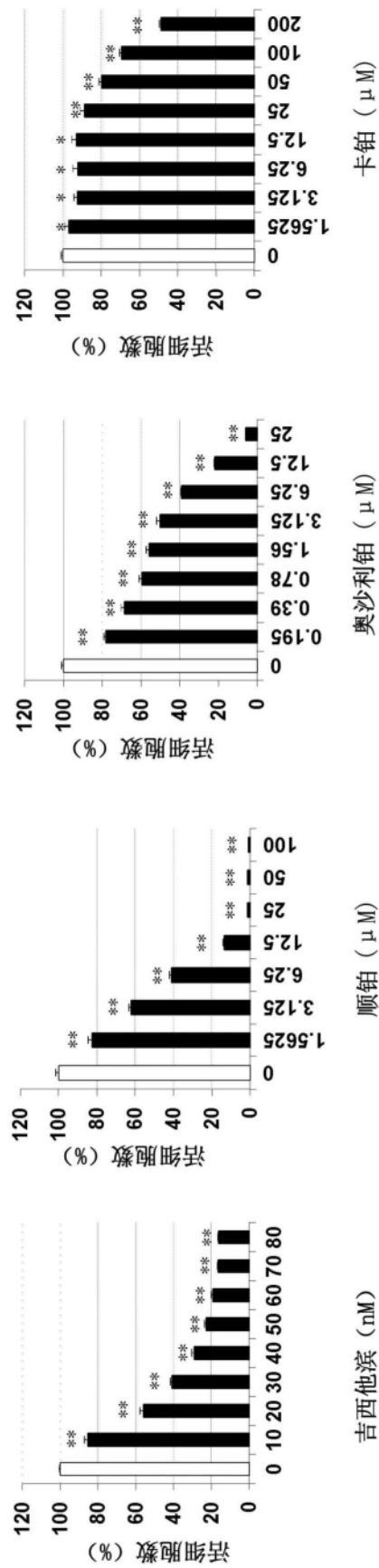


图12-1

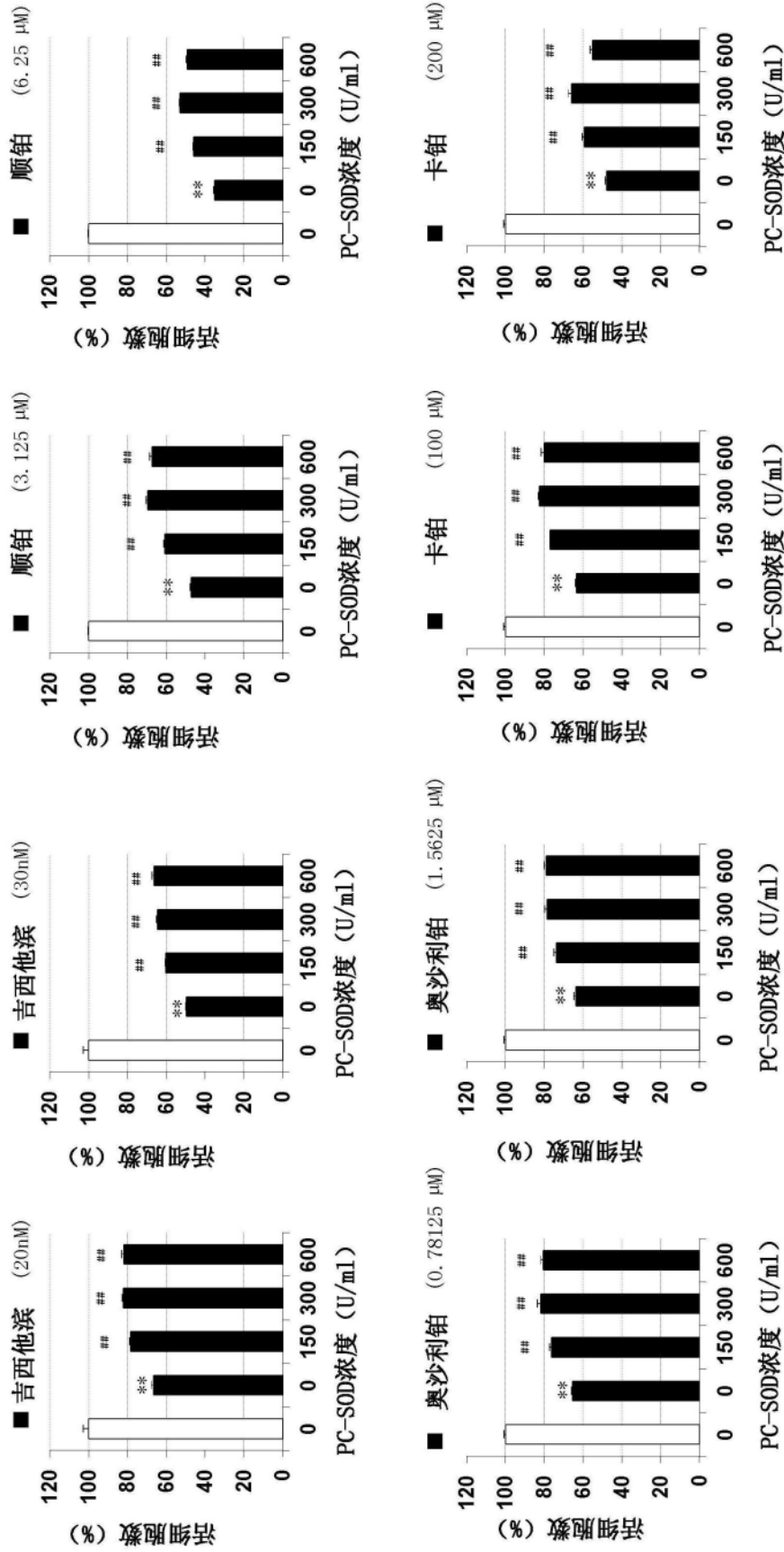


图12-2

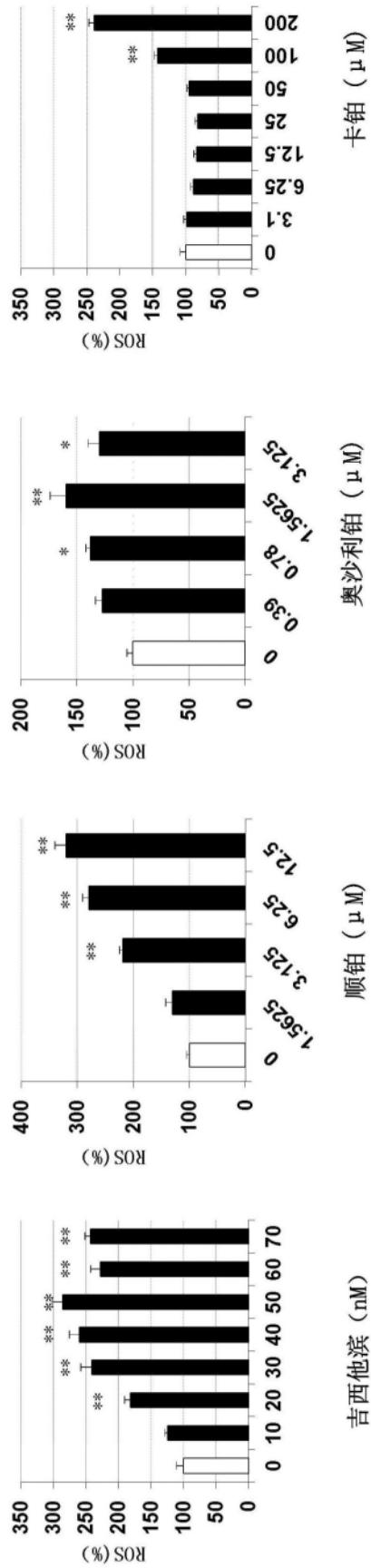


图13-1

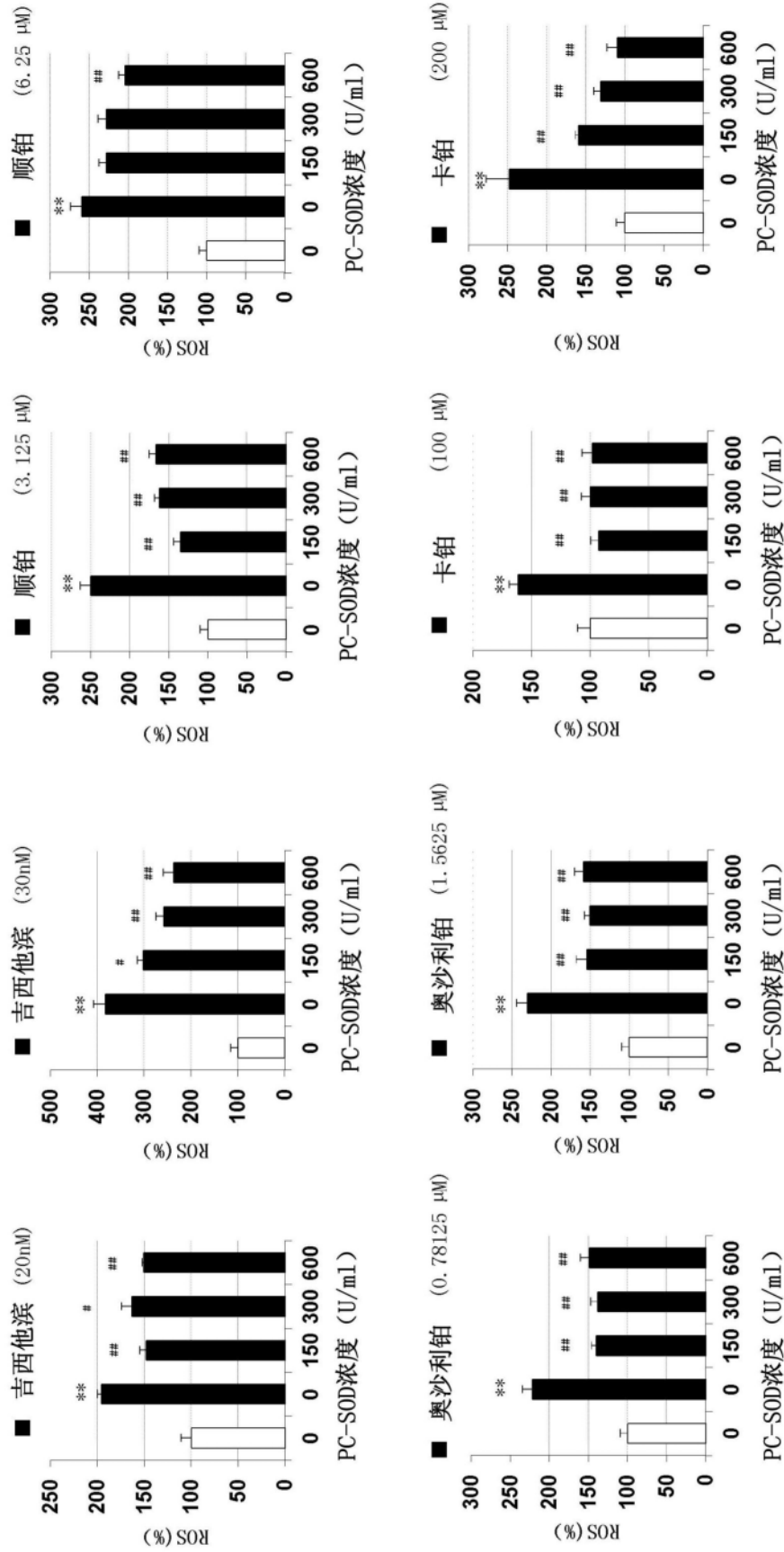


图13-2

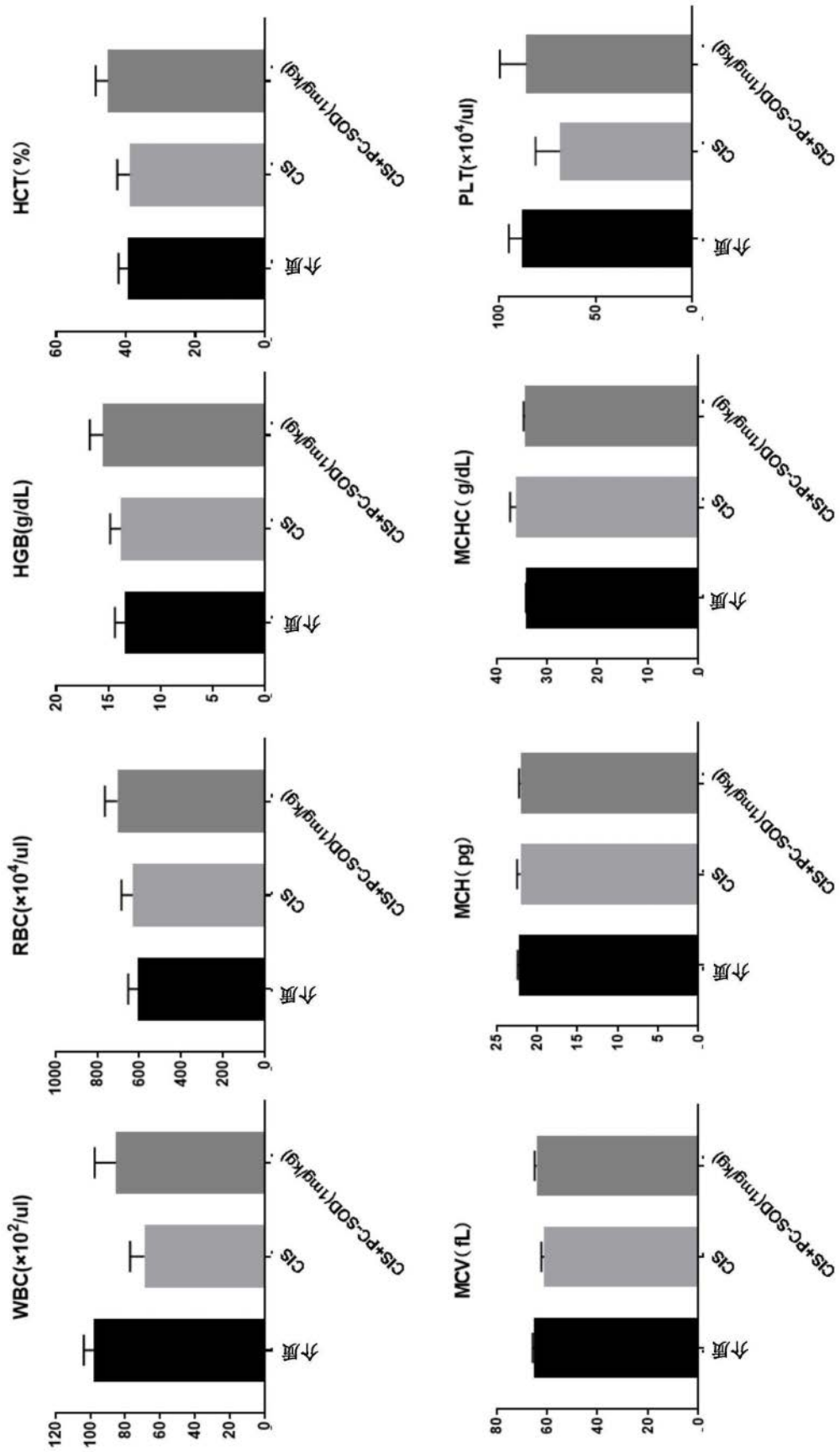


图14

