

**THE 1997  
PALM SPRINGS  
SYMPOSIUM ON HIV/AIDS**

**FOUNDATIONS OF HIV  
THERAPY**

**March 13 - 16, 1997  
Hyatt Regency Suites  
Palm Springs, CA**

## $\pi$ -WATER (MRN-100) POSSESSES ANTI-HIV ACTIVITY IN VITRO.

<sup>1</sup>Mamdooh Ghoneum, <sup>2</sup>Kim Choong and <sup>1</sup>Galal Namatalla,  
<sup>1</sup>Drew University of Medicine and Sci., 1621 E. 120<sup>th</sup> Street, Los Angeles, CA 90059, <sup>2</sup>University of California, Irvine, CA 92717.

We examined anti- HIV activity in vitro by  $\pi$ -water (MRN-100). The MRN-100 is an iron base compound derived from bivalent and trivalent ferrates. MRN-100 significantly enhanced the survival of HIV infected mononuclear cells (MNC). MNC were isolated from peripheral blood of healthy donors and activated by 5  $\mu$ g/ ml PHA for 3 days, infected by HIV-1 (equivalent to 3000pg/ml p24) for 1 h at 37 $^{\circ}$ c and resuspended in AIM-V medium at  $1 \times 10^6$  /ml. The infected cells were incubated in the presence of MRN-100 (0-100  $\mu$ l/ml) at 37 $^{\circ}$ c in 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cell viability was measured by MTT assay at 4, 7 and 11 days. Results showed that : 1) Infection with HIV demonstrated 50% MNC survival, 2) Treatment with MRN-100 at concentration of 25 $\mu$ l/ml significantly improved MNC survival (75%) , 3) Higher concentrations of 50-100  $\mu$ l/ml resulted in >85% recovery of cell survival and 4) cell recovery was detected as early as 4 days and maintained at the same value at 7 and 11 days post treatment with MRN-100. Another set of experiment were carried out to evaluate the cytotoxicity of  $\pi$ -water. Viability of MNC that has been cultured with MRN-100 alone at concentration of 0-100  $\mu$ l/ml was assessed by MTT assay. Results showed absence of cytotoxicity by this agent. We conclude that MRN-100 can be a useful agent for HIV therapy without cytotoxicity and more conclusive studies are needed to assess its anti-HIV activity in vivo. MRN-100 was offered by ACM Co., Ltd., Tokyo, Japan.

# INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus (HIV) is the causative agent of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). HIV is one of the principal threats to human life worldwide. According to several sources (Center for Disease Control, AIDS Hot Line, Red Cross and other public health agencies) there are approximately 1.5 million HIV infected people in the United States and as many as 50 million worldwide. It has been estimated that by the year 2000, approximately 110 million will be infected with HIV (2% of the world population). Drugs such as AZT and protease inhibitors have been developed as possible treatment for AIDS. However, they have significant side effects and therefore questionable effectiveness. Furthermore, the emergence of HIV strains resistant to AZT and other nucleoside analogues pose a major problem in slowing the progression of the disease. At the last AIDS International Conference held in Vancouver, Canada, there was very little promise of a vaccine in the next five years. The lack of a vaccine or effective treatment send alarming signals. Therefore, there is great interest and need to identify anti-HIV agents that are not only active against the virus, but also can potentiate the host immune system without having deleterious side effects.

# MATERIALS & METHODS

## HIV-1 Infection of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

Peripheral blood mononuclear cells isolated from healthy individuals were incubated with 5 ug/ml PH at 37°C for 3 days. Cells were washed 2x with HBSS and incubated with HIV-1 (HTLV equivalent to 3,000 pg/10<sup>6</sup> cells of HIV-1 p24) for 1 hour at 37°C. Unbound virus was removed by washing the cells 2x with HBSS and resuspended in AIM-V medium supplemented with IL-2. Cells were incubated at 37°C in the presence or absence of various amounts of Pi-Water for 11 days. One half of the culture medium of infected cells was replenished twice weekly with fresh medium containing original amounts of Pi-Water. At Day 4, 7, and 11 post-infection cell viability was tested by MTT assay, and virus production in culture medium was assessed by ELISA for HIV-1 p24 antigen.

## Cell Viability (MTT Assay)

Viability was measured by colorimetric method using the tetrazolium salt MTT assay. A mitochondrial dehydrogenase catalyzes formation of blue formazan crystals from tetrazolium salt. The amount of formazan produced is proportional to the number of living cells. Briefly, HIV-1 infected cells at Day 4, 7, and 11 post-infection were dispensed in triplicate into 96 well round bottom tissue culture plates. MTT (50 ug) was added to each well and the plates were incubated for 4 hrs at 37°C. The plates were centrifuged and supernatants were carefully removed. The formazan crystals were solubilized with 40 mM Hcl/isopropanol and the optical density at 590 nm was measured using an ELISA plate reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

## Lymphocyte proliferation

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from two healthy individuals and suspended at  $2 \times 10^5$ /ml in culture medium. Cells were treated with or without 10 ug/ml PHA, 10 ug/ml ConA, or 10 ug/ml PWM for 72 hrs, and incubated the final 4 hrs with 50 ug/ml MTT. Cell proliferation was analyzed by MTT assay.

# CONCLUSION

1. Pi-water has anti-HIV activity without cytotoxicity.
2. Pi-Water induces lymphocyte proliferation and has no effect on mitogen- induced lymphocyte function.
3. Pi-water is cytoprotective of HIV-1 infected PBMC.

1997年

H I V / エイズに関するパーム・スプリングス・シンポジウム

H I V 治療の基礎

1997年3月13 - 16日

Hyatt Regency Suites

Palm Springs, CA

π ウォーター (MRN-100) は試験管内抗 HIV 活性を有する

<sup>1</sup>Mamdooh Ghoneum, <sup>2</sup>Kim Choong and <sup>1</sup>Galal Namatalla

<sup>1</sup>Drew University of Medicine and Sci., 1621 E 120<sup>th</sup> Street, Los Angeles, CA90059,

<sup>2</sup>University of California, Irvine, CA92717

私たちはπウォーターの試験管内抗 HIV 活性を調べた。MRN-100 は二価および三価の鉄酸塩から誘導された鉄化合物である。MRN-100 は HIV に感染した単核細胞 (MNC) の生存率を有意に改善した。MNC は健康な供血者の末梢血から分離し、これを 5 μg/ml の PHA を用いて 3 日間活性化したのち、HIV-1 (3000 pg/ml の p 2 4 に相当) に 37 °C で 1 時間感染させ、 $1 \times 10^6$  /ml の割合で AIM-V 培地に再懸濁した。感染した細胞は 5 % CO<sub>2</sub> の恒温器中 37 °C で MRN-100 (0 ~ 100 μ l/ml) の存在下に培養した。細胞生存率は MTT 法により 4, 7 および 11 日後に測定した。得られた結果は次の通りである: 1) HIV に感染した MNC の生存率は 50 % であった、2) 濃度 25 μ l/ml の MRN-100 を添加した群では MNC の生存率は有意に改善した (75 %)、3) より高濃度の 50 ~ 100 μ l/ml 群では細胞生存率が > 85 % に回復した、4) 細胞の回復は MRN-100 添加後早くも 4 日目から見られ、7 および 11 日目でも同じレベルに保たれていた。さらに、πウォーターの細胞毒性を評価するため別の実験を行った。50 ~ 100 μ l/ml の MRN-100 単独の存在下に培養した MNC を MTT 法により評価した。その結果は MRN-100 に細胞毒性がないことを示した。私たちは、MRN-100 が細胞毒性を持たず HIV 治療に有用と思えるが、その生体内抗 HIV 活性を評価するためにより決定的な試験が必要であると結論した。MRN-100 は ACM 社 (東京) より提供を受けた。

## 序

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）は後天性免疫不全症候群（AIDS）を引き起こすウイルスである。HIV は世界中でヒト生命に対する脅威の一つとなっている。いくつかの情報源（米国防疫センター、AIDS ホットライン、赤十字、その他の公的保健機関）によれば、HIV 感染者は米国では約 150 万人、全世界では 5000 万人に達する。2000 年までには、約 1 億 1 千万人もの人々（世界人口の 2%）が HIV に感染すると推定されている。AIDS の治療のため AZT、プロテアーゼ阻害物質などの薬剤が開発されたが、これらの薬剤には重大な副作用があるので、その有効性には疑問がある。さらに、AZT その他のヌクレオシド類似体に抵抗性の HIV 株が出現して、AIDS の進行を遅らせる上で大きな問題となっている。カナダのバンクーバーで開かれた前回の AIDS 国際会議を見ても、来る 5 年間にワクチンが開発される見込みは殆どない。ワクチンまたは効果的な治療薬がないことは不安をかきたてる。それ故このウイルスに有効なだけでなく宿主の免疫系を強化し、しかも副作用のない抗 HIV 薬の発見に対する興味と必要性は大きい。



## 材料および方法

### 末梢血単核細胞 (PBMC) の HIV-1 感染

健康なヒトから分離した末梢血単核細胞を  $5 \mu\text{g/ml}$  の PH と共に  $37^\circ\text{C}$  で 3 日間培養した。細胞は HBSS で 2 回洗い、HIV-1 ( $3,000\text{pg}/10^6$  の HIV-1 p24 のに相当する HTLV) と共に  $37^\circ\text{C}$  で 1 日培養した。細胞は HBSS で 2 回洗って非結合ウイルスを除去し、IL-2 添加 AIM-V 培地に再懸濁した。様々な量の  $\pi$  ウォーターの存在または非存在下で、細胞を  $37^\circ\text{C}$  で 11 日間培養した。感染細胞の培地の半分は、週 2 回原設定量の  $\pi$  ウォーターを含む新しい培地に取り替えた。感染後 4、7 および 11 日目に細胞生存率を MTT 試験により測定し、培地内のウイルス産生を HIV-1 p 24 抗原に対する ELISA により検査した。

### 細胞生存率 (MTT 試験)

生存率は、テトラゾリウム塩 MTT 試験を用いる比色分析法により測定した。ミトコンドリアの脱水素酵素はテトラゾリウム塩からの青色ホルマザン結晶の生成を触媒する。産生されたホルマザンの量は生存細胞数に比例する。簡単に述べると、感染後 1、7、および 11 日目に HIV-1 感染細胞を 3 つの 96 穴丸底組織培養平板に分注した。各穴に MTT ( $50 \mu\text{g}$ ) を加え、平板を  $37^\circ\text{C}$  で 4 時間培養した。この平板を遠心分離し、上清液を注意深く取り除いた。ホルマザン結晶を  $40\text{mM}$  塩酸イソプロパノールで可溶化し、ELISA プレート読みとり器 (Molecular Devices, Menlo Park, CA) を用いて  $590\text{nm}$  における吸光度を測定した。

### リンパ球増殖

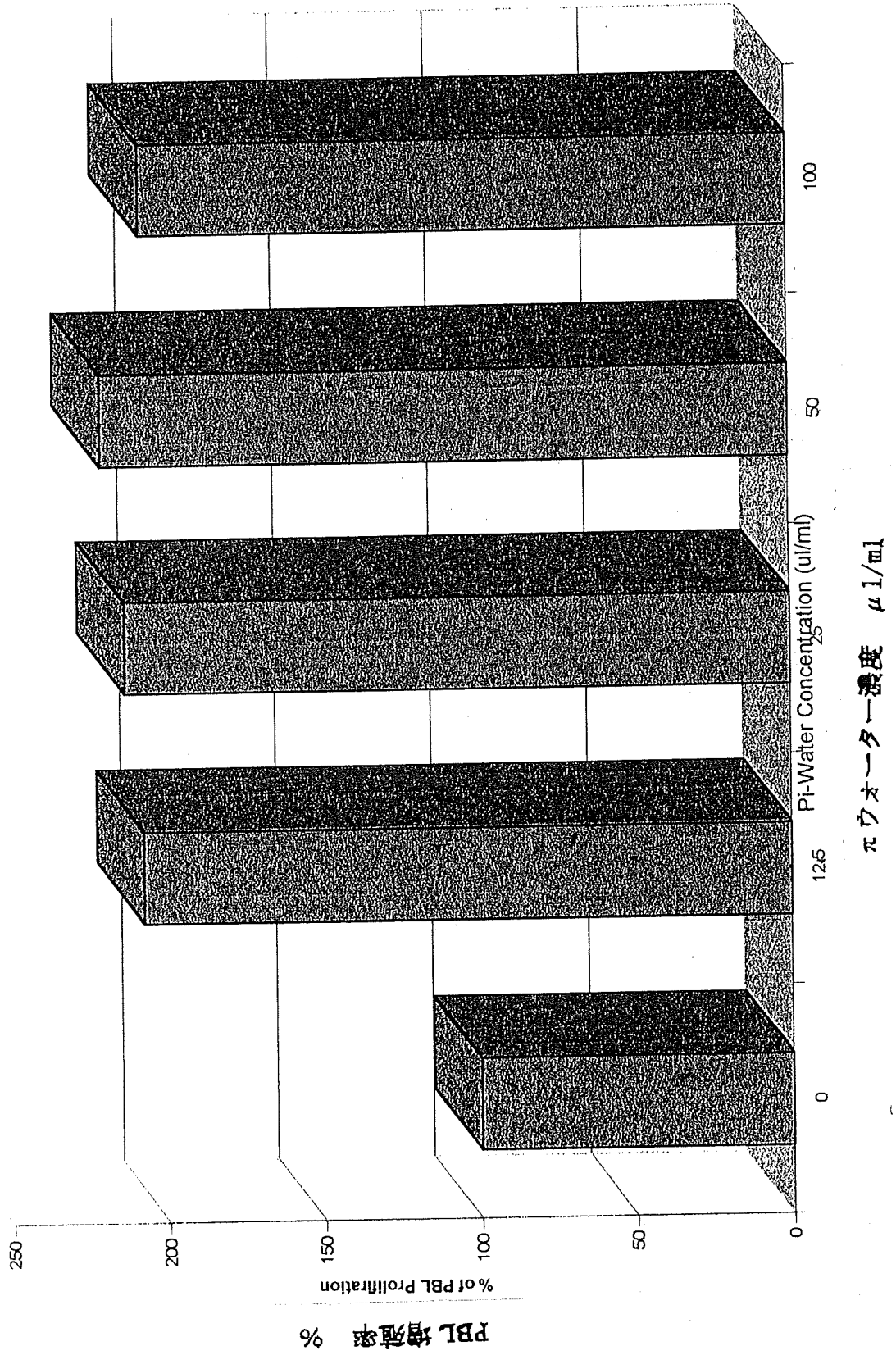
末梢血単核細胞は 2 人の健康供血者から分離し、培地に  $2 \times 10^5/\text{ml}$  の割合で懸濁した。これら細胞を  $10 \mu\text{g/ml}$  の PHA、 $10 \mu\text{g/ml}$  の ConA、または  $10 \mu\text{g/ml}$  の PWM で 72 時間処理するかこれらの処理なしに、 $50 \mu\text{g/ml}$  MTT と共に最終 4 時間培養した。細胞増殖は MTT 試験により分析した。

### 結論

1.  $\pi$ ウォーターは抗 HIV 活性を持ち、しかも細胞毒性を持たない。
2.  $\pi$ ウォーターはリンパ球増殖を誘発し、マイトジェン誘発リンパ球機能に影響を与えない。
3.  $\pi$ ウォーターは HIV-1 感染 PBMC から細胞を保護する。

PBL (末梢血リンパ球) に対するπウォーターの試験管内効果

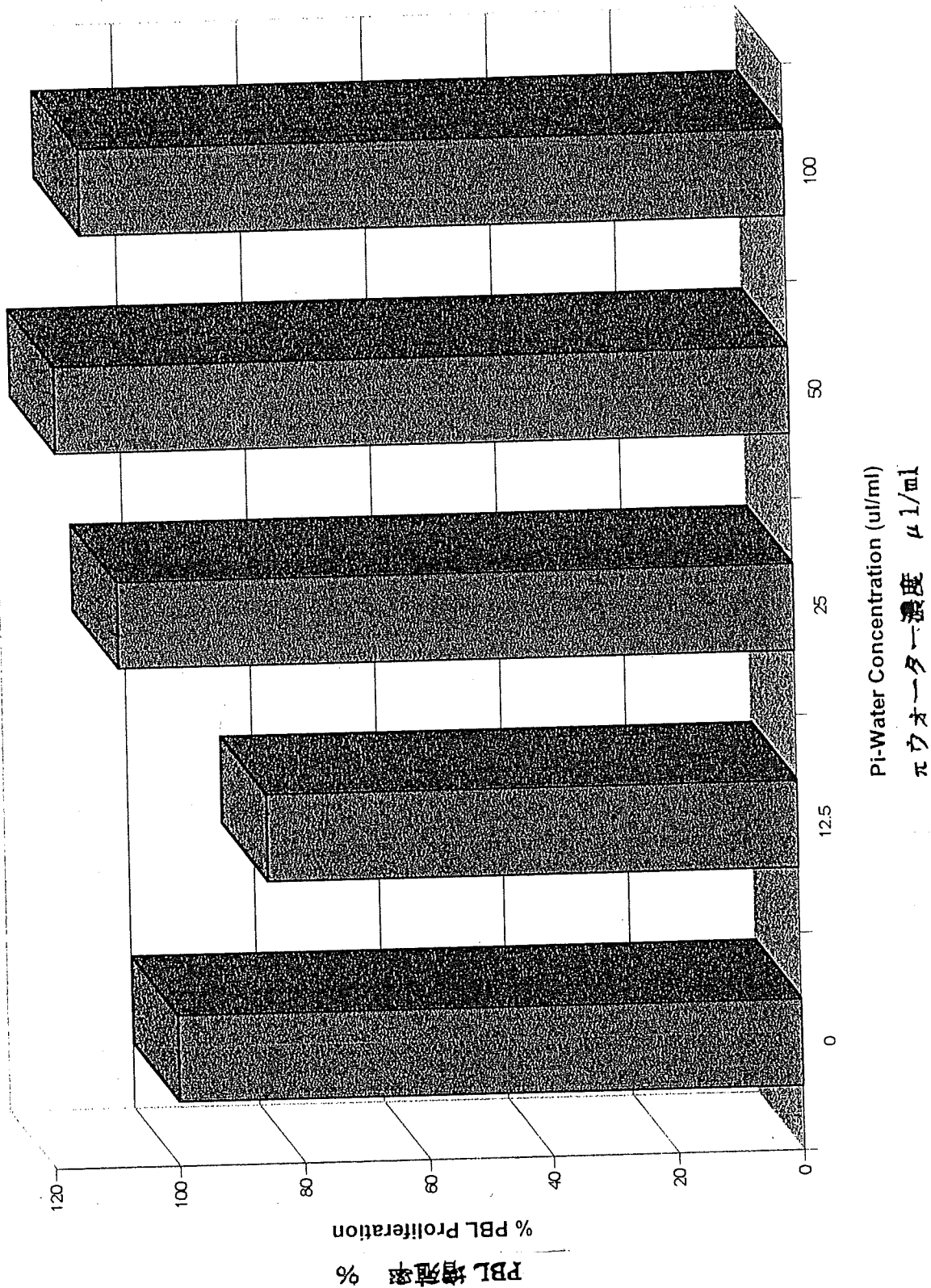
### Effect of Pi-Water on PBL Proliferation In Vitro



PHA (フィトヘマグルチニン) 添加時PBL (末梢血リンパ球) に対するπウォーター

一の試験管内効果

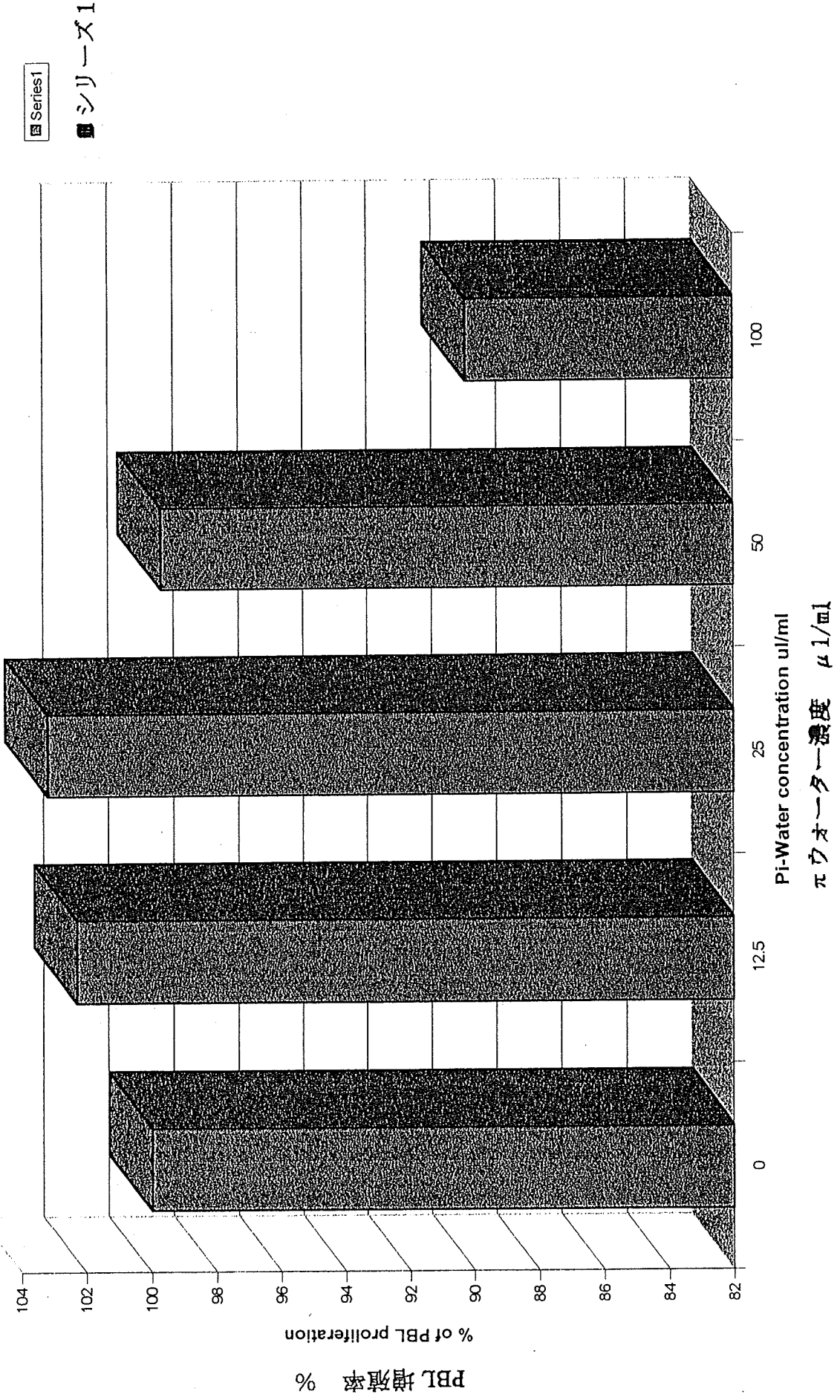
Effect of Pi-Water on PBL Proliferation in Presence of PHA In Vitro



# ConA (コンカナバリンA) 添加時PBL (末梢血リンパ球) に対するπウォーターの試験

## 管内効果

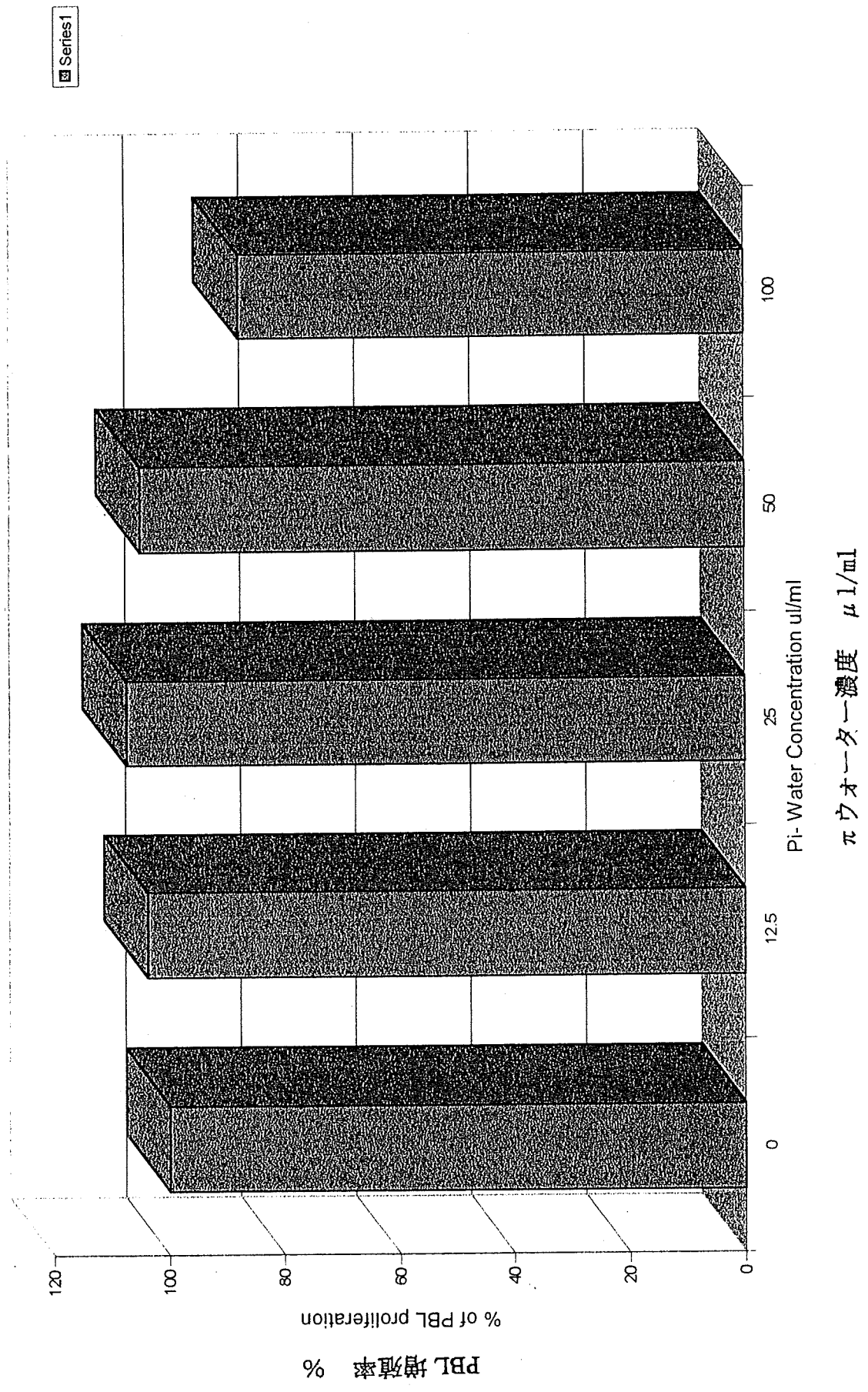
Effect Of Pi-Water on PBL proliferation in presence of Con A In Vitro



1308

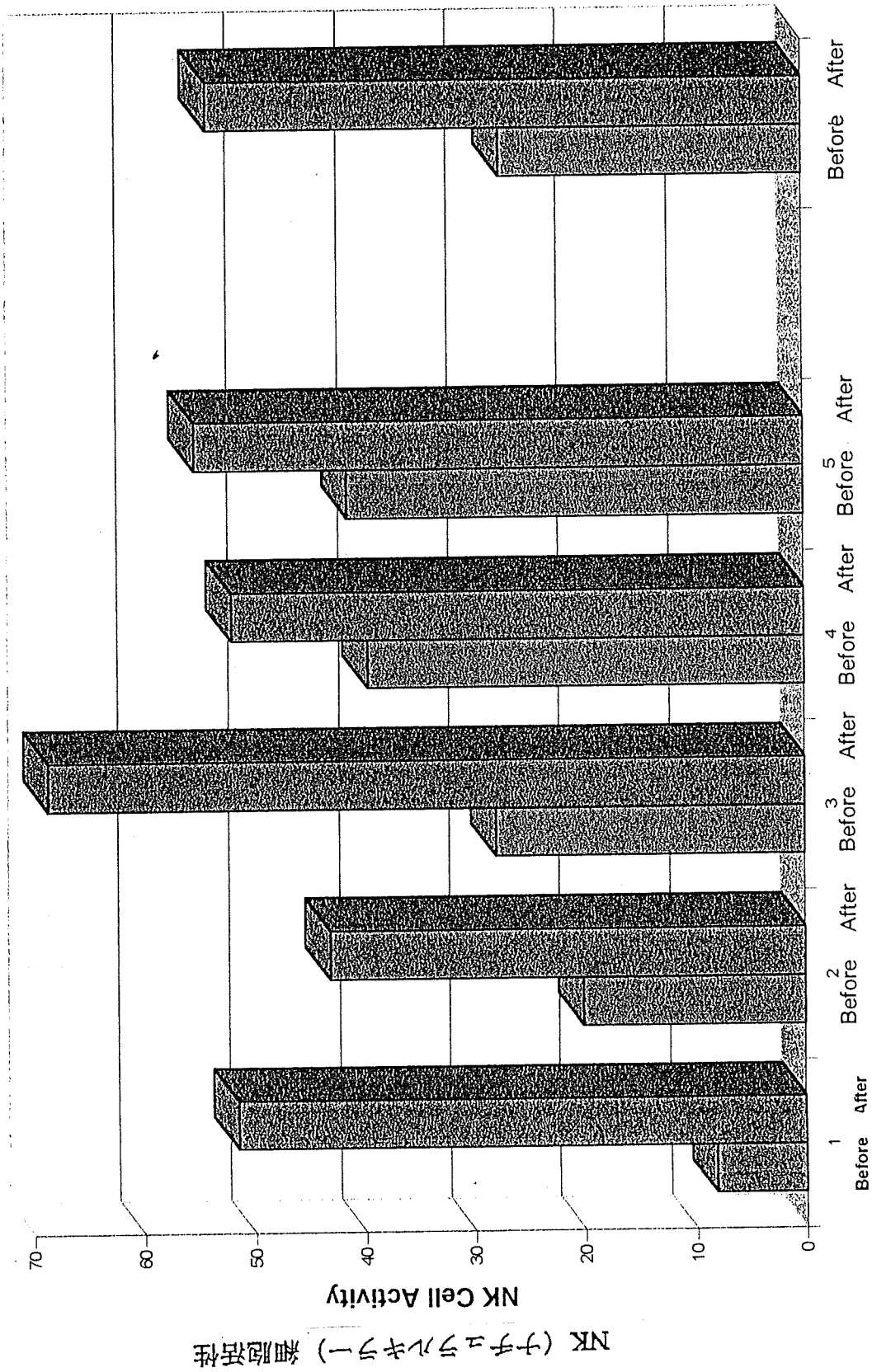
PWM (ヤマゴボウ・マイトジェン) 添加時PBL (末梢血リンパ球) に対するπウォーター  
の試験管内効果

Effect Of Pi- Water on PBL Proliferation In the presence of PWM  
In Vitro



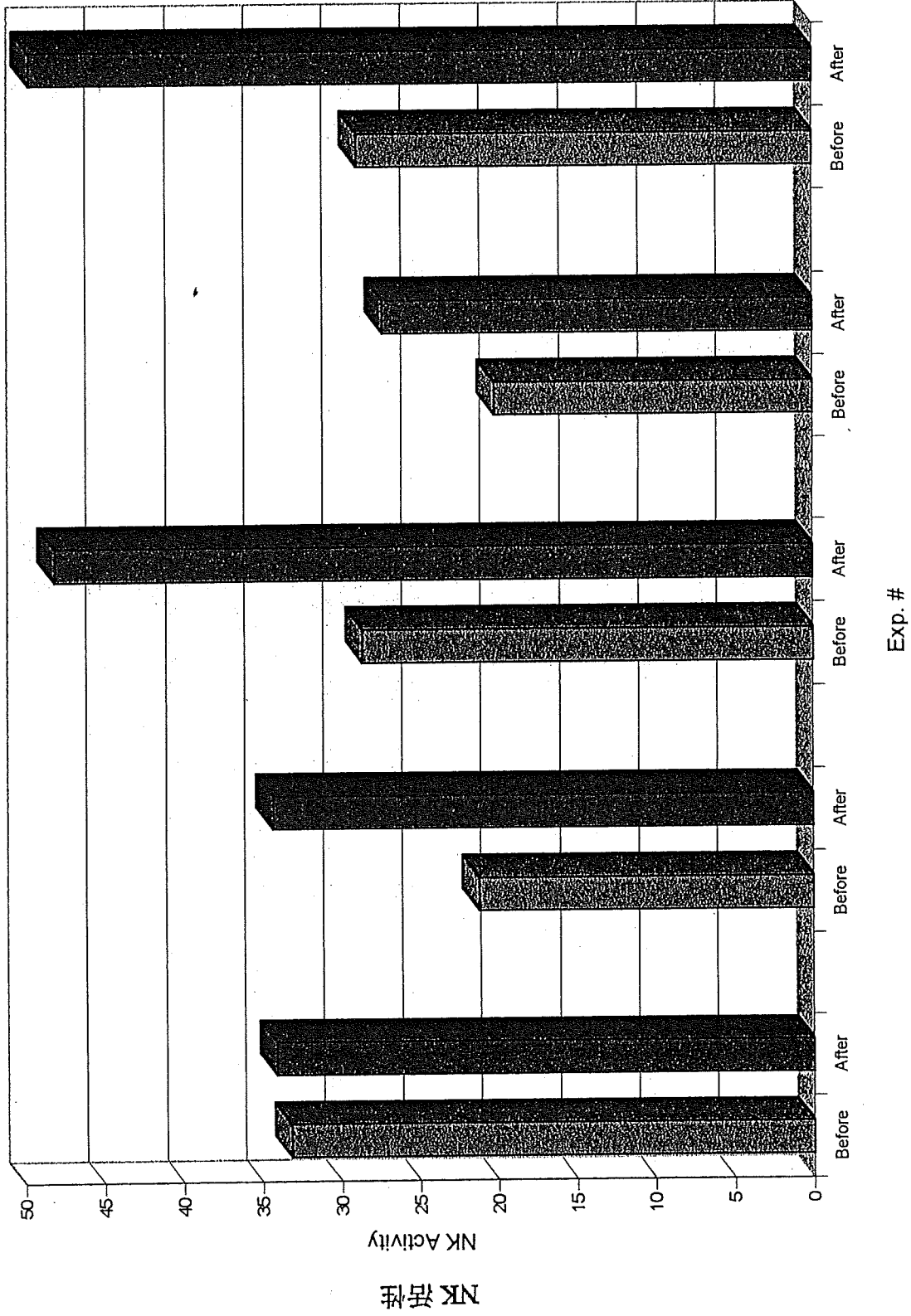
ヒトNK細胞に対するペウオーターの生体内効果

### In Vivo Effect of PW on Human NK Cell Activity



ヒトNK細胞に対するπウォーターの試験管内効果

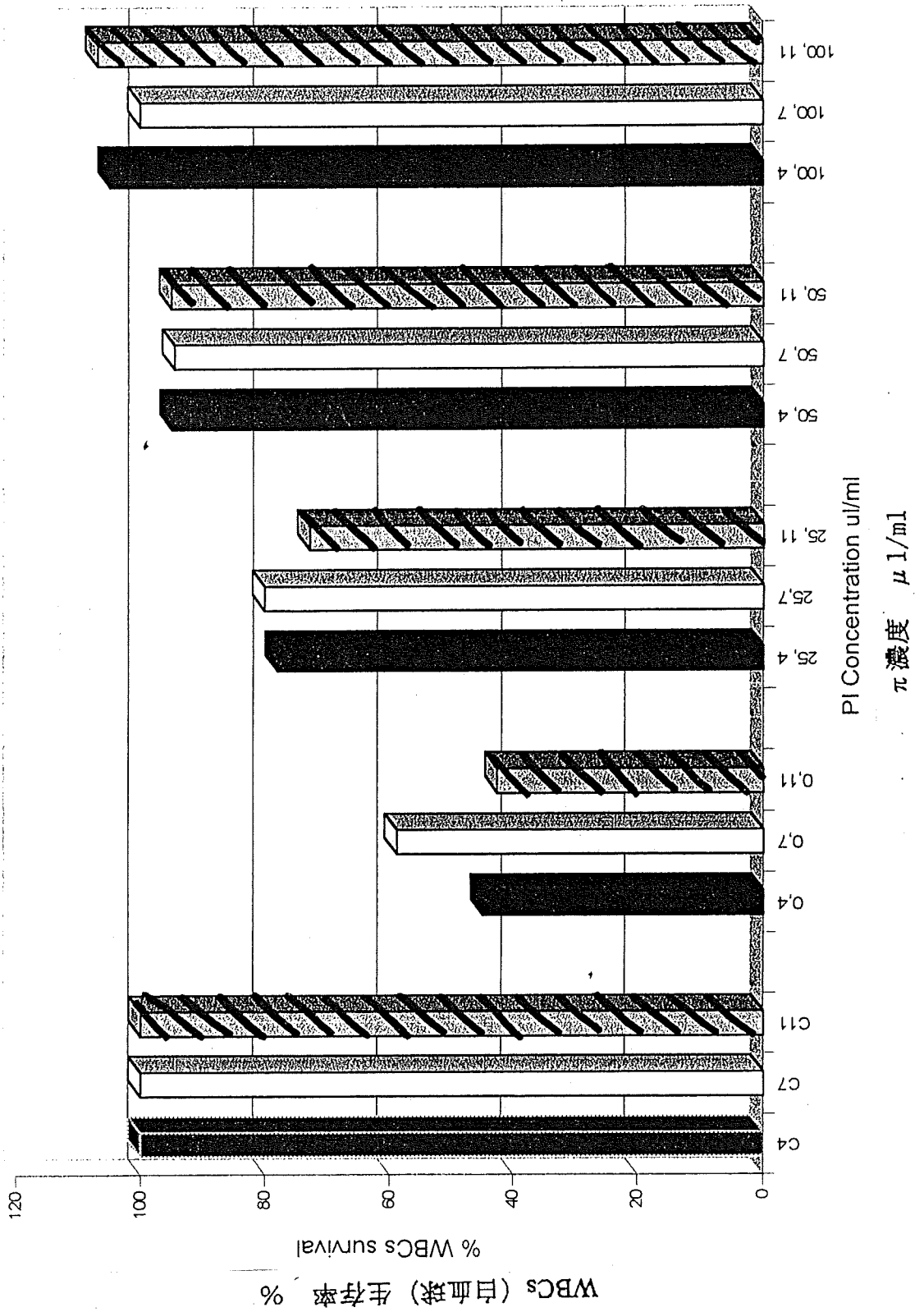
Effect of B W on Human NK activity In Vitro





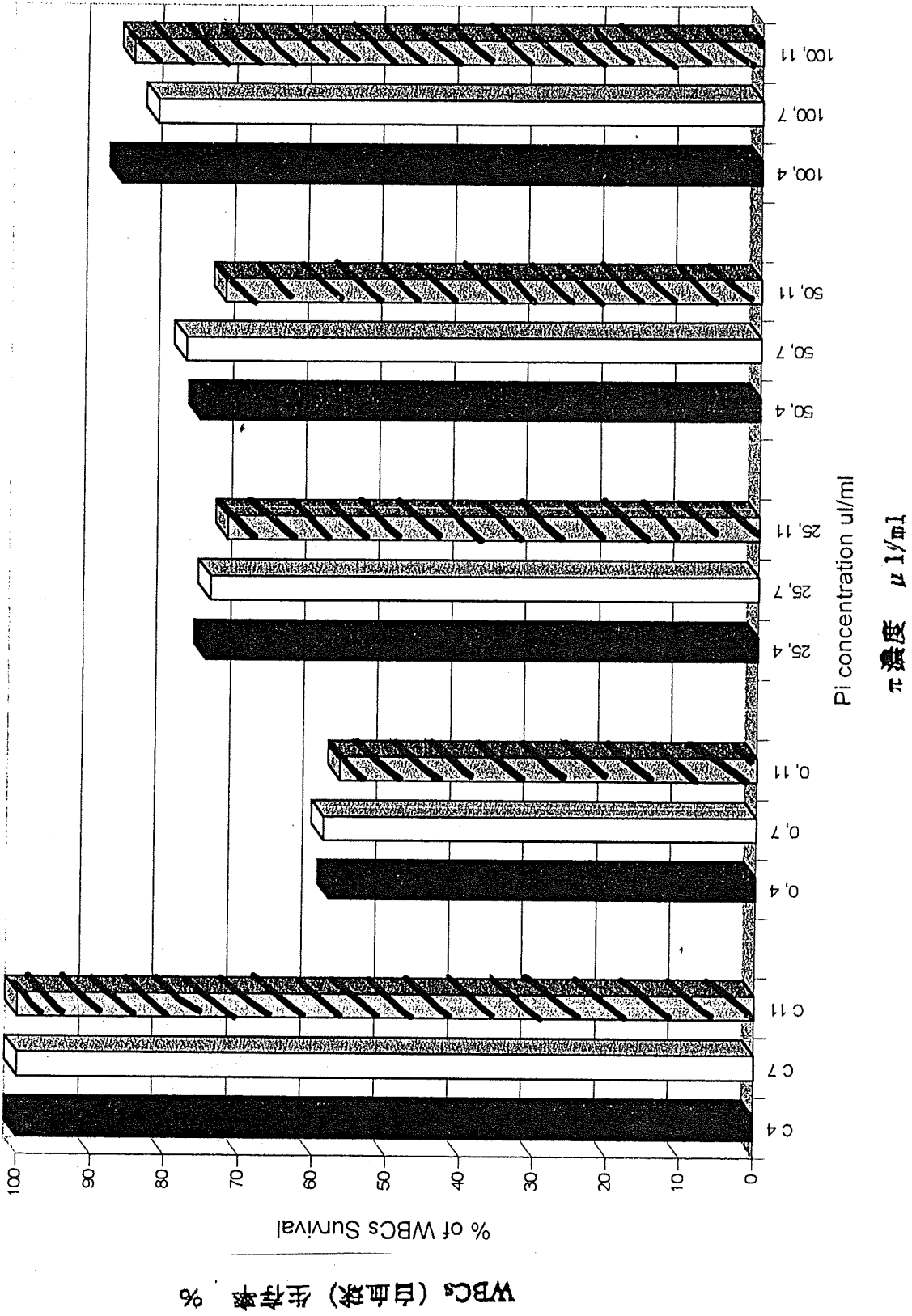
πの抗HIV活性 (題 #1)

Anti HIV activity by PI ( Subject # 1)



πの抗HIV活性 (題 #2)

Anti HIV activity by PI ( Subject # 2)



πの抗HIV活性 (題 #3)

Anti HIV activity by PI ( Subject #3)

