

(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2007-508316

(P2007-508316A)

(43) 公表日 平成19年4月5日(2007.4.5)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)	
A 61 K 31/353 (2006.01)	A 61 K 31/353	4 C 062	
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 1 1	4 C 086
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00		
A 61 P 35/04 (2006.01)	A 61 P 35/04		
C 07 D 311/62 (2006.01)	C 07 D 311/62		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

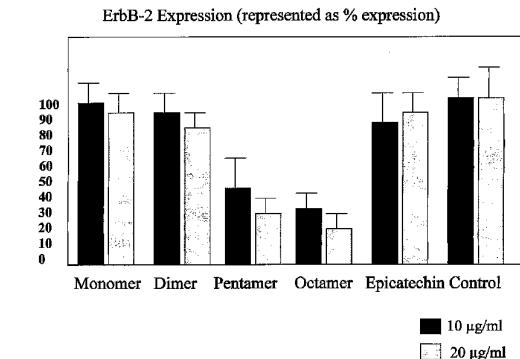
(21) 出願番号	特願2006-534418 (P2006-534418)	(71) 出願人	390037914 マーズ インコーポレイテッド MARS INCORPORATED アメリカ合衆国 ヴァージニア州 221 01-3883 マックリーン エルム ストリート 6885
(86) (22) 出願日	平成16年10月8日 (2004.10.8)	(74) 代理人	100073184 弁理士 柳田 征史
(85) 翻訳文提出日	平成18年6月8日 (2006.6.8)	(74) 代理人	100090468 弁理士 佐久間 剛
(86) 國際出願番号	PCT/US2004/033355	(72) 発明者	シュミツ, ハロルド エイチ アメリカ合衆国 メリーランド州 208 14 ベセスダ ラドヤード ドライブ 6109
(87) 國際公開番号	W02005/034879		F ターム (参考) 4C062 FF44
(87) 國際公開日	平成17年4月21日 (2005.4.21)		
(31) 優先権主張番号	60/510,604		
(32) 優先日	平成15年10月10日 (2003.10.10)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ErbB2キナーゼ過剰発現に関する病気の治療

(57) 【要約】

本発明は、フラバノールおよびその関連オリゴマーのようなポリフェノールを含有する組成物、およびErbB2キナーゼ過剰発現に関する状態を治療する方法、例えばErbB2キナーゼ過剰発現に関する癌の治療に関する。

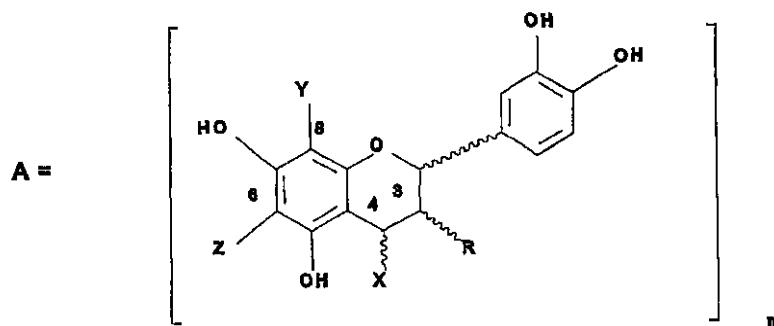


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ErbB2キナーゼの過剰発現に関連する状態を治療する方法であって、エピカテキン、カテキン、下記の構造式Aを有する高分子化合物、およびその薬剤的に許容できる塩、誘導体または酸化生成物から成る群より選択される化合物の有効な量を、ErbB2キナーゼを過剰発現するヒトまたは家畜動物に投与する工程を含むことを特徴とする方法。

【化 1】



10

(ここで、

nは2から18までの整数である；

RおよびXはそれぞれ または 配置を有する；

RはOHである；

C-4、C-6およびC-8の置換基はそれぞれX、ZおよびYであり、単量体単位の結合がC-4、C-6およびC-8で生じる；

C-4、C-6またはC-8のいずれかが別の単量体単位に結合しない場合、X、YおよびZは水素である。)

【請求項 2】

前記ErbB2の過剰発現と関連する状態が、ErbB2キナーゼ過剰発現により特徴付けられる癌であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 3】

nが5であることを特徴とする請求項2記載の方法。

30

【請求項 4】

nが8であることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項 5】

前記癌が乳癌であることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項 6】

前記癌が転移性乳癌であることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項 7】

前記癌が卵巣癌であることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項 8】

前記癌が咽頭癌であることを特徴とする請求項2記載の方法。

40

【請求項 9】

前記癌が前立腺癌であることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項 10】

前記癌が、膀胱癌、唾液腺癌、子宮内膜癌、肺癌および非小細胞肺癌から成る群より選択されることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項 11】

前記化合物が、追加の化学療法薬と一緒にまたは化学療法の効果を強めるために投与されることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項 12】

前記癌が乳癌であることを特徴とする請求項3記載の方法。

50

【請求項 1 3】

前記癌が転移性乳癌であることを特徴とする請求項 3 記載の方法。

【請求項 1 4】

前記癌が卵巣癌であることを特徴とする請求項 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

前記癌が咽頭癌であることを特徴とする請求項 3 記載の方法。

【請求項 1 6】

前記癌が前立腺癌であることを特徴とする請求項 3 記載の方法。

【請求項 1 7】

前記癌が、膀胱癌、唾液腺癌、子宮内膜癌、肺癌および非小細胞肺癌から成る群より選択されることを特徴とする請求項 3 記載の方法。 10

【請求項 1 8】

前記化合物が、追加の化学療法薬と一緒にまたは化学療法の効果を強めるために投与されることを特徴とする請求項 3 記載の方法。

【請求項 1 9】

前記癌が乳癌であることを特徴とする請求項 4 記載の方法。

【請求項 2 0】

前記癌が転移性乳癌であることを特徴とする請求項 4 記載の方法。

【請求項 2 1】

前記癌が卵巣癌であることを特徴とする請求項 4 記載の方法。 20

【請求項 2 2】

前記癌が咽頭癌であることを特徴とする請求項 4 記載の方法。

【請求項 2 3】

前記癌が前立腺癌であることを特徴とする請求項 4 記載の方法。

【請求項 2 4】

前記癌が、膀胱癌、唾液腺癌、子宮内膜癌、肺癌および非小細胞肺癌から成る群より選択されることを特徴とする請求項 4 記載の方法。

【請求項 2 5】

前記化合物が、追加の化学療法薬と一緒にまたは化学療法の効果を強めるために投与されることを特徴とする請求項 4 記載の方法。 30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本出願は、ErbB2キナーゼ過剰発現に関連する癌のようなErbB2キナーゼ過剰発現に関する病気を治療するための、フラバノールおよびその関連オリゴマー（プロシアニジン）のようなポリフェノール、例えば、カカオフラバノールおよびプロシアニジンのようなカカオポリフェノールを含有する組成物、およびその使用方法に関するものである。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

ErbB2と示されるキナーゼは、4つの既知のメンバーを含むレセプターチロシンキナーゼのErb-Bファミリーに属する：EGFR（上皮成長因子レセプター、ErbB1とも称される）、ErbB2、ErbB3およびErbB4。これらは全て正常な発育および正常な細胞の動作に必須であるが、特にEGFRおよびErbB2は、ある癌患者において調節が排除される（非特許文献1）。ErbB2はまた、HER2（ヒト上皮成長因子レセプター2）およびNEU（例えば、www.ncbi.nlm.nih.gov/entrezで利用できるOMIMデータベース参照）とも称される。 40

【0 0 0 3】

ErbB2は、脈管形成の調節において重要な役割を果たす。ErbB2レセプターによる脈管形成の調節は、ErbBファミリーの他のメンバーと一緒にErbB2を含有するヘテロダイマーの形成により媒介される。したがって、ErbB2遺伝子の抑制により、より有効なErbB2ヘテロダイマーの形成の可能性が減少し、脈管形成刺激を生じさせる下流シグナリング事象が減 50

少しうる。ErbBレセプターは、ERK1/2 (p44/p42) MAPK、ホスホリパーゼC、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ、およびc-Jun NH₂-末端キナーゼを含む、いくつかのキナーゼシグナル経路に連結される。ErbB2シグナリングはまた、PI-3/Aktキナーゼ経路、およびポリアミン合成経路に関連する。

【非特許文献1】Anderson and Ahmad, Front Biosci., 2002, 7:d1926-40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

ErbB2キナーゼの過剰発現は、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、子宮内膜癌、胰癌および上皮癌、非小細胞肺癌および咽頭癌を患う患者のある部分母集団で観察された (Dowsett et al., Eur.J.Cancer, 36:170-6, 2000; Wang and Hung, Semin.Oncol., 28:115-24, 2001; Eccles, Recent Res. Cancer Res., 157:41-54, 2000; Kazkayasi et al., Eur.Arch.Otorhinolaryngol., 258:329-35, 2001; Scholl et al., Anm.Oncol., 12 Suppl.1:S81-7, 2001)。例えは、ErbB2は、乳癌の20-30%で過剰発現される（通常はプロト癌遺伝子増幅の結果として）(Dowsett et al., Eur.J.Cancer, 36:170-6, 2000)。ErbB2を過剰発現する乳癌患者は、予後不良、短い再発期間、高い再発率、短寿命および低生存率を有する (Wang and Hung, Semin.Oncol., 28:115-24, 2001)。過剰発現は、転移能の上昇および化学療法薬に対する抵抗性の上昇に関係する。乳癌では、ErbB2の過剰発現はリンパ節転移と関連がある。したがって、当該技術において、腫瘍の攻撃性が高まっている患者の部分母集団の治療を特に対象とした治療の開発が必要である。

10

20

20

【0005】

現在、ErbB2キナーゼは抗ErbB2モノクローナル抗体治療のための標的である (Slamon et al., N Engl J Med., 344:783-92, 2001)。ErbB2過剰発現に関する病気の危険を考えると、治療のためのさらなる方法および薬が必要である。本出願人は、カカオから得られるものを含む、フラバノールおよびその関連オリゴマーのような特定のポリフェノールが、ErbB2過剰発現の減少において有効であり、ErbB2を過剰発現する癌のような病気の治療に有用であるということを思いがけなく発見した。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、ErbB2過剰発現により特徴付けられる状態の治療または予防、例えはErbB2キナーゼを過剰発現する癌の治療および化学予防のための組成物、生成物および方法に関する。

30

【0007】

1つの態様において、本発明は、フラバノールおよび／またはその関連オリゴマーのようなポリフェノールを含む食品、食品添加物、栄養補助食品、または薬剤等の組成物に関する。この組成物は、必要に応じて追加の癌治療剤を含んでもよい。

【0008】

上記の組成物およびErbB2キナーゼを過剰発現する癌の治療のために使用されるラベルおよび／または指示を含むパッケージ産物も、本発明の範囲内である。

40

【0009】

別の態様において、本発明は、フラバノールおよび／またはその関連オリゴマーのようなポリフェノールを含有する組成物を、それを必要とする哺乳類に投与することにより、ヒトまたは家畜動物のような哺乳類においてErbB2キナーゼを過剰発現する癌を治療する方法に関する。

【0010】

さらに別の態様において、本発明は、フラバノールおよび／またはその関連オリゴマーのようなポリフェノールを含有する組成物を、それを必要とする哺乳類に投与することにより、ヒトまたは家畜動物のような哺乳類においてErbB2キナーゼを過剰発現する癌を化学予防する方法に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

50

【 0 0 1 1 】**図面の簡単な説明**

図1は、プロシアニジンで処理されRsaI制限酵素で切断されたHAEC(ヒト大動脈上皮細胞)から調整されたチロシンキナーゼPCR断片のオートラジオグラフを示す。示差発現されたErbB2キナーゼを示すゲルバンドが標識される。レーン：M=モノマー、D=ダイマー、P=ペントマー、O=オクタマー、E=エピカテキン、C=コントロール生理食塩水。

【 0 0 1 2 】

図2は、プロシアニジンの存在下でHAECにおけるErbB2キナーゼの発現の減少を確かめるリアルタイムPCR実験の結果を示す。

【 0 0 1 3 】

図3は、血管内皮成長因子(VEGF)を加えてまたは加えないで、プロシアニジンモノマーまたはペントマーの存在下で行われた細胞増殖実験を示す。

【 0 0 1 4 】

図4Aは、ポリシアニジンにより処理されRsaI制限酵素により切断された微小皮膚内皮細胞から調製されたチロシンキナーゼPCR断片のオートラジオグラフを示す。チロシンキナーゼMETおよびErbB2を示す切断バンド、および切断産物のサイズが示される。レーン：M=モノマー、P=ペントマー、C=コントロール生理食塩水。

【 0 0 1 5 】

図4Bは、プロシアニジンにより処理されBsp1286Iにより切断された微小皮膚内皮細胞から調製されたチロシンキナーゼPCR断片のオートラジオグラフを示す。チロシンキナーゼErbB2およびVEGFR-3を示す切断バンド、および切断産物のサイズが示される。レーン：M=モノマー、P=ペントマー、C=コントロール生理食塩水。

【 0 0 1 6 】

図5は、ErbB2、KDR/VEGFR-2およびMAPK11遺伝子発現の減少を確かめる定量的リアルタイムPCR実験を示す(20μg/ml前処理ペントマーおよびコントロールHMDEC)。

【 0 0 1 7 】

図6は、RC20H抗体でプローブされた前処理ペントマーおよびコントロールHMDEC溶解物のウェスタンプロットを示す。

【 0 0 1 8 】

図7は、1mMのH₂O₂に30分間さらされ、組換えHRP-抗-ホスホチロシン(PY20)抗体でプローブされた前処理ペントマーおよびコントロールHMDEC溶解物のウェスタンプロットを示す。

【 0 0 1 9 】

図8は、1mMのH₂O₂で30分間刺激された処理ペントマーおよび処理オクタマーHMDECの増殖を示す。Agstは、血管由来の刺激を示す(1mMのH₂O₂)。

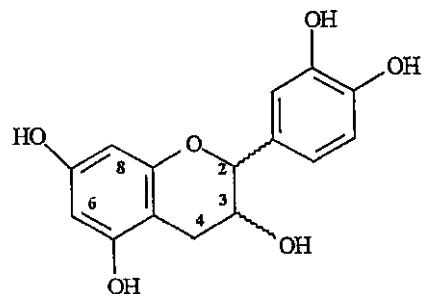
【 0 0 2 0 】

本出願において挙げられている全ての特許、特許出願、および引例が、参照によってこの中に組み込まれる。矛盾がある場合には、本開示が適用される。

【 0 0 2 1 】

本発明は、少なくとも1つのフラバノールおよび/またはその関連ポリシアニジンオリゴマーのような、フラバノールおよび/またはその関連オリゴマーを含む組成物、およびそのような組成物をそれを必要とする哺乳類に投与することに関する。例えば、本発明の組成物は、下記の構造式を有するフラバノール、またはその薬剤的に許容できる塩、誘導体または酸化生成物の有効量を含んでもよい。

【化1】

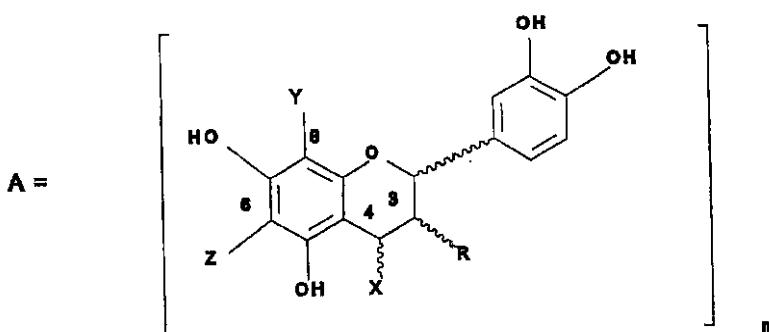


10

[0 0 2 2]

あるいは、または組み合わせて、本発明の組成物は、構造式A_nの高分子化合物またはその薬剤的に許容できる塩、誘導体または酸化生成物の有効量を含んでもよい。

【化2】



20

〔 0 0 2 3 〕

ここで、

n は2から18までの整数である；

RおよびXはそれぞれ または 配置を有する；

RはOHである；

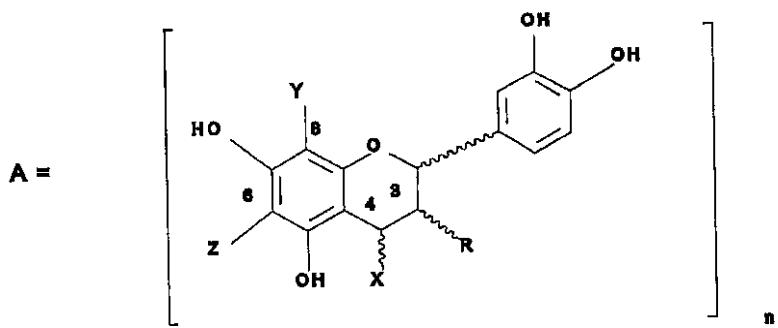
C-4、C-6およびC-8の置換基はそれぞれX、ZおよびYであり、単量体単位の結合がC-4、C-6およびC-8で生じる；

C-4、C-6またはC-8のいずれかが別の単量体単位に結合しない場合、X、YおよびZは水素である。

【 0 0 2 4 】

ある実施の形態において、高分子化合物A_nは下記の構造式を有する。

【化 3】



40

50

【0025】

ここで、

nは5である；

RおよびXはそれぞれ または 配置を有する；

RはOHである；

C-4、C-6およびC-8の置換基はそれぞれX、ZおよびYであり、単量体単位の結合がC-4、C-6およびC-8で生じる；

C-4、C-6またはC-8のいずれかが別の単量体単位に結合しない場合、X、YおよびZは水素である；

またはその薬剤的に許容できる塩、誘導体または酸化生成物である。

10

【0026】

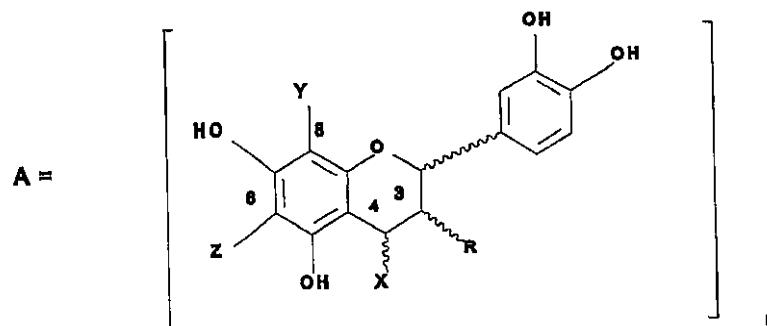
ペントマーの例は以下のようでもよい：[EC-(4 8)]₄-EC、[EC-(4 8)]₃-EC-(4 6)-EC、[EC-(4 8)]₃-EC-(4 8)-C、および[EC-(4 8)]₃-EC-(4 6)-C、ここで、ECはエピカテキンでありCはカテキンである。精製された個々のペントマーおよびペントマー混合物のいずれを使用してもよい。精製度は、例えば、少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約92%、または少なくとも約95%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%である。

【0027】

別の実施の形態において、高分子化合物A_nは下記の構造式を有する。

20

【化4】



30

【0028】

ここで、

nは8である；

RおよびXはそれぞれ または 配置を有する；

RはOHである；

C-4、C-6およびC-8の置換基はそれぞれX、ZおよびYであり、単量体単位の結合がC-4、C-6およびC-8で生じる；

C-4、C-6またはC-8のいずれかが別の単量体単位に結合しない場合、X、YおよびZは水素である；

またはその薬剤的に許容できる塩、誘導体または酸化生成物である。

40

【0029】

オクタマーの例は以下のようでもよい：[EC-(4 8)]₇-EC、[EC-(4 8)]₆-EC-(4 6)-EC、[EC-(4 8)]₆-EC-(4 8)-C、および[EC-(4 8)]₆-EC-(4 6)-C、ここで、ECはエピカテキンでありCはカテキンである。精製された個々のペントマーおよびペントマー混合物のいずれを使用してもよい。精製度は、例えば、少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約92%、または少なくとも約95%、または少なくとも約98%

50

%、または少なくとも約99%である。

【0030】

フラバノールおよび/またはその関連オリゴマーは、カカオフラバノールおよび/またはカカオプロシアニジンオリゴマーでもよい。カカオポリフェノールに加えて、またはそれに代えて、組成物は、カカオポリフェノールと同じまたは同様の構造および/または特性を有するカカオ以外の供給源からのポリフェノールを含んでもよい。組成物は、必要に応じて追加の癌治療薬を含んでもよい。

【0031】

ここで用いたように、「カカオポリフェノール」(CP)という用語は、カカオ豆の特徴であるフラバノールおよびその関連オリゴマーのようなポリフェノール物質を称する。言い換えれば、カカオポリフェノール、カカオフラバノールまたはカカオプロシアニジンオリゴマーは、供給源に関係なく、カカオで天然に発生するポリフェノール、フラバノールまたはプロシアニジンの構造式を有する、任意のポリフェノール、フラバノールまたはプロシアニジンオリゴマーである。ある実施の形態において、これらの化合物は、カカオ豆またはカカオ原料から抽出されてもよい。「フラバノール」という用語は、カテキンおよびエピカテキンのモノマーを含む。カテキンおよびエピカテキンのオリゴマーは、プロシアニジンと称される。この中のポリフェノールへの言及は、組み合わせておよび別々に、フラバノールおよびプロシアニジンにも適用されることを理解すべきであり、また逆の場合も同じである。

【0032】

「カカオ原料」の用語は、例えばチョコレート液、および部分または完全脱脂カカオ固体物(例えばケーキまたは粉末)のような、殻を含まないカカオニブに由来するカカオ固体物含有物質を称する。

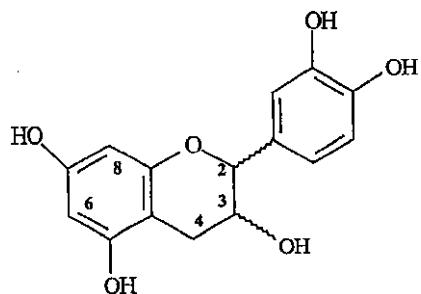
【0033】

本発明に使用されるポリフェノールは、天然由來のものでもよく、例えばカカオ豆またはポリフェノールの別の天然供給源由來のものであっても、あるいは合成によって調製されたものであっても差し支えない。当業者は、可用性およびコストに応じて、天然または合成ポリフェノールを選択して差し支えない。ポリフェノールは、例えばチョコレート中に含まれるチョコレート液のようなカカオポリフェノール含有カカオ原料の形態で組成物中に含まれていて差し支えなく、あるいは例えば抽出物、抽出画分、単離および精製された個々の化合物、プールした抽出画分または合成によって調製された化合物として、カカオ原料とは無関係に添加されても差し支えない。

【0034】

フラバノールは、(+)-カテキン、(-)-エピカテキンおよびそれらのそれぞれのエピマー(例えば(-)-カテキンおよび(+)-エピカテキン)を含み、以下の構造を有する。

【化5】



【0035】

プロシアニジンオリゴマーは、2から約18、好ましくは2から約12、さらに最も好ましくは2から約10のモノマー単位を有する。あるいは、オリゴマーは、3-18、好ましくは3-12、およびより好ましくは3-10のモノマー単位；あるいは、5-18、好ましくは5-12およびよ

10

20

30

40

50

り好ましくは5-10のモノマー単位を有してもよい。例えば、オリゴマーは、ダイマー（二量体）、トリマー（三量体）、テトラマー（四量体）、ペンタマー（五量体）、ヘキサマー（六量体）、ヘプタマー（七量体）、オクタマー（八量体）、ノナマー（九量体）、およびデカマー（十量体）であって差し支えない。オリゴマーでは、モノマーが(4 6)および/または(4 8)のフラバン間結合を介して結合している。もっぱら(4 8)結合のみを有するオリゴマーは直鎖であり；一方、1つ以上の(4 8)結合が存在すると分枝オリゴマーとなる。少なくとも1つの非天然結合(6 6)、(6 8)、および(8 8)を有するオリゴマーも本発明の範囲内である。そのような非天然発生オリゴマーの合成は、ここに言及することによりその関連部分が引用される、2000年10月19日にW000/61547号として公開された国際特許出願第PCT/US00/08234号に記載されている。

10

【0036】

カカオ豆、カカオニブ、あるいは例えはチョコレート液、部分脱脂カカオ固体物および/または完全脱脂カカオ固体物からの抽出によって、カカオポリフェノールを調製することができる。好ましくは、完全または部分脱脂カカオ粉末から抽出物を調製する。テオブロマ、ヘラニア(Herrania)、またはそれらの種内および種間の交配物の任意の種類の豆を用いて差し支えない。発酵した、発酵途中の、または未発酵の豆から抽出物を調製して差し支えなく、発酵豆が最も少ない量のカカオポリフェノールを有し、未発酵豆が最も多い量のカカオポリフェノールを有する。豆の発酵因子に基づいて豆の選択を行うことができ、例えは、275以下の発酵因子を有する豆から抽出が行われる。ここに言及することによりその関連部分が引用される、W098/09533号として公開された国際特許出願第PCT/US97/15893号に記載のように、発酵の程度を操作することによって、カカオ原料またはその抽出物中のポリフェノールレベルを最適化することができる。

20

【0037】

従来のカカオ加工法（例えは、Industrial Chocolate Manufacture and Use, ed. Beckett, S.T., Blackie Acad. & Professional, New York, 1997例えは1、5および6章に記載）、あるいは米国特許第6,015,913号(Kealey et al)に記載の改善された加工法（従来の方法に比べて、カカオ原料中のポリフェノールが、その破壊を防止することによって保存される）を用いて加工されたカカオ原料から、カカオポリフェノールを抽出する。改善された加工法は、従来の焙煎工程を省略する。以下の工程によってカカオ原料が得られる：(a) カカオニブを焙煎することなくカカオ殻を軟らかくするのにちょうど十分な時間および温度でカカオ豆を加熱する工程；(b) カカオ殻からカカオニブをふるい分ける工程；(c) カカオニブを回転圧搾する工程、および(d) 保存レベルのカカオポリフェノールを含有するカカオバターおよび部分脱脂カカオ固体物を回収する工程。本方法は、従来の加工法よりも非常に高レベルの高プロシアニジンオリゴマーを保持する。本方法によって作成されたカカオ固体物は、無脂肪固体物1g当り20,000μgを超える量；好ましくは25,000μg/gを超える量、より好ましくは28,000μg/gを超える量、さらに最も好ましくは30,000μg/gを超える量の全フラバノールおよび/またはプロシアニジンを含有する。本願発明の目的において、全フラバノールおよび/またはプロシアニジン量は実施例1に記載のように特定される。

30

【0038】

ポリフェノールを溶解させる溶媒を用いて、上記のような供給源から、または任意の他のポリフェノールまたはフラバノールまたはプロシアニジン含有供給源から、ポリフェノールを抽出する。適切な溶媒として、水、あるいは例えはメタノール、エタノール、アセトン、イソプロピルアルコールおよび酢酸エチルのような有機溶媒が挙げられる。溶媒混合物を用いても差し支えない。溶媒として水を用いる場合、例えは酢酸でわずかに酸性化したものでもよい。いくつかの溶媒の例は、水と、例えは水性メタノール、エタノールまたはアセトン等の有機溶媒との混合物である。水性有機溶媒は、例えは約50%から約95%の有機溶媒を含有する。従って、水中の約50%、約60%、約70%、約80%、および約90%有機溶媒を用いて差し支えない。また、溶媒は、少量、例えは約0.5%から約1.0%の量、の酢酸のような酸を含んでいて差し支えない。抽出物の組成、すなわち表示（すなわちオ

40

50

リゴマープロフィール)、およびプロシアニジンオリゴマーの量は、溶媒の選択に依存するであろう。例えば、水抽出物は主にモノマーを含有し、酢酸エチル抽出物はモノマーおよび低オリゴマー(主にダイマーおよびトリマー)を含有し、さらに水性メタノール、エタノールまたは酢酸抽出物はモノマーおよび一連の高オリゴマーを含有する。モノマーならびに高プロシアニジンオリゴマーの抽出に好ましい溶媒の1つは、70%アセトンである。しかしながら、いずれのポリフェノール含有抽出物も本発明において有用である。カカオフェノール抽出方法は当業界で公知であり、例えば米国特許第5,554,645号(Romanczyk et al.)およびW097/36497として公開された国際特許出願第PCT/US97/05693号に記載されている。従って、1つの実施形態では、カカオ豆をカカオ粉末に粉碎し、その粉末を脱脂し、カカオポリフェノールを抽出し、さらにその抽出物を精製することによって、カカオ抽出物を調製する。カカオ豆およびパルプを凍結乾燥し、凍結乾燥カカオ豆を脱パルプ化したまま外皮を剥ぎ、外皮を剥いだカカオ粉末を粉碎することによってカカオ粉末を調製して差し支えない。

【0039】

例えば、カフェインおよび/またはテオブロミンの除去によってカカオポリフェノール抽出物を精製し、さらにその後、ゲル浸透クロマトグラフィーおよび/または高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)によって精製する。ゲル浸透クロマトグラフィー(例えばセファデックスLH-20)を用いて、高プロシアニジンオリゴマーに関して抽出物の質を高めた。例えば、選択したオリゴマーがカラムから溶出を始めるまで、モノマーおよび低オリゴマーを含有する溶出物を集めない。そのような抽出の例は当業界で公知であり、ここに言及することによりその関連部分が引用されるW097/36497として公開された国際特許出願第PCT/US97/05693号の実施例5に記載されている。例えば順相HPLCのような予備HPLCを用いることによって、例えば50重量%以上のモノマーまたは特定オリゴマーを含有するモノマー画分およびオリゴマー画分に、抽出物を分画することができる。その特定の画分がモノマーおよび任意の低オリゴマー(例えばダイマー、トリマーまたはテトラマー画分)を含む場合、その画分は約90から95重量%の特定オリゴマー画分を含む。分離後、所望の画分をプールし、例えばオリゴマー3-10又は5-10を含有するように選択したオリゴマーの混合物を得ることができる。本願明細書におけるガイダンスおよび当業界における一般知識、例えば米国特許第5,554,645号(Romanczyk et al.)およびW097/36497として公開された国際特許出願第PCT/US97/05693号に記載の技術、を鑑みて、当業者はクロマトグラフィー条件を操作して、所望のプロシアニジン特性を達成することができる。

【0040】

モノマー画分は通常、モノマーエピカテキンおよびカテキンの混合物を含有する;オリゴマー画分は通常、ダイマー(ダイマー画分中)、トリマー(トリマー画分中)、テトラマー(テトラマー画分中)等の混合物を含有する。カカオはそれぞれのモノマー、ダイマー等を1種類以上含有するので、モノマーおよびオリゴマーの混合物は単離された画分で生じる。オリゴマーの変化性は、プロシアニジンの基礎単位である2つのモノマーであるエピカテキンおよびカテキン、並びにオリゴマー中にモノマーを結合する化学結合の結果として生じる。したがって、カカオダイマーは主として、それぞれエピカテキンの2つのモノマーを含有するB2およびB5である。それぞれのモノマーおよびオリゴマーは、例えばC18カラムを使用する逆相HPLCを使って得てもよい。

【0041】

例えば溶媒由来抽出物のようなカカオ抽出物、カカオ画分、単離された化合物またはカカオ原料の形態で、あるいは有効量のカカオフラバノールおよび/またはプロシアニジンを含むチョコレートとして、本発明の組成物中にカカオポリフェノールを使用してもよい。従来のカカオ加工法を用いてカカオ原料を調製して差し支えないが、好ましくは、米国特許第6,015,913号(Kealey et al.)に記載の方法を用いて調製する。あるいは、カカオポリフェノールレベルを高めるために、275以下の発酵因子を有するカカオ豆から調製したチョコレート液およびカカオ固形物を用いる。それら原料は、従来のカカオ加工法(例えば焙煎工程を含む)および完全発酵豆を用いて得られるよりも高いカカオポリフェノール

10

20

30

40

50

含有量を有する。従来技術を用いて上記の原料から、あるいはここに言及することによりその関連部分が引用されるW099/45788として公開された国際特許出願第PCT/US99/05414号に記載のように、チョコレート製造においてカカオポリフェノールを保護するために改善された方法を用いて、チョコレートを調製することができる。少なくとも1つの以下の非従来的方法によって調製されたチョコレートは、この中で、「保存量のカカオポリフェノールを有するチョコレート」と称される：(i)発酵途中または未発酵のカカオ豆からカカオ原料を調製する；(ii)カカオ原料製造においてカカオポリフェノールを保護する；および(iii)チョコレート製造工程においてカカオポリフェノールを保護する。

【0042】

ある実施の形態において、本発明の組成物は、例えばダイマーのように、少なくとも1つのオリゴマーを含有する。そのような組成物はさらに、少なくとも1つのモノマーまたはモノマーの組合せ、例えばカテキンおよびエピカテキンを含んでもよい。別の実施の形態において、例えばカカオから単離されたモノマー画分の形態で、モノマーであるカテキンおよびエピカテキンの組合せを含有する組成物を調製し使用してもよい。

【0043】

合成プロシアニジンを用いても差し支えなく、それらは、当業界で公知の方法、およびここに言及することによりその関連部分が引用される、W099/19319として公開された国際特許出願第PCT/US98/21392号の実施例に記載の方法によって調製できる。

【0044】

フラバノールおよび／またはプロシアニジン誘導体も有用である。それらは、以下のものを含む；没食子酸エステル（例えば没食子酸エピカテキンおよび没食子酸カテキン）のようなモノマーおよびオリゴマーのエステル；例えば上記の構造式の位置X、Yおよび／またはXにおいてモノ-またはジ-糖成分（例えば-D-グルコース）のような糖成分で誘導体化された化合物；グリコシル化モノマーおよびオリゴマー、およびそれらの混合物；例えば硫酸化、グルクロン酸化、およびメチル化形態のようなプロシアニジンモノマーおよびオリゴマーの代謝物であって、大腸微小植物代謝により産生されるプロシアニジンの酵素切断産物を除くもの。それら誘導体は、天然由来であっても合成によって調製されたものであっても差し支えない。

【0045】

本発明の組成物は、薬剤、食品、食品添加物、栄養補助食品として有用である。本組成物は、担体、希釈剤、または賦形剤を含んでいて差し支えない。意図された用途に応じて、ヒトまたは家畜での使用、食品、食品添加物、栄養補助食品、または薬剤における使用に適するように、担体、希釈剤、または賦形剤が選択される。

【0046】

ここで用いたように、「食品」は、成長、修復および生活過程を維持し、かつエネルギーを供給するために生物の体内で用いられる、タンパク質、炭水化物および／または脂肪から実質的に成る物質である。食品は、例えばミネラル、ビタミン、および調味料のような補助的物質も含んでいて差し支えない。Merriam-Webster's Collegiate Dictionary, 10th Edition, 1993を参照。食品の用語は、ヒトまたは動物が摂取するのに適合させた飲料を含む。ここで用いたように、「食品添加物」は、FDA(21 C.F.R. 170.3(e)(1))によって定義されており、直接的および間接的添加物を含む。ここで用いたように、「薬剤」は医薬である。Merriam-Webster's Collegiate Dictionary, 10th Edition, 1993を参照。薬剤は医薬品とも称される。ここで用いたように、「栄養補助食品」は、食事を補足することが意図された、以下の食物原料の1つ以上を有するまたは含有する製品（タバコ以外）である：ビタミン、ミネラル、ハーブまたは他の植物、アミノ酸、全1日摂取量を増やすことによって食事を補足するために男性に用いられる栄養物質、あるいはそれら原料の濃縮物、代謝物、構成成分、抽出物または配合物。

【0047】

例えばメチル化化合物または代謝分解産物のようなポリフェノールまたはその誘導体の存在により、および必要に応じて別の癌治療薬と組み合わせることにより、改良された任

10

20

30

40

50

意の飲料を含む、任意の従来の食品も本発明の範囲に含まれる。L-アルギニン、カルシウム、カリウム、マグネシウム、ビタミンEおよびビタミンCのような酸化剤、任意のビタミンB複合体、カロチノイド、グアールガム、および／またはモノまたはポリ不飽和脂肪酸（例えばオメガ-3脂肪酸）のような他の化合物が存在してもよい。

【0048】

(i)カカオポリフェノールを含有しない食品にポリフェノールまたはその誘導体を添加することによって、あるいは(ii)食品が従来から例えばチョコレートのようなポリフェノールを含有する場合には、従来の食品中に含まれるレベルを越えてポリフェノールレベルを強化することによって、改良を行う。例えば抽出物、画分または単離および精製された化合物の形態で、カカオポリフェノールのような追加のポリフェノールを添加することによって；原料を含む別のポリフェノール（例えば木の実の表皮）と共にカカオポリフェノールを添加することによって；食品の製造に用いられるカカオ原料中のカカオポリフェノールを保存するように、上記のようにカカオ原料加工およびカカオ豆選択を操作することによって；あるいは、上記のようにチョコレート製造工程を操作することによって；強化を行うことができる。従って、それら食品（飲料を含む）は、匹敵する従来の食品（飲料を含む）と比較して、「高められたレベルのポリフェノール」（カカオプロシアニジンを含む）。高められたレベルのポリフェノールを有するチョコレートの例は、チョコレート製造業者が、既に市販されている製品に、カカオポリフェノール含有カカオ抽出物を添加した場合に生じる。そのような食品は、「高カカオポリフェノール食品」とも称され、すなわち、それら食品は従来の対応物よりも高レベルのポリフェノールを含有する。

10

20

30

40

【0049】

カカオポリフェノールおよび必要に応じて別の癌治療薬を含む食品を、ヒトまたは家畜における使用（ペットフードを含む）に適合させて差し支えない。その食品は菓子以外であっても差し支えないが、好ましいコレステロール降下食品は、例えばミルクチョコレート、スウィートチョコレート、およびセミスウィートチョコレート（ブラックチョコレート、低脂肪チョコレート、およびチョコレートでキャンディーを覆ったようなキャンディーを含む）のような、同一性規格(standard of identity)(S01)または非S01チョコレートのような菓子類である。他の例として、焼き製品（例えばチョコレートケーキ、焼きスナック、クッキー、ビスケット等）、調味料、グラノーラバー(granola bar)、キャラメル(toffee chew)、食事代用バー(meal replacement bar)、スプレッド(spread)、シロップ、粉末飲料混合物、カカオまたはチョコレート風味飲料、ブディング、もち、米混合物(rice mix)、風味の良いソース等が挙げられる。所望であれば、食品はチョコレートまたはカカオ風味である。食品は、チョコレート、または例えば、木の実（例えばピーナッツ、くるみ、アーモンド、およびヘーゼルナッツ等）を含有するグラノーラバーのようなキャンディーバーでもよい。例えばピーナッツの表皮は約17%のフラバノールおよびプロシアニジンを含有し、さらにアーモンドの表皮は約30%のフラバノールおよびプロシアニジンを含有するため、この中に記載の食品に、表皮を有する木の実を加えると、全ポリフェノール含有量が高められることに注意すべきである。1つの実施形態では、チョコレートキャンディーのヌガー(nougat)に、木の実の表皮を添加する。

【0050】

ある実施の形態において、非チョコレート食品は、約5μg/g以上から約10mg/g（例えば5μg/g以上、好ましくは10μg/g以上、より好ましくは100μg/g以上）のカカオフラバノールおよび／またはプロシアニジンオリゴマーを含有する。所望であれば、非チョコレート食品は、以下に記載のチョコレート食品中に含まれるレベルよりもさらに高レベルのカカオプロシアニジンを含んでいて差し支えない。

【0051】

ある実施の形態において、チョコレート菓子は、心臓不整脈の発生、または例えば神経変性疾患のような、ギャップ結合伝達における異常と関連する任意の状態を治療し、予防し、危険を減少し、または発生を減少するために、有効量のカカオフラバノールおよび／またはプロシアニジンを含有する。ある実施の形態において、チョコレートは、その製品

50

中の無脂肪力カオ固体物の全体量に基づいて、チョコレート1g当たり、3,600 µg以上、好ましくは4,000 µg以上、より好ましくは4,500 µg以上、さらに好ましくは5,000 µg以上、最も好ましくは5,500 µg以上のカカオフラバノールおよび／またはプロシアニジンを含有する。他の実施形態では、チョコレートは、その製品中の無脂肪力カオ固体物の全体量に基づいて、チョコレート1g当たり、6,000 µg以上、好ましくは6,500 µg以上、より好ましくは7,000 µg以上、最も好ましくは8,000 µg以上のカカオプロシアニジンを含有し、さらにより好ましくは10,000 µg含有する。

【0052】

ミルクチョコレート菓子は、そのミルクチョコレート製品中の無脂肪力カオ固体物の全体量に基づいて、ミルクチョコレート1g当たり、1,000 µg以上、好ましくは1,250 µg以上、より好ましくは1,500 µg以上、最も好ましくは2,000 µg以上のカカオフラバノールおよび／またはプロシアニジンを含有する。より好ましい実施形態では、ミルクチョコレート菓子は、そのミルクチョコレート製品中の無脂肪力カオ固体物の全体量に基づいて、ミルクチョコレート1g当たり、2,500 µg以上、好ましくは3,000 µg以上、より好ましくは4,000 µg以上、最も好ましくは5,000 µg以上のカカオフラバノールおよび／またはプロシアニジンを含有する。

【0053】

食品中のL-アルギニンの量は変化して差し支えない。通常、カカオは、100gの部分脱脂カカオ固体物100g当たり、1から1.1gのL-アルギニンを含有する。それはカカオ100g当たり0.8から1.5gの範囲に亘るであろう。ある実施の形態において、本発明のチョコレート食品は、カカオ原料中に天然で生じる量よりも多い量で、L-アルギニンを含有する。食品中で用いられるカカオ原料およびL-アルギニンの量が分かれれば、当業者は容易に最終製品中のL-アルギニンの全体量を特定できるであろう。食品は、通常、食品1 g当たり、5 µg/g以上、好ましくは30 µg/g以上あるいは60 µg/g以上、さらに好ましくは200 µg/g以上でL-アルギニンを含むであろう。

【0054】

フラバノールおよび／またはプロシアニジンのようなポリフェノールの1日有効量を単一の1人前量で提供してもよい。したがって、菓子（例えばチョコレート）は、1人前当たり少なくとも約100mg（例えば150 - 200mg、200 - 400mg）のカカオプロシアニジンを含有してもよい。

【0055】

必要に応じてL-アルギニンと共に、フラバノールおよび／またはプロシアニジンを含む薬剤を、例えば経口、口腔内、経鼻、直腸、静脈内、非経口、および局所等の様々な経路で投与して差し支えない。当業者は、構造式Anの化合物、および必要に応じて他の癌治療薬の腫瘍部位への供給を最大限にするために適切な投与形態を特定することができる。したがって、各投与形態に適合させた剤形も本発明の範囲に含まれ、例えば錠剤、カプセル剤、ゼラチンカプセル剤（ゲルカップ）、バルクまたは単位量の粉末または顆粒、エマルジョン、懸濁液、ペースト、クリーム、ゲル、フォームまたはゼリー等の固体剤形、液体剤形、および半固体剤形が挙げられる。徐放性剤形も本発明の範囲に含まれ、米国特許第5,024,843号；第5,091,190号；第5,082,668号；第4,612,008号；および第4,327,725号（参照によって関連部分がこの中に組み込まれている）に記載のように調製することができる。適切な薬剤的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤は、当業界で周知であり、当業者は容易にそれらを特定できる。例えば錠剤は、効果量のポリフェノール含有組成物、ならびに例えばソルビトール、ラクトース、セルロースまたはリン酸2カルシウムのような担体を含んでもよい。

【0056】

カカオフラバノールおよび／またはプロシアニジン、および必要に応じて別の癌治療薬を含有する栄養補助食品を、当業界で公知の方法を用いて調製することができ、例えば、リン酸2カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、硝酸カルシウム、ビタミン、およびミネラルのような栄養素を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

更に、本発明の組成物（例えば食品、栄養補助食品、薬剤）を含むパッケージおよびフラバノールおよび／またはプロシアニジンおよび／またはその誘導体の存在または増強された含有量、またはErbB2を過剰発現する癌を治療するための組成物の使用を示すラベルも本発明の範囲内である。

【 0 0 5 8 】

ここで用いたように、「治療」とは、例えば病気の進行を遅らせ、寿命を延ばし、死の危険を減らすことにより、ErbB2を過剰発現する癌のような現在の病状を改善することを意味する。「予防する」という用語は、病気の兆候を減らすことを含む、病気を発症することに関連する危険性を減らすことを意味する。予防は、ErbB2を過剰発現する癌を発症する危険性が高いことが分かっている個体において使用してもよい。本方法は、ヒト、または例えばイヌ、ネコ、ウマ等の家畜動物において用いることができる。10

【 0 0 5 9 】

本発明の方法は、例えば有効な期間（例えばErbB2の過剰発現の治療的に適切な減少を達成するために）、必要に応じて他の癌治療薬と共に、ErbB2を過剰発現する癌の治療に有効な量でカカオフラバノールおよび／またはその関連オリゴマーのようなフラバノールおよび／またはその関連オリゴマーを含むある量の組成物を、哺乳類、好ましくはヒトまたは家畜動物に投与する工程を含む。20

【 0 0 6 0 】

ある実施の形態において、本発明は、有効な期間ペントマーまたはオクタマーを有効量含む組成物をヒトまたは家畜動物に投与することにより、ErbB2過剰発現により特徴付けられる癌を治療および／または予防する方法に関する。20

【 0 0 6 1 】

したがって、以下の使用は本発明の範囲内である。ErbB2過剰発現により特徴付けられる状態の使用のための、薬剤、食品、栄養補給または栄養補助食品の製品中でのフラバノールおよび／またはそのオリゴマーの使用。ある実施の形態において、ヒトまたは家畜動物においてErbB2を過剰発現する癌を治療するまたはその危険を減少するための、薬剤、食品、栄養補給または栄養補助食品中でのフラバノールおよび／またはそのオリゴマーの使用が提供される。フラバノールおよび／またはそのオリゴマーは、カカオフラバノールおよび／またはカカオフラバノールオリゴマーでもよい。30

【 0 0 6 2 】

以下の使用は、いくつかの実施の形態を示す。ErbB2を過剰発現する乳癌を治療するまたはその危険を減少するための、薬剤、食品、栄養補給または栄養補助食品の製品中でのフラバノールおよび／またはそのオリゴマーの使用。ErbB2を過剰発現する卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、内皮癌、唾液腺癌、子宮内膜癌、および肺癌、および咽頭癌および非小細胞肺癌を治療するまたはその危険を減少するための、薬剤、食品、栄養補給または栄養補助食品の製品中でのフラバノールおよび／またはそのオリゴマーの使用。家畜動物における類似の癌も治療される。

【 0 0 6 3 】

有効量は、ここに提供される指図を使用して当業者により特定されてもよい。例えば、有効量は、哺乳類の体内で生理的に適切な濃度を達成するようなものでもよい。そのような生理的に適切な濃度は、少なくとも20ナノモル(nM)、好ましくは少なくとも約100nM、およびより好ましくは少なくとも約500nMでもよい。ある実施の形態において、哺乳類の血液中少なくとも約1マイクロモルが達成される。40

【 0 0 6 4 】

本発明の方法はさらに、例えばErbB2発現または細胞増殖のレベルを測定することにより、治療の有効性を特定する工程を含んでもよい。

【 0 0 6 5 】

本発明の組成物は、予防目的で健康な哺乳類に、または治療を必要とするまたはErbB2を過剰発現する癌と関連する危険要素を少なくとも1つ有する哺乳類に投与されてもよい50

。例えば、そのような癌の家族の病歴を有する個体に組成物を投与してもよい。ErbB2を過剰発現する癌にかかりやすい哺乳類の他の母集団は当業者に明らかであろう。

【0066】

ErbB2を過剰発現する癌を治療する、またはその危険を減少するために有効な量は、ここに提供される指図および当該技術における一般知識を使用して当業者により特定されてもよい。フラバノールおよび／または関連オリゴマーは、約50mg/日-約1000mg/日、好ましくは約100-150mg/日から約900mg/日、および最も好ましくは約300mg/日から約500mg/日まで投与されてもよい。しかしながら、上記より多い量を使用してもよい。

【0067】

必要な回数に関して熟練した医者によって特定されたように、例えば毎日、1ヶ月に1回、2カ月に1回、半年に1回、1年に1回といった有効期間の投薬計画、あるいは他の投薬計画に従って、治療／予防的投与を継続して差し支えない。投与は、少なくともErbB2過剰発現をErbB2発現の治療的に適切なレベルに減少させるために必要な期間続けてよい。好ましくは、毎日組成物を投与し、最も好ましくは、哺乳類の体内の効果的な化合物レベルを維持するために、例えば朝と夜というように、1日2回または3回組成物を投与する。最も有益な結果を得るために、少なくとも約30日から約60日間組成物を投与する。そのような投薬計画を定期的に繰り返して差し支えない。

【0068】

以下の非限定的な実施例において本発明をさらに説明する。

【実施例】

【0069】

実施例1：フラバノール／プロシアニジンの特定

以下のようにプロシアニジンを定量化した：市販されている(-)-エピカテキン、ならびに以下の方法によって精製状態で得られたダイマーからデカマーを用いて複合標準を作成した：Hammerstone, J.F. et al., J. Ag. Food Chem.; 1999; 47(10)490-496, Lazarus, S.A. et al., J. Ag. Food Chem.; 1999; 47(9); 3693-3701、Adamson, G.E. et al., J. Ag. Food Chem.; 1999; 47(10) 4184-4188。励起波長276nmおよび発光波長316nmでの蛍光検出を利用して、以前挙げられたAdamson引例に記載の順相HPLC法を用いて、それら化合物を使用した標準ストック溶液を分析した。ピークを集め、任意の1つのオリゴマー類内の全ての異性体が含まれるようにその面積を合計し、さらに2次フィット(quadratic fit)を用いて校正曲線を作成した。モノマーおよび小さなオリゴマーはほとんど直線プロットを有しており、それはモノマーおよびダイマーに基づく校正曲線を作成するために直線回帰を事前に行ったものと一致していた。

【0070】

それら校正曲線を用いて、以下のように調製した試料中のプロシアニジンレベルを計算した：最初に、ヘキサン（各45mL）を用いて、カカオまたはチョコレート試料（約8g）を3回脱脂処理した。次に、5mLのアセトン／水／酢酸混合物（70:28.5:0.5 v/v）を用いて1gの脱脂材料を抽出した。次に、試料のHPLCデータを、上記のように得られた校正曲線（精製オリゴマーを用いた）と比較することによって、脱脂材料中のプロシアニジンの量を特定した。Association of Official Analytical Chemists(AOAC Official Method 920.177)による標準化方法を用いて、試料（チョコレートに関して1gの試料を用い、または液体に関して0.5gの試料を用いた）の脂肪の割合（%）を特定した。さらに、元の試料（脂肪を含む）中の全プロシアニジンの量を計算した。カラム間の変動を防ぐため、各試料について実施する前に校正を行った。

【0071】

実施例2：キナーゼプロファイリング発現アッセイ

この実施例は、プロシアニジンがErbB2レセプター-キナーゼの発現をダウンレギュレートすることを示す。以下に詳細に記載されるように、キナーゼプロファイリング発現アッセイを使用して表示が行われ、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により結果を確かめた。さらに、プロシアニジンは、ヒト大動脈内皮細胞（HAEC）およびヒト微

10

20

30

40

50

小皮膚内皮細胞（HMDEC）の成長を抑制し、この成長の抑制は一部ErbB2のダウンレギュレーションおよびその後の下流の事象により起こるかもしれない。分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ11（MAPK11）およびKDRもまたダウンレギュレートされた。

【0072】

物質および方法

予備的順相HPLCによるプロシアニジンオリゴマーの精製

約0.7gの半精製したカカオのアセトン抽出物を、それぞれ容量比で70：28.5：0.5のアセトン／水／酢酸の7mLに溶解させた。5m Supelcosil LC-Si 100 を使用して室温で分離させた。直線勾配によりプロシアニジンを溶出した。オリゴマーの分離を280nmで紫外線により観察し、オリゴマーに対応するピーク間の谷で画分を採集した。いくつかの予備的分離から同じ保持時間有する画分を混合し、不完全真空中で回転蒸発させ、凍結乾燥させた。モノマー画分はエピカテキンおよびカテキンを含んでいた。エピカテキンはSigmaから購入した。

10

【0073】

細胞処理

キナーゼプロファイリング実験のために、様々な濃度のプロシアニジンおよびコントロール（2.5-40μg/ml）を、10%ウシ胎仔血清を含有し、2% v/vヒドロコルチゾン、1mg/mlヒト上皮成長因子（EGF）、10ng/ml塩基性纖維芽細胞増殖因子（bFGF）、3ng/ml、およびヘパリン10mg/mlを加えた200培地中で、75%密集ヒト大動脈内皮細胞（HAEC）と共にインキュベートした。インキュベーションは、3つの異なる時間、すなわち2、8、および24時間続けた。ポジティブおよびネガティブコントロールを同時に用意した。例えば細胞形態、成長、および生存性の観察を記録した。

20

【0074】

RNA単離

各時間において、細胞を採取し、1mlのトリソール試薬（Invitrogen, Carlsbad, CA）を加えることによりすぐに溶解させ、製造者の指示によりRNAを単離視、-80°で凍らせた。指示にしたがってSuperscript II RT（Invitrogen, Carlsbad, CA）を使用して5μgのRNAを逆転写し、cDNAを得た。1μlのcDNAを以下に記載するように行ったPCRに使用した。

30

【0075】

試薬の毒性により実験で使用される細胞が危うくなる場合、異なるオーダーの大きさのmRNA収率を生じるようにチロシンキナーゼのPCRに基づく発現実験を変化させてもよい。したがって、実験で使用する前に、存続性およびウェルからの任意の分離について細胞を顕微鏡で視覚化した。全ての投与量および時点についての処理からの細胞は、>90%生存可能であり、ウェルに付着したままであった。

40

【0076】

キナーゼプロファイリング

キナーゼプロファイリングアッセイは、Robinsonらにより確立され（Robinson et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93:5958, 1996; and Kung et al., J.Biomed Sci 5:74, 1998）、わずかに修正してここで使用した。したがって、様々なチロシンキナーゼcDNA転写物を、キナーゼ触媒領域内に位置する保存モチーフDFGおよびDVWに由来する縮重プライマーの混合物を使用して増幅した（表1）。

40

【表1】

表1

レイジプライマー—センス		
プライマー	配列	配列番号
5' TYKI-14	CCAGGTCACCAARRTWGGNGAYTTYGG	配列番号 1
5' TYKI-15	CCAGGTCACCAARRTIDCNGAYTTYGG	配列番号 2
5' TYKI-16	CCAGGTCACCAARRTTDCNGAYTTYGG	配列番号 3
5' TYKI-17	CCAGGTCACCAARRTIWGYGAYTTYGG	配列番号 4
5' TYKI-18	CCAGGTCACCAARRTTGYGGAYTTYGG	配列番号 5
レイジプライマー—アンチセンス		
TYKI-A3	CACAGGTTACCRHANGMCCAAACRTTC	配列番号 6
TYKI-C3	CACAGGTTACCRHANGMCCACACRTTC	配列番号 7
TYKI-G3	CACAGGTTACCRHANGMCCAGACRTTC	配列番号 8
TYKI-T3	CACAGGTTACCRHANGMCCATACRTTC	配列番号 9
TYKI-YAG3	CACAGGTTACCRHARCTCCA YACRTTC	配列番号 10
TYKI-RAG3	CACAGGTTACCRHARCTCCARACRTTC	配列番号 11
TYKI-AT3	CACAGGTTACCRAACATCCAKACRTTC	配列番号 12

【0077】

したがって、アミノ酸配列K[V/I][S/C/G]DFG(配列番号13)をコードする5'(センス)プライマーは、5'-AAR RTT DCN GAY TTY GG(アミノ酸配列14)により示される。アミノ酸配列DVW[S/A][F/Y](配列番号15)をコードする3'(アンチセンス)プライマーは、5'-RHA IGM CCA IAC RTC(配列番号16)により示される。上記の配列に示される混合塩基は以下のようである：(1)N=A+C+T+G；(2)D=A+T+G；(3)H=A+T+C；(4)R=A+G；(5)Y=C+T；(6)M=A+C；および(7)I=デオキシイノシン。5'プライマーを、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(Invitrogen, Carlsbad, CA)を触媒にして[⁻³³P]-ATP(NEN Life Science Products, Boston, MA)で標識した。5'プライマーを、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用してP³³で末端標識した。50 μlのPCR反応物は、5 μlの10×PCRバッファー(Perkin Elmer, Boston, MA)；2 μlのMgCl₂溶液；1 μlの10mM dNTPs；5 μlのP33標識された5'プライマー；1 μlの3'プライマー；1 μlのサンプルcDNA；および1 μlのTaqGoldポリメラーゼ(Perkin Elmer, Boston, MA)を含有した。キナーゼ標的への縮重プライマーの結合を助けるために低ストリンジエンシーエレメントで以下のようにPCRを行った。これは以下のように行われた：94℃で10分間1サイクル、94℃で1分間、45℃で1.5分間、および72℃で15秒間を5サイクル。その後、高ストリンジエンシーのPCRエレメントにより、キナーゼ標的の增幅を以下のように行った：94℃で1分間、56℃で1.5分間および72℃で20秒間プラスサイクルごとに2秒間をさらに23サイクル。

【0078】

PCR増幅された産物を、2.4%アガロースゲル(3:1の割合のNusieve GTGおよびアガロースLE; BMA, Rockland, ME)中で電気泳動した。153-177bpのバンドをゲルから切り出し、QIAEX IIゲル抽出キット(QIAGEN, Valencia, CA)を使用してDNAを抽出した。抽出されたDNAの活性を、液体シンチレーション計数により特定し、ヌクレアーゼを有しないH₂Oによる希釈によりそれぞれのサンプルを20,000-cpm/μlに標準化した。

【0079】

各サンプルからの等量の放射性DNAを制限酵素(New England Biolabs, Beverly, MA)で

10

20

30

40

50

切斷し、その後切斷産物を7%アクリルアミドゲル(10:1アクリルアミド/ビス-アクリルアミド; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)上で分析した。ゲルを乾燥させ、オートラジオグラフィーにかけた。

【0080】

詳細な電子化された制限切斷地図が、各市販の酵素について100以上のチロシンキナーゼについて利用できる。したがって、オートラジオグラフ上の画像を調べることにより、示差発現したキナーゼバンドが各切斷についてマッピングされた。各示差発現されたバンドのサイズを、それぞれのゲル上で行った標準サイズマーカーに基づき算定した。示差発現された切斷バンドがオートラジオグラフ上で観察された場合、再現性のために切斷を繰り返した。いくつかのキナーゼは、1つ以上の酵素切斷部位を有し、利用できる場合にはキナーゼが正確に同定されたことを確かめるために使用した。10

【0081】

定量的リアルタイムPCR

あるキナーゼがプロシアニジンにより影響を受けていると同定された後、GenAmp 5700配列検出システム(PE Biosystems, Foster City, CA)を使用して定量的リアルタイムPCRを行い、キナーゼ同定が正しいことを確かめた。

【0082】

簡単には、Primer Expressソフトウェア(PE Biosystems, Foster City, CA)を使用して、最適なPCRプライマーを各キナーゼについて設計した。ErbB2についてはプライマーは以下のようである：フォワードプライマー5'-AGGGAAACACATCCCCCAA(配列番号17)、およびリバースプライマー5'-TTGGCAATCTGCATACACCAG(配列番号18)。KDRについて、プライマーは以下のようである：フォワードプライマー5'-CTTCCAAGTGGCTAAGGGCA(配列番号19)およびリバースプライマー5'-GGCGAGCATCTCCTTTCTG(配列番号20)。MAPK11について、プライマーは以下のようである：フォワードプライマー5'-ACGCCCGGACATATATCC(配列番号21)およびリバースプライマー5'-GTCCAGCACCGACATCCT(配列番号22)。ハウスキーピング遺伝子、アクチンまたはGAPDHについてのプライマーは、通常使用されるように、PE(Perkin Elmer, Boston, MA)から購入した。20

【0083】

SYBR Green technologyを使用してPCRを行った(S.A.Bustin, Quantification of mRNA Using Real-time Reverse Transcription PCR(RT-PCR): Trends and Problems. J.Mol.Endocrinol. 29(2002), pp.23-39)。PCR反応を三重に繰り返した。各50μlのPCR反応物は、5μlの最適に希釈されたcDNAサンプル、3μlの最適なフォワードおよびリバースプライマー、5μlの10× SYBR PCRバッファー、4μlのdNTP混合物(2.5mM)、6μlの25mM MgCl₂、0.25μlのAmpliTaq Goldおよび23.75μlのH₂Oを含有した。標的およびハウスキーピング遺伝子の両方についての標準曲線を、予め準備した参照サンプルから調製した。標的遺伝子の相対的濃度を標準曲線から特定し、ハウスキーピング遺伝子の量に正規化した。30

【0084】

細胞増殖

細胞増殖を算定するために、HAEC(2.5×10⁴細胞/15mmウェル)を、指示されるように、VEGF(10ng/ml)の不存在または存在下でEGFおよびFGF(10ng/ml)を加えたヒト内皮血清フリー培地(Cascade Biologics Inc., Portland, OR)で培養した(Battista PJ, Bowen HJ, & Gorfien SF(1994)A serum-free medium for the culture of human umbilical vein endothelial cells, Focus 17:10-13)。内皮細胞を、24時間および48時間カカオオリゴマーおよびコントロールで処理した。この時、細胞を12時間0.6 μCi[3H]チミジン/15mmウェルと共に振盪し、DNA中への[3H]チミジンの混入を細胞増殖の指標として測定した(Ferrara et al. 1991, Endocrinology 129, 896-900)。40

【0085】

免疫沈降および免疫プロット法

これらの実験の目的は、タンパク質レベルで、特定のレセプターの使用におけるカカオプロシアニジンの効果を示すことである。ErbB2レセプターはこの方法で分析できる。50

【0086】

免疫沈降後のErbB2の免疫プロット分析のために、細胞を1mM Na3VO4を含有する氷冷溶解バッファー[150mM NaCl、10mM Tris-HCl(pH 7.4)、1mM EDTA、0.5% NP40、および1% Triton X-100]で溶解する。それぞれの処理のために、タンパク質A/タンパク質G-セファロースビーズの混合物と共に4℃で1時間インキュベートすることにより、等量のタンパク質(100μg)を前処理する。低速遠心分離によるセファロースビーズの除去後、上澄みを新しい試験管に移す。溶解物上澄みを、2μg/mlの特異的抗体の存在下で4℃で一晩溶解バッファー中にインキュベートする。さらに4℃で2時間25μlのタンパク質A-セファロースビーズ(50%懸濁)と共に溶解物をインキュベートすることにより、免疫複合体を採取する。その後免疫沈澱物を溶解バッファーで3回洗浄し、1mM Na3VO4を含有するPBS(pH7.4)で1回洗浄する。2倍濃縮Laemmliサンプルバッファー[125mM Tris-HCl(pH6.8)、20%グリセロール、4%SDS、10%β-メルカプトエタノール、および0.00125%プロモフェノールブルー]でタンパク質を抽出し、4分間煮沸し、7.5%SDS-PAGE上で分離し、ウェスタンプロットにより分析する。

10

【0087】

生体外キナーゼアッセイ

これらの実験の目的は、細胞の刺激の前後に単離されたキナーゼのリン酸化のレベルを分析することである。

【0088】

密集HAECは24時間飢餓させた血清であり、次に細胞をVEGFまたは1.0mM H₂O₂で刺激し溶解する。前処理した細胞溶解物(450μgタンパク質)を抗VEGFR-1および2と共に一晩インキュベートし、生じた免疫複合体をタンパク質A-セファロースビーズで採取し洗浄する。洗浄されたビーズを、特異的カテキンを含有する15μlのキナーゼバッファー[100mM Tris-HCl(pH7.0)、0.2%β-メルカプトエタノール、20mM MgCl₂、および0.2mM Na3VO4]中で氷上1時間インキュベートする。最終容量20μlまで5μCiの[-32P]ATP(ICN Biochemicals, Irvine, CA)を加えることによりキナーゼ反応を開始し、30℃で15分間インキュベートする。Laemmliサンプルバッファーを加えることにより反応を停止し、7.5%SDSゲル上で電気泳動によりタンパク質を分離する。30%メタノールおよび10%酢酸中の0.1%(w/v)クーマシーブルーレ-250中で30分間染色し、クーマシーブルーカラムを有しない同じ溶液中で脱染色する。その後この溶液中でゲルをよく洗浄し、フジX線フィルムにさらす。

20

30

【0089】

ヒト皮膚内皮細胞におけるプロシアニジンの効果

ErbB2は、毛細血管細胞の新しい組織への成長に重要なレセプターである。これらの微小血管細胞は、大動脈内皮細胞と比較して多くの異なるタンパク質を発現し、これらの微小血管細胞は、腫瘍血管新生、炎症、および創傷治癒に通常関連する細胞である。したがって、キナーゼ発現プロファイリング、リアルタイムPCR、および細胞増殖実験は、1mMのH₂O₂で誘発され血管新生(すなわち成長)刺激を受けるヒト微小皮膚内皮細胞(HMDEC)を使用して行った。細胞を30分間刺激し、4時間後に採取した。HAECについて上記のように実験を行った(しかし、HAECは2、8、および24時間培養し、H₂O₂は使用しなかった)。ペータアクチンをしようしてPCR発現結果を正規化した。

40

【0090】

リン酸化における変化についても細胞をテストした。したがって、50μg/mlの前処理ペントママー(48時間)およびコントロールHMDECのタンパク質溶解物を使用してウェスタンプロットを調製した。「免疫沈降および免疫プロット法」に記載されるように溶解物を調製した。組換えHRP-抗-ホスホチロシン(RC20H)抗体でプロットをプロープした。抗チューブリンタンパク質に同じ染色をすることによりタンパク質サンプルを正規化した。さらに、50μg/mlの前処理ペントママーおよびコントロールHMDECのタンパク質溶解物を使用するウェスタンプロットを調製した。細胞を1mM H₂O₂に30分間さらし、20分後に採取した。プロットを組換えHRP-抗-ホスホチロシン(PY20)抗体でプロープした。

【0091】

50

結果

示差発現されたキナーゼの最大数を同定するために、30の異なる制限酵素のパネルをこの実験で使用し、150の異なるキナーゼについて同定の平均を提供する。カカオから単離および精製したプロシアニジンモノマー、ダイマー、ペントマーおよびオクタマーによる処理の後、ほとんどのチロシンキナーゼの発現は変化しないままであった。例えば、RsaIで切斷した場合、キナーゼTrk、Gsk-3bおよびS1kはプロシアニジン処理により影響を受けないようであった。これらの影響を受けていないバンドは、切斷の効果および異なるキナーゼ間の発現の相対レベルを確認するために内部統制として作用した。

【0092】

発現におけるほとんどの多数の、一貫したおよび強い相違は、8時間の時点で生じた。
例えは、2時間の時点で、6/8(75%)の再生率を有する全部で8つの示差発現したバンドが、10 μ g/mlのプロシアニジン投与量で観察された。8時間の時点で、18/20(90%)の再生率を有する20の示差発現したバンドが観察された。これらの示差発現バンドの90%は、コントロール処理をペントマーおよびオクタマー処理と比較した場合に観察された。異なる投与量および時点で再現可能に示差発現したキナーゼを、さらなる実験のために選択した。ErbB2、MAPK11およびKDRキナーゼをさらに詳細に調べた。

【0093】

特にペントマーおよびオクタマーのプロシアニジンは、制限酵素RsaI切斷ゲルにより示されるようにErbB2キナーゼの発現を下方調節した(図1)。キナーゼPCR産物をBsp1286I制限酵素で切斷した場合に、下方調節の同様のパターンが観察された; ErbB2はこの制限部位を含む。大動脈内皮細胞を異なる個体から単離した場合、同じ下方調節が観察された。

【0094】

定量的リアルタイムPCRおよびErbB2特異的プライマーを使用して、上記の結果を確かめた。発現における著しい減少が、特にペントマーおよびオクタマーを20 μ g/ml(8時間)の投与量で使用した場合に観察された(図2)。

【0095】

ErbB2はVEGF(血管内皮成長因子)およびMAPK(分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ)系に関係しうるので、さらにリアルタイムPCR実験を行い、VEGFR-2/KDR(血管内皮成長因子レセプター-2/キナーゼ挿入ドメインレセプター)、VEGFについての主要分裂促進因子キナーゼレセプター、およびMAPK11/p38ベータ2キナーゼにおける減少を明らかにした(図5)。

【0096】

プロシアニジンがHAECの成長特性を変化するか否かを特定するために行った増殖実験により、細胞増殖の抑制が示された(図3)。図3を参照すると、特にペントマー処理は、細胞の増殖を減少させ、細胞はVEGF(10ng/ml)を加えることにより救出できなかった。

【0097】

微小真皮内皮細胞を使用する実験において、ErbB2発現は、RsaI(図4A)およびBsp1286I(図4B)制限酵素切斷の両方においてモノマーおよびペントマー処理により下方調節された。MetおよびVEGFR-3は、プロシアニジンにより影響を受けないチロシンキナーゼを示す。厳密な検査において、VEGFR-3およびMetのカカオ処理サンプルからのバンドは、コントロールとほとんど同じ強度を示す。対照的に、ペントマーサンプルからのErbB2バンドは下方調節される。定量的リアルタイムPCR実験により、これらの観察を確かめた(図5、20 μ g/ml前処理ペントマーおよびコントロールHMDEC)。図5を参照すると、減少したErbB2発現に加えて、KDR/VEGFR-2およびMAPK11キナーゼ発現も減少した。

【0098】

プロシアニジンがチロシンキナーゼリン酸化に影響を与えるか否かを特定するために、HMDEC溶解物のウェスタンプロットをRC20 H抗体でプローブした。コントロール(C)と前処理ペントマー(T)細胞との間のチロシンリン酸化における小さい相違が観察された(図6)。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 9 】

さらに、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の前処理ペントマーおよびコントロールHMDECのタンパク質溶解物を使用してウェスタンプロットを得た。図6のウェスタンプロットについて、細胞を30分間 1mM の H_2O_2 にさらし、20分後に採集した。プロットを組換えHRP-抗-ホスホチロシン(PY20)抗体でプロープした。図7を参照すると、矢印は、コントロール(C)とプロシアニジン処理細胞(T)との間のチロシンリン酸化における変化を示す。プロシアニジン処理細胞は、 129kDa 分子量付近のチロシンリン酸化を減少した。

【 0 1 0 0 】

様々な濃度のペントマーおよびオクタマーにより処理されたHMDECの増殖が図8に示される。細胞を30分間 1mM の H_2O_2 にさらし(成長前刺激)、48時間後に採集した。図8を参考すると、ペントマーおよびオクタマーは、成長の投与量依存性抑制を示す。
10

【 0 1 0 1 】

多くのタイプの腫瘍の成長は血管新生に依存し、血管新生工程の破壊は通常抑制を引き起こす。血管新生工程は、血管内皮成長因子(VEGF)レセプターおよび表皮成長因子(Erb)レセプター情報伝達を活性化することにより生じうる。ErbBチロシンキナーゼレセプターとそのリガンドとの間の相互作用は、自己分泌および傍分泌ループの調節を介して血管新生において重要な役割を果たす。ErbB2レセプターの過剰発現はVEGFの基礎レベルの誘導およびヘレグリンへの暴露を生じ、ErbB3およびErbB4についてのリガンドはさらにVEGF分泌を増強するということが報告されている。したがって、ErbB2のレベルの低下は、1つのメカニズムによる成長を減少させ、活性化ErbB3およびErbB4による二量化のためにErbB2を除去することによりVEGF産生の効果を抑制しうる。ErbB2およびVEGFはMAPKキナーゼ系を活性化できるので、プロシアニジンはMAPK11およびKDR(VEGFレセプター)を下方調節するという上記の観察は、ErbB2の下方調節およびその結果として生じる成長抑制における効果と一致する。したがって、プロシアニジンは、内皮および腫瘍血管新生において効果を生じうる。
20

【 図面の簡単な説明 】**【 0 1 0 2 】**

【図1】図1は、プロシアニジンで処理されRsaI制限酵素で切断されたHAEC(ヒト大動脈上皮細胞)から調整されたチロシンキナーゼPCR断片のオートラジオグラフを示す
30

【図2】図2は、プロシアニジンの存在下でHAECにおけるErbB2キナーゼの発現の減少を確かめるリアルタイムPCR実験の結果を示す

【図3】図3は、血管内皮成長因子(VEGF)を加えてまたは加えないで、プロシアニジンモノマーまたはペントマーの存在下で行われた細胞増殖実験を示す

【図4】図4は、ポリシアニジンにより処理されRsaI制限酵素により切断された微小皮膚内皮細胞から調製されたチロシンキナーゼPCR断片のオートラジオグラフおよびプロシアニジンにより処理されBsp1286Iにより切断された微小皮膚内皮細胞から調製されたチロシンキナーゼPCR断片のオートラジオグラフを示す

【図5】図5は、ErbB2、KDR/VEGFR-2およびMAPK11遺伝子発現の減少を確かめる定量的リアルタイムPCR実験を示す($20\mu\text{g}/\text{ml}$ 前処理ペントマーおよびコントロールHMDEC)

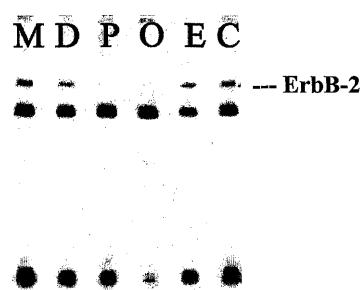
【図6】図6は、RC20H抗体でプロープされた前処理ペントマーおよびコントロールHMDEC溶解物のウェスタンプロットを示す
40

【図7】図7は、 1mM の H_2O_2 に30分間さらされ、組換えHRP-抗-ホスホチロシン(PY20)抗体でプロープされた前処理ペントマーおよびコントロールHMDEC溶解物のウェスタンプロットを示す

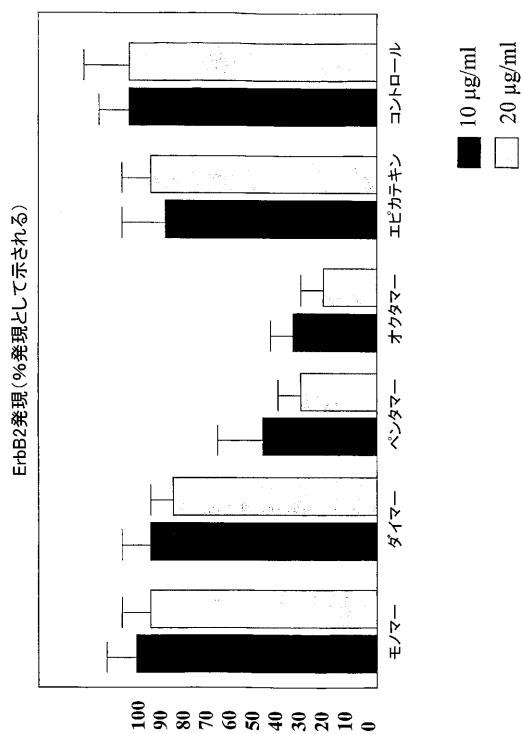
【図8】図8は、 1mM の H_2O_2 で30分間刺激された処理ペントマーおよび処理オクタマーHMDECの増殖を示す。Agstは、血管由来の刺激を示す(1mM の H_2O_2)

【図1】

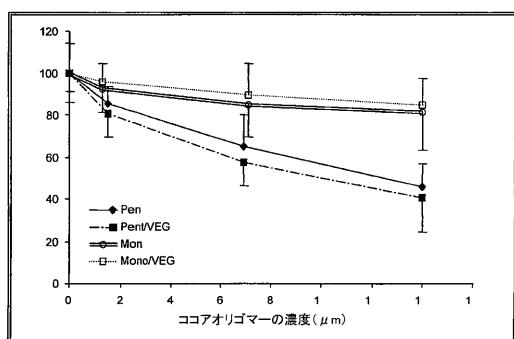
FIG.1



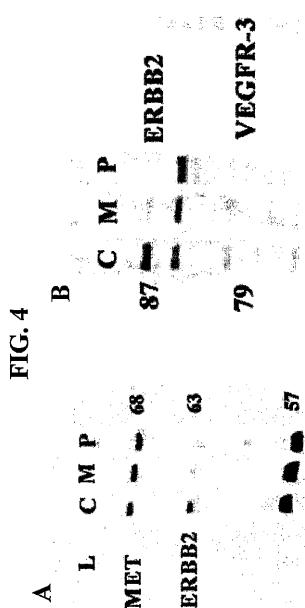
【図2】



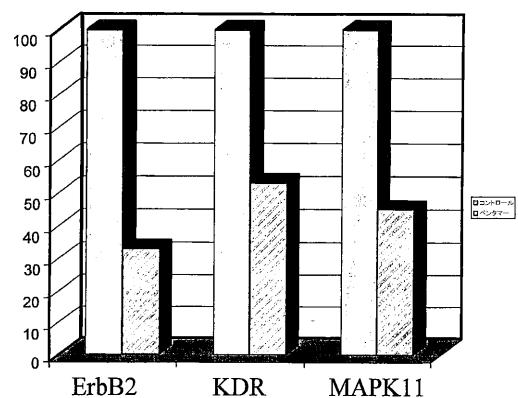
【図3】



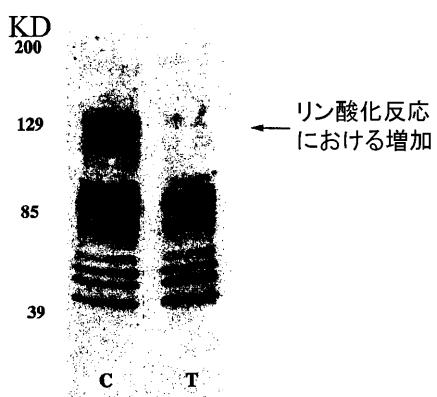
【図4】



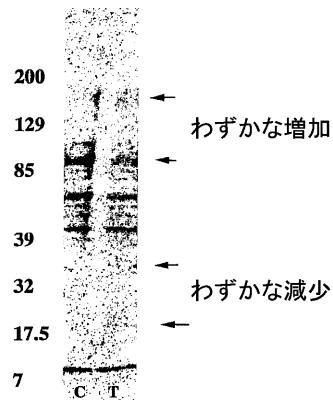
【図5】



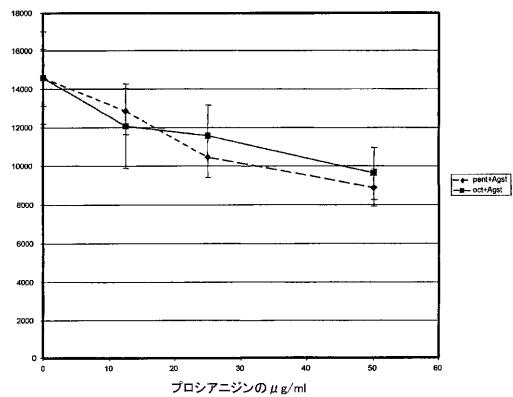
【図7】



【図6】



【図8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/33355
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 31/35 US CL : 514/456		
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) U.S. : 514/456		
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 practicable, search terms used) REGISTRY, HCPLUS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,420,572 B1 (ROMANCZYK L et al) 16 July 2002 (16.07.2002), columns 5-8, column 32, line 1 through column 33, line 5.	1-25
X	Database HCPLUS on STN (Columbus, OH, USA) DN 136:334883, ITO H et al, 'Antitumor activity of compounds isolated from leaves of Eriobotrya japonica,' J Agr & Food Chem 2002, 50 (8), abstract.	1-25
X	Database HCPLUS on STN (Columbus, OH, USA) DN 138:180310, YAMAGISHI M et al, 'Effects of cacao liquor proanthocyanidins on PhIP-induced mutagenesis in vitro, and in vivo mammary and pancreatic tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats,' Cancer Letters, 2002, 185 (2) 123-130, abstract.	1-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		
<p>Date of the actual completion of the international search 02 October 2005 (02.10.2005)</p> <p>Name and mailing address of the ISA/US · Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230</p>		<p>Date of mailing of the international search report 04 NOV 2005</p> <p>Authorized officer Rebecca Cook <i>Valerie Bell-Harris for</i></p> <p>Telephone No. (571) 272-1600</p>

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,IT,LU,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,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,M,A,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BA08 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZC02