

(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2005-522454

(P2005-522454A)

(43) 公表日 平成17年7月28日(2005.7.28)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/127	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 4
A 6 1 K 9/72	A 6 1 K 9/72	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/255	A 6 1 K 31/255	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/282	A 6 1 K 31/282	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-568051 (P2003-568051)	(71) 出願人	591026333
(86) (22) 出願日	平成15年2月14日 (2003. 2. 14)		リサーチ ディベロップメント ファンデーション
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月7日 (2004. 10. 7)		RESEARCH DEVELOPMEN T FOUNDATION
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/004522		アメリカ合衆国, 89703 ネバダ, カ ーソン シティ, ノース デイヴィジョ ン ストリート 402番地
(87) 国際公開番号	W02003/068936	(74) 代理人	100080115
(87) 国際公開日	平成15年8月21日 (2003. 8. 21)		弁理士 五十嵐 和壽
(31) 優先権主張番号	60/356, 864	(72) 発明者	ナイト, ジェイ., バーノン
(32) 優先日	平成14年2月14日 (2002. 2. 14)		アメリカ合衆国 77027 テキサス, ヒューストン, ラーナ レイン 29
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 p 5 3 遺伝子及び抗癌化合物のエアゾール送達による肺転移抑制

(57) 【要約】

本発明は個体内の肺転移の成長を抑制する方法を提供する。この方法は、エアゾール化されたポリエチレンイミン-DNA複合体とエアゾール化されたリポソーム-抗癌剤複合体とを組み合わせることで投与するステップで構成され、上記複合体の両方ともエアゾール化によって送達される。こうした方法による上記DNAと抗癌剤の両者の送達は、前記個体内の肺転移の成長を抑制する。さらに、ポリエチレンイミン-p 5 3 複合体とジラウロイルホスファチジルコリン-9-ニトロカンプトセシン複合体をエアゾール化によって組み合わせることで個体内の肺転移の成長を抑制する方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体内の肺転移の成長を抑制する方法において：

エアゾール化されたポリエチレンイミン-核酸複合体とエアゾール化されたりポソーム-抗癌剤複合体を組み合わせて投与するステップで構成され；

前記核酸と前記抗癌剤の送達によって前記個体内の肺転移の成長を抑制することを特徴とする個体内の肺転移の成長を抑制する方法。

【請求項 2】

請求項 1 記載の方法において、前記組み合わせが：

エアゾール化されたポリエチレンイミン-核酸複合体を投与するステップと；そして同時に、
エアゾール化されたりポソーム-抗癌剤複合体を投与するステップとで構成されることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 記載の方法において、前記組み合わせが：

エアゾール化されたポリエチレンイミン-核酸複合体を投与するステップと；そして連続的に、

エアゾール化されたりポソーム-抗癌剤複合体を投与するステップとで構成されることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 3 記載の方法において、前記組み合わせが更に：

エアゾール化されたりポソーム-抗癌剤複合体を少なくとも 1 回再投与するステップで構成されることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 記載の方法において、前記エアゾール化されたポリエチレンイミン-核酸複合体と前記エアゾール化されたりポソーム-抗癌剤複合体の組み合わせの投与が少なくとも 1 回繰り返されることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1 記載の方法において、前記核酸が、DNA、RNA、触媒活性核酸、リボザイム、アンチセンス・オリゴヌクレオチド及び修飾核酸で構成される群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 6 記載の方法において、前記核酸が腫瘍抑制活性を示すことを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 7 記載の方法において、前記核酸が、p53 遺伝子、p53 遺伝子の切断誘導体、CD1 遺伝子、インターロイキン 12、及びインターフェロン- γ で構成される群から選択される DNA であることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 1 記載の方法において、前記抗癌剤が、9-ニトロカンプトセシン、パクリタキセル、ドキソルビシン、カルボプラチン、メトトレキサート、ビンブラスチン、エトポシド、ドセタキセル・ヒドロキシウレア、フルオロウラシル、ブスルファン、メシル酸イマチニブ、アレンプズマブ、アルデスロイキン及びシクロフォスファミドで構成される群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 1 記載の方法において、前記リポソームがジラウロイルホスファチジルコリンであることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 1 記載の方法において、前記エアゾールが約 3 % から約 7.5 % の二酸化炭素を含んでなることを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 1 記載の方法において、ポリエチレンイミン窒素の核酸リン酸に対する前記比率が約 2 : 1 から約 50 : 1 であることを特徴とする方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 記載の方法において、ポリエチレンイミン窒素の核酸リン酸に対する前記比率が約 5 : 1 から約 20 : 1 であることを特徴とする方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 記載の方法において、前記ポリエチレンイミン-核酸複合体がポリエチレンイミン-p 53 であり、前記リポソーム-抗癌剤複合体がジラウロイルホスファチジルコリン-9-ニトロカンプトセシンであることを特徴とする方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 記載の方法において、前記 p 53 が、エアゾール化溶液 10 ml あたり 2 mg の p 53 を含んでなる投与量で投与されることを特徴とする方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 4 記載の方法において、前記 9-ニトロカンプトセシンが、約 1 : 50 の 9-ニトロカンプトセシン：ジラウロイルホスファチジルコリンの重量比率で 1 ml あたり約 0.5 mg の 9-ニトロカンプトセシンを含んでなる投与量で投与されることを特徴とする方法。

【請求項 1 7】

個体内の肺転移の成長を抑制する方法において：

エアゾール化されたポリエチレンイミン-p 53 複合体とエアゾール化されたジラウロイルホスファチジルコリン-9-ニトロカンプトセシン複合体を組み合わせて投与するステップで構成され；

p 53 と 9-ニトロカンプトセシンの両方の送達によって前記個体内の肺転移の成長を抑制することを特徴とする個体内の肺転移の成長を抑制する方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 記載の方法において、前記組み合わせが：

エアゾール化されたポリエチレンイミン-p 53 複合体を投与するステップと；そして同時に

エアゾール化されたジラウロイルホスファチジルコリン-9-ニトロカンプトセシン複合体を投与するステップとで構成される方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 7 記載の方法において、前記組み合わせが：

エアゾール化されたポリエチレンイミン-p 53 複合体を投与するステップと；そして連続的に

エアゾール化されたジラウロイルホスファチジルコリン-9-ニトロカンプトセシン複合体を投与するステップとで構成される方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 記載の方法において、前記組み合わせが更に：

エアゾール化されたジラウロイルホスファチジルコリン-9-ニトロカンプトセシン複合体を少なくとも 1 回再投与するステップで構成される方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 7 記載の方法において、前記エアゾール化されたポリエチレンイミン-p 53 複合体と前記エアゾール化されたジラウロイルホスファチジルコリン-9-ニトロカンプトセシン複合体の組み合わせの投与が少なくとも 1 回繰り返されることを特徴とする方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 7 記載の方法において、ポリエチレンイミン窒素の p 53 リン酸に対する比率が約 5 : 1 から約 20 : 1 であることを特徴とする方法。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 記載の方法において、ポリエチレンイミン窒素の p 53 リン酸に対する前記比率が約 10 : 1 であることを特徴とする方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 4】

請求項 1 7 記載の方法において、前記 p 5 3 が、エアゾール化溶液 1 0 m l あたり 2 m g の p 5 3 を含んでなる投与量で投与されることを特徴とする方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 7 記載の方法において、前記 9-ニトロカンプトセシンが、1 : 5 0 の 9-ニトロカンプトセシン：ジラウロイルホスファチジルコリンの重量比率で、1 m l あたり約 0 . 5 m g の 9-ニトロカンプトセシンを含んでなる投与量で投与されることを特徴とする方法。

【請求項 2 6】

請求項 1 7 記載の方法において、前記エアゾールが約 3 % から約 7 . 5 % の二酸化炭素を含んでなることを特徴とする方法。 10

【請求項 2 7】

請求項 2 6 記載の方法において、前記エアゾールが約 5 % の二酸化炭素を含んでなることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は薬物学及び癌治療に関するものである。より具体的には、本発明は、肺転移腫瘍の成長抑制の効果的な方法としての、p 5 3 遺伝子及び抗癌化合物の連続的エアゾール送達に関するものである。 20

【0 0 0 2】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2 0 0 2 年 2 月 1 4 日に提出され、現在は放棄された米国特許出願番号 6 0 / 3 5 6 , 8 6 4 の仮出願の優先権を主張するものである。

【背景技術】

【0 0 0 3】

肺癌は癌による死亡の単独で最大の原因であり、新たに診断される患者の 5 年超生存率は 1 5 % 未満である。8 0 % 以上の肺癌は化学療法による良好な反応がない。既存の肺転移の治療は、臨床環境においては難しい課題であり、多種のアプローチを要することが多い。主な臨床課題の 1 つは、化学療法薬物に対する腫瘍の抵抗性に打ち勝つことである。p 5 3 腫瘍抑制遺伝子突然変異が肺癌の大多数で報告され、p 5 3 機能の損失の結果、薬物抵抗と腫瘍再発が増加する (1)。ここ数年前提とされてきたアプローチは、p 5 3 遺伝子を腫瘍細胞内に入れ替えて、細胞をアポトーシスに導入するのみならず、化学療法薬に対する細胞の感受性を増大できるようにすることである (2, 3)。 30

【0 0 0 4】

ほとんどの抗癌剤は、従来は経口または静脈経路を介して送達されてきた。これらの送達方法による薬物の生体分布は広範囲に及び、肺に沈着する薬物の割合は低い (4)。種々の組織内の導入遺伝子発現の類似の分布は、遺伝子治療のためのベクター DNA 複合体の静脈内又は腹腔内送達の後に見られる (5)。もう 1 つの問題は、経口又は静脈経路を介して送達した後に見られる全身毒性である。遺伝子及び化学療法薬物のエアゾール送達は、特に肺を標的とする非常に有望な技術を代表し、薬物及び遺伝子の肺への沈着と薬物動態学的特長を増大させる (4, 6)。 40

【0 0 0 5】

ポリエチレンイミン (P E I) は、エアゾール送達後に高いレベルで導入遺伝子発現を実現し (6)、最小限の毒性又はサイトカイン反応を伴う (6, 7)。エアゾールで送達されるポリエチレンイミンの投与の結果、p 5 3 腫瘍抑制遺伝子を用いた 2 つの異なる肺癌モデルにおいて抗癌効果が示されている (8, 9)。ポリエチレンイミン-p 5 3 複合体のエアゾール送達によって、肺にある B 1 6 - F 1 0 腫瘍病巣内に多少のアポトーシスの痕跡がもたらされる。導入遺伝子発現のための免疫組織化学は、ポリエチレンイミン- 50

DNA複合体が肺にあるB16-F10腫瘍病巣をトランスフェクトすることを明らかにしている(13)。

【0006】

9-ニトロカンプトセシン(9NC)のリポソーム形成、すなわち9-ニトロカンプトセシンのジラウロイルホスファチジルコリン・リポソーム形成(9NC-DLPC)などのトポイソメラーゼI抑制剤のエアゾール送達は、肺転移のみならず皮下腫瘍の成長も抑制できる(10, 11)。しかし、9-ニトロカンプトセシンも含め、p53遺伝子とカンプトセシンの両方が、単独でも他の物質と組み合わせても、肺転移のみならず皮下腫瘍の成長も抑制できるとは言え(8, 10, 11, 14, 15)、送達される投与量は大きい。9-ニトロカンプトセシンを用いたエアゾール治療は、1日2回、週5日、5mgの9-ニトロカンプトセシンをマウスに送達させる必要があり、この治療は腫瘍接種後1日目から開始された。9-ニトロカンプトセシンの投与量は、1日あたり1mgから9mgの間で変化させてもよい(28)。同様に、腫瘍接種後1日目から週2回の処方での治療を開始すると、PEI-p53 DNA複合体のエアゾール送達は、B16-F10肺転移の大きな抑制をもたらす(8)；肺の中で微少癌組織の転移が既に定着した時に治療が開始された場合、遺伝子治療は不活性であった。

【0007】

カンプトセシンは、DNAにおいて単一ストランド切断を誘発することによって腫瘍細胞内にアポトーシスを誘発するトポイソメラーゼ抑制剤である(16)。カンプトセシン及び類似物質はp53独立経路を介していくつかの細胞株にアポトーシスを誘発するが、p53は多様な腫瘍細胞株にカンプトセシンに対する感受性を持たせることが明らかになっている(17, 18)。また、Kalechmanら(19)は、AS101(トリクロロ(ジオキソエチレン-0, 0')テルル酸アンモニウム)がp53の上方制御によってB16-F10細胞内のアポトーシスを増大させ得ることを既に示している。

【0008】

血管形成は、腫瘍が直径1-2mmを超えて成長するために必要である(20)。更に、カンプトセシンは、腫瘍内で活発に成長する新しい血管を損傷させることによって、血管形成の調節を通じて腫瘍成長を抑制することが明らかになっている(21, 22)。p53は、血管内皮成長因子(VEGF)などの多様な血管形成因子及びトロンボスポンジン-1(TSP-1)などの抗血管形成因子の転写調節による血管形成の主要な調整因子であることが明らかになった(23, 24)。B16-F10細胞株は*in vivo*で血管形成能力が高く、B16-F10細胞のp53トランスフェクションは、血管内皮成長因子の下方制御とTSP-1の上方制御を通して、この血管形成表現型を無効にし、腫瘍の成長を抑制することができる(13)。

【0009】

p53は動物モデルにおいて腫瘍に抗癌剤に対する感受性を持たせる能力があることが研究によって実証されており(25)、これらの組み合わせ実験のいくつかは臨床試験の初期段階にも組み込まれている(26)。Fujiwaraらは、p53が*in vitro*でも*in vivo*でも腫瘍細胞にDNA破壊薬であるシスプラチナムに対する感受性を持たせる能力があることを実証した(25)。ある程度の臨床上的メリットも、臨床試験でこのアプローチを用いて実証された(26)。これらの研究におけるp53遺伝子は、カチオン・リポソーム又はアデノウイルスを利用して送達された。更に、肺癌患者への遺伝子送達ベクターを投与するのに利用された方法は、主にコンピュータ断層撮影誘導の経皮細針注射又は気管支鏡検査法を用いた腫瘍内注射を手段とした(26, 27)。治療上の反応がある程度見られたものの、これらの方法はかなり侵襲性であった。

【0010】

ほとんどの遺伝子トランスフェクションは気管支上皮に局在するため(13)、p53発現の直接的な影響は気管支及び肺胞上皮に対するものである可能性が高く、肺のいずれかの部位の腫瘍成長に対しては潜在的に間接的な効果がある。9-ニトロカンプトセシンのエアゾール送達は、腫瘍成長に対して更に付加的な抑制効果を持つであろう。p53が

腫瘍細胞をカンプトセシンの働きに対して感受性にすることができ、更に抗血管形成因子を調節することによるカンプトセシンと p 5 3 遺伝子の両方の役割を考慮すると、p 5 3 と 9-ニトロカンプトセシンの組み合わせは既存の肺転移の成長を抑えんと考えられる。

【0011】

本発明者等は、その技術において、遺伝子／抗癌薬物の組み合わせの連続的なエアゾール送達を用いて、既存の肺転移腫瘍のための改良された治療法の必要性を認識した。先行技術は、肺転移腫瘍の成長を抑制するために抗癌剤と共に p 5 3 遺伝子を連続的に用いるための方法が欠けている点において不十分である。本発明は、本技術分野におけるこの長年のニーズと願望を実現するものである。

【発明の開示】

【0012】

(発明の概要)

本発明の1つの実施の形態において、個体の肺転移の成長を抑制する方法が提供され、その方法はエアゾール化されたポリエチレンイミン-核酸複合体及びエアゾール化されたリボソーム-抗癌剤複合体を組み合わせることで投与するステップからなり、前記ステップにおいて、核酸と抗癌剤の両方の送達によって前記個体内の肺転移の成長が抑制される。

【0013】

本発明の別の実施の形態において、個体の肺転移の成長を抑制する方法が提供され、その方法はエアゾール化されたポリエチレンイミン-p 5 3 複合体及びエアゾール化されたジラウロイルホスファチジルコリン-9-ニトロカンプトセシン複合体を組み合わせることで投与するステップからなり、前記ステップにおいて、p 5 3 と 9-ニトロカンプトセシンの両方の送達によって前記個体内の肺転移の成長が抑制される。

【0014】

本発明のその他の、そして更なる態様、特徴、便益及び利点は、開示の目的で提供される本発明の現在のところ望ましい実施の形態の以下の記述から明らかになるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明の1つの実施の形態において、個体の肺転移の成長を抑制する方法が提供され、その方法はエアゾール化されたポリエチレンイミン-核酸複合体及びエアゾール化されたリボソーム-抗癌剤複合体を組み合わせることで投与するステップからなり、前記ステップにおいて、核酸と抗癌剤の両方の送達によって前記個体内の肺転移の成長が抑制される。

【0016】

この実施の形態の1つの態様において、エアゾール化ポリエチレンイミン-核酸複合体及びエアゾール化されたリボソーム-抗癌剤複合体が同時に投与される。この実施の形態の別の態様において、ポリエチレンイミン-核酸複合体及びエアゾール化されたリボソーム-抗癌剤複合体が連続して投与される。この態様に関して更に、エアゾール化されたリボソーム-抗癌剤複合体が繰り返して投与されてもよい。これらすべての態様において、複合体の投与に用いられる組み合わせは、少なくとも1回繰り返されてもよい。

【0017】

この実施の形態のすべての態様において、ポリエチレンイミン窒素対核酸リン酸の比率、又は窒素対リン酸の比率は約 2 : 1 から約 50 : 1、好適には約 5 : 1 から 20 : 1 を用いることができる。核酸は、DNA、RNA、触媒活性核酸、リボザイム、アンチセンス・オリゴヌクレオチド、または修飾核酸であってもよい。上記核酸は、腫瘍抑制活性を示してもよい。本実施の形態のポリエチレンイミン核酸複合体に用いてもよいDNAの代表例は、p 5 3 遺伝子、p 5 3 の切断誘導体、CD 1 遺伝子、IL-12、及びINF- γ である。リボソーム-抗癌剤複合体は、9-ニトロカンプトセシン、パクリタキセル、ドキシソルビシン、カルボプラチン、メトトレキサート、ビンブラスチン、エトポシド、ドセタキセル・ヒドロキシウレア、フルオロウラシル、ブスルファン、メシル酸イマチニブ、アレンプズマブ、アルデスロイキン、及びシクロフォスファミドを含んでもよい。

【0018】

ポリエチレンイミン核酸複合体は、窒素：リン酸の比率が5：1から20：1、好ましくは10：1である、エアゾール10mlあたり2mgのp53を含むポリエチレンイミン-p53複合体であってもよい。また、リポソーム-抗癌剤は、9-ニトロカンプトセシン：DLPCの重量比率が約1：50で、1mlあたり約0.5mgの9-ニトロカンプトセシンを含んでいるDLPC-9-ニトロカンプトセシン・リポソームである。更に、ポリエチレンイミン核酸及びリポソーム-抗癌剤の複合体は、約3%から約7.5%の二酸化炭素を含んでなるエアゾールで投与されてもよい。

【0019】

本発明の別の実施の形態において、p53と9-ニトロカンプトセシンの両方の送達によって個体内の肺転移の成長を抑制するように、エアゾール化されたポリエチレンイミン-p53複合体とエアゾール化されたジラウロイルホスファチジルコリン-9-ニトロカンプトセシン複合体を組み合わせるステップを含んでなる、個体内の肺転移の成長を抑制する方法が提供される。ポリエチレンイミン-p53複合体とジラウロイルホスファチジルコリン-9-ニトロカンプトセシン複合体の投与量と配合及びその投与方法は、上記に開示したとおりである。。

10

【0020】

下記の定義は、本明細書に開示された発明を容易に理解する目的で提供される。特に定義されない用語は、本技術分野の用語の一般的な意味に従って解釈される。

【0021】

本明細書において、「個体」という用語は、動物又はヒトを意味する。

20

【0022】

本明細書において、PEI-核酸及びリポソーム抗癌剤の複合体のエアゾール送達によって個体内の肺転移の成長を抑制する方法が提供される。in vivoモデルは、患者が既存の肺腫瘍を呈し、そのような疾患の治療がしばしば多種の診療を要するような臨床状態を、厳密に再現する。通常、ポリエチレンイミンは、腫瘍抑制活性を有する遺伝子からのDNAなどの核酸との複合に利用され、例えば9-ニトロカンプトセシン、パクリタキセル、ドキシソルビシン、カルボプラチンなどのリポソーム抗癌剤組成物との組み合わせ投薬において、連続的に又は同時に送達されてもよい。更に、核酸又は抗癌剤のいずれかが、異なる組み合わせによって2回以上投与されてもよい。

【0023】

抗癌剤は更に、代謝拮抗剤、アルキル化剤、Bcr-Ablチロシナーゼ抑制剤、インターロキニン-2-デリビターゼ (derivitase)、ナイトロジェンマスタード誘導体、及び葉酸拮抗剤などの抗腫瘍剤を特に含んでもよい。限定することなく、そのような物質の例は、それぞれドセタキセル・ヒドロキシウレア、ビンブラスチン又はエトポシド、フルオロウラシル又はブスルファン、メシル酸イマチニブ又はアレンプズマブ、アルデスロイキン、シクロフォスファミド、及びメトトレキサートである。

30

【0024】

特にPEI-p53及び9-ニトロカンプトセシン-ジラウロイルホスファチジルコリンのエアゾール複合体は、いずれかの薬剤単独と比較すると、B16-F10メラノーマという難題に対して強力な治療反応を実現できる。肺の重量と腫瘍の負荷は、コントロールやp53又は9-ニトロカンプトセシン単独と比較すると、p53と9-ニトロカンプトセシンの両方を用いて治療されたマウスにおいて著しく減少した。

40

【0025】

更に、p53も9-カンプトセシンも単独では転移の成長を抑制したり腫瘍を持つマウスの生存を延ばすのに十分な効力がないとはいえ、連続して投与すれば、既存のB16-F10肺転移の成長を抑制するには、はるかに少ないp53と9-ニトロカンプトセシンの投与量、すなわち、少なくとも約2倍少ない量が必要量となる。効果が確認された処方計画は、遺伝子の前に薬剤を使うより、9-ニトロカンプトセシン-ジラウロイルホスファチジルコリンによる治療の前のPEI-p53の送達を含む。リポソーム薬調剤の送達の結果、導入遺伝子発現レベルとPEI-DNAエアゾール送達の難治期間が減少するこ

50

とが考えられる。p 5 3 と 9-ニトロカンプトセシンの連続的なエアゾール送達は、異なるコントロール・グループにおけるそれらの動物と比較すると、B 1 6-F 1 0 メラノーマを持つマウスの平均生存時間において 3 0-4 0 % の増加をまねく。また、約 3 %-7. 5 % の C O₂ を含む薬剤のエアゾール送達は、9-ニトロカンプトセシンの肺沈着及び薬物動態学の増加を導くことができる。

【0 0 2 6】

腫瘍抑制活性を持つその他の核酸は、本明細書に開示された抗癌化合物と組み合わせて使用することができる。P E I は、例えば、その他の D N A、R N A、触媒活性核酸、リボザイム、アンチセンス・オリゴヌクレオチド、又は修飾核酸と組み合わせてもよい。C D 1 遺伝子のような遺伝子を制限することなく、p 5 3 の切断誘導体、I I-1 2、および I N F- γ は、i n v i v o での抗癌の可能性を示した。更に、腫瘍発現において p 5 3 によって調節される抗血管形成因子の役割は、肺のどの部位の腫瘍にも、恐らくは小細胞肺癌 (S C L S) のような p 5 3 陽性腫瘍に対しても間接的に効果をもたらすことができるであろう。

10

【0 0 2 7】

以下の実施例は、本発明の種々の実施の形態を示す目的で提供されるが、いかなる意味でも本発明を制限するものではない。

【実施例 1】

【0 0 2 8】

P E I-p 5 3 複合体と 9-N C リポソームの調製

20

参考文献 6 に記載のとおり、P E I-D N A 複合体を調製した。N e o B a m (N e o) はプラスミドを含んでいる p 5 3 遺伝子のプラスミド・バックボーンであるが、p 5 3 遺伝子は含まない。p 5 3 複合体は、N : P の比率を 5 : 1 で調製する；ポリエチレンジアミン窒素 : D N A リン酸の比率は、1 μ g の D N A が 3 n m o l のリン酸を含み、0. 1 M のポリエチレンジアミン溶液 1 μ l が 1 0 0 n m o l のアミン窒素を含み、1 0 : 1 の N : P の比率は 1. 2 9 : 1 の P E I : D N A 重量比率に対応することを考慮して計算することができる。9 N C-ジラウロイルホスファチジルコリン・リポソームは、参考文献 1 0 に記載の通りに調製する。

【実施例 2】

【0 0 2 9】

30

B 1 6-F 1 0 細胞増殖における p 5 3 遺伝子及び 9 N C の i n v i t r o での効果

組織培養プレートで培養された B 1 6-F 1 0 細胞 (4 8 ウェル・プレートに 2 0, 0 0 0 細胞/ウェル; 1 2 ウェル・プレートに 1 $\times$ 1 0⁵ 細胞/ウェル) を P E I-D N A 複合体 (1 μ g / m l ; p 5 3 又はコントロールの空のプラスミド、N e o) で 2 4 時間トランスフェクトする。次に培地を P B S で洗浄し、トランスフェクション媒体を 9-ニトロカンプトセシン-ジラウロイルホスファチジルコリン (1 0 0 n M) を含んでいる新しい媒体と交換した。2 4 時間後の B 1 6-F 1 0 細胞の増殖を、血球計を用いて評価した。細胞を数えるため、上記細胞層を P B S で洗浄した後に 0. 2 5 % トリプシンでトリプシン化した。A l a m a r B l u e 検定 (T r e k D i a g n o s t i c S y s t e m s, I n c) も実施して細胞の生存能力をテストした (データ図示せず)。

40

【0 0 3 0】

コントロール・グループは、遺伝子 (p 5 3 及び N e o b a m) のみ、又は薬剤 (9-ニトロカンプトセシン) のみ、あるいは N e o b a m と 9-ニトロカンプトセシンの組み合わせで処置した細胞などであった。単独物質又はポリエチレンジアミン-N e o B a m と 9-ニトロカンプトセシン-ジラウロイルホスファチジルコリンの組み合わせで処置された細胞と比較すると、ポリエチレンジアミン-p 5 3 でトランスフェクトされ 9-ニトロカンプトセシン-ジラウロイルホスファチジルコリンで処置された B 1 6-F 1 0 細胞の増殖におけるきわめて有意な減少が示された (図 1)。更に、薬剤 (> 0. 5 m g / m l) 又は p 5 3 プラスミド (> 2 μ g / m l) の濃度の増加は、単独物質として B 1 6-F 1 0 抑制の非常に強力な抑制を示し、同時に検査してもなんら相加効果は現れなかった (デ

50

ータ図示せず；8）。親細胞及びp53処置済みB16-F10細胞におけるp53発現レベルは、既に報告されている（8）。9-ニトロカンプトセシン+p53の値は、他のグループと大きく異なる（ $p < 0.01$ ；スチューデントt検定、両側）。

【実施例3】

【0031】

B16-F10転移におけるp53遺伝子及び9NCのin vivoでの効果

C57BL/6マウス（7-8週齢、Harlan Sprague Dawley, Houston, TX）に、尾部血管から25,000個のB16-F10細胞を0日目に注入した。腫瘍細胞注入後11日目より、腫瘍病巣が肺に十分定着して（図示せず）顕微鏡で見える大きさに成長したとき、9-ニトロカンプトセシン-ジラウロイルホスファチジルコリンを週に2回、及びPEI-p53エアゾール複合体を週に1回マウスに投与した。in vitroでの検査と同様、p53遺伝子を薬剤治療の前に送達した；週ごとの組み合わせ治療のため、p53を月曜日に投与し、9-ニトロカンプトセシンは火曜日と金曜日にエアゾール吸入させた。単独物質治療グループのマウスには、p53を週1回、又は9-ニトロカンプトセシンを週2回投与した。

【0032】

治療のための投薬量は、PEI：DNA（N：P）比率10：1のDNAのエアゾール溶液10mlあたり2mgのプラスミド、及び9-ニトロカンプトセシン：ジラウロイルホスファチジルコリン重量比率1：50での濃度0.5mg/mlの9-ニトロカンプトセシン5mgであった。薬剤及び遺伝子のエアゾール送達は、肺への沈着が増加するように、空气中5%のCO₂を使用して実施した。腫瘍接種後25日目に、マウスを致死させ、肺を処置して腫瘍指数を計算した。

【0033】

図2Aに示すように、他のすべてのグループと比較して、p53と9-ニトロカンプトセシンで治療されたマウスの腫瘍指数は著しく低く（ $p < 0.001$ ）、一方、他のすべてのグループのマウスには多くの腫瘍の小結節があった。p53と9-ニトロカンプトセシンを組み合わせたグループのすべてのマウスには、非常に小さい個別的な腫瘍病巣があった（図2B、2C）。9-ニトロカンプトセシン-ジラウロイルホスファチジルコリン治療グループからの肺（図示せず）は、9-ニトロカンプトセシンとPEI-NeoBamの組み合わせで見られたものと同様の大きさ及び形状であった。5%CO₂のみでは、未治療マウスと比較して、腫瘍の成長に影響がなかった（データ図示せず）。

【0034】

腫瘍指数は公式を使って計算した：腫瘍指数＝肺重量×当該グループの平均等級。コントロール・グループのほとんどの肺に数え切れないほど多くの病巣があったので、先に（8）で記述されたような1-5のスケールに基づいて肺を等級付けした；1 腫瘍病巣が10個未満の場合、2 腫瘍病巣が10-100個の場合、3 1つの肺葉が腫瘍で満たされている場合、4 両方の肺葉が腫瘍で満たされている場合、及び5 肺が腫瘍で満たされ、腫瘍が肺の外に出て胸壁内にまで成長している場合。肺に隣接した腫瘍の成長は、肺の重量を測定する際には肺の一部とみなされた。値は平均値±SDである（1グループあたりn＝マウス10匹）。

【0035】

肺の重量はまた、9NC+p53組み合わせグループと他のすべてのグループの間の著しい差異を示した（ $p < 0.01$ ；スチューデントt検定、両側）（図2D）。偽接種（腫瘍なし）マウスの肺重量は、約0.17gmである。

【実施例4】

【0036】

PEI-p53/9NC-DLPC治療したB16-F10罹患マウスの生存

0日目に25,000個のB16-F10細胞を尾部血管からC57BL/6マウス（1グループあたりn＝マウス10匹）に注入し、上記腫瘍を10日目まで定着させた。次に腫瘍細胞接種後11日目からマウスを治療せずに放置；又はPEI-p53エアゾール

10

20

30

40

50

複合体、9-ニトロカンプトセシン単独又はp53と9-ニトロカンプトセシンの連続組み合わせ、又は9-ニトロカンプトセシンとNeoBamの組み合わせを受けさせた。NeoBamをネガティブ・コントロールとして用いた。投与量は、単独の薬剤又は遺伝子で週に2回；そして組み合わせでは、遺伝子を週に1回と薬剤治療を週に2回であった。マウスを2週間治療し、その後時間をかけて生存を監視した。

【0037】

図3に示すように、p53と9-ニトロカンプトセシンの両方で治療されたマウスの平均生存時間は、他のグループのマウスと比較して、30-40%増加した(9NC+p53の37±6日に対して、9-ニトロカンプトセシン単独で29±3日、他のグループで25±4日)。上記治療は十分許容された。更に、p53と9-ニトロカンプトセシンの組み合わせグループのマウスの約20%は、腫瘍接種後50日まで生存し、52日目に解剖したところ腫瘍はなかった(肺に明らかな腫瘍病変がなかった)。各ステップは、指定された時点で死亡したマウスの数を示す。データは少なくとも2つの別個の実験の代表地である。9-ニトロカンプトセシン+p53の値は、他のグループと著しく異なる($p < 0.05$; マンホイットニー順位和検定)。

10

【実施例5】

【0038】

ヒトSAOS LM-6骨肉腫におけるp53遺伝子及び9NCの*in vivo*での効果

p53は、放射線治療と同様、パクリタキセルなど他の抗癌剤に対する感受性を腫瘍に持たせる可能性があると考えられる。p53治療と組み合わせたパクリタキセル(PTX)の有効性が、ヒトSAOS LM-6骨肉腫異種移植マウス・モデルで検査される。免疫不全(nu/nu)マウスの尾部血管に静脈注射された 1×10^6 個のSAOS LM-6細胞は、マウスの体内で肺転移を形成する。上記腫瘍を、微少癌組織が転移するまで、8週間成長させた。上記のスケジュールにしたがって、治療を行ない、治療期間は8週間であった。次にマウスを致死させ、肺表面の腫瘍を数え、測定した。

20

【0039】

抗癌効果を被治療及び未治療グループの間の肺重量の差によって評価した。治療のために腫瘍があまり成長しなかった肺の方が、腫瘍成長が抑制されなかった未治療マウスからの肺よりも軽かった(図4)。p53遺伝子治療と組み合わせたパクリタキセルは、相加効果よりも腫瘍抑制の方が大きいことを示した。p53単独とパクリタキセル単独は、同様の治療効果があった(データ図示せず)。

30

【0040】

本明細書に引用される参考文献は以下の通り：

1. Lowe SW, Bodis S, McClachey A, et al. P53 status and the efficacy of cancer therapy *in vivo*. Science 1994; 266:807-810.
2. Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, et al. A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis. Cancer Res 1993; 53(18):4129-33.
3. Horio Y, Hasegawa Y, Sekido Y, et al. Synergistic effects of adenovirus expressing wild-type p53 on chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells. Cancer Gene Ther 2000; 7(4):537-44.
4. Koshikina NV, Gilbert BE, Waldrep JC, et al. Distribution of camptothecin after delivery as a liposome aerosol or following intramuscular injection in mice. Cancer Chemother Pharmacol 1999; 44(3):187-92.
5. Thierry AR, Lunardi-Iskandar Y, Bryant JL, et al. Systemic gene therapy; bio distribution and long-term expression of a transgene in mice. Proc Natl Acad Sci 1995; 92(21):9742-6.
6. Gautam A, Densmore CL, Xu B, and Waldrep JC. Enhanced gene expression in mouse lung after PEI-DNA aerosol delivery. Mol Ther 2000; 2(1):63-70.

50

7. Gautam A, Densmore CL, and Waldrep JC. Pulmonary cytokine responses associated with PEI-DNA aerosol delivery. *Gene Ther* 2001; 8:254-257.
8. Gautam A, Densmore CL, and Waldrep JC. Inhibition of experimental lung metastasis by aerosol delivery of PEI-p53 complexes. *Mol Ther* 2000; 2(4):318-323.
9. Densmore CL, Kleinerman E, Gautam A, et al. Growth inhibition of established human osteosarcoma lung metastases in mice by aerosol delivery of PEI-p53 complexes. *Cancer Gene Ther* 2001; 8(9):619-627.
10. Koshkina NV, Kleinerman ES, Waldrep JC, et al. 9-Nitrocamptothecin liposome aerosol treatment of melanoma and osteosarcoma lung metastases in mice. *Clin Cancer Res* 2000; 6(7): 2876-80.
11. Knight V, Koshkina NV, Waldrep JC, et al. Anticancer effect of 9-nitrocamptothecin liposome aerosol on human cancer xenografts in nude mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1999; 44(3):177-86.
12. Koshkina NV, Knight V, Gilbert BE, et al. Improved respiratory delivery of the anticancer drugs, camptothecin and paclitaxel, with 5%CO₂-enriched air: pharmacokinetic studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 47:451:456.
13. Gautam A, Densmore CL, Melton S, et al. Aerosol delivery of PEI-p53 complexes inhibits B16-F10 lung metastases through regulation of angiogenesis. *Cancer Gene Therapy*, 2001; In press.
14. Murren JR, Anderson S, Fedele J, et al. Dose-escalation and pharmacodynamic study of topotecan in combination with cyclophosphamide in patients with refractory cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15(1):148-57.
15. Lebedeva S, Bagdasarova S, Tyler T, et al. Tumor suppression and therapy sensitization of localized and metastatic breast cancer by adenovirus p53. *Hum Gene Ther* 2001; 12(7): 763-72.
16. Cummings J, Smyth JF. DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs. *Ann Oncol* 1993; 4(7):533-43.
17. Liu W, Zhang R. Upregulation of p21WAF1/CIP1 in human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-468 undergoing apoptosis induced by natural product anticancer drugs 10-hydroxycamptothecin and camptothecin through p53-dependent and independent pathways. *Int J Oncol* 1998; 12(4):793-804.
18. Nieves-Neira W, Pommier Y. Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI Anticancer Drug Screen: multifactorial relationships with topoisomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. *Int J Cancer* 1999; 82(3):396-404.
19. Kalechman Y, Strassman G, Albek M, and Sredni B. Up-regulation by ammonium trichloro(dioxoethylene-0,0') tellurate (AS101) of Fas/Apo-1 expression on B16 melanoma cells: implications for the antitumor effects of AS101. *J. Immunol* 1998; 161(7):3536-42.
20. Hanrahan D, and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3):353-64.
21. Clements MK, Jones CB, Cumming M, Daoud SS. Antiangiogenic potential of camptothecin and topotecan. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44(5):411-6.
22. O'Leary JJ, Shapiro RL, Ren CJ, et al. Antiangiogenic effects of camptothecin analogues 9-amino-20(S)-camptothecin, topotecan, and CPT-11 studied in the mouse cornea model. *Clin Cancer Res* 1999; 5(1):181-7.
23. Zhang L, Yu D, Hu M, et al. Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 2000; 60(13):3655-61.

10

20

30

40

50

24. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265(5178):1582-4.
25. Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, et al. Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene. *Cancer Res* 1994; 54(9):2287-91.
26. Nemunaitis J, Swisher SG, Timmons T, et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2000; 18(3): 609.
27. Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J, et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(9):763-71. 10
28. Knight, V., et al. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 44:177-186 (1999))

【0041】

本明細書に記載されるいずれの特許又は刊行物も、本発明に関する当業者のレベルを示すものである。更に、これらの特許及び刊行物は、個々の刊行物が参照によって具体的に個別にあたかも組み込まれるかのように、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0042】

当業者であれば、本発明が、本明細書に固有のものと同様に、目的を実行し、述べられた結果と利点を獲得するために、十分適していることを理解するであろう。本実施例、ならびに本明細書記載の方法、手順、処置、分子、及び特定の化合物は、現在のところ好ましい実施の形態の代表例であり、典型例であり、発明の範囲の限定として意図されたものではない。特許請求の範囲によって定義されるような本発明の精神に含まれるその変更及びその他の利用は、当業者によって想起されるものである。 20

【図面の簡単な説明】

【0043】

上記に明示される本発明の特徴、利点及び目的が達成され、詳細に理解され得るように、本発明のより具体的な説明を簡単に要約する。上記の詳細は、添付図面に示される本発明の特定の実施の形態を参照して得ることができる。これらの図面は、本明細書の一部を構成する。ただし、添付図面は本発明の望ましい実施の形態を示すものであり、従ってその範囲を限定することを意図したものではない。 30

【図1】 *in vitro*でのB16-F10細胞増殖に対するp53及び9-ニトロカンプトセシンの影響を示す図である。

【図2A】 図2は既存のB16-F10肺転移の成長に対するp53及び9-ニトロカンプトセシンの組み合わせの影響を示す図であり、図2において、図2Aは、腫瘍指数を、コントロール及びPEI：p53-及び／又は9-ニトロカンプトセシンで処理したB16-F10肺転移と比較する図である。値は中間値+SDである（1グループあたりn=マウス10匹）。

【図2B】 未処置（上列）、p53（中列）、及び9-ニトロカンプトセシンとp53の組み合わせ（下列）で処置されたマウスの典型的な肺を示す（1グループあたりn=マウス10匹）。 40

【図2C】 未処置（上列）、9-ニトロカンプトセシンとNeobam（中列）、及び9-ニトロカンプトセシンとp53（下列）の組み合わせで処置されたマウスの典型的な肺を示す（1グループあたりn=マウス10匹）。データは少なくとも2つの個別の実験の代表値である。

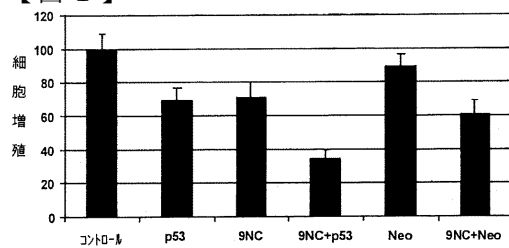
【図2D】 異なるグループからのマウスの肺の重量を示す。値は中間値+SDである（1グループあたりn=マウス10匹）。

【図3】 PEI-p53エアゾール複合体で処置されたマウス（1グループあたりn=マウス10匹）の生存時間を示す図である。データは少なくとも2つの個別の実験の代表値である（ $p < 0.05$ ；マンホイットニー順位和検定）。

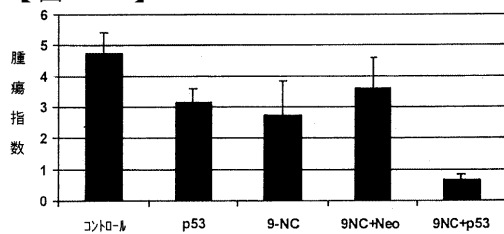
【図4】 コントロール及びPEI：p53及び／又はPTXで処置されたLM-6骨肉腫 50

肺転移における、腫瘍の大きさと腫瘍病巣の数を比較する図である。

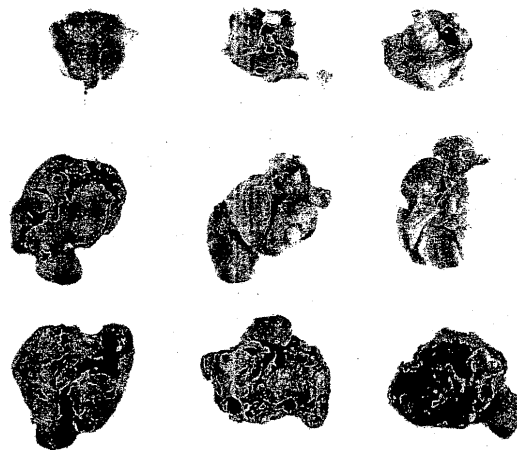
【図 1】



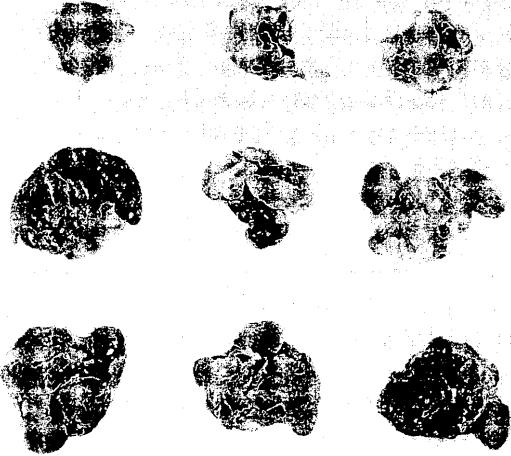
【図 2 A】



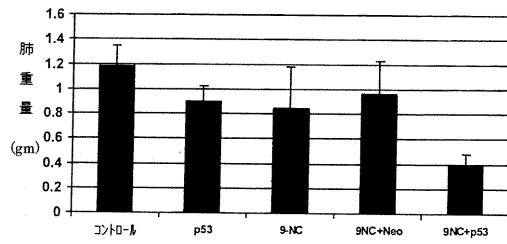
【図 2 B】



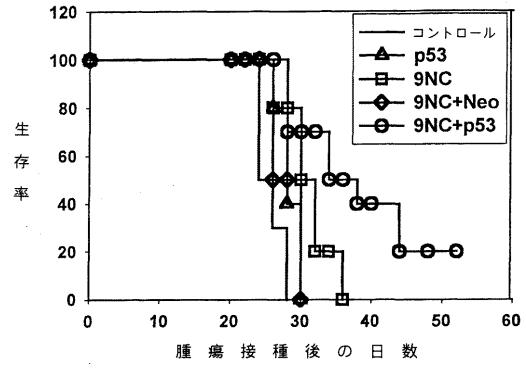
【図 2 C】



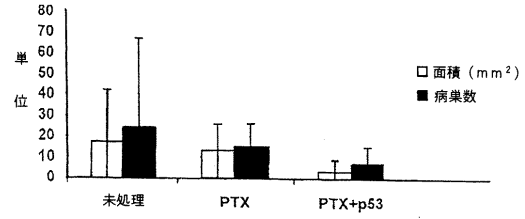
【図 2 D】



【図 3】



【図 4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/04522
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 48/00, 9/14; C12N 15/63 US CL : 514/44; 424/486; 435/320.1, 455 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. : 514/44; 424/486; 435/320.1, 455		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, CAS ONLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2002/0006901 A1 (IACONO) 17 January 2002 (17.01.2002), page 4, paragraph 0039.	1-27
Y	US 6,333,051 B1 (KABANOV et al) 25 December 2001 (25.12.2001), columns 23-31.	1-27
Y	US 5,049,389 A (RADHAKRISHNAN) 17 September 1991 (17.09.1991), columns 35 and 36.	1-27
Y	US 6,271,207 B1 (CRISTIANO et al) 07 August 2001 (07.08.2001), columns 20-22.	1-27
Y	US 6,248,720 B1 (MATHIOWITZ et al) 19 June 2001 (19.06.2001), columns 11-12, 15-16, and column 19 bridging column 20.	1-27
Y	US 6,069,134 A (ROTH et al) 30 May 2000 (30.05.2000), columns 20-21.	1-27
☐ 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 August 2003 (13.08.2003)		Date of mailing of the international search report 17 NOV 2003
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		Authorized officer Dave T. Nguyen <i>Janice Ford</i> Telephone No. 703-308-0196 <i>for</i>

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/337	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 31/4745	A 6 1 K 31/4745	
A 6 1 K 31/475	A 6 1 K 31/475	
A 6 1 K 31/506	A 6 1 K 31/506	
A 6 1 K 31/513	A 6 1 K 31/513	
A 6 1 K 31/519	A 6 1 K 31/519	
A 6 1 K 31/675	A 6 1 K 31/675	
A 6 1 K 31/704	A 6 1 K 31/704	
A 6 1 K 31/7048	A 6 1 K 31/7048	
A 6 1 K 31/7105	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/711	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 47/24	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/34	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 35/04	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN, GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CU,CZ,DE,DK,EE,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,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S G,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

- (72)発明者 ギルバート, ブライアン
アメリカ合衆国 77096 テキサス, ヒューストン, ジェイスン 5171
- (72)発明者 コシュキナ, ナジェズダ
アメリカ合衆国 77054 テキサス, ヒューストン, ケンブリッジ 7900, ナンバー17
21
- (72)発明者 ウォルドレップ, ジェイ. クリフォード
アメリカ合衆国 77381 テキサス, ザ ウッドランズ, ウィンド トレイス コート 6
- (72)発明者 デンズモー, チャールズ エル.
アメリカ合衆国 77381 テキサス, ザ ウッドランズ, サウス コッペ セイジ サークル
83
- (72)発明者 ゴウタム, アジャイ
アメリカ合衆国 77030 テキサス, ヒューストン, ドライドン ストリート 1932-1
/2

Fターム(参考) 4C076 AA19 AA24 AA93 AA95 BB27 CC27 DD15 EE17 EE59 FF33
FF34 FF68
4C084 AA13 AA17 MA02 MA13 MA24 MA56 NA10 NA11 NA13 ZA591
ZB261 ZB262
4C086 AA01 AA02 BA02 BC43 BC50 CB09 CB21 CB22 DA38 EA10
EA11 EA16 GA07 GA08 GA12 MA02 MA05 MA07 MA10 MA13
MA24 MA56 NA10 NA11 NA13 ZA59 ZB26
4C206 AA01 AA02 CB09 JA06 JB16 MA02 MA05 MA13 MA14 MA17

MA24 MA28 MA29 MA33 MA44 MA76 NA10 NA11 NA13 ZA59
ZB26