

(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2008-536822

(P2008-536822A)

(43) 公表日 平成20年9月11日(2008.9.11)

|                                     |                     |             |
|-------------------------------------|---------------------|-------------|
| (51) Int.Cl.                        | F I                 | テーマコード (参考) |
| <b>A 6 1 K 31/522 (2006.01)</b>     | A 6 1 K 31/522      | 4 C 0 8 4   |
| <b>C 0 7 D 473/18 (2006.01)</b>     | C 0 7 D 473/18      | 4 C 0 8 6   |
| <b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>      | A 6 1 P 35/00       |             |
| <b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>      | A 6 1 P 35/02       |             |
| <b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>      | A 6 1 P 43/00 1 2 1 |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く |                     |             |

|               |                              |          |                       |
|---------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2008-503271 (P2008-503271) | (71) 出願人 | 506240908             |
| (86) (22) 出願日 | 平成18年3月27日 (2006.3.27)       |          | アルト ソリューションズ インコーポレ   |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成19年10月29日 (2007.10.29)     |          | ーテッド                  |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2006/011027            |          | アメリカ合衆国 19801 デラウェア   |
| (87) 国際公開番号   | W02006/104975                |          | 州, ウィルミントン, オレンジ ストリー |
| (87) 国際公開日    | 平成18年10月5日 (2006.10.5)       |          | ト 1209, コーポレーション トラス  |
| (31) 優先権主張番号  | 60/665, 105                  |          | ト センター                |
| (32) 優先日      | 平成17年3月25日 (2005.3.25)       | (74) 代理人 | 100091096             |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 弁理士 平木 祐輔             |
|               |                              | (74) 代理人 | 100096183             |
|               |                              |          | 弁理士 石井 貞次             |
|               |                              | (74) 代理人 | 100118773             |
|               |                              |          | 弁理士 藤田 節              |
|               |                              | (74) 代理人 | 100119183             |
|               |                              |          | 弁理士 松任谷 優子            |
| 最終頁に続く        |                              |          |                       |

(54) 【発明の名称】 テロメラゼ陽性細胞におけるテロメア長の調節および癌治療

## (57) 【要約】

非環状ヌクレオシドアナログを使用するテロメラゼ陽性癌細胞におけるテロメア短縮化、G2停止およびアポトーシスの誘導が開示されている。また、非環状ヌクレオシドアナログを使用して、腫瘍形成性テロメラゼ陽性細胞が腫瘍へと成長する機会を得るのを低減 (impair) 又は妨げる (prevent) ための方法および腫瘍退縮 (定着腫瘍のサイズの減少) を促進させるための方法が開示されている。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

不適當もしくは病的に増殖している細胞または不死細胞の存在により引き起こされる障害を予防または治療するための、あるいは哺乳動物またはヒトにおける癌を治療するための方法であって、該細胞においてテロメア短縮化を誘導する1以上の非環状ヌクレオシドアナログまたはその製薬上許容される塩を含む組成物の治療的有効量を、該癌に罹患しているヒトに投与することを含んでなる方法。

**【請求項 2】**

該ヌクレオシドアナログが、アシクロビル (acyclovir)、ガンシクロビル (ganciclovir) およびペンシクロビル (penciclovir) またはそれらのプロドラッグよりなる群から選ばれる、請求項1記載の方法。 10

**【請求項 3】**

該癌が、骨癌、乳癌、前立腺癌、肝癌、膵癌、肺癌、脳癌、卵巣癌、子宮癌、精巣癌、皮膚癌、白血病、黒色腫、食道癌、胃癌、結腸癌、網膜癌または膀胱癌よりなる群から選ばれる、請求項1記載の方法。

**【請求項 4】**

該組成物を経口、非経口、皮下、筋肉内または血管内投与する、請求項1記載の方法。

**【請求項 5】**

2以上の該ヌクレオシドアナログを含む組成物を投与する、請求項2記載の方法。

**【請求項 6】**

投与する該ヌクレオシドアナログの1つが1日当たり約10mg/kg体重～約150mg/kg体重である、請求項1記載の方法。 20

**【請求項 7】**

該ヌクレオシドアナログを、3'-アジド-2',3'-ジデオキシチミジン (AZT)、2',3'-ジデオキシイノシン (ddI) および2',3'-ジデヒドロ-3'-デオキシチミジン (d4T) よりなる群から選ばれる異なるタイプのアナログと組合せて投与し、ここで、その異なるタイプのアナログが、単独では癌の治療には不十分な低用量で存在する、請求項1記載の方法。

**【請求項 8】**

テロメラーゼ陽性癌細胞においてテロメア伸長を減弱する方法であって、該細胞においてテロメア短縮化を誘導する非環状ヌクレオシドアナログの有効量を該細胞に投与することを含んでなる方法。 30

**【請求項 9】**

該ヌクレオシドアナログが、アシクロビル (acyclovir)、ガンシクロビル (ganciclovir) およびペンシクロビル (penciclovir) またはそれらのプロドラッグよりなる群から選ばれる、請求項8記載の方法。

**【請求項 10】**

該ヌクレオシドアナログを、3'-アジド-2',3'-ジデオキシチミジン (AZT)、2',3'-ジデオキシイノシン (ddI) および2',3'-ジデヒドロ-3'-デオキシチミジン (d4T) よりなる群から選ばれる異なるタイプのアナログと組合せて投与し、ここで、その異なるタイプのアナログが、単独ではテロメアの伸長の終結には不十分な低用量で存在する、請求項9記載の方法。 40

**【請求項 11】**

該癌細胞が乳癌細胞、前立腺癌細胞、肝癌細胞、骨癌細胞、膵癌細胞、肺癌細胞、脳癌細胞、卵巣癌細胞、子宮癌細胞、精巣癌細胞、皮膚癌細胞、白血病細胞、食道癌細胞、胃癌細胞、結腸癌細胞、網膜癌細胞もしくは膀胱癌細胞またはそのような細胞の組合せである、請求項8記載の方法。

**【請求項 12】**

テロメラーゼ陽性細胞の成長を妨げ又は阻害する方法であって、該細胞を十分な量の非環状ヌクレオシドアナログと接触させて、該細胞におけるテロメア短縮化、G2停止およびアポトーシスの誘導を達成させることを含んでなる方法。 50

## 【請求項 13】

該細胞を約 $1.5\mu\text{M}$ ~ $3.0\mu\text{M}$ の濃度のヌクレオシドアナログと接触させる、請求項12記載の方法。

## 【請求項 14】

該ヌクレオシドアナログが、アシクロビル (acyclovir)、ガンシクロビル (ganciclovir) もしくはペンシクロビル (penciclovir) またはそれらのプロドラッグである、請求項12記載の方法。

## 【請求項 15】

該テロメラーゼ陽性細胞が癌細胞であり、該癌細胞が、骨肉腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、副腎皮質癌および黒色腫よりなる群から選ばれる、請求項12記載の方法。

10

## 【請求項 16】

癌の予防を要するヒトにおける癌の予防方法であって、該癌が該ヒトの細胞におけるテロメラーゼ活性によるものであり、該方法が、1以上の非環状ヌクレオシドアナログまたはその製薬上許容される塩を含む組成物の治療的有効量を該ヒトに投与することを含んでなり、腫瘍形成性テロメラーゼ陽性細胞が癌へと成長する機会を得るのを該ヌクレオシドアナログが低減 (impair) 又は妨げる (prevent)、方法。

## 【請求項 17】

該癌が、骨癌、乳癌、前立腺癌、肝癌、膵癌、肺癌、脳癌、卵巣癌、子宮癌、精巣癌、皮膚癌、白血病、黒色腫、食道癌、胃癌、結腸癌、網膜癌または膀胱癌よりなる群から選ばれる、請求項16記載の方法。

20

## 【請求項 18】

テロメラーゼ陽性癌細胞においてアポトーシスを促進させる方法であって、該細胞においてテロメア短縮化を誘導する1以上の非環状ヌクレオシドアナログまたはその製薬上許容される塩を含む組成物の有効量を該細胞に投与することを含んでなる方法。

## 【請求項 19】

該ヌクレオシドアナログがG2停止を誘導する、請求項18記載の方法。

## 【請求項 20】

該癌細胞が乳癌細胞、前立腺癌細胞、肝癌細胞、骨癌細胞、膵癌細胞、肺癌細胞、脳癌細胞、卵巣癌細胞、子宮癌細胞、精巣癌細胞、皮膚癌細胞、白血病細胞、食道癌細胞、胃癌細胞、結腸癌細胞、網膜癌細胞もしくは膀胱癌細胞またはそのような細胞の組合せである、請求項19記載の方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2005年3月25日付け出願の米国仮特許出願第60/665,105号の利益を主張するものであり、出願第60/665,105号の開示の全体を参照により本明細書に組み入れることとする。

## 【0002】

本発明は癌治療の分野に関する。特に、本発明はテロメラーゼ陽性細胞におけるテロメア伸長の調節に関する。さらに詳しくは、本発明は、テロメア伸長の阻害、アポトーシスの誘導およびテロメラーゼ陽性癌の治療または予防のための、ガンシクロビル (GCV)、アシクロビル (ACV) およびそれらのエステルプロドラッグを含む非環状ヌクレオシドアナログの使用に関する。

40

## 【背景技術】

## 【0003】

リーディング鎖およびラギング鎖の合成における対称性は、直鎖状ゲノムの複製に関する「末端問題 (end problem)」を引き起こす<sup>1</sup>。この問題を克服するために、真核生物染色体は、TTAGGG反復配列よりなる末端構造テロメアを専門化させている<sup>2</sup>。テロメラーゼ<sup>3,4</sup>は、テロメアを伸長させ従って細胞倍加中の癌細胞の大多数における染色体安定性を維持するリボ核タンパク質酵素である<sup>5</sup>。テロメアの末端からのDNAの漸減は体細胞の細胞増

50

殖能の制御に関連づけられている<sup>6</sup>。

【0004】

正常培養ヒト細胞は、培養内で、限られた複製能しか有していない。培養内の正常細胞は、それが、集団成長が終止する独立した点に達するまで、複製される。これは致死期 (mortality stage) 1 (M1期) と称され、細胞老化と呼ばれる成長停止を招くサイズへの少数のテロメアの短縮により引き起こされる。この段階は、p53およびpRBヒト腫瘍抑制遺伝子の機能の阻止により迂回されうる。ついで該細胞は、致死期2 (M2期) または危機期 (crisis stage) と称される別のチェックポイントまで、テロメア長の更なる減少と共に増殖し続ける。M2期における成長停止は細胞増殖および細胞死速度間の釣り合いにより生じる。この時期において、テロメアのほとんどが非常に短い場合、末端-末端融合および染色体の破壊-融合が、著しい染色体異常およびアポトーシスを引き起こす。稀な状況下では、細胞はM2から逃れ、そのテロメアの長さを安定化することにより不死化する。これは酵素テロメラーゼの活性化またはテロメア延長の代替メカニズム (ALT) により生じる<sup>7, 8</sup>。

10

【0005】

ヒト生殖系列<sup>9</sup>および癌細胞の大多数<sup>3</sup>はテロメラーゼを発現する。テロメラーゼは、テロメアを伸長させ従って細胞倍加中の癌細胞の大多数における染色体安定性を維持するリボ核タンパク質酵素である<sup>10</sup>。実際、テロメラーゼによる短縮化テロメアの伸長はヒト癌細胞におけるテロメア維持の主要メカニズムである。テロメラーゼの阻害は、テロメア長を減少させることによりヒトテロメラーゼ陽性癌細胞の成長を抑制する<sup>11</sup>。

20

【0006】

テロメラーゼによる短縮化テロメアの伸長は、ヒト癌細胞におけるテロメア維持の、よく知られたメカニズムである。生物学的観点からは、テロメラーゼは、細胞分裂中のテロメアの末端におけるTTAGGG型の反復DNA配列 (テロメア配列) の付加によりテロメアを伸長させる。この作用により、テロメラーゼは染色体安定性をもたらし、細胞を不死化する。この酵素を研究するための有用な手段としての選択的インヒビターを得るための試みにおいて、無細胞系においてヌクレオチドアナログの阻害効果が調べられている (Yamaguchiら, 2001, Nucleic Acids Research Supplement No. 1 211-212)。癌細胞などの増殖中の細胞はテロメラーゼ活性を発現するが、正常ヒト体細胞は、癌細胞で見られるような多数の細胞分裂にわたってテロメア長を維持するのに十分なレベルのテロメラーゼ活性を発現しないため、テロメラーゼは、癌を含む増殖性障害を治療するための良好な標的である。

30

【0007】

現在、テロメラーゼ陽性細胞からの癌を選択的に治療するための方法は、アンチセンス法、ドミナントネガティブ突然変異体または薬理学的因子によるTERT (テロメラーゼ逆転写酵素) 機能またはテロメアの長さの調節を含む (Bisoffiら, Eur J Cancer, 1998, 34: 1242-1249; Rothら, Leukemia, 2003, 17:2410-2417; Dammら, EMBO J., 2001, 20:6958-6968; 米国特許第6,294,332号、第6,194,206号、第6,156,763号および第6,046,307号を参照されたい)。癌を治療するためにヒトテロメラーゼ活性を阻害するために、ヌクレオシドアナログ (例えば、AZT) の使用が試みられている。しかし、テロメラーゼ活性を修飾するためにヌクレオシドアナログを投与する、先行技術において開示されている方法は、満足しうるものではないか、あるいは臨床場面に適していない。なぜなら、それらの臨床的有用性は、低い治療比 (すなわち、有効量に対する毒性量の比) により限定されるからである。

40

【0008】

AZTに対するテロメラーゼ陽性細胞系の長期曝露は、100  $\mu$ M (Murakami, J., Nagai, N., Shigemasa, K., Ohama, K. Inhibition of telomerase activity and cell proliferation by a reverse transcriptase inhibitor in gynaecological cancer cell lines. Eur. J. Cancer 35, 1027-1034 (1999)) または更には800  $\mu$ M (Gomez DE, Tejera AM, Olivero OA. Irreversible telomere shortening by 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT

50

) treatment. Biochem Biophys Res Commun. 1998; 246(1): 107-10; Tejera AM, Alonso DF, Gomez DE, Olivero OA. Chronic in vitro exposure to 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine induces senescence and apoptosis and reduces tumorigenicity of metastatic mouse mammary tumor cells. Breast Cancer Res Treat. 2001;65(2):93-9) に等しい薬物濃度で、有意なテロメア短縮化を誘導しなかった。

#### 【0009】

300mgのAZTの1回の経口投与後のピーク血清濃度は10 $\mu$ M未満であり、それは0.5時間以内に急速に吸収された (Morse GD, Olson J, Portmore A, Taylor C, Plank C, Reichman RC Pharmacokinetics of orally administered zidovudine among patients with hemophilia and asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) infection. Antiviral Res. 1989 Mar;11(2):57-65)。標準的なAZT治療は、Retrovir (登録商標) (AZT) の製造業者の推奨によれば、成人では2または3分割量で500または600mg/日である。5 $\mu$ Mの濃度のAZTに対する短時間曝露は、in vitroおよびin vivoで哺乳類細胞に対して望ましくない毒性効果を誘発すると報告されている (Roskrow M, Wickramasinghe SN. Acute effects of 3'-azido-3'-deoxythymidine on the cell cycle of HL60 cells. Clin Lab Haematol. 1990; 12(2): 177-84)。これらの報告に基づけば、抗テロメラーゼおよび抗腫瘍効果をもたらすのに十分に高いAZTのようなヌクレオシドアナログの用量は非常に毒性であり、ヒトにおける重要な組織に対する損傷を引き起こしうると予想することが可能である。したがって、ヒトテロメラーゼに対する調節または阻害活性を有する治療用ヌクレオシドアナログの特定、ならびにテロメラーゼが不死および望ましくない増殖に寄与する癌の治療方法の開発が必要とされている。

#### 【発明の開示】

#### 【0010】

##### 発明の概要

本発明は、抗ウイルスヌクレオシドアナログを含有する組成物、ならびに真核生物テロメラーゼ活性の調節、抑制または阻害および癌などの増殖性障害の治療におけるそれらの使用方法を提供する。より詳しくは、本発明は、非環状ヌクレオシドアナログ、または抗ヘルペスウイルスおよび抗サイトメガロウイルス物質として活性であるヌクレオシドアナログが、癌細胞などの増殖している細胞におけるテロメラーゼ活性を修飾して、抗腫瘍物質として機能しうることを開示する。本発明の1つの態様において、ガンシクロビルまたはアシクロビルでのテロメラーゼ陽性細胞の処理は、進行性のテロメア喪失、G2期停止、染色体異常および最終的な細胞死を誘導することが見出された。

#### 【0011】

さらに、これらの抗腫瘍性ヌクレオシドアナログは、増殖中の細胞においてテロメラーゼ活性を抑制し細胞死を誘発するのに、臨床上許容されうるレベルで十分である点で、テロメラーゼに対する驚くべき効果を有する。これらの知見は本発明において、テロメラーゼ活性により特徴づけられる癌 (テロメラーゼ陽性癌) の治療または予防のための新規療法への道を切り開くものである。

#### 【0012】

現在のところ、非環状であり抗テロメラーゼ性であり抗腫瘍性であるヌクレオシドアナログに基づく有用な治療用組成物は存在しない。本出願人は、非環状ヌクレオシドアナログ (本明細書中ではテロメラーゼのインヒビターまたはアンタゴニストとも称される) を使用する in vivoでのテロメラーゼの阻害が治療上有益であることを示す開示を初めて提供するものである。さらに、この開示以前には、そのような操作が治療上の有用性を有することが予測されうるといふ当業者による合意は存在しなかった。

#### 【0013】

テロメアは細胞周期、細胞複製および老化の制御に関与しているため、本発明のヌクレオシドアナログ含有組成物は腫瘍細胞の不死および無制御な細胞成長を予防または制御しうる。本発明の組成物は、細胞増殖性疾患、特に、テロメラーゼにより維持されるテロメアを有することにより特徴づけられるヒトの腫瘍の治療において特に有用である。

## 【0014】

したがって、1つの態様においては、本発明は、テロメラーゼに関連した状態、特に細胞内のテロメラーゼ活性のレベルの上昇に関連した状態の治療方法に関する。該方法は、非環状であり抗テロメラーゼ性であり抗増殖性の物質である少なくとも1つのヌクレオシドアナログの治療的有効量を含む組成物を、治療を要するその細胞または哺乳動物に投与することを含む。テロメラーゼ活性のレベルは、後記のとおり又は任意の他の既存方法もしくは同等の方法により測定されうる。テロメラーゼ活性の「レベルの上昇（上昇したレベル）」は、個々の細胞におけるテロメラーゼ活性の絶対レベルが、その対象もしくは個体における正常細胞の場合と比べて又は該状態に罹患していない他の対象もしくは個体における正常細胞の場合と比べて上昇していることを意味する。そのような状態の例には、癌状態、またはその個体に通常は存在しない細胞の存在に関連した状態が含まれる。1つの実施形態においては、該組成物は、AZT、ddI、ddA、d4T (Strahl C, Blackburn E H Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. Mol Cell Biol. 1996;16(1):53-65) 以外のヌクレオシドアナログを含む。好ましくは、該組成物はGCVもしくはACVまたはそれらのプロドラッグを含む。もう1つの実施形態においては、これらの組成物は更に、臨床上許容されるレベルのAZTを含む。これらのテロメラーゼインヒビター（テロメラーゼ活性を直接的に阻害し又は間接的にテロメア内に取り込まれて、テロメアの更なる伸長を妨げるもの）の利用は、テロメラーゼが活性である腫瘍における進行性のテロメア短縮化をもたらす。テロメア長が臨界長まで短くなれば、腫瘍は危機的状态となり、最終的には死亡する。正常細胞内のテロメラーゼ活性は一般には低いか又は検出不能であるため、これらのテロメラーゼインヒビターは正常体細胞にはほとんど又は全く影響を及ぼさない。

10

20

## 【0015】

テロメラーゼ活性の阻害は直接的に細胞死をもたらしたり、あるいは最終的にアポトーシスにより細胞を殺す化学療法剤の効果を増強しうる。特に、本発明は、テロメラーゼのインヒビターおよびアンタゴニストを投与することにより、細胞数を連続的に増加させる能力を有するテロメラーゼ発現細胞の増殖を阻害するための方法を提供する。ヌクレオシドアナログの投与は、当業者によく知られた任意の望ましい手段により達成されうる。

30

## 【0016】

本発明の1つの実施形態においては、癌の予防を要する哺乳動物または対象（例えば、ヒト）におけるテロメラーゼの発現により特徴づけられる癌の予防方法を提供する。該予防方法は、組成物の治療的有効量を該哺乳動物に投与することを含む。該組成物は本発明のテロメラーゼインヒビターまたはアンタゴニストを含む。該インヒビターまたはアンタゴニストはテロメラーゼ陽性細胞におけるテロメアの延長を阻止し、それによりテロメラーゼ発現細胞の増殖を阻害する。該インヒビターは、非環状ヌクレオシドアナログまたはそのようなアナログの製薬上許容される塩、あるいは該インヒビターまたはアンタゴニストが強化（富化）された液体または固体食材である。該食品は、例えば、バター、マーガリン、ビスケット、パン、ケーキ、キャンディー、菓子類、ヨーグルトまたは他の発酵乳製品の形態の機能性食品、あるいはヒトによる消費に適した穀類でありうる。あるいは、それは栄養補助食品（栄養サプリメント）、栄養素、医薬、食物、栄養剤（nutraceutical）、健康食品および/またはデザイナーフードでありうる。定期的に、テロメラーゼ陽性細胞の存在に関して該ヒトを試験する。テロメラーゼ陽性細胞がもはや該哺乳動物において検出されなくなったら、インヒビターまたはアンタゴニストの使用を中止することが可能である。

40

## 【0017】

治療的態様に加えて、本発明は、テロメラーゼを発現する病的に増殖する細胞を検出するための診断方法およびキットをも提供する。本発明のこれら及び他の実施形態を以下に更に詳しく説明する。

## 【発明を実施するための最良の形態】

50

## 【 0 0 1 8 】

## 発明の詳細な説明

本発明は、哺乳類テロメラーゼ活性を阻害しうるヌクレオシドアナログの使用を含む組成物および方法を提供する。特に、あるヌクレオシドアナログは、臨床上許容されるレベルで細胞におけるテロメア/テロメラーゼ機能に影響を及ぼしうることが見出された。特に、本発明の文脈においては、「ヌクレオシドアナログ」は、天然に存在するヌクレオシドに対する構造類似性を有する化合物であるが、非環状であるアナログに限定される。本発明において意図される非環状ヌクレオシドアナログは、尾部（例えば、グアニンに存在する9-(1,3-ジヒドロキシ-2-プロポキシメチル)を伴うがヒドロキシル環状環（ペントース）を欠くプリン（またはピリミジン）骨格を有するものである。本発明のアナログの具体例には、限定的なものではないが以下のものが含まれる：アシクロビル（acyclovir）、ガンシクロビル（ganciclovir）、ペンシクロビル（penciclovir）および対応するプロドラッグ、すなわち、それぞれバラシクロビル（valacyclovir）、バルガンシクロビル（valganciclovir）およびファミシクロビル（famciclovir）。アシクロビル<sup>12</sup>は、細胞DNA成分であるグアニン（すなわち、DNAのAT-CGにおけるG）を模倣することにより作用する。アシクロビル（9-[2(ヒドロキシメトキシ)-メチル]グアニン）は構造上はGに類似しているが、その尾部、すなわちヒドロキシル「環状」環（ペントース）を欠いており、したがってそれは「非環状」である。ガンシクロビル（ganciclovir）<sup>13, 14, 15</sup>およびペンシクロビル（penciclovir）<sup>16, 17</sup>も、それらはヒドロキシル環状環を欠いているため、「非環状」である。本発明の1つの実施形態においては、本発明の非環状ヌクレオシドアナログの尾部は、ヌクレオシドの2'-デオキシリボース部分の3'-および5'-ヒドロキシル基を模倣する少なくとも1つのヒドロキシル基を有する。本発明の非環状ヌクレオシドアナログは、臨床上許容される程度の毒性で抗テロメラーゼおよび抗増殖特性を示すことが判明している。非環状ヌクレオシドアナログであるアシクロビル、ガンシクロビル、ペンシクロビルおよび対応プロドラッグ、すなわち、バラシクロビル、バルガンシクロビルおよびファミシクロビルは全て、抗ウイルス薬としての臨床使用に関して承認されている。それらの化学構造、およびウイルス感染に対処するための投与計画は、当業者によく知られている。

## 【 0 0 1 9 】

アシクロビル、ガンシクロビル、ペンシクロビルおよび対応プロドラッグはヘルペスウイルスおよび/またはCMV感染症の治療のための抗ウイルス薬としてよく知られているが、増殖性疾患の治療におけるそれらの使用は公知ではない。また、これらの抗ヘルペスウイルス剤の標的酵素はDNAポリメラーゼであることが当技術分野で公知である。

## 【 0 0 2 0 】

本発明において、該非環状抗ウイルス剤が増殖細胞および腫瘍における真核生物テロメラーゼをも標的化しうることが示された。これらの物質は、増殖細胞内に入ると、リン酸化（例えば、ジ-およびトリホスファート）形態となり、テロメラーゼ反応の天然基質（例えば、dGTP）と競合すると考えられている。該リン酸化アナログは、成長中のテロメアDNA鎖内への天然基質の取り込みを阻害することが可能であり、あるいはそれら自体がDNA内に取り込まれてテロメラーゼ媒介重合活性を阻害することが可能であり、これは最終的に鎖伸長の終結につながりうる。要するに、これらのヌクレオシドアナログは、鎖伸長の終結により、テロメアDNAを損傷し、テロメアを短縮化し、アポトーシスを引き起こす。テロメアに対する損傷は、迅速に増殖している（例えば、腫瘍）細胞に対して、正常細胞に対してより有害である。

## 【 0 0 2 1 】

該抗HIVおよび抗ヘルペスヌクレオシドアナログは、ヌクレオシドからヌクレオチド段階へのそれらのリン酸化後においてのみ活性であると報告されている。したがって、リン酸化は、それらの標的に対するヌクレオシドアナログの活性のための決定的に重要な要因であるらしい。この点に関して、AZTは、それがテロメラーゼに対して活性となるためには、3つの連続的なリン酸化を要すると報告されている。

## 【 0 0 2 2 】

本発明の非環状ヌクレオシドアナログは、AZTのような先行技術において公知の抗テロメラーゼヌクレオシドアナログより強力かつ選択的な抗テロメラーゼ物質である。臨床上市容される用量<sup>18, 19, 20, 21, 22</sup>は、AZTのようなヌクレオシドアナログと比べて、抗テロメラーゼ活性およびアポトーシスまたは細胞死を得るのに十分なものである。

## 【 0 0 2 3 】

ガンシクロビル (GCV) およびアシクロビル (ACV) 処理後のテロメラーゼ陽性癌細胞におけるテロメア短縮化、G<sub>2</sub>/M停止 (本明細書中ではG<sub>2</sub>停止とも称される) およびアポトーシスの誘導は、後記のとおりに行った。

## 【 0 0 2 4 】

2つの細胞系 (HeLaおよびNuTu-19) におけるテロメラーゼ比活性を検出するために、リアルタイムTRAPアッセイを行った。報告されているテロメラーゼ陽性細胞系 (HeLa) を比較のために使用した<sup>4</sup>。どちらの細胞系もこの試験で陽性であった (データ非表示)。

## 【 0 0 2 5 】

テロメアDNA合成がテロメラーゼ陽性細胞内で阻害されてテロメア短縮化を誘導しうることを示すために、該テロメラーゼ陽性細胞系を治療濃度のGCV (1.5 μM) またはACV (3.0 μM) で処理した。GCVおよびACVで処理された細胞系ならびに未処理細胞系におけるテロメア長を、テロメア特異的ペプチド核酸 (PNA) プローブ<sup>23, 24</sup>を使用するフローサイトメトリーにより測定した。細胞周期分布を測定するために、細胞をヨウ化プロビジウム (PI) で染色した<sup>23</sup>。両方の種類の処理の14日後、どちらの細胞系もテロメア短縮化、著しいアポトーシスおよびG<sub>2</sub>停止を示した (図1および2)。

## 【 0 0 2 6 】

細胞周期分布における変化を示すために、HeLaおよびNuTu-19細胞をGCVまたはACVで14日間処理し、PIで染色し、フローサイトメトリーにより分析した (同時に行った)。結果は細胞周期のG<sub>2</sub>停止を示している (図3)。変化は迅速でありACV処理の僅か14日後に検出可能であったことに注目することが重要である。これとは対照的に、ヌクレオシドアナログAZTは、高濃度、例えば100 μMにおいてさえも、テロメラーゼ陽性細胞HeLaおよびNuTu-19において、テロメア長にも細胞周期分布にも何ら影響を及ぼさなかった (データ非表示)。

## 【 0 0 2 7 】

同時に、PI染色は、より後の処理段階のGCVまたはACV処理細胞において、未処理細胞と比べて、より高いDNA含量を示した。この事実の合理的な説明は、短いテロメアが染色体の末端-末端連結を誘導したというものである。

## 【 0 0 2 8 】

細胞系の起源は子宮頸 (HeLa) および上皮卵巣 (NuTu-19) である。細胞を、10% ウシ胎児血清で補足されたD-MEM培地内で、5% CO<sub>2</sub>の加湿雰囲気中、37 °Cで培養した。細胞をGCVで処理するために、該培地を1.5 μMのGCV (Cymevene, Hoffman-La Roche) で補足した。細胞をACVで処理するために、該培地を3 μMのアシクロビル (Aciclovir, TEVA Pharm. Lid. Ltd, Israel) で補足した。

## 【 0 0 2 9 】

リアルタイムTRAPアッセイは、記載されているとおり (Wegeら, SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. Nucleic Acids Res. 2003;31(2):E3-3) に行った。

## 【 0 0 3 0 】

フローサイトメトリーによるテロメア長の測定のために、細胞をテロメア特異的FITC結合 (C<sub>3</sub>TA<sub>2</sub>)<sub>3</sub> PNA (Applied Biosystems) プローブで染色し、0.06 μg/ml PIで対比染色 (contrast stain) した (Rufer, N., Dragowska, W., Thornbury G., Roosnek, E., Lansdorp P.M. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations were measured by flow cytometry. Nat. Biotechnol. 16, 743-747 (1998) に記載されているとおりに行った)。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 3 1 】

このようにして、ヌクレオシドアナログGCVおよびACVは、広く受け入れられているモデル系内のテロメラーゼ陽性癌を明らかに抑制することが、本発明において示された。有用なテロメラーゼ抑制性化合物は、前記において具体的に例示されている特定の化合物またはヌクレオシドアナログおよび誘導体に何ら限定されるものではないと考えられる。実際、本開示に照らして設計され合成される最も有用な薬理学的化合物は、第2世代誘導体または更に化学的に修飾された非環状ヌクレオシドアナログであるということになるかもしれない。

## 【 0 0 3 2 】

本発明により可能となる有利な用途を示唆するものではないが、エイズまたは他の免疫不全の患者におけるCMV（サイトメガロウイルス）感染症を治療するためのGCVのこれまでの投与は、GCVが癌患者に容易に投与されうることを意味している。

10

## 【 0 0 3 3 】

さらに、HSVおよびCMV患者への多数の非環状ヌクレオシドアナログの現在の使用は、これらのアナログが有意により低用量で使用可能なことと相まって、テロメラーゼにより誘導および／または媒介される癌の治療におけるアシクロビル、ガンシクロビル、ペンシクロビルおよび対応プロドラッグ、すなわち、パラシクロビル、バルガンシクロビルおよびファミシクロビルの使用に関する規制機関の承認を加速するはずである。

## 【 0 0 3 4 】

本発明はまた、種々の動物モデルの使用を含む。テロメラーゼを発現する細胞系を開発または単離することにより、種々の実験動物における疾患モデルを作製することが可能である。種々の病態を模擬するために、これらのモデルは細胞の皮下、正位（orthotopic）または全身投与を用いることが可能である。例えば、HeLa細胞系をヌードマウス内に皮下注射してテロメラーゼ陽性腫瘍を得ることが可能である。得られた腫瘍は、テロメア反復増幅プロトコル（TRAP）アッセイにおいてテロメラーゼ活性を示すはずである。そのような動物モデルは、ヌクレオシドアナログを単独で又は組合せて試験するための有用な手段となる。

20

## 【 0 0 3 5 】

化合物の*in vivo*での有効性の判定では、生存、腫瘍退縮、腫瘍の進行の停止または遅延、腫瘍の消失および転移の抑制または予防を含む（これらに限定されるものではない）多種多様な基準を用いることが可能である。

30

## 【 0 0 3 6 】

試験化合物での動物の処理は、適当な形態の化合物または組成物を該動物に投与することを含むであろう。本発明の医薬組成物、抑制性または拮抗性物質は、経口、非経口、鼻腔内、頬側、直腸、膣または局所を含む（これらに限定されるものではない）種々の方法で投与されうる。あるいは、投与は気管内点滴、気管支点滴、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内注射によるものでありうる。特に意図されるものとして、全身静脈内注射、血液またはリンパ供給を介した局所投与、および腫瘍内注射が挙げられる。

## 【 0 0 3 7 】

本発明の組成物は多数の態様において重要であろう。それらは、単独で投与される場合にも、癌の治療の当業者に公知の化学および／または放射線療法と組合せて投与される場合にも、テロメラーゼ関連癌の治療計画において重要であろう。あるいは、単にテロメラーゼ活性を軽減することにより、これらの組成物は、癌細胞の、著しいアポトーシスを選択的に誘導するのに役立つであろう。

40

## 【 0 0 3 8 】

該ヌクレオシドアナログは、増殖性疾患などの治療のために、生理的に許容される又は製薬上許容される担体中で宿主に投与されうる。製薬上許容される担体は、1つには、投与される個々の組成物および該組成物を投与するために用いる個々の方法によって決まる。

## 【 0 0 3 9 】

50

本発明の1つの態様においては、哺乳動物における不適当または病的に増殖する細胞または不死細胞の存在により引き起こされる障害の予防または治療方法を提供する。不適当または病的に増殖する細胞または不死細胞は、細胞の正常な調節メカニズムには無関係に存在し、増殖する。これらの細胞が病的なのは、それらが、細胞要素（すなわち、テロメラーゼ）の活性の結果として、正常細胞から逸脱するからである。もちろん、本明細書中で用いる「不適当に増殖する細胞」なる語は良性過増殖細胞でありうるが、特に示さない限り、これらの細胞は、多種多様な腫瘍および癌に特徴的な悪性過増殖細胞を意味する。

#### 【0040】

特に、テロメラーゼの発現により特徴づけられるヒト腫瘍の予防または治療方法を提供する。該ヒト腫瘍には、胃癌、骨肉腫、肺癌、脾癌、副腎皮質癌または黒色腫、脂肪癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、結合組織癌、子宮癌、肛門性器（anogenital）癌、中枢神経系癌、網膜癌、血液およびリンパ系癌、腎癌、膀胱癌、結腸癌および前立腺癌が含まれる。本発明による障害の予防または治療は、本発明の非環状ヌクレオシドアナログ（テロメラーゼのインヒビターまたはアンタゴニスト）の使用により達成される。本発明において使用するインヒビターまたはアンタゴニストは、テロメラーゼを直接的もしくは間接的に妨げてその活性を阻害するもの、および/またはテロメラーゼは機能的なままであるが、テロメア内に取り込まれてテロメアの更なる伸長を妨げてテロメラーゼ発現細胞の成長を阻害するものである。したがって、テロメラーゼのインヒビターまたはアンタゴニストは、細胞の成長を妨げるために使用される。例えば、テロメラーゼのインヒビターまたはアンタゴニストを患者に投与する場合、これらは、進行性のテロメア短縮化、細胞における細胞周期停止、および/またはテロメラーゼ発現細胞の、著しいアポトーシスを引き起こす。本発明においては、「成長を阻害（する）」または「成長の阻害」なる語は、細胞分裂を軽減し又は妨げることをも意味する。本発明における、テロメラーゼを発現する細胞の成長の阻害は、約100%、または100%未満であるが0%ではないことが可能である。例えば、該阻害は、対照細胞（テロメラーゼを発現するがインヒビターでもアンタゴニストでも処理されていない対照細胞）の場合と比較して、約10%～約100%、好ましくは少なくとも25%、より好ましくは少なくとも約50%、より一層好ましくは少なくとも約90%、95%または厳密に100%でありうる。成長の阻害は、当技術分野で公知の任意の方法により測定されうる。例えば、生体染色剤と共にインキュベートした後に測定した、処理サンプルにおける生存可能細胞数を、対照サンプルにおける生存可能細胞数と比較することが可能である。また、成長阻害は、*in vitro*または*in vivo*での細胞増殖における減少を検出するアッセイ、例えばトリチウム化水素取り込みアッセイ、BdU取り込みアッセイ、MTTアッセイ、フォーカス生成能の変化、足場依存性もしくは不死性喪失、腫瘍特異性マーカーの喪失、および/または動物宿主内に注入された腫瘍の形成もしくは抑制の不能性により測定されうる（Dorafsharら、2003、J Surg Res., 114: 179-186; Yangら、2004、Acta Pharmacol Sin., 25:68-75）。

#### 【0041】

単一の不死化細胞または数個のそのような細胞からの癌性腫瘍の発生はヒトにおいては数ヶ月～数年を要する。しかし、本発明を実施することにより、癌を予防することが可能である。なぜなら、テロメラーゼインヒビターで処理された腫瘍形成性テロメラーゼ陽性細胞は、それらが腫瘍へと成長する機会を得る前に、それらの増殖能を喪失するからである。さらに、癌の臨床的発現の前に腫瘍の進行を停止させるための、リスク群へのテロメラーゼインヒビターまたはアンタゴニストの定期的な予防的投与は、新たな癌の症例の割合を潜在的に有意に減少させうるであろう。

#### 【0042】

該ヌクレオシド化合物は、単独で又は異なるアナログと組合せて、経口投与を含む任意の投与経路により投与されうる。ヌクレオシドアナログACV、GCVまたはそれらのL-バリル（L-valil）エステルであるバルガンシクロビル（V-GCV）およびバラシクロビル（V-ACV）は、好ましいヌクレオシドアナログである。それらのすべては商業的に入手可能であり、該製剤は多数の特許および刊行物に記載されている。

## 【0043】

テロメラーゼ活性を有する細胞は選択的に標的化されるはずである。なぜなら、これらの細胞は、テロメアを伸長または維持するためにはテロメラーゼに依存的であり、テロメアの伸長または維持は、ヌクレオシドおよび/またはそれらのアナログとテロメラーゼとの相互作用を要するからである。抗癌作用を発現させるために該アナログを運搬するためにいずれかの特異的標的化因子が望まれる場合には、本発明においては標的化ACVもしくはGCVおよび/または他のアナログが想定される。したがって、いくつかの実施形態においては、医薬組成物は、特定の標的細胞または核内の核部分への特異的運搬のための標的化因子（例えば、ペプチド）に結合した活性化合物（この場合はACVおよびGCVまたは他のヌクレオシドアナログ）を含有することが可能である。

10

## 【0044】

ある与えられたテロメラーゼインヒビターまたはアンタゴニストの用量は、通常の実験の実施により当業者により決定されうる。患者への投与の前に、標準的な実験動物モデルにおいて効力が示されうる。この場合、当技術分野で公知のテロメラーゼ誘発性癌に関する任意の動物モデルが使用されうる（Hahnら，1999，*Nature Medicine*，5(10)：1164-1170；Yeagerら，1999，*Cancer Research*，59(17)：4175-4179）。本発明の方法を用いて処理（治療）される対象または患者は、好ましくはヒトであり、胎児、小児または成人でありうる。処理（治療）される他の哺乳動物はマウス、ラット、ウサギ、サルおよびブタでありうる。

## 【0045】

20

該インヒビターまたはアンタゴニストは、単独で、または照射を含む他の化学療法剤（すなわち、非ヌクレオシドアナログに基づく抗癌剤）と組合せて使用されうる。例えば、テロメラーゼまたはいくつかの他の要因により誘発された癌を治療するために、テロメラーゼ誘発性癌の療法を化学療法および/または放射線療法と組合せることが可能である。当業者に公知の化学療法剤の具体例には、抗癌薬、例えばブレオマイシン（bleomycin）、マイトマイシン（mitomycin）、ナイトロジェンマスタード（nitrogen mustard）、クロラムブシル（chlorambucil）、5-フルオロウラシル（5-fluorouracil）（5-FU）、フロクスウリジン（floxuridine）（5-FUdR）、メトトレキセート（methotrexate）（MTX）、コルヒシン（colchicine）およびジエチルスチルベストロール（diethylstilbestrol）（DES）が含まれるが、これらに限定されるものではない。組合せ療法（併用療法）を実施するためには、本発明のインヒビター化合物を別の抗癌因子（化学または放射線）と組合せて、それらの組合せられた抗癌作用を該動物または患者において得るのに有効な状態で、動物に単に投与することになる。したがって、該因子は、標的細胞の領域におけるそれらの併存をもたらすのに有効な期間にわたり及び有効な量で与えられるであろう。この目的を達成するためには、該因子を同時に投与することが可能であり、化学療法剤の場合には、単一の組成物中で、または異なる投与経路を用いて2つの異なる組成物として投与することが可能である。あるいは、それらの2つの治療を、例えば数分～数時間または数日の範囲の間隔をあけて、お互いの前または後に行うことが可能である。限定的なものではないが一例としては、全身適用の場合のGCVの平均1日量はヒトの成人には1日当たり100mg/kg、マウスおよびヒトの乳児には1日当たり50mg/kgでありうる。

30

40

## 【0046】

治療される対象の状態に応じて、投与量における或る程度の変動が生じうる。投与を担当する医師は個々の患者のための適当な用量を決定し、問題の患者の年齢、状態、病歴などのような複数の要因を考慮しうるであろう。

## 【0047】

したがって、本発明の方法は、細胞のテロメラーゼ誘発性病的増殖に関連した状態および疾患のための治療用途において使用されうる。本発明の治療用途から利益が得られる疾患には、例えば充実性腫瘍および白血病ならびに非癌状態を含む、細胞の過増殖により特徴づけられる全ての疾患が含まれる。さらに、本発明の方法は、*in vivo*の場合だけでなく*ex vivo*の状況においても癌細胞の成長を抑制するために使用されうると意図される。

50

本発明の方法は、限定的なものではないがヒト癌細胞 - 骨肉腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、副腎皮質癌または黒色腫を含む、ex vivoにおける病的に増殖するヒト細胞の成長を抑制するのに特に有用である。骨髓パーズィング (bone marrow purging) は癌治療分野でよく知られており、病的に増殖するヒト細胞の成長を抑制するためのex vivo治療の一例である。

#### 【0048】

本発明は、細胞内のテロメラーゼの発現により不適当、病的または異常に増殖する細胞を特定するための方法およびキットを提供する。該方法は、患者からの組織におけるテロメラーゼの発現の存在 (および / またはレベル) を決定することにより、患者における癌性細胞または腫瘍の存在の診断を補助するスクリーニング方法として使用することが可能であり、テロメラーゼ発現の存在は該患者における癌細胞または病的細胞増殖の指標となる。

10

#### 【0049】

例えば、癌性腫瘍サンプルは、それが本発明の非環状ヌクレオシドアナログの存在下で増殖し得ないことにより診断されうる。該診断は更に、核酸を使用するハイブリダイゼーション、ノーザンブロット法、in situハイブリダイゼーション、RNAマイクロアレイ、RNAプロテクションアッセイ、RT-PCR、リアルタイムRT-PCRまたはテロメラーゼ触媒サブユニットコード化タンパク質の存在の測定 [これは、限定的なものではないがウエスタンブロット法、免疫沈降または免疫組織化学的方法またはテロメラーゼの酵素活性 (TRAPアッセイおよびその変法<sup>4, 26, 27</sup>) を含む種々の方法により測定される] を含む (これらに限定されるものではない) 種々の方法により測定されるテロメラーゼ特異的mRNA発現の検出を含みうる。

20

#### 【0050】

好ましい実施形態においては、ヒト骨肉腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、副腎皮質癌または黒色腫を含む初代癌細胞のような迅速な増殖が生じている組織におけるテロメラーゼ触媒サブユニットRNAの存在および / またはそのmRNAレベルの増加を検出するために、テロメラーゼ触媒サブユニットRNAに対する核酸プローブを使用することが可能である。したがって、本発明は、癌細胞を含む病的に増殖している細胞を検出し特定するために、テロメラーゼの部分配列に相補的な核酸プローブを使用する方法を提供する。例えば、病的に増殖している細胞を特定するための方法は、試験細胞におけるhTERT mRNAの発現のレベルを対照細胞におけるhTERT mRNAの発現のレベルと比較するためにhTERT mRNAに対する核酸プローブを使用することを含みうる。hTERT発現のレベルが対照細胞の場合と同様に観察された場合に、試験細胞は、病的に増殖している細胞として特定される。しかし、本発明の方法において使用する核酸プローブはヒト、マウスまたは他の哺乳動物のhTERT mRNA配列に実質的に相補的でありうる。

30

#### 【0051】

病的に増殖している細胞 (例えば、癌細胞) におけるhTERT mRNAを該核酸プローブが有効に検出する能力に影響を及ぼさない置換を該核酸プローブ内に施しうることは当業者に明らかであろう。したがって、そのような置換は本発明の範囲内である。本発明の方法において使用する核酸プローブは、DNAプローブまたは修飾プローブ、例えばペプチド核酸プローブ、ホスホロチオアートプローブもしくは2'-Oメチルプローブでありうる。核酸プローブの長さは約8または10~50ヌクレオチド、好ましくは約15~25ヌクレオチド長でありうる。本発明の方法は、ヒト、哺乳動物または他の脊椎動物からの細胞抽出物、培養細胞または組織サンプルにおいて容易に実施することが可能である。

40

#### 【0052】

本発明の方法は、in vitroの細胞、細胞培養ならびにヒト細胞および組織、例えば充実性腫瘍および癌 (例えば、ヒト骨肉腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、副腎皮質癌または黒色腫) において、テロメラーゼの発現により不適当、病的または異常に増殖している細胞を検出するのに有用である。

#### 【0053】

50

本発明は、過増殖細胞または癌細胞を検出および／または阻害するためのキットをも提供する。該キットは、ACV、GCV、パルガンシクロビル、バラシクロビルまたは他の非環状ヌクレオシドアナログを含有することが可能であり、および／またはhTERT mRNAの部分配列に完全または実質的に相補的である核酸プローブを含有することが可能である。

【0054】

本発明の医薬組成物、阻害性または拮抗性物質は、経口、局所、非経口、例えば皮下、腹腔内、ウイルス感染、血管内などを含む種々の方法で投与されうる。導入方法に応じて、該化合物は種々の方法で製剤化されうる。経口投与に適した製剤は液体溶液でありうる。非経口投与（例えば、関節内、心室内、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内および皮下経路）に適した製剤には、水性および非水性の等張無菌注射溶液が含まれる。本発明の実施においては、例えば静脈内注入、経口、局所、非経口または腹腔内に組成物を投与することが可能である。経口および非経口投与は、好ましい投与方法である。製剤化および投与のための技術は当技術分野において通常のものであり、更なる詳細は例えばRemington's Pharmaceutical Sciences (2000), Gennaro AR(編), 20th edition, Maack Publishing Company, Easton, PAにおいて見出されうる。

10

【0055】

治療的有効量（または有効量）または薬理学的有効量は当技術分野において十分に認識されている用語であり、意図される薬理学的結果をもたらすのに有効な物質の量を意味する。例えば、治療的有効量は、経時的に患者において有益な治療応答をもたらすのに（すなわち、患者において治療されている疾患もしくは状態を治療し又は疾患の症状を改善するのに）十分な量である。非環状ヌクレオシドアナログ（またはその組成物）の治療的有効量は、アッセイにおいて、未処理（未治療）細胞におけるレベルと比較して癌細胞におけるテロメア短縮化、G<sub>2</sub>停止および／または著しいアポトーシスを再現可能な状態で誘導するのに有効な量である。非環状ヌクレオシドアナログ（またはその組成物）の治療的有効量は、癌細胞の成長を減少させ軽減し阻害し又は妨げる非環状ヌクレオシドアナログの量をも意味する。該量は、好ましくは、有意な副作用を伴うことなく所望の効果が得られる最適である。後記で更に詳しく説明するとおり、該用量は、使用する個々のインヒビターまたは拮抗物質の効力、治療する患者の状態ならびに患者の体重または体表面積によっても左右されうる。該用量のサイズは、例えば個々の患者への個々の物質、ベクターまたは導入細胞型の投与に伴ういずれかの有害な副作用の存在、性質および程度によっても左右されるであろう。

20

30

【0056】

テロメラーゼ誘発性癌を予防し阻害し又はその頻度を減少させうる物質の治療的有効量は、本明細書中に開示されている細胞培養アッセイからの及び／又は動物モデルを使用するin vivoアッセイからのデータを用いて容易に決定されうる。該動物モデルは、ヒトにおける適当な投与量範囲および投与経路を推定するためにも使用されうる。臨床環境へ移行する前に適当な治療量を最適化するために、ヒト由来の充実性腫瘍を担持する実験動物（または当技術分野で受け入れられている動物モデル）が頻繁に使用される。そのようなモデルは、有効な抗癌戦略を予想する場合に非常に信頼しうるものであることが公知である。例えば、充実性腫瘍を担持するマウスは、当技術分野で受け入れられているマウスモデルであり、最小の毒性で有益な抗腫瘍効果をもたらす治療用物質の実施範囲を決定するために前臨床試験において広く使用されている。当技術分野で受け入れられているモデルにおいて既に示されている安全性により、少なくともテロメラーゼ誘発性癌の場合に使用するヌクレオシドアナログに関しては、本発明の前臨床試験はむしろ通常の実験だといえるであろう。腫瘍形成（進行）の阻害、腫瘍退縮または転移などを測定するアッセイを用いて、in vivo効力を予想することが可能である。

40

【0057】

ヒトHeLa癌細胞系から成長させたヌードマウス皮下（s.c.）腫瘍（すなわち、異種移植片担持マウス）を癌モデルとして使用する、ACVおよび／またはGCVの抗腫瘍効力の典型的なin vivoアッセイは、後記で説明する。

50

## 【0058】

in vivoアッセイに必要なヒト癌性細胞は、例えば以下のとおりに調製することが可能である。テロメラーゼ陽性HeLaヒト細胞系を公の入手源から入手することが可能である。細胞を、10%ウシ胎児血清で補足されたD-MEM培地内で5% CO<sub>2</sub>の加湿雰囲気中、37℃で維持する。

## 【0059】

in vivoアッセイには、適当な宿主、例えば約5~7週齢のヌード (nu/nu) マウスを得、発現物質非含有条件中で維持する。200 µlの無血清培地内に含有された約 $1 \times 10^6$ 個のHeLa細胞を、メトファン (Metofane) で手短に麻酔された全動物の脇腹に皮下 (s.c.) 注射により運搬する。ついで該マウスを実験群および対照群に分ける。

10

## 【0060】

1つの実施形態においては、定着腫瘍のサイズの減少ではなくs.c.腫瘍の成長または進行までの時間の減少を評価する。この実施形態においては、第0日から、実験群のマウスに飲用水中のGCVを任意量で投与する。水中のGCVの濃度は2mg/mlでありうる。GCVの新鮮な溶液を3日ごとに供給する。対照群のマウスには飲用水のみを投与する。腫瘍を2~3日ごとに測定する。腫瘍が1cm<sup>3</sup>を超えたらマウスを犠牲させる。式 $\frac{4}{3} r^3$  (ここで、rは腫瘍の半径である) を使用して、腫瘍体積を計算する。対照群の全てのマウスは腫瘍を発生するはずであり、実験群の全てのマウスは腫瘍を含有しないままであるはずである。

## 【0061】

in vivo実験を以下のとおりに行った。in vivoにおけるテロメラーゼ陽性腫瘍の発生の予防および治療を示すために、ヌードマウスにHeLa細胞 ( $3 \times 10^5$  個) を皮下 (s.c.) 注射した。ヒト癌HeLa細胞培養をATCCから購入した。全部で12匹のCD1/-nuヌードマウスおよび12匹のNMR1/-nuヌードマウスをCharles River Laboratories, Charles River Deutschland GmbHから購入した。これらのヌードマウスに $3 \times 10^5$  個のHeLa細胞を皮下注射した。実験群に第0日から飲用水中のバルガンシクロビルを投与した。具体的には、第0日から実験群のマウス (マウス6匹/系統) を飲用水中のValcyte (バルガンシクロビル) (1mg/ml) にさらした。対照群および処理群の全てのマウスが腫瘍を発生していた。約14日のうちに、全てのマウスが腫瘍を担持していた。処理群の1匹のマウスの腫瘍が退縮し始め、第30日までに、この腫瘍はValcyteでの単独療法により消失した。処理群の他のマウスは腫瘍成長 (安定化) の遅延を示した。

20

30

## 【0062】

もう1つの実施形態においては、本発明の試薬および方法は、予め定着した腫瘍を担持する免疫正常動物 (immunocompetent animal) においてin vivoで腫瘍退縮を促進させるために使用することが可能である。すなわち、本発明の試薬は、既存の腫瘍を有する動物を治療するために使用することが可能である。この場合、癌性の $10^6$  個のNuTu-19細胞をFischerラットの脇腹に皮下注射して、腫瘍を定着させる。腫瘍細胞移植後に腫瘍が定着したら、実験群のラットには、GCV (またはACV) を含有する組成物 (例えば、飲用水中の溶液) の任意量を投与し、対照群のラットには、薬物を含有しないこと以外は同じ組成物 (例えば、蒸留水) を投与する。腫瘍の成長を2~3日ごとに監視する。GCV (またはACV) を21~28日にこれらの腫瘍担持動物に投与した場合には、腫瘍成長の遅延が観察される。腫瘍細胞成長のそのような阻害は対照群においては観察されない。処理の開始の数週間後、GCV処理動物のみが100%の生存を示す。

40

## 【0063】

もう1つの実施形態においては、アポトーシスの促進を評価するin vivoアッセイを用いることも可能である。この実施形態においては、治療用組成物で処理された異種移植片担持動物をアポトーシスフォーカスの存在に関して検査し、未処理対照異種移植片担持動物と比較することが可能である。処理動物の腫瘍においてアポトーシスフォーカスが見出される度合は該組成物の治療効力の指標となる。

## 【0064】

前記の典型的なin vivoアッセイから、非ヌクレオシドアナログに基づく抗癌物質 (例

50

えば、前記で挙げたブレオマイシン、マイトマイシン、ナイトロジェンマスタード、クロラムブシル、5-フルオロウラシル（5-FU）など）または照射を用いる組合せ治療は本発明の要件ではないことが明らかなはずである。非環状ヌクレオシドアナログを単独で又は非環状ではないヌクレオシドアナログと組合せて使用することで、癌細胞においてテロメア短縮化、G<sub>2</sub>停止および/または著しいアポトーシスを誘導するのに十分であり、したがって、腫瘍の単なる弱い成長遅延以上のものを達成するのに十分である（または腫瘍の成長遅延を劇的に軽減するのに十分である）。したがって、いくつかの態様においては、本発明は、非ヌクレオシドアナログに基づく抗癌物質または照射の使用を含まない。また、本発明のいくつかの態様（腫瘍成長の治療または予防方法）においては、以下のヌクレオシドアナログは除外されるか又は使用されない：HPMPC[(S)-1-[3-ヒドロキシ-2-(ホスホメトキシ)プロピル]シトシン]；アデニン誘導体であるHPMPA、または9-(2-[ホスホニルメトキシエチル)のアデニン誘導体（PMEA、アデフォビル（adefovir））、グアニン誘導体（PMEG）、2-6ジアミノプリン誘導体（PMEDAP）、シクロプロピルPMEDAP（c-Pr-PMEDAP）誘導体。

10

20

30

40

50

#### 【0065】

本発明は、当技術分野で公知の、皮膚、結合組織、脂肪、乳房、肺（小細胞肺癌および非小細胞肺癌（NSCLC））、胃（胃癌）、脾臓、卵巣、子宮頸、子宮、腎臓、膀胱、結腸、前立腺、肛門性器（anogenital）、中枢神経系（CNS）、網膜ならびに血液およびリンパ（前駆体T細胞、前駆体B細胞、胚中心細胞、活性化T細胞またはリード・スターンバーグ細胞内のCDK9/CYCLIN T1の発現から生じるリンパ腫）を冒す多種多様な腫瘍および癌ならびにウイルス関連癌（HBV関連癌、EBV関連癌、HCV関連癌およびHPV関連癌）ならびに本開示のどこかに記載されている他の癌に対する、テロメラーゼインヒビターに基づく癌療法の使用を含む。しかし、1つの態様においては、本発明は、当技術分野で公知のウイルス関連癌の治療も予防も含まない。

#### 【0066】

ヒトテロメラーゼ誘発性癌（初期段階の腫瘍および血管形成腫瘍の両方）を治療するための物質の適当な用量の設計においては、臨床投与のための適当な用量に達するために、本明細書に記載の動物研究から容易に推定を行うことが可能である。この変換を行うためには、実験動物の単位質量当たり投与する物質の質量を明らかにし、好ましくは、実験動物とヒト患者との間の体表面積の相違を明らかにすることになる。すべてのそのような計算は当業者によく知られており、常套的なものである。したがって、治療的有効量の決定は当業者の能力の範囲内に十分に含まれる。

#### 【0067】

例えば、細胞培養アッセイおよびマウス研究において成功した、GCVまたはACV（V-GCVまたはV-ACV）の用量を採用し、質量および表面積に基づく標準的な計算を適用した場合、成人患者に使用する有効量は患者当たり1日当たりGCVまたはACV約1000mg～約6000mg、好ましくは、患者当たり1日当たり約500mg～約1000mgとなる。したがって、この情報を用いて、本発明においては、ヒトへの投与のための治療用物質（例えば、アシクロビル、ガンシクロビル、ペンシクロビルならびに対応プロドラッグ、すなわち、バラシクロビル、バルガンシクロビルおよびファムシクロビル）の低用量は患者当たり1日当たり約1、5、10、20、25または約30mgなどであることが可能であり、ヒトへの投与のための治療用物質の有用な高用量は患者当たり1日当たり約250、300、400、450、500または約600mgなどであることが可能であると予想される。有用な中間用量は患者当たり約40～約200mgなどの範囲となりうる。

#### 【0068】

これらの記載されている範囲にもかかわらず、本明細書に記載のパラメータおよび詳細な指針を考慮すれば、活性な又は最適な範囲内の更なる変動が本発明に含まれると理解されるであろう。本発明の治療計画の意図は概ね、許容されない毒性を伴うレベル未満の用量を維持したままで、有意な抗腫瘍効果を得ることにある。用量自体を変化させることに加えて、治療戦略を最適化するために投与計画を適合化させることも可能である。現在好

ましい治療戦略は、約1～500mg、好ましくは約10～100mgのテロメラゼインヒビターもしくはアンタゴニストまたはそれらを含む治療カクテルを約60日以内に～約4回投与するというものである。例えば、おおよそ第1日、第3日または4日および第6日または7日に投与を行うことになる。投与は、1回量または分割量で、経口的に、または例えば充実性腫瘍部位への直接的な投与により、または徐放製剤を使用して行うことが可能である。投与を担当する医師は、本開示を考慮して、個々の対象に対する適当な用量、投与の形態および経路を決定しうるであろう。そのような最適化および調節は当技術分野において通常行われているものであり、決して過度な量の実験を要するものではない。個々の用量自体を投与する場合には、好ましくは、無菌性、発熱性、純度およびヒト患者に対する全身的な一般的安全性の規制基準に従う製薬上許容される組成物を与えることになる。もちろん、治療前および治療の1～数ヶ月後まで時々、身体検査、腫瘍の測定および臨床検査を行うべきであり、そのような通常の手法の実施方法は当業者に公知であろう。臨床応答は、いずれかの許容される尺度により定められうる。例えば、完全応答は、治療後の或る期間内の全ての測定可能な腫瘍の消失により定められうる。

10

【0069】

以下の1～27の番号が付いた参考文献は前記の説明中に引用されており（対応する上付き番号で示されている）、そのようなものとして、当業者は該参考文献を前記の本文中の適当な上付き番号と対応させるであろう。

【0070】

1. Olovnikov, A.M. Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. Dokl.Akad.Nauk SSSR 201, 1496-1499 (1971).
2. Allshire, R.C., Dempster, M., Hastie, N.D. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. Nucleic Acids Res. 17, 4611-4627 (1989).
3. Greider, C.W., Blackburn, E.H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell 43, 405-413 (1985).
4. Morin GB .The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. Cell. 1989 Nov 3;59(3):521-9.
5. Kim, N. W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 266, 2011-2015 (1994).
6. Harley, CB. , Futcher, A.B., Greider, CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature 34, 458-460 (1990).
7. Bryan, T.M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M.A., Reddel, R.R. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. Nat. Med. 3, 1271-1274 (1997).
8. Reddel, R.R., Bryan, T.M., Colgin, L.M., Perrem, K.T., Yeager, T.R. Alternative lengthening of telomeres in human cells. Radiat. Res. 155, 194-200 (2001).
- 9 .Wright, W.E., Piatyszek, M.A., Rainey, W.E., Byrd, W., Shay, J.W. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. Dev. Genet. 18,173-179 (1996).
10. Greider CW Mammalian telomere dynamics: healing, fragmentation shortening and stabilization. Curr Opin Genet Dev. 1994;4(2):203-11..
11. Hahn, W. C et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. Nat. Med. 5, 1164-1170 (1999).
12. Elion, G. B.; Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; de Miranda, P.; Beauchamp, L.; Schaeffer, H. J. Selectivity of Action of an Antiherpetic Agent, 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine. Proc. Natl Acad. Sci U.S.A. 1977, 74, 5716-5720.
13. Martin, J. C; Dvorak, C. A.; Smee, D. F.; Matthews, T. R.; Julien, P. H.; Vrehayden, J. P. H. 9-[(1,3-Dihydroxy-2-propyloxy)methyl]guanine: A New Potent and

20

30

40

50



- Selective Antiherpes Agent. J. Med. Chem. 1983, 26, 759-761.
14. Smee, D. F.; Martin, J. C; Verheyden, J. P. H.; Matthews, T. R. Antiherpesvirus Activity of the Acyclic Nucleosides 9-(1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. Antimicrob. Agents Chemother. 1983, 23, 676-682.
  15. Field, E. K.; Davies, M. E.; DeWitt, C; Perry, H. C; Liou, R.; Germershausen, J.; Karkas, J. D.; Ashton, W. T.; Johnston, D. B.; Tolman, R. L. 9-([2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine: A Selective Inhibitor of Herpes Group Virus Replication. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 1983, 80, 4139-4143.
  16. Harnden, M. R.; Jarvest, R. L.; Bacon, T. H.; Boyd, M. R. Synthesis and Antiviral Activity of 9-[4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)but-1-yl]purines. J. Med. Chem. 1987, 30, 1636-1643 10
  17. Vere Hodge, R. A.; Perkins, R. M. Mode of Action of 9-(4-Hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl) guanine (BRL 39123) against Herpes Simplex Virus in MRC- 5 Cells. Antimicrob. Agents Chemother. 1989, 33, 223-229.
  18. de Miranda P, Whitley RJ, Blum MR, Keeney RE, Barton N, Cocchetto DM, Good S, Hemstreet GP 3rd, Kirk LE, Page DA, Elion GB. Acyclovir kinetics after intravenous infusion. Clin Pharmacol Ther. 1979;26(6):718-28.
  19. Van Dyke RB, Connor JD, Wyborny C, Hintz M, Keeney RE. Pharmacokinetics of orally administered acyclovir in patients with herpes progenitalis. Am J Med. 1982;73(1A):172-5. 20
  20. Lycke J, Malmstrom C, Stahle L. Acyclovir levels in serum and cerebrospinal fluid after oral administration of valacyclovir. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(8):2438-41.
  21. Piketty C, Bardin C, Gilquin J, Gairard A, Kazatchkine MD, Chast F. Monitoring plasma levels of ganciclovir in AIDS patients receiving oral ganciclovir as maintenance therapy for CMV retinitis. Clin Microbiol Infect. 2000;6(3): 117-20.
  22. Brown F, Banken L, Saywell K, Arum I. Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir following multiple oral dosages of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive volunteers. Clin Pharmacokinet. 1999;37(2): 167-76.
  23. Rufer, N., Dragowska, W., Thornbury G., Roosnek, E., Lansdorp P.M. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. Nat. Biotechnol. 16, 743-747 (1998). 30
  24. Hultdin, M. et al. Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. Nucleic Acids Res. 26, 3651-3656 (1998).
  25. Guiducci, C, Cerone, M.A., Bacchetti, S. Expression of mutant telomerase in immortal telomerase-negative human cells results in cell cycle deregulation, nuclear and chromosomal abnormalities and rapid loss of viability. Oncogene 20, 714-725 (2001).
  26. TRAP-ELISAA. K. Velin, A. Herder, K.J. Johansson et al., Telomerase is not activated in human hyperplastic and adenomatous parathyroid tissue. Eur J Endocrinol 145 (2001), pp. 161-164. 40
  27. real time TRAP (Wege et al., SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. Nucleic Acids Res. 2003;31(2):E3-3).

【 0 0 7 1 】

本明細書中に記載されている全ての刊行物、特許および特許出願は、本発明に関連した当業者の技術水準を示すものである。全ての刊行物、特許および特許出願を、各個の刊行物または特許出願が参照により本明細書に組み入れられると明示的かつ個別に示されているのと同様に、参照により本明細書に組み入れることとする。前記の本発明は理解の明瞭化のために例示および具体例によりかなり詳細に説明されているが、添付の特許請求の範囲の範囲内で或る変更および修飾が実施されうることが明らかであろう。

## 【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 2 】

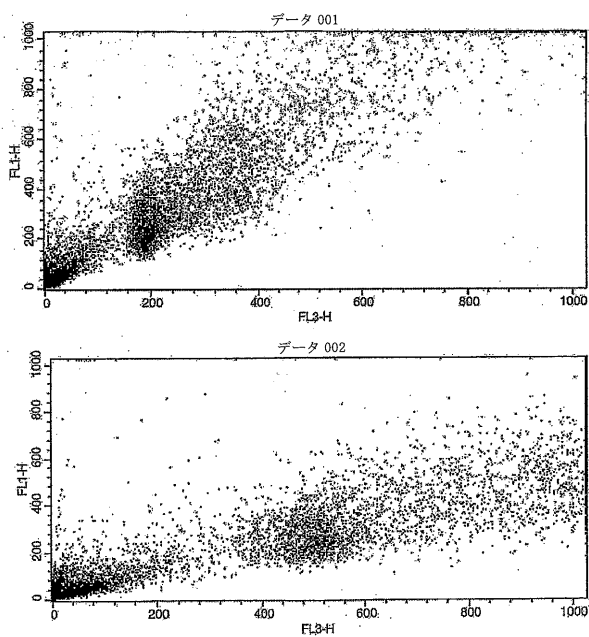
【図 1】図1は、1.5  $\mu$ MのGCVでのテロメラーゼ陽性HeLa細胞系の処理の10日後のテロメア長の減少、著しいアポトーシスおよび細胞周期の変化を示すフローサイトメトリーデータを示す。未処理細胞 - 上パネル、処理細胞 - 下パネル。

【図 2】図2は、3  $\mu$ MのACVでのテロメラーゼ陽性NuTu細胞系の処理の14日後のテロメア長の減少、著しいアポトーシスおよび細胞周期の変化を示すフローサイトメトリーデータを示す。未処理細胞 - 上パネル、処理細胞 - 下パネル。

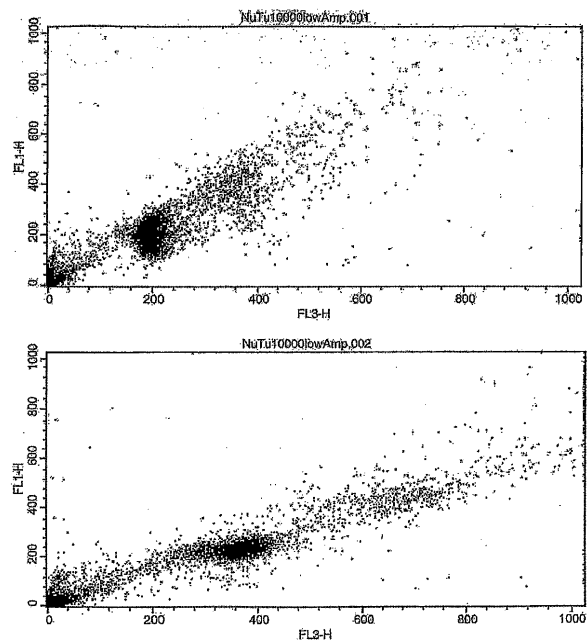
【図 3】図3は、1.5  $\mu$ MのGCVで10日間処理されたHeLa（上パネル）およびNuTu-19（下パネル）細胞における細胞周期分布の変化を示すフローサイトメトリーデータを示す。未処理細胞 - 上パネル、処理細胞 - 下パネル。

10

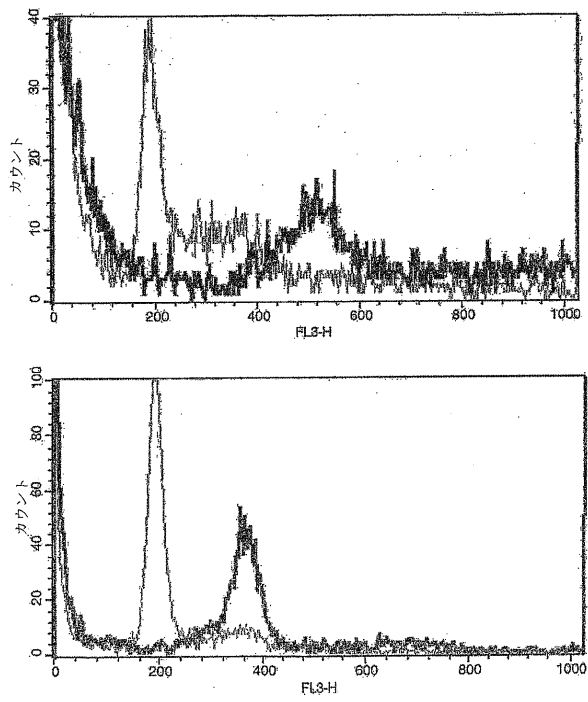
【図 1】



【図 2】



【図 3】



## 【国際調査報告】

60800070030



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/11027

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8): A61K 31/685( 2006.01)

USPC: 514/81

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. : 514/81

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)  
Please See Continuation Sheet

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                      | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | US 5,166,140 (Scanlon et al.) 24 November 1992 (24.11.1992), col. 2, lines 20-65.                       | 1-15 and 18-20        |
| X          | US 5,631,236 (Woo et al.) 20 May 1997 (20.05.1997), entire document.                                    | 1-15 and 18-20        |
| X          | US 5,981,507 (Josephson et al.) 9 November 1999 (09.11.1999), entire document, especially claims 16-17. | 1-15 and 18-20        |

☐ 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 application or patent 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 2007 (16.10.2007)

Date of mailing of the international search report

02 NOV 2007

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. (571) 273-3201

Authorized Officer

James D. Anderson

Telephone No. 571-272-9038

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

12.2.2008

2

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT****International application No.**  
PCT/US06/11027

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
MEDLINE, CAPLUS, USPATFULL

search terms: acyclic nucleoside, acyclovir, ganciclovir, penciclovir, cancer, telomerase

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.                      | F I                 | テーマコード ( 参考 ) |
|----------------------------------|---------------------|---------------|
| <b>A 6 1 K 31/7072 (2006.01)</b> | A 6 1 P 43/00 1 2 3 |               |
| <b>A 6 1 K 31/513 (2006.01)</b>  | A 6 1 K 31/7072     |               |
| <b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>   | A 6 1 K 31/513      |               |
|                                  | A 6 1 K 45/00       |               |
|                                  | A 6 1 P 43/00 1 0 5 |               |

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

(72)発明者 ボンダレフ , イゴール , イー .  
 ロシア 1 9 3 2 3 1 サンクトペテルブルク , ソリダルノスティー ピーアール . 2 5 - 1 - 1  
 2 3

F ターム(参考) 4C084 AA17 MA02 MA52 MA55 MA65 MA66 NA14 NA15 ZB211 ZB261  
 ZB271 ZC751  
 4C086 AA01 AA02 BC42 CB07 EA17 MA01 MA02 MA04 MA52 MA55  
 MA65 MA66 NA14 NA15 ZB21 ZB26 ZB27 ZC75