

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5685357号
(P5685357)

(45) 発行日 平成27年3月18日(2015.3.18)

(24) 登録日 平成27年1月23日(2015.1.23)

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 K 33/34 (2006.01) A 6 1 K 33/34
A 6 1 K 9/127 (2006.01) A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 47/26 (2006.01) A 6 1 K 47/26
A 6 1 K 47/36 (2006.01) A 6 1 K 47/36
A 6 1 K 47/42 (2006.01) A 6 1 K 47/42

請求項の数 25 (全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-520537 (P2007-520537)	(73) 特許権者	507007441
(86) (22) 出願日	平成17年7月8日(2005.7.8)		セービン, ロバート
(65) 公表番号	特表2008-505922 (P2008-505922A)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1176
(43) 公表日	平成20年2月28日(2008.2.28)		5 ミル ネック グースダウン エステ
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/024272		ート ピー. オー. ボックス 332
(87) 国際公開番号	W02006/017179	(74) 代理人	100158920
(87) 国際公開日	平成18年2月16日(2006.2.16)		弁理士 上野 英樹
審査請求日	平成20年6月30日(2008.6.30)	(72) 発明者	セービン, ロバート
審判番号	不服2012-14797 (P2012-14797/J1)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1176
審判請求日	平成24年8月2日(2012.8.2)		5 ミル ネック グースダウン エステ
(31) 優先権主張番号	10/888,576		ート ピー. オー. ボックス 332
(32) 優先日	平成16年7月9日(2004.7.9)	(72) 発明者	シングハル, アミット
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ニュージャージー 08
(31) 優先権主張番号	60/598,179		854 ピスカタウェイ ボウラー コー
(32) 優先日	平成16年8月2日(2004.8.2)		ト 370
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳類疾病の治療のための組成物および使用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

非経口的投与により哺乳類における腫瘍疾患又はウイルス性疾患の治療に医薬品として使用する化学組成物であって、前記化学組成物は、水溶性の銅塩を水に溶解し、酸化デキストラン又は水酸化デキストランの存在下に還流し、さらにNaOHを添加して還流することによって製造したCu(OH)₂-デキストランナノ粒子が、少なくとも1つのコーティング材料で被包、被覆、囲包、吸着、複合体形成または結合されており、前記少なくとも1つのコーティング材料は、脂質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ポリヌクレオチド、タンパク質、リポソーム及びこれらの組合せからなる群より選ばれるか、又はグルコース、サッカライド、ポリサッカライド、デキストラン、リポソーム、これらの誘導体及びこれらの組合せからなる群より選ばれ、前記非経口的投与が静脈内、皮下、腹膜内、包膜内、筋肉内、又は頭蓋内投与である場合、前記化学組成物はコロイド溶液を形成する、化学組成物。

【請求項2】

リポソームコートが前記少なくとも1つのコーティング材料を被包していることを特徴とする請求項1に記載の化学組成物。

【請求項3】

前記少なくとも1つのコーティング材料が前記化学組成物を被包していることを特徴とする請求項1又は2に記載の化学組成物。

【請求項4】

前記少なくとも1つのコーティング材料が主としてデキストランから形成されることを特徴とする請求項1～3のいずれか1つに記載の化学組成物。

【請求項5】

前記少なくとも1つのコーティング材料が、主として1種以上のリポソームからなることを特徴とする請求項1～3のいずれか1つに記載の化学組成物。

【請求項6】

さらに哺乳類の血液循環中に残留する製薬上許容される物質を含んでいることを特徴とする請求項1～5のいずれか1つに記載の化学組成物。

【請求項7】

哺乳類の前記ウイルス性疾患がA型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎、マールブルグウイルス、エボラウイルス及びオルトポックスウイルスであることを特徴とする請求項1～6のいずれか1つに記載の化学組成物。

【請求項8】

非経口的投与により哺乳類における腫瘍疾患又はウイルス性疾患の治療に用いられる化学組成物を含む医薬品を製造する方法であって、該方法は、

(a) 水溶性の銅塩を水に溶解し、

(b) 酸化デキストラン又は水素化デキストランの存在下に還流し、

(c) さらにNaOHを添加して還流する、

ことを含み、それによって製造した前記化学組成物としてのCu(OH)₂-デキストランナノ粒子を少なくとも1つのコーティング材料で被包、被覆、囲包、吸着、複合体形成又は結合し、前記少なくとも1つのコーティング材料は、グルコース、サッカライド、ポリサッカライド、デキストラン、リポソーム、脂質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ポリヌクレオチド、タンパク質、及びこれらの組合せからなる群より選ばれ、前記非経口的投与が静脈内、皮下、腹膜内、包膜内、筋肉内、又は頭蓋内投与である場合、前記化学組成物をさらにコロイド溶液組成物とする、方法。

【請求項9】

非経口的投与により哺乳類における腫瘍疾患又はウイルス性疾患の治療に用いられる薬剤組成物を調製する方法であって、該方法は、

(a) 水溶性の銅塩を水に溶解し、

(b) 酸化デキストラン又は水素化デキストランの存在下に還流させ、

(c) さらにNaOHを添加して還流する、

ことを含み、それによって前記薬剤組成物としてCu(OH)₂-デキストランナノ粒子を調製し、前記非経口的投与が静脈内、皮下、腹膜内、包膜内、筋肉内、又は頭蓋内投与である場合、前記化学組成物をさらにコロイド溶液組成物とする、方法。

【請求項10】

非経口的投与により哺乳類における腫瘍疾患又はウイルス性疾患の治療に用いられる薬剤組成物を調製する方法であって、該方法は、

(a) 水溶性の銅塩を水に溶解し、

(b) (a)の溶液を酸化デキストラン又は水素化デキストランの存在下に還流させ、

(c) (b)の溶液をデキストランと混ぜ合わせてからさらに還流させ、

(d) (c)の溶液を水酸化ナトリウムと混ぜ合わせ、

(e) さらに(d)の溶液を還流させ、

(f) (e)の溶液を冷却し、

(g) (f)の溶液を水酸化ナトリウムを用いて沈殿させ、

(h) (g)の溶液を真空中で蒸発させる、

ことを含み、それによって前記薬剤組成物として、デキストランで被包、被覆、囲包、吸着、複合体形成又は結合されたCu(OH)₂-デキストランナノ粒子を調製し、前記非経口的投与が静脈内、皮下、腹膜内、包膜内、筋肉内、又は頭蓋内投与である場合、前記化学組成物をさらにコロイド溶液組成物とする、方法。

【請求項11】

非経口的投与により癌の治療に用いられる医薬品を調製する方法であって、該方法は、
(a) 硝酸銅を水中に溶解させ、
(b) 該硝酸銅と水との溶液を形成し、
(c) (b) の溶液を還流させ、
(d) (c) の溶液を酸化デキストラン又は水素化デキストランの存在下に還流し、
(e) (d) の溶液にさらにNaOHを添加して還流する、
ことを含み、それによって前記医薬品としてCu(OH)₂-デキストランナノ粒子を調製し、前記非経口的投与が静脈内、皮下、腹膜内、包膜内、筋肉内、又は頭蓋内投与である場合、前記化学組成物をさらにコロイド溶液組成物とする、方法。

【請求項12】

非経口的投与により哺乳類における腫瘍疾患又はウイルス性疾患の治療において医薬品として使用する組成物を調製する方法であって、該方法は、
(a) 水溶性の銅塩を水に溶解し、
(b) (a) の溶液を酸化デキストラン又は水素化デキストランの存在下に還流し、
(c) (b) の溶液をさらにNaOHを添加して還流し、
(d) (c) の溶液に少なくとも1つのコーティング材料を添加する、
ことを含み、それによって前記組成物として、前記少なくとも1つのコーティング材料で被包、被覆、囲包、吸着、複合体形成又は結合されたCu(OH)₂-デキストランナノ粒子を製造し、前記少なくとも1つのコーティング材料は、グルコース、サッカライド、ポリサッカライド、デキストラン、リポソーム、脂質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ポリスクレオチド、タンパク質、それらの誘導体及びこれらの組合せからなる群より選ばれ、前記非経口的投与が静脈内、皮下、腹膜内、包膜内、筋肉内、又は頭蓋内投与である場合、前記化学組成物をさらにコロイド溶液組成物とする、方法。

【請求項13】

非経口的投与により哺乳類における腫瘍疾患又はウイルス性疾患の治療において医薬品として使用する組成物を調製する方法であって、該方法は、
(1) 水溶性の銅塩を水に溶解して銅塩溶液を形成し、
(2) 該溶液を還流し、
(3) (2) の溶液を酸化デキストラン又は水素化デキストランの存在下に還流し、
(4) (3) の溶液をデキストランと混ぜ合わせてからさらに還流し、
(5) (4) の溶液を水酸化ナトリウムと混ぜ合わせてさらに還流し、
(6) (5) の溶液を冷却し、
(7) (6) の溶液を水酸化ナトリウムを用いて沈殿させ、
(8) (7) の溶液を真空中で蒸発させる、
ことを含み、それによって前記組成物としてデキストランで被包、被覆、囲包、吸着、複合体形成又は結合されたCu(OH)₂-デキストランナノ粒子を調製し、前記非経口的投与が静脈内、皮下、腹膜内、包膜内、筋肉内、又は頭蓋内投与である場合、前記化学組成物をさらにコロイド溶液組成物とする、方法。

【請求項14】

非経口的投与による哺乳類における腫瘍疾患又はウイルス性疾患の治療用の医薬品の製造のため請求項1～7のいずれか1つに記載の化学組成物の使用。

【請求項15】

前記ウイルスがHIV、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎、マールブルグウイルス、エボラウイルス及びオルトポックスウイルスから選ばれることを特徴とする請求項14に記載の化学組成物の使用。

【請求項16】

前記医薬品が哺乳類におけるインスリン強化療法、放射線増感剤療法または細胞の磁気イメージングと一緒に哺乳類の完全静脈栄養として使用するのに好適であることを特徴とする請求項14又は15に記載の化学組成物の使用。

【請求項17】

請求項 1～7 のいずれか 1 つに記載の化学組成物と、再分布剤とを含む製薬上許容される製品であって、前記再分布剤が鉄デキストラン又は鉄グルコースを含んでいる、製品。

【請求項 1 8】

癌、腫瘍疾患又はウイルス性疾患の予防のために、非経口的投与により少なくとも 1 つの発癌性ウイルスを標的とする医薬品として使用する化学組成物であって、前記化学組成物は、水溶性の銅塩を水に溶解し、酸化デキストラン又は水素化デキストランの存在下に還流し、さらに NaOH を添加して還流することによって製造された Cu(OH)₂-デキストランナノ粒子が、少なくとも 1 つのコーティング材料で被包、被覆、囲包、吸着、複合体形成または結合されており、前記少なくとも 1 つのコーティング材料は、グルコース、サッカライド、ポリサッカライド、デキストラン、リポソーム、脂質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ポリヌクレオチド、タンパク質、それらの誘導体及びこれらの組合せからなる群より選ばれ、前記非経口的投与が静脈内、皮下、腹膜内、包膜内、筋肉内、又は頭蓋内投与である場合、前記化学組成物はコロイド溶液を形成する、化学組成物。

10

【請求項 1 9】

前記発癌性ウイルスが発癌性肝細胞ウイルスであり、前記癌が肝臓癌であることを特徴とする請求項 1 8 に記載の化学組成物。

【請求項 2 0】

前記化学組成物が B 型肝炎ウイルス感染の治療に使用されることを特徴とする請求項 1 8 に記載の化学組成物。

【請求項 2 1】

前記化学組成物が C 型肝炎ウイルス感染の治療に使用されることを特徴とする請求項 1 8 に記載の化学組成物。

20

【請求項 2 2】

前記発癌性ウイルスが人乳頭腫ウイルス (HPV) であり、前記癌が子宮癌であることを特徴とする請求項 1 8 に記載の化学組成物。

【請求項 2 3】

前記発癌性ウイルスがエプスタイン・バーウイルス (EBV) であり、前記癌がバーキットリンパ腫であることを特徴とする請求項 1 8 に記載の化学組成物。

【請求項 2 4】

前記発癌性ウイルスがヒト T 細胞白血球ウイルス (HTLV-1) であり、前記癌が成人 T 細胞白血病リンパ腫であることを特徴とする請求項 1 8 に記載の化学組成物。

30

【請求項 2 5】

癌、腫瘍疾患又はウイルス性疾患を予防する医薬品の製造のための請求項 1 8～2 4 のいずれか 1 つに記載の化学組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本開示は、薬剤組成物、使用法、および製造法に関する。これらの組成物は癌、肝炎または HIV のようなウイルス性感染症、エボラのような感染性ウイルス性疾患、微生物媒介性の症状、マラリア、および天然痘、および、細菌を含めた感染性微生物によって引き起される他の疾患を含め、哺乳類における広く多様な疾患および感染症の治療のために有用である。

40

【背景技術】

【0 0 0 2】

本文において言及された全ての特許、科学論文、および他の文献は、下文に全て複写されているように、参考として本文に含まれている。癌は、身体内の新たな細胞の迅速かつ制御されない増殖であり、ヒトを含めた動物における死の主な原因である。この増殖は、多細胞生物の正常な発生およびホメオスタシスに必須の生理学的プロセスである、アポトーシスの正常なレベルをはるかに上回る。(ステラー (Stellar) 著、Science、1995 年、第 267 巻、p. 1445-1449)。

50

【非特許文献1】ステラー (Stellar) 著、Science、1995年、第267巻、p. 1445-1449

【0003】

しばしば放射線療法および外科手術と一緒に使用される化学療法は、今日使用されている標準的な癌治療法である。化学療法は一般に、癌細胞を破壊する薬物治療または薬物を意味するものと理解される。現在、癌を治療するために様々な組合せで使用されている100を超える薬物がある (米国癌学会著 (The American Cancer Society)、「Consumers Guide to Cancer Drugs (癌治療薬の消費者ガイド)」、ジョーンズ・アンド・バートレット・パブリッシャーズ (Jones and Bartlett Publishers)、2000年)。「これらの全ての薬物には共通した一つの特徴がある。それらが作用するのは、それらが毒物であるからである。」(モス (Moss) 著、「Questioning Chemotherapy (化学療法を問う)」、エキノックス・プレス (Equinox Press)、2000年、p. 77)。化学療法薬は非常に毒性であり、典型的には狭い治療指数を有する。これらの薬剤は悪性細胞に対しほとんど特異性を示さず、正常細胞と悪性細胞との間を事実上識別することはできない。結果として、全ての細胞および組織、および特に、骨髄細胞、精原細胞、および胃腸の陰窩上皮細胞といった、迅速に増殖する細胞は非常に攻撃されやすい。(バキラン (Baquiran) 著、「Cancer Chemotherapy Handbook (癌の化学療法ハンドブック)」、リッピンコット (Lippincott)、2001年、p. 85)。さらに、化学療法の副作用が恐ろしいものとなる可能性があることは、当業者にとり、また、彼らに対して実行された技術を受けるべき充分に不運な者にとり、周知の通りである。(米国癌学会著 (The American Cancer Society)、「Consumers Guide to Cancer Drugs (癌治療薬の消費者ガイド)」、ジョーンズ・アンド・バートレット・パブリッシャーズ (Jones and Bartlett Publishers)、2000年)。また、(バキラン (Baquiran) 著、「Cancer Chemotherapy Handbook (癌の化学療法ハンドブック)」、リッピンコット (Lippincott)、2001年、p. 85)；(チュー (Chu) & デビータ (Devita) 著、「Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual (医師用癌化学療法薬マニュアル)」、ジョーンズ・アンド・バートレット・パブリッシャーズ (Jones and Bartlett Publishers)、2003年)；ランス・アームストロング (Lance Armstrong) 著、「It's Not About the Bike (それは自転車についてではない)」、バークレイ・パブリッシング (Berkley Publishing)、2000年)、キング (King)、キング (King)、およびパールロース (Pearlroth) 著、「Cancer Combat (癌戦闘)」、バンタム・ブックス (Bantam Books)、1998年)；(リッチ (Rich) 著、「The Red Devil (赤い悪魔)」、スリー・リバーズ・プレス (Three Rivers Press)、1999年)；および(マルキオーネ (Marchione) 著、「Hopes in cancer drug dashed (打ち砕かれた癌治療薬における希望)」、ミルウォーキー・ジャーナル・センチネル (Milwaukee Journal Sentinel)、2002年5月22日)も参照のこと。化学療法を含めた現在の癌療法は、一般に充実性腫瘍にはうまく作用しない。(モス著、「(Questioning Chemotherapy) 化学療法を問う」改訂版、エキノックス・プレス (Equinox Press)、2000年、p. 18)、および(マスターズ (Masters) およびコベール (Koberle) 著、Curing Metastatic Cancer : Lessons from Testicular Germ-Cell Tumours (転移癌の治療：精巣の胚細胞腫瘍からの教訓)、Nature Reviews、2003年7月、第3巻、第7号)。

【非特許文献2】米国癌学会著 (The American Cancer Society)、「Consumers Guide to Cancer Drugs (癌治療薬の消費者ガイド)」、ジョーンズ・アンド・バートレット・パブリッシャーズ (Jones and Bartlett Publishers)、2000年

【非特許文献3】モス (Moss) 著、「Questioning Chemotherapy (化学療法を問う)」、エキノックス・プレス (Equinox Press)、2000年、p. 77)

【非特許文献4】バキラン (Baquiran) 著、「Cancer Chemotherapy Handbook (癌の化学療法ハンドブック)」、リッピンコット (Lippincott)、2001年、p. 85

【非特許文献5】米国癌学会著 (The American Cancer Society)、「Consumers Guide to Cancer Drugs (癌治療薬の消費者ガイド)」、ジョーンズ・アンド・バートレット・パ

10

20

30

40

50

ブリッシャーズ (Jones and Bartlett Publishers)、2000年

【非特許文献6】バキラン (Baquiran) 著、「Cancer Chemotherapy Handbook (癌の化学療法ハンドブック)」、リッピンコット (Lippincott)、2001年、p. 85

【非特許文献7】チュー (Chu) & デビータ (Devita) 著、「Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual (医師用癌化学療法薬マニュアル)」、ジョーンズ・アンド・バートレット・パブリッシャーズ (Jones and Bartlett Publishers)、2003年

【非特許文献8】ランス・アームストロング (Lance Armstrong) 著、「It's Not About the Bike (それは自転車についてではない)」、バークレイ・パブリッシング (Berkley Publishing)、2000年

【非特許文献9】キング (King)、キング (King)、およびパールロース (Pearlroth) 著、「Cancer Combat (癌戦闘)」、バンタム・ブックス (Bantam Books)、1998年

【非特許文献10】リッチ (Rich) 著、「The Red Devil (赤い悪魔)」、スリー・リバーズ・プレス (Three Rivers Press)、1999年

【非特許文献11】マルキオーネ (Marchione) 著、「Hopes in cancer drug dashed (打ち砕かれた癌治療薬における希望)」、ミルウォーキー・ジャーナル・センチネル (Milwaukee Journal Sentinel)、2002年5月22日

【非特許文献12】モス著、「(Questioning Chemotherapy) 化学療法を問う」改訂版、エキノックス・プレス (Equinox Press)、2000年、p. 18

【非特許文献13】マスターズ (Masters) およびコベール (Koberle) 著、Curing Metastatic Cancer : Lessons from Testicular Germ-Cell Tumours (転移癌の治療：精巣の胚細胞腫瘍からの教訓)、Nature Reviews、2003年7月、第3巻、第7号

【0004】

化学療法薬に対し、耐性が生じる可能性があり、薬剤を、あるタイプの癌には作用するがその他には作用しないか、または全く作用しないようさせる。耐性は、これまでに開発された全ての単一の化学療法薬について証明されている。この耐性は、先天的、後天的、または緊急的な耐性であってよい。(チュー (Chu) & デビータ (Devita) 著、「Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual (医師用癌化学療法薬マニュアル)」、ジョーンズ・アンド・バートレット・パブリッシャーズ (Jones and Bartlett Publishers)、2003年)。さらに、化学療法薬を併用することが、結果として優れた反応率をもつレジメンを生じるものと一般的には考えられてきた。しかしながら一つの研究は、連続してあるいは併用して転移性乳癌に使用された化学療法薬が、生存に関して同等の結果をもたらし、生活の質が測定されたことを証明した。(スレッジ (Sledge) ら著、「Phase III, Trial of Doxorubicin, paclitaxel, and the combination of doxorubicin and paclitaxel as front-line chemotherapy for metastatic breast cancer : an intergroup trial (第III相、転移性乳癌の最先端化学療法としての、ドキソルビシン、パクリタキセル、および、ドキソルビシンおよびパクリタキセル併用の試験：インターグループ・トライアル)」、J. of Clin. Oncology、2003年2月、第21巻、第4号、p. 588-592)。

【非特許文献14】チュー (Chu) & デビータ (Devita) 著、「Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual (医師用癌化学療法薬マニュアル)」、ジョーンズ・アンド・バートレット・パブリッシャーズ (Jones and Bartlett Publishers)、2003年

【非特許文献15】スレッジ (Sledge) ら著、「Phase III, Trial of Doxorubicin, paclitaxel, and the combination of doxorubicin and paclitaxel as front-line chemotherapy for metastatic breast cancer : an intergroup trial (第III相、転移性乳癌の最先端化学療法としての、ドキソルビシン、パクリタキセル、および、ドキソルビシンおよびパクリタキセル併用の試験：インターグループ・トライアル)」、J. of Clin. Oncology、2003年2月、第21巻、第4号、p. 588-592

【0005】

加えて、より新しい4つの化学療法レジメンおよび薬物を利用している研究が、11%という2年生存率、および実質的な毒性を提示した。反応および生存率は、進行した非小

10

20

30

40

50

細胞肺癌用に、異なるレジメンで治療された4群の間で有意に異なることはなかった。(シラー (Schiller) ら著、「Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (進行した非小細胞肺癌用の4つの化学療法レジメンの比較)」、The N. Eng. J. of Med.、2002年1月、第346巻、第2号、p. 92-98)。

【非特許文献16】シラー (Schiller) ら著、「Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (進行した非小細胞肺癌用の4つの化学療法レジメンの比較)」、The N. Eng. J. of Med.、2002年1月、第346巻、第2号、p. 92-98

【0006】

癌細胞は高いグルコース取込みおよび代謝を有することが周知であり、結果として生じる増強された解糖は、悪性の形質転換の指標として役立つことが可能である。(メーヴァ (Mehvar) 著、「Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents (治療用およびイメージング用薬剤の、標的化および持続化された送達のためのデキストラン)」、J. of Controlled Release、2000年、第69巻、p. 1-25)；(エスナー (Essner) ら著、「Advances in FDG PET Probes in Surgical Oncology (外科腫瘍学におけるFDG-PETの進歩)」、Cancer Jour.、2002年、第8巻、p. 100-108)。癌細胞は、グルコースを高率で利用および代謝し、(高い酸素濃度の存在下であっても) 主として乳酸塩を形成する。(ワールブルグ (Warburg) 著、「On The Origin of Cancer Cells (癌細胞の起源について)」、Science、1956年2月、第123巻、第3191号、p. 309-314)。それ故乳酸塩は、癌細胞においては、対応する正常組織におけるよりもはるかに高レベルで検出される。(リベンゾン-セガル (Rivenzon-Segal) ら著、「Glycolysis as a metabolic marker in orthotopic breast cancer, monitored by in vivo ¹³C MRS (インビボの¹³C MRSによりモニターされた正所性乳癌における代謝マーカーとしての解糖)」、Amer. J. Phys. Endocrinology Metabolism、2002年、第283巻、E623-E630)；また(リー (Lee) およびピーダーセン (Pedersen) 著、「Glucose Metabolism in Cancer (癌のグルコース代謝)」、J. of Bio. Chem.、2003年10月、第278巻、第42号、p. 41047-41058)；(ゲイテンビー (Gatenby) およびガウリンスキー (Gawlinski) 著、「The glycolysis phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models (発癌および腫瘍浸潤における解糖表現型：数学的モデルによる洞察)」、Cancer Res.、2003年7月、第63巻、第14号、p. 3847-54)；(デガーニ (Degani) 著、「The American Society of Clinical Oncology (米国臨床腫瘍学会)」、Intn'l J. of Cancer、2003年、11月、第107巻、p. 177-182)；(ワールブルグ (Warburg) 著、「The Prime Cause and Prevention of Cancer (癌の主要原因と予防)」、コンラッド・トリルチ (Konrad Triltsch)、1969年、p. 6)も参照のこと。グルコースは、典型的には、グルコース輸送体ファミリーの一つを介した促進拡散により、ほとんどの細胞へ入る。(カッツング (Katzung) 著、「Basic & Clinical Pharmacology (基礎および臨床薬理学)」、マグローヒル社 (McGraw Hill Co. Inc.)、2001年、p. 715)。これらのグルコース輸送体に不適合であるグルコースの形状は、エンドサイトーシスとしても公知の食作用により、食作用系の細胞かまたは組織に付随した細胞のいずれかによって摂取されることが可能である。細網内皮系(「RES」)または単核食細胞系(「MPS」)としても公知の食作用系は、散在性の系であって、組織の固定されたマクロファージ、肝臓、脾臓、リンパ節、および骨髄を、造血組織の繊維芽細胞様細胞ととともに含む。

【非特許文献17】メーヴァ (Mehvar) 著、「Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents (治療用およびイメージング用薬剤の、標的化および持続化された送達のためのデキストラン)」、J. of Controlled Release、2000年、第69巻、p. 1-25

【非特許文献18】エスナー (Essner) ら著、「Advances in FDG PET Probes in Surgic

10

20

30

40

50

al Oncology (外科腫瘍学における F D G - P E T の進歩)」、Cancer Jour.、2002 年、第 8 巻、p. 100-108

【非特許文献 19】ワールブルグ (Warburg) 著、「On The Origin of Cancer Cells (癌細胞の起源について)」、Science、1956 年 2 月、第 123 巻、第 3191 号、p. 309-314

【非特許文献 20】リベンゾン-セガル (Rivenzon-Segal) ら著、「Glycolysis as a metabolic marker in orthotopic breast cancer, monitored by in vivo ¹³C MRS (インビボの ¹³C MRS によりモニターされた正所性乳癌における代謝マーカーとしての解糖)」、Amer. J. Phys. Endocrinology Metabolism、2002 年、第 283 巻、E623-E630

10

【非特許文献 21】リー (Lee) およびピーダーセン (Pedersen) 著、「Glucose Metabolism in Cancer (癌のグルコース代謝)」、J. of Bio. Chem.、2003 年 10 月、第 278 巻、第 42 号、p. 41047-41058

【非特許文献 22】ゲイテンビー (Gatenby) およびガウリンスキー (Gawlinski) 著、「The glycolysis phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models (発癌および腫瘍浸潤における解糖表現型: 数学的モデルによる洞察)」、Cancer Res.、2003 年 7 月、第 63 巻、第 14 号、p. 3847-54

【非特許文献 23】デガーニ (Degani) 著、「The American Society of Clinical Oncology (米国臨床腫瘍学会)」、Intn'l J. of Cancer、2003 年、11 月、第 107 巻、p. 177-182

20

【非特許文献 24】ワールブルグ (Warburg) 著、「The Prime Cause and Prevention of Cancer (癌の主要原因と予防)」、コンラッド・トリルチ (Konrad Triltsch)、1969 年、p. 6

【非特許文献 25】カッツング (Katzung) 著、「Basic & Clinical Pharmacology (基礎および臨床薬理学)」、マグローヒル社 (McGraw Hill Co. Inc.)、2001 年、p. 715

【0007】

グルコースは、腫瘍細胞の増殖および転移を開始し、促進し、駆動し、かつ増幅する。腫瘍細胞に好まれる嫌気性解糖は、ATP を産生するためには非常に非効率かつ原始的なプロセスであり、膨大な量のグルコースを必要とする。したがって、科学界は現在、腫瘍細胞からグルコースを奪う方向で研究している。(ヴァン・ダング (Van Dang) ら著、The Proc. of the Nat'l. Acad. of Sci.、1998 年、第 95 巻、p. 1511-1516)。(ペデルセン (Pedersen) 著、「Inhibiting glycolysis and oxidative phosphorylation, 3-BrPA abolishes cell ATP production (解糖および酸化リン酸化の阻害、3-BrPA は細胞の ATP 産生を廃止する)」、Reuters News、2002 年 7 月 18 日)。ヒト骨肉腫および非小細胞肺癌の異種移植モデルに対するインビボのマウス研究は、解糖阻害剤 2-デオキシ-D-グルコースが、アドリアマイシンまたはパクリタキセルとの併用において、有意に低速な腫瘍増殖を生じる結果となることを見出した。(マシエク (Maschek) ら著、「2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo (2-デオキシ-D-グルコースはインビボで、ヒト骨肉腫および非小細胞肺癌におけるアドリアマイシンおよびパクリタキセルの有効性を高める)」、Cancer Res.、2004 年、第 64 巻、第 1 号、p. 31-34)。さらに、糖新生を阻害する抗悪液質薬、硫酸ヒドラジンを用いて、陽性の臨床結果が見出されている。(モス (Moss) 著、「Cancer Therapy (癌療法)」、エキノックス・プレス (Equinox Press)、1992 年、p. 316)。癌細胞のグルコースを奪うことに向けられた多くの食事改善法もまた研究されてきた。(クイリン (Quillin) 著、「Beating Cancer with Nutrition (栄養学で癌に勝つ)」、ニュートリション・タイムズ・プレス (Nutrition Times Press)、1998 年、p. 225)；クイリン (Quillin) 著、「Cancer's Sweet Tooth (癌の甘い物好き)」、ニュートリション・サイエンス・ニュース (Nutrition Science News)、2000 年 4 月)；および

30

40

50

(ハウザー (Hauser) & ハウザー (Hauser) 著、「Cancer-Treating Cancer with Insulin Potentiation Therapy (癌ーインスリン強化療法による癌治療)」、ビューラ・ランド・プレス (Bhulah Land Press)、2001年)。

【非特許文献26】ヴァン・ダング (Van Dang) ら著、The Proc. of the Nat'l. Acad. of Sci., 1998年、第95巻、p. 1511-1516

【非特許文献27】ペデルセン (Pedersen) 著、「Inhibiting glycolysis and oxidative phosphorylation, 3-BrPA abolishes cell ATP production (解糖および酸化リン酸化の阻害、3-BrPAは細胞のATP産生を廃止する)」、Reuters News、2002年7月18日

【非特許文献28】マシェク (Maschek) ら著、「2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo (2-デオキシ-D-グルコースはインビボで、ヒト骨肉腫および非小細胞肺癌におけるアドリマイシンおよびパクリタキセルの有効性を高める)」、Cancer Res., 2004年、第64巻、第1号、p. 31-34 10

【非特許文献29】モス (Moss) 著、「Cancer Therapy (癌療法)」、エキノックス・プレス (Equinox Press)、1992年、p. 316

【非特許文献30】クイリン (Quillin) 著、「Beating Cancer with Nutrition (栄養学で癌に勝つ)」、ニュートリション・タイムズ・プレス (Nutrition Times Press)、1998年、p. 225

【非特許文献31】クイリン (Quillin) 著、「Cancer's Sweet Tooth (癌の甘い物好き)」、ニュートリション・サイエンス・ニュース (Nutrition Science News)、2000年4月 20

【非特許文献32】ハウザー (Hauser) & ハウザー (Hauser) 著、「Cancer-Treating Cancer with Insulin Potentiation Therapy (癌ーインスリン強化療法による癌治療)」、ビューラ・ランド・プレス (Bhulah Land Press)、2001年

【0008】

銅 (Cu) は、必須微量元素であり、細菌から哺乳類にいたる生物体において生命に必要である。銅は、癌、特に充実性腫瘍の増殖の必要条件である血管新生を促進し、かつそれに必須のコファクターである。(ブリュワ (Brewer) 著、「Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology (銅の薬理学および毒性学ハンドブック)」、フマナ・プレス (Humana Press)、2002年、第27章)；(ブレム (Brem) 著、「Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial (血管新生および癌制御：概念から治験まで)」、Cancer Control Jour., 1999年、第6巻、第5号、p. 436-458)。血管新生は一般に成体では必要とされないことから、銅の除去、銅減少療法、または銅を与えないでおくことによる血管新生の阻害が、さらなる腫瘍増殖を阻害するための可能なメカニズムとして探求されてきた。(ブリュワ (Brewer) 上記)；またブリュワ (Brewer) らの米国特許第6,703,050号も参照のこと。銅は血管新生および増殖のための必須のコファクターであることから、多くのタイプの腫瘍は、銅を大いに必要とし、かつ銅を封鎖する。(ブリュワ (Brewer) 著、「Copper Control as an Antiangiogenic Anticancer Therapy: Lessons from Treating Wilson's Disease (抗血管新生抗癌療法としての銅制御：ウィルソン病の治療からの教訓)」、Exp. Bio. and Med., 2001年、第226巻、第7号、p. 665-673)。銅へのこの親和力と、腫瘍の開始、増殖、および転移を促進する銅の作用とのゆえに、科学界は腫瘍細胞に銅を与えないでおく方法および医薬品を開発し続けている。(ブレム (Brem) 上記)；ブリュワ (Brewer) 上記)；(ブリュワ (Brewer) ら著、「Treatment of Metastatic Cancer with Tetrathiomolybdate, an Anticopper, Antiangiogenesis Agent: Phase I Study (抗銅、抗血管新生薬、テトチオモリブデートによる転移性癌の治療：第I相調査)」、Clin. Can. Res., 2000年、第6巻、p. 1-10)；(レッドマン (Redman) 著、「Phase II Trial of Tetrathiomolybdate in Patients with Advanced Kidney Cancer (進行性腎臓癌の患者におけるテトラチオモリブデートの第II相試験)」、Clin. Cancer Res., 20 40 50

03年、第9巻、p. 1666-1672) ; (パン (Pan) ら著、「Copper Deficiency Induced by Tetrathiomolybdate Suppresses Tumor Growth and Angiogenesis (テトラチオモリブデートにより誘導された銅欠乏症は腫瘍増殖および血管形成を抑制する)」、Cancer Res.、2002年、第62巻、p. 4854-4859) ; (テクノス (Teknos) ら著、「Inhibition of the Growth of Squamous Cell Carcinoma by Tetrathiomolybdate-Induced Copper Suppression in a Murine Model (マウスモデルにおけるテトラチオモリブデート誘導性の銅抑制による扁平上皮細胞の増殖阻害)」、Arch. of Otolaryngology : Head And Neck Surgery、Oncolink Cancer News、Reuters、2003年、第129巻、p. 781-785) ; (ヨシジ (Yoshiji) ら著、「The Copper Chelating Agent, trientine, suppress tumor development and angiogenesis in the murine hepatocellular carcinoma cells (銅キレート剤トリエンチンは、マウス肝細胞癌の細胞における腫瘍発育および血管新生を抑制する)」、Int'l J. of Cancer、2001年12月、第94巻、p. 768-773) ; (ヨシジ (Yoshiji) ら著、「The copper chelating agent, Trientine attenuate liver enzymes-altered preneoplastic lesions in rats by angiogenesis suppression (銅キレート剤トリエンチンは、ラットにおいて血管新生の抑制により、肝酵素変異性の前新生物病巣を弱める)」、Oncology Rep.、2003年、第10巻、第5号、p. 1369-73) ; (プレム (Brem) ら著、「Penicillamine and Reduction of Copper for Angiosuppressive Therapy of Adults with Newly Diagnosed Glioblastoma (新規に神経膠芽細胞腫と診断された成体の血管新生抑制療法のためのペニシラミンおよび銅低減)」、H. リー・モフィット・がんセンター&研究所 (H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Inst.)、1999年) ; (サグリパンティ (Sagripanti) およびクレマー (Kraemer) 著、「Site-specific Oxidative DNA Damage at Polyguanosines Produced by Copper Plus Hydrogen Peroxide (銅プラス過酸化水素によって発生されたポリグアノシンにおける部位特異酸化的DNA損傷)」、J. of Biol. Chem.、1989年、第264巻、第3号、p. 1729-1734)。

【特許文献1】米国特許第6,703,050号

【非特許文献33】ブリュワ (Brewer) 著、「Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology (銅の薬理学および毒性学ハンドブック)」、フマナ・プレス (Humana Press)、2002年、第27章

【非特許文献34】プレム (Brem) 著、「Angiogenesis and Cancer Control : From Concept to Therapeutic Trial (血管新生および癌制御：概念から治験まで)」、Cancer Control Jour.、1999年、第6巻、第5号、p. 436-458

【非特許文献35】ブリュワ (Brewer) 著、「Copper Control as an Antiangiogenic Anticancer Therapy : Lessons from Treating Wilson's Disease (抗血管新生抗癌療法としての銅制御：ウィルソン病の治療からの教訓)」、Exp. Bio. and Med.、2001年、第226巻、第7号、p. 665-673

【非特許文献36】ブリュワ (Brewer) ら著、「Treatment of Metastatic Cancer with Tetrathiomolybdate, an Anticopper, Antiangiogenesis Agent : Phase I Study (抗銅、抗血管新生薬、テトラチオモリブデートによる転移性癌の治療：第I相調査)」、Clin. Can. Res.、2000年、第6巻、p. 1-10

【非特許文献37】レッドマン (Redman) 著、「Phase II Trial of Tetrathiomolybdate in Patients with Advanced Kidney Cancer (進行性腎臓癌の患者におけるテトラチオモリブデートの第II相試験)」、Clin. Cancer Res.、2003年、第9巻、p. 1666-1672

【非特許文献38】パン (Pan) ら著、「Copper Deficiency Induced by Tetrathiomolybdate Suppresses Tumor Growth and Angiogenesis (テトラチオモリブデートにより誘導された銅欠乏症は腫瘍増殖および血管形成を抑制する)」、Cancer Res.、2002年、第62巻、p. 4854-4859

【非特許文献39】テクノス (Teknos) ら著、「Inhibition of the Growth of Squamous Cell Carcinoma by Tetrathiomolybdate-Induced Copper Suppression in a Murine Model

10

20

30

40

50

el (マウスモデルにおけるテトラチオモリブデート誘導性の銅抑制による扁平上皮細胞の増殖阻害)」、Arch. of Otolaryngology : Head And Neck Surgery、Oncolink Cancer News、Reuters、2003年、第129巻、p. 781-785

【非特許文献40】ヨシジ (Yoshiji) ら著、「The Copper Chelating Agent, trientine, suppress tumor development and angiogenesis in the murine hepatocellular carcinoma cells (銅キレート剤トリエンチンは、マウス肝細胞癌の細胞における腫瘍発育および血管新生を抑制する)」、Int'l J. of Cancer、2001年12月、第94巻、p. 768-773

【非特許文献41】ヨシジ (Yoshiji) ら著、「The copper chelating agent, Trientine attenuate liver enzymes-altered preneoplastic lesions in rats by angiogenesis suppression (銅キレート剤トリエンチンは、ラットにおいて血管新生の抑制により、肝酵素変異性の前新生物病巣を弱める)」、Oncology Rep.、2003年、第10巻、第5号、p. 1369-73

【非特許文献42】プレム (Brem) ら著、「Penicillamine and Reduction of Copper for Angiosuppressive Therapy of Adults with Newly Diagnosed Glioblastoma (新規に神経膠芽細胞腫と診断された成体の血管新生抑制療法のためのペニシラミンおよび銅低減)」、H. リー・モフィット・がんセンター&研究所 (H. Lee Moffit Cancer Center & Research Inst.)、1999年

【非特許文献43】サグリパンティ (Sagripanti) およびクレマー (Kraemer) 著、「Site-specific Oxidative DNA Damage at Polyguanosines Produced by Copper Plus Hydrogen Peroxide (銅プラス過酸化水素によって発生されたポリグアノシンにおける部位特異酸化的DNA損傷)」、J. of Biol. Chem.、1989年、第264巻、第3号、p. 1729-1734

【0009】

銅はまた、DNAを損傷するといった方法で癌増殖を促進することもある。(サグリパンティ (Sagripanti)、上記1999年)。細胞における銅の破壊的な活性は、DNAへ結合すること、還元剤および過酸化水素の存在下にDNAを切断すること、細胞機能の非特異的破壊、およびハーバー・ワイス (Harber-Weiss) 反応を通したヒドロキシルフリーラジカルの発生を含む。(ティオフアニデス (Theophanides) ら著、「Copper and Carcinogenesis (銅と発癌)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology)、2002年、第42巻、p. 57-64)。銅はまた、反応性酸素種 (「ROS」) の形成においても役割を果たす。(サグリパンティ (Sagripanti) 著、「DNA Damage Mediated by Metal Ions with Special Reference to Copper and Iron (特に銅および鉄に関連した、金属イオンにより仲介されるDNA損傷)」、Metal Ions Biol. Syst.、1999年、第36巻、p. 179-209)。

【非特許文献44】ティオフアニデス (Theophanides) ら著、「Copper and Carcinogenesis (銅と発癌)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology)、2002年、第42巻、p. 57-64

【非特許文献45】サグリパンティ (Sagripanti) 著、「DNA Damage Mediated by Metal Ions with Special Reference to Copper and Iron (特に銅および鉄に関連した、金属イオンにより仲介されるDNA損傷)」、Metal Ions Biol. Syst.、1999年、第36巻、p. 179-209

【0010】

銅の使用はまた、癌の治療に関して、多くの米国特許において同様に開示されてきた：米国特許第4,952,607号は、哺乳類細胞において、スーパーオキシドジスムターゼ様の活性を示す銅錯体を開示している；米国特許第5,124,351号は、ニトリロ三酢酸の銅キレートか、またはビスチオセミカルバザンの銅キレートの使用を開示している；米国特許第5,632,982号は、標的細胞に対する使用に関して、表面膜タンパク質受容体インターナライズ薬、特にTNFと一緒に、銅キレートの使用を開示している；また米国特許第6,706,759号は、ジチオカルバメート誘導体および銅の使用

10

20

30

40

50

を開示している。

【特許文献2】米国特許第4,952,607号

【特許文献3】米国特許第5,124,351号

【特許文献4】米国特許第5,632,982号

【特許文献5】米国特許第6,706,759号

【0011】

癌細胞と正常細胞との間に、鉄の必要量に関して量的な差異があることもまた公知であるが、その理由は、増強された鉄の獲得が、腫瘍細胞の増殖および転移を開始し、促進し、かつ増幅するからである。鉄は、酸素輸送からDNA合成および電子伝達までの範囲にわたる数多くの生物学的プロセスにとり必須の遷移金属である。鉄はまた、DNA損傷性の反応性酸素種の生成と、宿主細胞の防御の抑制とを含む、発癌機構にも関与している。

(デソイズ (Desoize) 編、「Cancer in Metals and Metal Compounds : Part I - Carcinogenesis (金属および金属化合物における癌：パートIー発癌)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology、2002年、第42巻、p. 1-3)；(ガラリス (Galaris) ら著、「The Role of Oxidative Stress in Mechanisms of Metal-induced Carcinogenesis (金属誘導性発癌の機構における酸化ストレスの役割)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology、2002年、第42巻、p. 93-103)；(ワインバーグ (Weinberg) 著、「Cancer and Iron : a Dangerous Mix (癌と鉄：危険な配合物)」、Iron Disorders Insight、1999年、第2巻、第2号、p. 11)；(ワインバーグ (Weinberg) 著、「The Development of Awareness of the Carcinogenic Hazard of Inhaled Iron (吸入された鉄の発癌性災害という意識の発展)」、Oncology Res.、1999年、第11巻、p. 109-113)；(ワインバーグ (Weinberg) 著、「Iron Therapy and Cancer (鉄療法と癌)」、Kidney Int'l、1999年、第55巻、第60号、p. S131-134)；(ワインバーグ (Weinberg) 著、「The Role of Iron in Cancer (癌における鉄の役割)」、Eur. J. Cancer Prevention、1996年、第5巻、p. 19-36)；(ワインバーグ (Weinberg) 著、「Iron in Neoplastic Disease (新生物疾患における鉄)」、Nutrition Cancer、1993年、第4巻、第3号、p. 223-33)；(スティーブンス (Stevens) ら著、「Body Iron Stores and the Risk of Cancer (身体の鉄貯蔵と癌のリスク)」、N. Eng. J. of Med.、1988年、第319巻、第16号、p. 1047-1052)。

【非特許文献46】デソイズ (Desoize) 編、「Cancer in Metals and Metal Compounds : Part I - Carcinogenesis (金属および金属化合物における癌：パートIー発癌)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology、2002年、第42巻、p. 1-3

【非特許文献47】ガラリス (Galaris) ら著、「The Role of Oxidative Stress in Mechanisms of Metal-induced Carcinogenesis (金属誘導性発癌の機構における酸化ストレスの役割)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology、2002年、第42巻、p. 93-103

【非特許文献48】ワインバーグ (Weinberg) 著、「Cancer and Iron : a Dangerous Mix (癌と鉄：危険な配合物)」、Iron Disorders Insight、1999年、第2巻、第2号、p. 11

【非特許文献49】ワインバーグ (Weinberg) 著、「The Development of Awareness of the Carcinogenic Hazard of Inhaled Iron (吸入された鉄の発癌性災害という意識の発展)」、Oncology Res.、1999年、第11巻、p. 109-113

【非特許文献50】ワインバーグ (Weinberg) 著、「Iron Therapy and Cancer (鉄療法と癌)」、Kidney Int'l、1999年、第55巻、第60号、p. S131-134

【非特許文献51】ワインバーグ (Weinberg) 著、「The Role of Iron in Cancer (癌における鉄の役割)」、Eur. J. Cancer Prevention、1996年、第5巻、p. 19-36

【非特許文献52】ワインバーグ (Weinberg) 著、「Iron in Neoplastic Disease (新生物疾患における鉄)」、Nutrition Cancer、1993年、第4巻、第3号、p. 223-33

【非特許文献53】スティーブンス (Stevens) ら著、「Body Iron Stores and the Risk of Cancer (身体の鉄貯蔵と癌のリスク)」、N. Eng. J. of Med.、1988年、第319巻、第16号、p. 1047-1052

【0012】

金属の抜取りのための細胞内鉄キレート剤、鉄の取込みを妨害するためのガリウム塩の使用、および鉄の取込みを阻止するための、腫瘍上のトランスフェリン受容体に対するモノクローナル抗体の利用を含めた異なるアプローチを用いて、数多くの医薬品が腫瘍細胞に対する鉄の供給を調節および制限するべく開発されてきた。たとえば、その全てが本文中に含まれている米国特許第6,589,96号は、癌細胞から鉄を奪うための、癌に対する化学療法薬としての鉄キレート化剤の使用を教示している。また、(腫瘍細胞が高レベルのトランスフェリン受容体1 (TFR1) を発現し、かつトランスフェリンから鉄 (Fe) を速い速度でインターナライズすることを開示している、クウォク (Kwok) ら著、「The Iron Metabolism of Neoplastic Cells: alterations that facilitate proliferation? (新生物細胞の鉄代謝: 増殖を促進する変更?)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology、2002年、第42巻、p. 65-78); (デソイズ (Desoize, B) 編、「Cancer and Metals and Metal Compounds, Part II - Cancer Treatment (癌と金属および金属化合物、パートII - 癌治療)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology、2002年、第42巻、p. 213-215); (コルリー (Collery) ら著、「Gallium in Cancer Treatment (癌治療におけるガリウム)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology、2002年、第42巻、p. 283-296); (ワインバーグ (Weinberg) 著、「Development of Clinical Methods of Iron Deprivation for Suppression of Neoplastic and Infectious Diseases (新生物性および感染性疾患の抑制のための鉄剥脱の臨床方法の開発)」、Cancer Investigation、1999年、第17巻、第7号、p. 507-513); (ワインバーグ (Weinberg) 著、「Human Lactoferrin: a Novel Therapeutic with Broad Spectrum Potential (ヒトのラクトフェリン: ボードスペクトルポテンシャルをもつ新規な治療薬)」、Pharmacy & Pharmacology、2001年10月、53); (リチャードソン (Richardson) 著、「Iron Chelators as therapeutic agents for the Treatment of Cancer (癌治療のための治療薬としての鉄キレート化剤)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology、2002年、第42巻、p. 267-281) も参照のこと。

【特許文献6】米国特許第6,589,96号

【非特許文献54】クウォク (Kwok) ら著、「The Iron Metabolism of Neoplastic Cells: alterations that facilitate proliferation? (新生物細胞の鉄代謝: 増殖を促進する変更?)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology、2002年、第42巻、p. 65-78

【非特許文献55】デソイズ (Desoize, B) 編、「Cancer and Metals and Metal Compounds, Part II - Cancer Treatment (癌と金属および金属化合物、パートII - 癌治療)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology、2002年、第42巻、p. 213-215

【非特許文献56】コルリー (Collery) ら著、「Gallium in Cancer Treatment (癌治療におけるガリウム)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology、2002年、第42巻、p. 283-296

【非特許文献57】ワインバーグ (Weinberg) 著、「Development of Clinical Methods of Iron Deprivation for Suppression of Neoplastic and Infectious Diseases (新生物性および感染性疾患の抑制のための鉄剥脱の臨床方法の開発)」、Cancer Investigation、1999年、第17巻、第7号、p. 507-513

10

20

30

40

50

【非特許文献58】ワインバーグ (Weinberg) 著、「Human Lactoferrin : a Novel Therapeutic with Broad Spectrum Potential (ヒトのラクトフェリン：ブロードスペクトルポテンシャルをもつ新規な治療薬)」、Pharmacy & Pharmacology、2001年10月、53

【非特許文献59】リチャードソン (Richardson) 著、「Iron Chelators as therapeutic agents for the Treatment of Cancer (癌治療のための治療薬としての鉄キレート化剤)」、Critical Reviews In Oncology/Hematology、2002年、第42巻、p. 267-281

【0013】

鉄デキストラン複合体が血液系へ投与されると、RES系のクリアランス率を上回るか下回る用量では、鉄の細胞毒性はデキストランシース (鞘) またはシェル (殻) によって阻止される。(ローレンス (Lawrence) 著、「Development and Comparison of Iron Dextran Products (鉄デキストラン製品の開発および比較)」、J. of Pharm. Sci. & Tech., 1998年、第52巻、第5号、p. 190-197) ; (コックス (Cox) 著、「Structure of an iron-dextran complex (鉄-デキストラン複合体の構造)」、J. of Pharma & Pharmac, 1972年、第24巻、p. 513-517) ; (ヘンダーソン&ヒルマン (Henderson & Hillman) 著、「Characteristics of Iron Dextran Utilization in Man (ヒトにおける鉄デキストラン利用の特徴)」、Blood、1969年、第34巻、第3号、p. 357-375) ; 米国特許第5, 624, 668号。鉄デキストランは血漿中に留まることが可能であって、何週間も体中を不活発に往来し、その間に食作用系および癌細胞により血漿から除去される。

【特許文献7】米国特許第5, 624, 668号

【非特許文献60】ローレンス (Lawrence) 著、「Development and Comparison of Iron Dextran Products (鉄デキストラン製品の開発および比較)」、J. of Pharm. Sci. & Tech., 1998年、第52巻、第5号、p. 190-197

【非特許文献61】コックス (Cox) 著、「Structure of an iron-dextran complex (鉄-デキストラン複合体の構造)」、J. of Pharma & Pharmac, 1972年、第24巻、p. 513-517

【非特許文献62】ヘンダーソン&ヒルマン (Henderson & Hillman) 著、「Characteristics of Iron Dextran Utilization in Man (ヒトにおける鉄デキストラン利用の特徴)」、Blood、1969年、第34巻、第3号、p. 357-375

【0014】

銅および鉄は、基本的な代謝プロセスにおいて酸化還元反応を触媒する酵素のコファクターとしてのその機能の故に、全ての生物体にとり必須の微量元素である。(マッサロ (Massaro) 編、「Handbook of Copper Pharmacology and Toxicity (銅の薬理学および毒性学ハンドブック)」、フマナ・プレス (Humana Press)、2002年、第30章、p. 481)。研究は、鉄のみの化合物を用いて検出される利用に比較して、有意に増加した鉄の利用を生じる結果となる、鉄と銅との間の相乗的相互作用を示してきた。(マッサロ (Massaro)、第30章、上記)。血漿タンパク質トランスフェリンに対し鉄を結合するためには、Fe²⁺からFe³⁺への酸化が必要である。この酸化は、マルチ銅フェロキシダーゼ、ヘファエスチン、またはセルロプラスミンによって仲介されてよい。ヘファエスチンは、トランスフェリン上への負荷のための血漿内への移出に先立ち、Fe²⁺をFe³⁺へ酸化するべく、腸細胞の表面において、フェロポーチン1と一緒に作用してもよい。セルロプラスミンのさらなる重要な役割は、セルロプラスミンが合成される肝臓のような組織からの、鉄の動員である。セルロプラスミンは6個の銅原子を含有することが可能であり、肝臓から分泌され、組織への送達のための全血清銅の少なくとも95%を運ぶことが可能である。加えて、セルロプラスミンはそのフェロキシダーゼ活性によって、肝臓からの、また組織への送達のための、鉄の放出を仲介する。このように、銅および鉄の双方が造血系、特に赤血球形成を支援している。各々は、赤血球の形成に必須である。

【非特許文献63】マッサロ (Massaro) 編、「Handbook of Copper Pharmacology and T

otoxicity (銅の薬理学および毒性学ハンドブック)」、フマナ・プレス (Humana Press)、2002年、第30章、p. 481

【0015】

米国癌学会 (The American Cancer Society) レポート、「Cancer Facts and Figures 2003 (癌データ、2003年)」は、「癌は、異常細胞の制御されない増殖および広がりによって特徴づけられる一群の疾患である。……2003年には、米国で約1,334,100の新たな癌症例が診断されると予想され、556,500の癌死亡が2003年に予想されている。」と開示している。本発明は、これに制限されないが、口腔および咽頭、消化系、呼吸系、骨および関節、軟組織、皮膚、乳房、生殖系、泌尿系、眼および眼窩、脳および他の神経系、内分泌系、リンパ腫、多発性骨髄腫、白血病、および他の不特定の原発部位といった、上記「Cancer Facts and Figures 2003 (癌データ、2003年)」、第4頁に開示された癌の治療を包含する。本発明による治療はまた、基底および扁平上皮細胞皮膚癌、およびインシトゥの癌腫、過増殖性疾患、脊髄異形成障害、および、骨髄または稀には他の組織における形質細胞の増殖によって特徴づけられる、形質細胞ディスクラシアも包含する。これらの臨床上の異常性についての記載は、マークマン医師 (Markman M.D.) により、「Basic Cancer Medicine (基礎癌内科学)」、W. B. サンダース社 (W. B. Saunders Co.)、1997年、第103頁に開示されている。

10

【非特許文献64】マークマン医師 (Markman M.D.) により、「Basic Cancer Medicine (基礎癌内科学)」、W. B. サンダース社 (W. B. Saunders Co.)、1997年、第103頁

20

【0016】

最小で細胞死を果たし、癌細胞の複製を防止し、かつ、古典的で数多くの致命的な化学療法の副作用を回避するために、身体の全ての細胞に栄養を与える生体適合性の材料を用いる有効な化学療法薬を開発することは有利であろう。かかる治療薬は、多くの医薬品によって引き起される、組織抵抗性および特異性の欠如という問題を回避することができ、それにより、以前には管理不能であった多くの癌を、患者を衰弱させるかまたは死亡させることなく、破壊するかまたは不能にする。

【0017】

ウイルス性疾患に関しては、肝炎が最も重要な実例である。肝炎は、一般に、ウイルス感染によって引き起され、多くの異なる系統を含むであろう。C型肝炎は最も一般的な系統であり、血液を介した最大の感染症であり、米国では慢性肝疾患の最も重要な原因の一つである。C型肝炎ウイルス (「HCV」) 病は、肝臓の炎症を引き起す疾患である。HCVは、フラビウイルス科およびヘパシウイルス属の単鎖RNAウイルスであり、少なくとも6つの遺伝子型と、50を超えるHCVのサブタイプとを有する。C型肝炎は、米国における肝臓移植の、ならびに急性ウイルス性肝炎の15パーセント、慢性肝炎の60～70%、および、肝硬変、末期肝臓疾患、および、肝細胞癌を含めた肝臓ウイルス性疾患の50%までの主な原因である。米国疾病管理予防センター (U.S. Center for Disease Control and Prevention) は、米国人口の約1.8パーセントかまたは390万人のアメリカ人がHCVに感染されており、これらのうちのほとんどの症例が診断未確定であると報告している。世界的には、世界保健機構 (World Health Organization) は、世界の人口の約3パーセントである1億7千万人が、慢性的にHCVに感染されており、さらに3～4百万人が毎年新たに感染している。

30

40

【0018】

C型肝炎感染の経過は、HIV感染に関連した免疫不全により加速される可能性があり、それにより肝硬変の発生率が増加する。B型肝炎ウイルス (「HBV」) との同時感染もまた、強められた慢性C型肝炎の重篤さ、および肝硬変への加速された進行と関連づけられてきた。さらに、HBVの同時感染は、肝細胞癌の発症のリスクを増大するように思われる。(たとえば、同時感染情報に関しては、イーメディスン・コム・インク (eMedicine, Inc) を参照のこと)。

【0019】

50

A型肝炎は、ピコルナウイルス科、ヘパトウイルス属の、非エンベロープ、プラス鎖RNAウイルスである、A型肝炎ウイルス（「HAV」）によって引き起される。HAVは、肝細胞中で複製しながら肝臓の機能を妨害する。病理学的損傷の結果として、肝臓は炎症性になる。HAVは感染性肝炎の主原因であることが見出されている。

【0020】

B型肝炎は、42nmの部分的に二重鎖の環状DNAゲノムを含有するエンベロープのあるウイルスであり、かつヘパドナウイルス科に分類される、B型肝炎ウイルス（「HBV」）によって引き起される。B型肝炎は、重篤で一般的な肝臓の感染性疾患であり、世界中で数百万の人々を冒している。HBVは血清肝炎の主要な原因であると信じられている。肝炎デルタウイルス（「HDV」）は、それ自身のビリオンコートとしてB型肝炎表面抗原（HBsAg）を使用したことから、伝播に関してHBVに依存することが示された。この抗原は、その細胞内局在性において、B型肝炎コア抗原（「HbcAg」）に類似している。その存在は常にHBV感染と関連していたが、HbcAgと共存することはめったになかった。HDV感染は、HBVとの同時感染としてか、または慢性HBV感染をもつ人の重感染として獲得されることが可能である。HBV-HDV同時感染をもつ人は、HBVのみに感染された人に比較して、より重篤な急性疾患および、より高い劇症肝炎のリスク（2～20%）を有することがある。しかしながら、慢性HBV感染は、HBV-HDV同時感染をもつ人ではさほど頻繁に起こらないように見える。HDVの重感染を獲得する慢性HBVの保因者は、通常、慢性HDV感染を発症する。HDVの重感染をもつ慢性HBV保因者についての長期間の研究では、慢性HBV感染のみの患者の15%～30%に比較して、70%～80%が肝硬変のある慢性肝疾患の証拠を現していた。

【0021】

E型肝炎は、非エンベロープ、球形、プラス鎖RNAウイルスである、E型肝炎ウイルス（「HEV」）によって引き起される。いくつかの異なる株が単離され、部分的にキャラクタライズされ、分子クローニングされた（1990～92）。当初はカリシウイルス科に分類されたが、それらは現在分類不能である。HEVは、15～40才の成人において、一過性の急性ウイルス性肝炎を引き起す。症候性HEV感染は、小児ではまれである。小児ではHEV感染は頻繁ではあるが、ほとんどが無症候性および無黄疸性である。

【0022】

A型肝炎およびB型肝炎を予防するためのワクチンが存在する。欠損ウイルスによって引き起されたD型肝炎は、HBVなしでは無害である。A型肝炎およびE型肝炎の双方は、一過性であり、ほとんどの症例において、一定期間の後に終わる。C型肝炎は、しかしながら、欠損性でも一過性でもなく、感染を予防するためのワクチンは現在存在していない。

【0023】

典型的な徴候と、急性ウイルス性肝炎の症状とをもつ患者の中には、これらのタイプのウイルス性肝炎のいずれの血清マーカーももたないものがあり、非ABCDE肝炎を有するとして分類される。最近、非ABCDE肝炎をもつ患者において新たなウイルスが発見された。

【0024】

慢性肝炎、特にC型肝炎をもつ人々のための現在の治療オプションは、通常、ライフスタイルの変更と厳密な薬物レジメンを組合せている。肝臓の代謝性の役割の故に、疾病の進行の速度を左右する上で、食事制限は重要な役割を最も果たしやすい。C型肝炎に感染された人の病的な肝臓は、ナトリウム、脂肪、および特に、投薬の有効性を低下させるアルコールを含めた、いくつかの生成物の過剰によって特に影響され得る。多くの通常の治療の失敗と、薬物レジメンに関連した副作用の重さとの故に、C型肝炎に感染された人の中には、本草学および植物学、リラクゼーション、および精神治療の使用を包含し得る別の治療法へ転向する人もいる。

【0025】

インターフェロンは、C型肝炎の通常の治療法の主力である。インターフェロンは天

10

20

30

40

50

然に生じる糖タンパク質であり、ウイルス感染に応答して細胞によって分泌される。インターフェロンは、細胞表面の特定の受容体へ結合し、タンパク質-タンパク質相互作用の複雑なカスケードにより細胞内シグナリングを開始し、遺伝子転写の迅速な活性化をもたらす。インターフェロンに刺激された遺伝子は、感染細胞におけるウイルス複製の阻害、細胞増殖の阻害、および免疫制御を含めた多くの生物学的作用を調整する。インターフェロンアルファの種々の組換え型、およびインターフェロンアルファ-2b、および天然には生じない組換え型のI型インターフェロンが、ウイルス性C型肝炎を治療するべく承認されている。しかしながらインターフェロンは、イライラ、抑うつ、不安、および自殺行為、白血球および血小板の数の減少、心臓の問題、全身性エリテマトーデスを含めた、結果として自己免疫疾患を生じる可能性がある体器官の問題といった、身体的および心理的副作用の双方を引き起こすことが公知である。インフルエンザ様の副作用もまた一般的である。インターフェロンは、免疫系による破壊からの保護として、また体内でより長い滞留時間を与えることから、ポリエチレングリコール（「PEG」）をリジンへの安定なアミド結合を介してインターフェロン分子へ結合することにより、しばしばPEG化される。リバビリンは、肝炎の治療のためにインターフェロンとしばしば併用され、ウイルスの増殖の防止において何らかの効果をもつと信じられている。

10

【0026】

感染症は、毎年1000万を超える人を殺しており、その90パーセントをこえる人は発展途上世界に局在している。マラリアおよび他の、ベクター媒介性疾患は、世界中で約10億人に感染している。こうした数値は現在、マラリアが薬剤耐性株の寄生体の出現、寄生体を媒介する殺虫剤耐性である蚊の出現、環境変化、および人口増加といった要因に基づく再燃を受けていることから、増加することが予想されている。

20

【0027】

ほとんどの抗感染マラリア薬は、ヒト宿主とは有意に異なる原虫代謝という局面を妨害する。マラリア原虫のプラスモディウム (*Plasmodium*) 種が、ヒトに感染する。熱帯熱マラリア (*P. falciparum*) 寄生体は、ヒトにおける最も致死性の形状のマラリアの原因であり、かつ最も一般的な種である。三日熱マラリア (*P. vivax*)、卵形マラリア (*P. ovale*)、および四日熱マラリア (*P. malariae*) を含めた他の種は、毒性の低いタイプの疾病を引き起こすことがある。蚊は、スポロゾイトとしても公知の寄生体を、哺乳類の皮下組織内へ、または時には直接血流中へ注入する。寄生性スポロゾイトは次に肝臓まで移動し、そこで侵襲の前にいくつかの肝細胞を通過すると信じられている。その後寄生体の発生が始まる。スポロゾイト上のコリセプターが侵襲を仲介する。コリセプター、トロンプスポンジンは、あるドメインを介し、洞様毛細血管内皮およびクッパー細胞への付着成長において、肝細胞上のヘパリン硫酸プロテオグリカンに特異的に結合する。各スポロゾイトは、肝細胞の内側で一度に数万のメロゾイトに発育し、肝臓からの放出に際し、それらは各々赤血球 (erythrocyte) (または赤血球 (red blood cell 「RBC」)) に侵入することが可能である。プラスモディウムは、そのライフサイクルの相の間中、宿主赤血球に感染しており、そのことがマラリアの症状を誘発する。寄生体は、侵入、増殖、および感染された赤血球からの放出からなる48時間のサイクルを有する。このサイクルの間に寄生体は、宿主赤血球細胞膜の透過性に大きな増加を引き起こし、寄生体が宿主の血流から栄養物を獲得し、老廃物を放出できるようにする。マラリア寄生体は、宿主細胞中のヘモグロビンの80%までを分解させる。この分解はリソソーム食胞中で起こり、少なくともアスパラギン酸プロテアーゼ (プラスメプシン)、システインプロテアーゼ・ファルシパイニン-2、および、メタロペプチダーゼを含めた多くの付加的なペプチダーゼを含む。その結果は、大量のFe(II)ヘムの放出を含み、それはFe(III)ヘマチンへ迅速に酸化され、凝集したヘムダイマーからなる構造格子を含んでなるヘモゾインと呼ばれる不活性色素として隔離される。

30

40

【0028】

寄生体のその宿主内での生存には、いくつかの代謝上の適応が必要であり、そのことがそれを化学療法的攻撃に影響されやすくしており、いくつかの薬物標的が、異質のオルガ

50

ネラ構造の機能に対して標的化されることが可能である。キノリン、芳香族アルコール抗マラリア薬、および、アルテミシニンおよび他の抗マラリア過酸化物は、食胞内で濃縮され、ヘムとの相互作用によってそれらの活性を及ぼすと信じられている。キノリンは、その芳香族性の平面構造の互い違いのスタッキングを介してヘムへ結合することにより、ヘモゾインの有効な形成を混乱または妨害し、その結果としてヘム介在性の毒性を寄生体に対して生じ、脂質の過酸化を誘導することがあると信じられている。アルテミシニンは、最もありそうなことにはFe(II)ヘムとの相互作用を介して、そのペルオキシド結合の酸化還元的切断を食胞内で受けることが可能である。これらの相互作用は、寄生体に対し致命的なフリーラジカル誘導性の損傷を生成すると信じられている。しかしながら、厳密な生成の機構および寄生体死の機構は分かっていない。

10

【0029】

しかしながら、耐性は、多くの一般に流通されている薬物、特に安価なタイプを発生している。さらに、実際問題として、普通に市販されている安価な薬物に対し広く行渡った耐性をすでに有しているかもしれない国では、大多数の抗マラリア感染薬を用いてマラリア患者を治療するコストは、ほとんどの地域社会または家族にとり手頃ではないといっ

【0030】

た。抗マラリア治療を得るために生体適合性の材料を用いており、原虫を殺すと同時に、赤血球、白血球、血小板の産生を支援し、広範にわたる鉄欠乏症および貧血症に対処し、炭水化物を供給し、かつ、身体にとって天然である成体材料から構成され、全ての正常細胞を養う、有効な薬剤を開発することは有利であろう。

20

【0031】

一般には「エボラ」と呼ばれるエボラ出血熱は、ヒトおよび非ヒト霊長類に感染する最も致死的なウイルス性疾患の一つである。エボラウイルスによって引き起されるこの感染症は、1976年に初めてそれが発見されたザイールの川にちなんで名づけられた。その発見以来、様々な株のウイルスが50～90パーセントの死亡率で流行を引き起してきた。

【0032】

エボラウイルスは、フィロウイルス科のマイナス鎖RNAウイルスの一員であり、関連性はあるが、より致死性の低い出血性疾患、マールブルグウイルスに類似している。粒子は多形性であるが、基本的な構造は長く糸状であり、本質的には杆状であって、ウイルスはしばしば「U」字型を呈する。粒子は長さ14,000nmまでが可能であり、直径平均は80nmである。エボラウイルスは糖タンパク質に包埋された外側の脂質膜と、ウイルスRNAを取囲む内側のウイルスカプシドとからなる。ウイルスゲノムは、一本鎖マイナス鎖RNAからなり、それ自身では非感染性であり、ポリアデニル化されておらず、直線的な遺伝子配列をもつ。全ビリオン、すなわちタンパク質シェルによって取囲まれたRNAからなる完全なウイルス粒子が、ウイルスの感染性の形状を構成する。たとえば、米国疾病管理センター(United States Center for Disease Control) (「CDC」)のウェブサイトを参照。

30

【0033】

ウイルスは未知の機構によって細胞に侵入し、感染された細胞の細胞質内で、ウイルスはそのRNAを転写し複製する。感染が進行するにつれて、感染された細胞の細胞質は「顕著な封入体」を生じ、それは高度に構造化されるようになることが可能な、ウイルスヌクレオカプシドを含有する。ウイルスは次に集合し、宿主細胞から出芽し、感染された細胞の外膜からそのリポタンパク質コートを得る。

40

【0034】

エボラの4つの異なる株が存在することが公知であり、それらのうち3つがヒトにおいて疾病を引き起こす。それらの大発生の場所にちなんで、それらはエボラ・ザイール(Ebola-Zaire) (致死率90%)、エボラ・スーダン(Ebola-Sudan) (致死率50%)、およびエボラ・アイボリーコースト(Ebola-Ivory Coast) (1症例が報告された。患者は

50

生存)。4番目、エボラ・レストン (Ebola-Reston) は、非ヒト霊長類で疾病を引き起こしたが、ヒトにおいてはなかった。エボラ出血熱の確認された症例は、アフリカの数カ国において、ならびに、研究所作業員が針刺し事故の結果として疾病になった英国において報告されている。エボラ・レストンウイルスは、米国および伊国で、研究施設へ輸入されたサルにおいて重篤な疾病および死を引き起こした。これらの大発生の際に、数名の研究員がウイルスに感染していったが、発病はしなかった。エボラは、典型的には散発性の大発生において出現し、通常は、注射針の不適切な殺菌を介したヘルスケア・セッティングの中で広がる。散発的な、隔離された症例はよく起きているが (エボラ・アイボリーコーストのように)、未承認および未報告になることがある。エボラウイルスの天然の保有者は、分からないままである。

10

【0035】

フィロウィルスの病因論についてはほとんど知られていない。しかしながら、エボラがリンパ組織の機能に重要な細胞を攻撃することは公知である。ウイルスは、皮膚下の疎性結合組織の中の、線維芽細胞様細胞 (「FRC」) において、またリンパ節中のFRC導管において検出可能である。このことは、エボラが迅速に血液中に入ることを可能にし、かつ高内皮細胞静脈におけるリンパ球の帰巢の破壊をもたらす。フィロウィルスについてのスタンフォード大学 (Stanford University) ウェブサイトを参照のこと。出血(hemorrhagic)熱の特質から、感染に対する宿主の免疫応答についてはほとんど分かっていない。産生された抗体は、主としてウイルスの表面糖タンパク質を攻撃する。死亡する患者は、通常、死ぬ時点ではウイルスに対する有意な免疫応答を発達させていなかったことが知られている。たとえば、米国疾病管理センター (United States Center for Disease Control) のウェブサイトを参照。抗エボラ抗体は、モルモットにおいて検出されているが、ヒトに対するその伝達の証拠はない。カナダ研究所安全局 (Canadian Office of Laboratory Safety) ウェブサイトを参照のこと。

20

【0036】

エボラを、わずか数日感染していただきの個体において診断することは困難であるが、その理由は、目の充血および皮膚発疹といった初期症状が、このウイルスに非特異的であって、はるかに頻繁に発生する疾病の他の患者において見られることからである。抗原捕捉酵素結合免疫吸着法 (ELISA) 試験、IgM ELISA、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、およびウイルス単離は、症状開始数日以内のエボラ出血熱 (HF) の症例を診断するために使用可能である。疾病の経過の後期か、または回復後に試験された人は、IgMおよびIgG抗体について試験されることが可能である。この疾病はまた、ウイルス単離、免疫組織化学試験、またはPCRを用いることにより、死亡した患者において遡及的に診断されることも可能である。

30

【0037】

エボラの既知の治療法はどれもこれまで成功していない。現在の治療法は、腎機能および電解質バランスを維持すること；および、出血およびショックの抑制に努めることに向けられている；回復期血清の輸液もまた有益であるといつてよい。免疫系を増強するインターフェロン、および抗ウイルス薬リババリン (ribavarin) を含めた標準的な抗ウイルス療法は、エボラウイルスに対して有効であることが証明されていない。カナダ研究所安全局 (Canadian Office of Laboratory Safety) ウェブサイトを参照のこと。患者がより長く生き続けられるほど、より多くの時間が天然の免疫応答を発達させるために与えられることから、回復のチャンスは大きくなる。今日まで、ヒトに使用するために承認されたエボラ用ワクチンはない。

40

【0038】

ワクチン研究センター (Vaccine Research Center) (VRC) の研究者らは、米陸軍感染症医学研究所 (US Army Medical Research Institute for Infectious Diseases) (USAMRIID)、および疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention) (CDC) とともに、非ヒト霊長類において、エボラウイルス感染症のための潜在的に有効なワクチン戦略を開発してきた。2003年、VRCはエボラ感染症を予

50

防するべくデザインされたDNAワクチンの初の人体試験を開始した。もし、エボラウイルスからの3つの遺伝子を含有するこのDNAワクチンがヒトにおいて安全であることが証明されるなら、ワクチンは、保健医療従事者、軍人、および、起こりうるバイオテロリズム攻撃への最初の対応者を保護するための長期間の予防薬の一部として将来的に利用可能となるであろう。

【0039】

天然痘（スモールポックス）は、「人の業績の天頂および天底の双方」を表すと言われている。それは、ひとたび何百万人もの死および損傷を引き起せば、政治およびイデオロギーの境界を超越して一致団結した広範囲の努力を通じて首尾よく撲滅される、唯一の疾病である。こうした努力の故に、この一度に高い死亡率の感染の自然発生した症例は、1977年10月26日以降起きたとの記録はない（最後の自然発生した症例は、ソマリアの病院のワクチン未接種の料理人であった）。天然痘は、1980年、世界保健機構（WHO）により、撲滅されたと公式に宣言された。これにもかかわらず、または、もしかしたらこのことの故に、その撲滅後20年を超えて、天然痘は今一度まさに現実の脅威である。

10

【0040】

公式には、天然痘は研究目的のみのため、疾病管理予防センター（Center for Disease Control and Prevention）、米国ジョージア州アトランタ、および、ロシア国立ウイルス学・バイオテクノロジー研究センター、ロシア連邦ノボシビルスク地域コルツォボ、の2ヶ所に存在する。世界の他の地域における秘密の備蓄の程度は分からないままである。しかしながら、テロリストまたはならず者国家が、これまでに考え出された最も破壊性の可能性のある生物兵器の一つとして、このウイルスを解き放つかもしいないという懸念はある。天然痘は、感染された人の咳からの呼吸器分泌物（空中浮遊飛沫）により、または感染された皮膚病巣との直接的な接触を介して、人から人へまき散らされることから、天然痘は生物兵器としてエアロゾルの形状で散布されることも可能であろう。

20

【0041】

レンガ型によって特徴づけられるポックスウイルスは、光学顕微鏡で見ることのできる最大の動物ウイルスであり、いくつかの細菌よりも大きい。天然痘は、ポックスウイルス（Poxviridae）科、コルドポックスウイルス（Chordopoxvirinae）亜科、オルトポックスウイルス（Orthopoxvirus）属の一員であるバリオライルスによって引き起される。この属の他のメンバーは、牛痘、ラクダ痘、およびサル痘を含む。ビリオンはDNA依存RNAポリメラーゼを含有する；この酵素が必要であるのは、ウイルスが細胞質中で複製しかつ、核内に局在する細胞RNAポリメラーゼにアクセスすることができないことからである。ポックスウイルスは、核を必要とせずに細胞の細胞質中で複製可能であることが知られている唯一のウイルスである。

30

【0042】

天然痘（variola major）および軽症型天然痘（variola minor）という2つの主要な形状の天然痘が存在する。似たような病変を示しながら、より一般的ではない軽症型天然痘では、この疾病は非常に穏やかな経過をとり、約1パーセントの症例死亡率を有する。比較して、天然痘は全症例の約30パーセントが致死性である。天然痘にはまた、出血性および悪性という2つの稀な形状がある。常に致死性の形状である前者においては、発疹は粘膜および皮膚内への出血を伴う。悪性天然痘は、膿疱期まで発達せず、柔らかく扁平のまま残っている病巣によって特徴づけられる。それはほとんどいつも致死性である。

40

【0043】

ウイルスの侵入は通常、気道および局所リンパ節を通して達成され、それに続きウイルスは血液の中に入る（第一次ウイルス血症）。細胞への侵入および脱外被の後、ビリオンのDNA依存RNAポリメラーゼが初期mRNAを合成し、それは初期の非構造タンパク質一主として、ウイルス複製における次の段階に必要な酵素へ翻訳される。ウイルスDNAは、典型的な半保存様式で複製され、その後後期の構造タンパク質が合成され、それが子孫ビリオンを形成することとなる。ビリオンは集められ、それらが細胞から放出され

50

る際、細胞膜から出芽することによってそれらのエンベロープを獲得する。内部臓器は感染される。次いでウイルスは血液中に再び入り（第二次ウイルス血症）、皮膚へ広がる。こうした事象は、患者がまだ元気に見える潜伏期間の間に起こる。天然痘の潜伏期間は、7から17日までであり、最も一般的には12と14日の間である。この期間の間は、ウイルス放出の形跡はない。本人は健康であるように見え、健康を感じており、他者を感染させる可能性はない。

【0044】

既存のワクチンは有効であることが証明されているが、しかし高発生率の有害副作用も有している。このリスクは十分に高く、もし実際の暴露のリスクがないか、またはほとんどないなら、ワクチン接種は認可されない。ワクチン接種された100万人毎に一人が、種痘性湿疹、進行性種痘疹、全身性種痘疹、および種痘後脳炎を含めた副作用で死ぬと推定されている。現在、ウイルスに感染した人のための既知の抗ウイルス治療法はないことから、予防は天然痘に対処するための唯一の有効な方法である。

10

【0045】

天然痘は、根絶前は、ワクチン未接種の人で30%の死亡率を保持していた。研究者は、ワクチン接種された個体が約10年間にわたり免疫性を保持すると推定しているが、その持続時間は完全には評価されていない。米国における一般住民のワクチン接種は、1980年以降は中止されている。

【発明の開示】

【発明を解決するための手段】

20

【0046】

本開示は、哺乳類における、抗癌特性およびその使用法、抗ウイルス特性およびその使用法、抗原虫特性およびその使用法、および、抗細菌特性およびその使用法といった、哺乳類の疾病に使用するための医薬特性を有する組成物に関する。医薬品としての使用のための化学組成物は、生物学的に許容される銅化合物、また鉄のような他の成分を含んでもよく、製薬上許容される担体中で、苦しんでいる細胞へ輸送される。たとえば、化合物は、少なくとも生物学的に許容される銅化合物のコアから形成されてよく、それは、銅化合物コアを取囲むかまたはコートし、かつ、コアの周囲環境との即時の化学的相互作用を防止するシースで被包されてもよい。組成物は、患者への投与のための製薬上許容される担体と組合わされており、単独で、または通常の治療と併用して使用されてよい。

30

【0047】

また、生物学的に許容される銅化合物コアを有する組成物を、該銅化合物コアを被包するシースおよび、製薬上のキャリアとともに患者に対し投与することにより、疾病を治療するための方法も開示される。患者は、疾病のレベルおよび／または存在を測定するべく、定期的にモニターされる。組成物は、モニタリングの結果に基づき、医師により医学的に必要であると決められた間隔で、再投与されてもよい。

【0048】

以下の、開示された態様についての詳細な記述、および添付された図面およびクレームを綿密に調べた後は、当業者には、本発明のこれらおよび他の目的、特徴、および利点が、限定されることなく明らかとなるであろう。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0049】

本開示は、数多くの哺乳類の疾患の治療において使用されてよい組成物に関する。たとえば組成物は、正常細胞と癌細胞との間の化学的変異および要求性を選択的に活用して、哺乳類における癌性細胞の増殖を阻害および／または防止することが可能である。ほとんどの癌治療は焦点が定められておらず、治療にあたって癌性細胞ばかりでなく健康な細胞にも有害に作用するが、その理由は伝統的な治療法における特異性の欠如のためである。開示された組成物のこれらの化学的変異および要求性を利用し、癌細胞を標的にする能力は、治療薬を所望の細胞へ集中させ、哺乳類の健康な細胞に対する影響を制限するようにする。開示された化学組成物は、それ故、副作用の低減された、より低毒性の化学治療薬

50

を提供する。本開示は、癌細胞、細胞増殖性疾患（前癌細胞、および乾癬などといった）、過剰増殖性疾患、脊髄異形成障害、形質細胞ディスクラシア、充実性腫瘍、液性腫瘍、および転移性疾患に対し、グルコース、銅、および鉄化合物を添加して、腫瘍細胞を殺すことおよび／またはそれらの増殖を止めることにより、腫瘍を萎縮させることに関する。与えないでおくこと、制限すること、限定すること、および調整することに関する研究の主題が、回帰的に、腫瘍の開始、促進、および増殖、および癌細胞の転移を阻止することを意図したにもかかわらず、下文の実施例では、組成物は有効な抗癌剤であることが示されている薬剤を用いている。

【0050】

開示された組成物は、抗ウイルス薬としても使用されて、哺乳類に存在しているウイルスを減らすかまたは破壊するべく使用されてよい。かかるウイルスは、とりわけ、肝炎系、たとえば、C型肝炎、A型肝炎、B型肝炎、D型肝炎、およびE型肝炎、ならびに他の感染性ウイルス、ウイルス感染細胞、および、天然痘のようなウイルス性疾患、その系統および、サル痘、牛痘、ラクダ痘のような関連する疾患；ならびに他の感染性ウイルス、ウイルス感染細胞、および、HIV/AIDS、肝炎、およびエボラといったウイルス性疾患を含んでよい。かかるウイルスは、特に、エボラ・ザイル、エボラ・スーダン、およびエボラ・アイボリーコースト、およびエボラ・レストンを含めたエボラウイルス、およびマールブルグ（Marburg）ウイルス、ならびに他の感染性ウイルス、ウイルス感染細胞、および、天然痘、肝炎、およびHIVのようなウイルス性疾患の系統を含む。開示された組成物は、強力な殺ウイルス剤であることが可能であり、特定の理論または機構に束縛されなければ、殺ウイルス作用は、上述のように、ウイルスDNAを破壊しかつウイルスエンベロープを破裂させるべく機能するものと信じられている。開示された組成物はまた、細菌または原虫、細胞構造または細胞壁を有する任意の病原体、および／または、哺乳類における結核のような、一部に細胞内ライフサイクルをもつ任意の病原体といった、細胞内病原体を治療するためにも有効であり、かつそのための薬剤として使用されてよい。

【0051】

本開示はまた、哺乳類におけるベクターおよび微生物-媒介性の疾患を阻害および／または予防することができ、かつ典型的には哺乳類へ投与されることとなる組成物にも関係する。開示された組成物は、ベクターまたは微生物-媒介性の疾患に感染された哺乳類の、寄生性の負荷を低減または除去することが可能であり、それらの疾患は、たとえば、原虫、蠕虫（寄生虫）、グラム陽性およびグラム陰性（スピロヘータのような）を含めた細菌、真菌（全身性感染を引き起す真菌を含む）、およびウイルスといった、好気性および嫌気性の双方の微生物によって引き起される疾患を含む。これらの微生物はしばしば、命を脅かす疾病を媒介し、世界中の多くの場所、特に開発途上国において、大規模に命を奪い続ける。多くの微生物のライフサイクルは、昆虫ベクターおよび脊椎動物宿主を必要とする。ランブル鞭毛虫のような他のタイプは、乏しい、または汚染された水源を介してうつされることがある。開発途上地域では、飲用の新鮮な水の不足および、疾病媒介性のベクターの継続的な存在が特に問題である。開示された組成物は、原虫および原虫に感染した細胞を破裂させることにより、たとえば、プラスモディウム、トリコモナス（Trichomonas）、エントアメーバ（Entamoeba）、およびリーシュマニア（Leishmania）などといった原虫の存在を減らすこと、および／または除去することにおいて有効である。ブドウ状球菌、または嫌気性マイコプラズマのような細菌細胞、真菌細胞、ウイルス、および他の微生物もまた、微生物の外側の層を破壊すること、および宿主細胞を破裂させることにより除去され、および／またはその数が効果的に制限されかつ低下されてよい。開示された組成物は、製薬上許容される、生理学的に有利な、かつコスト効率のよい方式で、マラリア、および微生物によって引き起される他の疾患のための治療法として投与可能である。多くの医薬品のコストは、しばしば、開発途上国における治療の決定要因であり、開示された組成物のような有効かつコスト効率のよい医薬品は、そのような地域において治療を提供し、疾病を除去することが可能である。

10

20

30

40

50

【0052】

組成物は、少なくとも、固定銅 (fixed copper) 化合物コア、または固定銅 (fixed copper)—鉄化合物コアのナノ粒子か、または2つの組合せからなる。これらのコアは、癌細胞を標的化するためにも機能する、保護シースまたはジャケットにより、被包されるか、コートされるか、吸着されるかまたは複合体形成などされてもよい。このシースまたはジャケットは、グルコースまたはリポソームのような材料の任意の組合せでよく、また任意に、結果として生じるグルコース被包コアがリポソームでコートされてもよい。もう一つの態様においては、コアはデキストランのみか、または任意のグルコースまたは糖をベースとする物質の組合せによって被包されてもよい。別法として、リポソーム被包コアがその後外側のデキストランシースでコートされてもよい。

10

【0053】

遷移金属として、銅および鉄はヒドロキシルラジカルを含めた反応性酸素種を発生することが可能である。 Cu^+ 、 Fe^{2+} 、 Sn^{3+} 、 Co^{2+} 、および Ni^{2+} を含めた遷移金属が、生体系においてフリーラジカル反応の触媒作用を引き起こすことが証明されていることは、広く認識されている。それ故癌細胞は消化および断片化によって破壊されることが可能であり、それは銅または鉄による酸化、および/または触媒されたフリーラジカルの化学反応によって達成され得る。 Cu^+ は、DNAのグアニン—シトシン塩基対と結合し、ヒドロキシルイオンによる攻撃の特徴である、局所のフリーラジカル障害をDNAに対して引き起こす。銅は、脂質、タンパク質、および特にDNAおよびその塩基対に対するフリーラジカル障害の促進剤である。(アルオマ (Aruoma)、「Copper ion-dependent damage to the base pairs in DNA in the presence of hydrogen peroxide (過酸化水素の存在下でのDNA中の塩基対に対する銅イオン依存性の障害)」、Biochem. Jour., 1991年、第273巻、p. 601-4)。酸素種の発生に加えて、遷移金属、銅および鉄は、多くのインビトロの哺乳類の研究において証明されているように、哺乳類における癌細胞の増殖および複製に対する制限栄養物であってもよい。

20

【非特許文献65】アルオマ (Aruoma)、「Copper ion-dependent damage to the base pairs in DNA in the presence of hydrogen peroxide (過酸化水素の存在下でのDNA中の塩基対に対する銅イオン依存性の障害)」、Biochem. Jour., 1991年、第273巻、p. 601-4

【0054】

30

コアとしての使用のための適当な銅化合物は、任意の生物学的に許容される銅化合物であり、水酸化銅、酸化銅、オキシ塩化銅、塩基性炭酸銅、硫酸銅、塩基性硫酸銅、亜酸化銅、水酸化銅—水酸化鉄、銅—酸化鉄、クエン酸銅、グリシン酸銅、グルコン酸銅、リン酸銅、キュプロバム (cuprobam)、キュプリックサリチライト (cupric salicylite)、銅藍、銅—硫酸第二銅 (cupro-cupric sulfate)、硫酸第一銅、硫酸第一銅ヘミハイドライトを含めた任意の固定銅 (fixed coppers)、塩基性硫酸第二銅、鉱物プロシャンタイト銅鉱、ラング石、マラカイト、藍銅鉱、チージライト (Cheesylite)、コルネタイト、ジハイドライト (dihydrite)、リベセナイト、ホスホロカルサイト、シュードリベセナイト、シュードマラカイト、タージライト (tagilite)、アントレル鉱、銅藍、マーシュ石、赤銅鉱、輝銅鉱、ロゴイスキーの塩 (Rogojski's salt)、プロシャン銅鉱、水藍石、およびカルカンサイトなどといった、任意の天然の銅含有鉱物、または、ナントコ石、またはドレロファン (dolerophane) のような、天然に生じる任意の銅鉱物を含むが、これに制限されない。また、たとえば銅化合物については、「Merck's Manual (メルクマニュアル) 第13版」、メルク・アンド・カンパニー (Merck & Co.)、2001年、および「Hawley's Condensed Chemical Dictionary (ホーリーの簡約化学辞典) 第14版」、ジョン・ウィリー&サンズ・インク (John Wiley & Sons, Inc)、2001年も参照のこと。固定銅 (fixed copper)、水酸化銅は、コアを形成するための好ましい化合物である。もう一つの態様においては、コアはまた、銅および鉄の双方の細胞毒性を増強する相乗効果を与えるべく、水酸化銅—水酸化鉄で構成されてもよい。一つの態様においては、生体系においてフリーラジカル反応の触媒作用を引き起こすことが可能な、任意の生体適合性

40

50

の形状の銅化合物が、開示された組成物のためのコア金属として使用されてよい。本文において定義された生物学的に許容される銅化合物は、有害作用がほとんど、または全くなしに、生体系とともに、および生体系の中で、使用されてよい銅化合物であり、すなわち、それが導入された生体系を、任意の有害な方法で、明らかに変更するか、または明らかに侵すことはない。

【0055】

さらなる態様においては、酸化銅、水酸化銅－水酸化鉄、またはもう一つの固定銅 (fixed copper) および鉄の組合せが、組合せの相乗効果を与えるためのコアとして使用されてもよい。任意の生体適合性の鉄化合物が、銅コアと一緒に使用されてよく、たとえば、これに制限されないが、 Fe^{3+} 、およびその塩、水酸化鉄、オキシ水酸化鉄、酸化鉄、鉄グルコース、クエン酸鉄、フェリチン、フマル酸第一鉄、および硫酸第一鉄などを含み、鉄飽和されたヒトのホロトランスフェリンを含め、生物学的環境へ鉄を負荷する。

【0056】

カニクイザル (*Macaca fascicularis* (種)) について行なわれた代謝クリアランス速度の実験は、鉄デキストランから派生した大用量の鉄元素の安全な使用を示している。(全ての実験は、動物の権利保護法および規則 (Animal Welfare Act and Regulations) を遵守して行なわれた。) 鉄デキストランから派生された、体重 1 kg あたり 400 mg および 500 mg 用量の鉄元素は、静脈内注入によりカニクイザルへ安全に投与された。鉄デキストランは、延長された血漿滞留時間を示したが、それは、開示された組成物をほとんど負の副作用なしに血漿へ再分布するための食作用系のデコイ (おとり) として機能する。投与された鉄デキストランは、サルの血漿中に少なくとも 120 時間、ミリグラムレベルで残存する。鉄デキストランの一回用量もまた、負の副作用、すなわち腹部の腫脹がほとんどなく、別々にサルへ投与された。(その全てが本文中に含まれている、米国特許出願第 10/888, 576 号参照のこと)。サルモデルは、高い代謝速度の故に、ヒトに比較してはるかに素早く系から鉄デキストランを取除く。それ故ヒトでは、たとえばヘンダーソン (Henderson) & ヒルマン (Hillman) (1969 年) のような研究において示されているように、より長い血漿滞留時間が予想される。

【特許文献 8】米国特許出願第 10/888, 576 号

【0057】

好ましくは開示された組成物のナノ粒子は、少なくとも一つのシースまたはコートによって、被包されるか、取囲まれるか、複合体形成されるか、または吸着され、かつ結合することが可能であり、それは好ましくは、グルコース、糖類、多糖類、たとえばデンプン、セルロース、デキストラン、アルギニド、キトサン、ペクチン、ヒアルロン酸、プルラン (細菌の多糖類)、デキストラン、カルボキシアルキルデキストラン、およびカルボキシアルキルセルロースなどといった、糖物質から構成される。これらのデキストランは、たとえば、メーヴァ (Mehvar)、上記 (2000 年) ; および「Recent Trends in the Use of Polysaccharides for Improve Delivery of Therapeutic Agents : Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Perspectives (治療薬の改良送達のための多糖類の使用における最近の傾向 : 薬物動態学および薬力学的展望)」、Curr. Pharm. Biotech., 2003 年、第 4 巻、p. 283-302)、によって開示されたもの、および、モーギミ (Moghim) ら、「Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles : Theory to Practice (長期循環性および標的特異性のナノ粒子 : 実施のための理論)」、Pharm. Rev., 2001 年、第 53 巻、第 2 号、p. 283-318)、どちらも、その全てが本文中に含まれている、によって開示されたようなデキストランで覆われたリポソームを含むことが可能である。シースは、開示された組成物のコアをコートに入れるか、または被包し、コアと周囲の環境との化学的相互作用を防止し、コアの分解および、銅化合物からの銅および/または鉄の、および/またはコアからの銅－鉄化合物の発散を阻止する。シースの厚さは、所望であれば当業者により変更されてよい。シースは主として、身体により必ずしも外来物質として認識されない物質から構成されることから、身体は組成物に対する耐性を発生させる見込みは少ない。一つの態様においては、シースは、マクロース (macrose)

としても公知の高分子量多糖類、デキストランから構成可能である。デキストランは、シースとしての使用のための理想的な候補であり、その理由は、それが血漿代用物質または拡張剤としてしばしば哺乳類へ投与されること、一般的には哺乳類の系によって拒絶されないこと、および血漿中に延長された期間にわたり残留可能であることからである。ポリマーシェール、シース、またはジャケットの形成のための、他の生体適合性の材料は、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ポリヌクレオチド、多糖類、および脂質などを含むことが可能である。さらなるシース材料は、たとえば、その全てが本文中に含まれている、米国特許第6, 096, 331号および米国特許第6, 506, 405号を含む。別法として、前文に挙げられた2以上の材料の組合せがシースを形成するべく使用されてもよい。

10

【特許文献9】米国特許第6, 096, 331号

【特許文献10】米国特許第6, 506, 405号

【非特許文献66】「Recent Trends in the Use of Polysaccharides for Improve Delivery of Therapeutic Agents : Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Perspectives (治療薬の改良送達のための多糖類の使用における最近の傾向：薬物動態学および薬力学的展望)」、Curr. Pharm. Biotech., 2003年、第4巻、p. 283-302

【非特許文献67】モーギミ (Moghim) ら、「Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles : Theory to Practice (長期循環性および標的特異性のナノ粒子：実施のための理論)」、Pharm. Rev., 2001年、第53巻、第2号、p. 283-318

20

【0058】

もう一つの態様においては、開示された組成物は、リポソームコートで被覆されるか、または被包されることが可能である。このリポソームコートは、コアを被包するソールシースであってもよく、あるいは、前文に挙げられた材料の1つまたは組合せによる第2コートであってもよい。PEGリポソームポリマーコーティングは、その全てが本文中に含まれている、アルツァ・コーポレーション (Alza Corporation)、「Delivery Times, Issues and Opportunities (送達時間、問題点、および可能性)」、第2巻、第1号、による研究により、食作用系の取込みを低減させること、および長い滞留時間を提供することが示されている。血漿中の滞留時間は、静脈内注射の少なくとも数日～数週間の間、被包された薬物を放出することなく延長されることが可能であり、そのことは薬物の投与頻度を減少させる。各々、その全てが本文中に含まれている、米国特許第6, 465, 008号；米国特許公開 US 2002/0172711 81；米国特許公開 US 2001/0051183 81を参照のこと。

30

【特許文献11】米国特許第6, 465, 008号

【特許文献12】米国特許公開 US 2002/0172711 81

【特許文献13】米国特許公開 US 2001/0051183 81

【0059】

別法としてコアは、癌細胞、細胞増殖性疾患（前癌細胞、および乾癬など）、充実性腫瘍、液性腫瘍、および転移性疾患を標的とする標的化剤またはマーカーの使用により、細胞特異部位へ輸送されてもよい。生体系内で医薬用に利用可能な任意の標的化剤またはマーカーが、癌細胞の特異的な部位へコアを積極的に輸送するべく使用されてよい（たとえば、ジュリアーノ (R. C. Juliano)、「Targeted Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology (標的化薬物送達、実験薬理学ハンドブック)」、第100巻、ボーン (G. V. R.) ら編、シュプリンガー・フェアラーク (Springer Verlag) 参照のこと)。たとえば、癌性細胞の表面部位または細胞表面受容体へ結合する分子、界面活性剤、リガンド、抗体、タンパク質、ペプチド、酵素、および特異な化学的化合物などは、癌細胞を標的化するための標的化剤またはマーカーとして使用されてよい。これらの標的化剤またはマーカーは、コアを被包する少なくとも一つのシースの代わりに、または一緒に使用されてもよい。

40

【0060】

一つの実施例として、肝細胞の細胞表面部位または細胞表面受容体に対する結合性分子

50

、界面活性剤、リガンド、抗体、タンパク質、ペプチド、酵素、および特異な化学的化合物などは、感染された細胞を標的化するための標的化剤またはマーカーとして使用されてよい。これらの標的化剤またはマーカーは、コアを被包する少なくとも一つのシースの代わりに、または一緒に使用されてもよい。

【0061】

もう一つの、エボラに関する実施例においては、標的化剤は、エボラのビリオン表面上にあることが知られている唯一のタンパク質である、EBOV糖タンパク質のような保存された部位、および保存されたヘリカーゼ、プロテアーゼ、ポリメラーゼ、およびウイルスRNAの非翻訳領域に特異的である。これらは全て、ウイルス複製の重要な段階に関係しており、それ故、標的化剤のための論理的な部位であるといつてよい。エボラエンベロープ糖タンパク質はすでにマップされており、保存された領域は標的として使用されてよい。完全長のエンベロープ糖タンパク質は、血管を侵すことによりインビボにおいて毒性の作用を誘導することから、このようなウイルスエンベロープ糖タンパク質の毒性は、ヒトの疾患において重大な役割を果たしている。

【0062】

さらにもう一つの実施例においては、標的化剤は、肝細胞およびBリンパ球上に発現された受容体(CD81)のための結合部位を含んでいるC型肝炎エンベロープタンパク質E2、および高度に保存されたC型肝炎ウイルス特異的ヘリカーゼ、プロテアーゼ、ポリメラーゼ、およびウイルスRNAの両端の非翻訳領域、5'-UTRおよび3'-UTRに特異的である。これらは全て、ウイルス複製の重要な段階に関係しており、それ故、標的化剤のための論理的な部位であるといつてよい。細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン(「HSPG」)は、ヘパリンと肝臓由来の高度に硫酸化されたヘパラン硫酸とによって用量依存性の様式で阻害されることが可能な、HCVエンベロープ-標的細胞相互作用の仲介において重要な役割を果たすことも見出されている。細胞のHSPGに対するE2のドッキングは、HCVと細胞表面との間の相互作用における最初の段階といつてよく、受容体介在性の侵入および感染の開始を生じる結果となる。(バース(Barth, H.)ら、「Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate (C型肝炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質E2の細胞結合は細胞表面のヘパラン硫酸を必要とする)」、J. Biol. Chem., 2003年、第278巻、第42号、p. 41003-41012)、それゆえ、この部位に特異的な標的化剤は、細胞表面受容体を阻止し、細胞の感染を防止するであろう。同様に、E2のためのCD81結合部位は、大きい細胞外ループドメイン中に局在化され、かつこの相互作用に必須のアミノ酸残基が同定されており、特異的な標的化剤のための理想的な部位といつてよい。(ロッカセッカ(Roccasecca, R.)、「Binding of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein to CD81 Is Strain Specific and Is Modulated by a Complex Interplay between Hypervariable Regions 1 and 2 (C型肝炎ウイルスE2糖タンパク質のCD81に対する結合は株特異的であり、超可変領域1および2間の複雑な相互作用により調整される)」、Jour. of Virology, 2003年、第77巻、第3号、p. 1856-1867)。

【非特許文献68】バース(Barth, H.)ら、「Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate (C型肝炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質E2の細胞結合は細胞表面のヘパラン硫酸を必要とする)」、J. Biol. Chem., 2003年、第278巻、第42号、p. 41003-41012

【非特許文献69】ロッカセッカ(Roccasecca, R.)、「Binding of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein to CD81 Is Strain Specific and Is Modulated by a Complex Interplay between Hypervariable Regions 1 and 2 (C型肝炎ウイルスE2糖タンパク質のCD81に対する結合は株特異的であり、超可変領域1および2間の複雑な相互作用により調整される)」、Jour. of Virology, 2003年、第77巻、第3号、p. 1856-1867

【0063】

たとえば、赤血球細胞表面部位または細胞表面受容体、界面活性剤、リガンド、抗体、

タンパク質、ペプチド、酵素、および特異な化学的化合物などに対する結合性分子が、マリア感染細胞を標的化するための標的化剤またはマーカーとして使用されてよい。こうした標的化剤またはマーカーは、コアを被包する少なくとも一つのシースの代わりに、または一緒に使用されてよい。

【0064】

対応する天然痘の実例では、標的化剤は、エンベロープ糖タンパク質のような保存された部位、および保存されたヘリカーゼ、プロテアーゼ、ポリメラーゼ、およびウイルスRNAの非翻訳領域に対して特異的である。これらは全て、ウイルス複製の重要な段階に係り、それ故、標的化剤のための論理的な部位といってよい。

【0065】

開示された組成物全体のナノ粒子サイズは、約1 nm～約10,000 nmでよい。さらに好ましい態様においては、粒子サイズは約15 nm～約500 nmでよい。粒子サイズに関して最も好ましい態様は、約20 nm～約200 nmである。

【0066】

薬物のない空のリポソームは、食作用系に対し、デコイ、プラセボ担体、または再分布剤として機能するべく、患者に対し組成物自身と同時投与されるか、または先立つか、その間中、またはその後に投与されてもよく、組成物が血漿中に延長された時間にわたり残留するようにする。空のリポソームデコイ、またはプラセボ担体は、食作用系を占拠し、また、開示された組成物を肝臓内および脾臓内の細胞によるクリアランスから遠ざけて再分布させ、したがって血漿中の開示された組成物を延長された期間にわたって濃縮させる。ポリマーシエル用に使された生体適合性材料は、またデコイとして、単独で、またはリポソームと併用して使用されてよい。

【0067】

鉄デキストランもまた、代表的な生体適合性鉄化合物の実例であり、その鉄は、少なくとも2つの異なる経路を介して組織を負荷し、かつ再分布剤として、開示された組成物に有利に作用する。第1は、延長されたヒト血漿滞留時間を介した、癌細胞による食作用である。第2は、食作用系による鉄デキストランのプロセッシングを介したトランスフェリン飽和度の増加である。腫瘍細胞内での鉄デキストランの細胞内代謝は、周囲の酸性度を増大させ、そのことは開示された組成物の破壊をさらに促進する。本特許出願の目的のためには、食作用およびエンドサイトーシスは、膜小胞の形成による、微粒子状の材料を含めた材料の、細胞内への取込みとして定義され、本文においては同等の用語として使用されている。

【0068】

一つの態様においては、開示された組成物プラス、鉄デキストランプラス、空のリポソームが、癌患者のための完全静脈栄養（「TPN」）へ添加されてよい。開示された組成物は、必須微量元素である銅を含んでおり、鉄、ならびにグルコース、および／または、患者の身体の要求条件に寄与するための脂肪であるリポソームを含んでもよい。このように、組成物はまた、患者の完全静脈栄養に対しても重要な貢献を提供する。

【0069】

なおもう一つの態様においては、組成物はインスリン強化療法（「IPT」）とともに、鉄デキストランを用いて、または用いずに、本発明のこれらの薬剤の摂取を腫瘍細胞内に促進するべく使用されてよい。（ハウザー（Hauser）&ハウザー（Hauser）著、「Cancer-Treating Cancer with Insulin Potentiation Therapy（癌－インスリン強化療法による癌治療）」、ビューラ・ランド・プレス（Bhulah Land Press）、2001年、第267頁）。さらに、他のインスリン強化剤もまた組成物の効果を増幅するべく添加されてよく、潜伏性に感染された休止期記憶リンパ球および、聖域内のものを含めて他の潜伏性に感染された細胞を活性化する。

【非特許文献70】ハウザー（Hauser）&ハウザー（Hauser）著、「Cancer-Treating Cancer with Insulin Potentiation Therapy（癌－インスリン強化療法による癌治療）」、ビューラ・ランド・プレス（Bhulah Land Press）、2001年、第267頁

【0070】

いかなる特定の理論または作用機序にも制限、保持、または束縛されないなら、再分布剤すなわち鉄デキストランは、空のリポソームと一緒に、またはリポソームなしに、系に侵入し、不活性な実体として身体中を往来し、食細胞系および／または癌細胞によって血漿から除去されると信じられている。組成物はプロドラッグとして機能し、血漿内では不活性であり、癌細胞の中では細胞内活性をもつ。組成物は、再分布薬またはプラセボ担体とともに使用されると、用量レベルに依存して、何日もの間哺乳類の血漿内に残存する。

(鉄デキストランは、特に、用量が食作用系のクリアランス速度を超えて投与された場合、数週間にわたり血漿中に残存可能であることが公知である。食作用系による鉄デキストランのプロセッシングは、一日最大量までに律速され、そのバランスをその後の使用についてそのまま残す。) シースは、それが糖をベースとする物質であり、かつ哺乳類の系によって拒絶されないことから、食作用系によって直ちに外来物質として認識されることはないといつてよく、組成物が、ほとんどの治療よりも長い間哺乳類の循環中に残存できるようにし、標的細胞とさらに接触しやすくなるようにし、伝統的な化学治療薬よりも少ない用量でより大きい効果を提供する。組成物は、任意の生物学的経路により、身体中を循環し、いかなる細胞タイプとも接触することがある。ほとんどの部分では、糖のような増殖のために必要な分子を貪食するために高い親和性を有する癌細胞がそうするように、食作用系が組成物を摂取する。正常な健康細胞は、一般に組成物とごくわずかに相互作用する。食作用系によって摂取された組成物は、肝臓を通り、グルコース、鉄、および銅を貯蔵する肝細胞において大いに処理され、後にそれらの適当なタンパク質担体を介して放出され、身体の細胞を養育する。糖、銅、および鉄は、食細胞系にとり周知の身体の要求物質であるが故に、食作用系はそれらを処理するか、輸送するか、貯蔵するか、または、ほとんど毒性のないそれらを除去することができるのに対し、組成物は癌細胞を殺し、同時に身体の細胞を養育する。

【0071】

組成物が癌細胞によって貪食されるか、または他の手段により細胞へ侵入すると、組成物は、癌細胞に共通である嫌気性解糖プロセスによって生じた乳酸を含んでいる、細胞の酸性環境に対して暴露される。細胞中に存在してもよい任意の鉄デキストランもまた、鉄デキストラン化合物の破壊の間に、周囲の酸性度の一因となる。糖のシースは代謝され、開示された組成物のコアは酸性の条件下に破壊され、少なくとも遊離のイオン、フリーラジカル、および反応性酸素種(「ROS」)を発生させる。遊離の遷移金属イオンと一緒に摂取されたフリーラジカルは、細胞に対して細胞毒性作用を有しており、DNA損傷性フリーラジカルおよびROSを発生させる。フリーラジカルおよびROSは細胞の複製を妨害し、最終的には細胞死を引き起す。対照的に、正常な健康細胞は一般に、乳酸産生なしに好氣的にグルコースを処理する。それ故もし正常細胞によって貪食されれば、シースは容易には破壊されず、金属コアはシース中に安全に被包されたまま残り、そのことがコアの細胞毒性を和らげる。

【0072】

組成物は理想的には、マラリアおよび類似の微生物媒介性疾患の治療剤として適しているが、その理由は、プラスモディウムがそのライフサイクルの一部として宿主哺乳類の中にいるとき組成物が肝臓によってプロセスされることからである。ひとたび哺乳類が感染すると、スポロゾイト期のプラスモディウムが哺乳類の肝臓に感染し、そこでそれらは無性生殖的に繁殖する。肝臓中のスポロゾイトはシゾンヘ成熟し、それは後に破裂してメロゾイトを放出する。それ故、組成物およびスポロゾイトの双方が、宿主哺乳類の肝臓を通して進行するはずであることから、組成物は肝臓における寄生虫の負荷と接触し、低下および／または除去することができる。肝臓におけるこの最初の複製の後、寄生虫は赤血球内で無性増殖を受ける。この増殖がメロゾイトを産生し、それが赤血球に感染する。リング期トロフォゾイトは、シゾンヘ成熟し、それは破裂してメロゾイトを宿主の血流中へ放出する。(寄生虫のあるものは、有性の赤血球期へと分化する。)[血液期]の寄生虫は、疾病の臨床症状発現の原因である。

【0073】

血中にある間、すなわち、血液期の間は、プラスモディウムはエネルギーの主要供給源としてグルコースを活発に発酵する。解糖の代謝プロセスは、グルコースを乳酸塩へ転換し、プラスモディウムは本質的に、他の生物に見られるものと同様のプロセスを使用する。プラスモディウムおよび他の寄生虫は、高率の解糖を示し、未感染の赤血球より75倍多くグルコースを利用する。プラスモディウムによって利用されるグルコースの約85%が、乳酸塩へ転換される。高い乳酸デヒドロゲナーゼ（「LDH」）活性は、解糖経路において先にグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼによって産生されるNADHからの、NAD⁺の再生に機能すると信じられている。解糖の正味の結果は、ATPを産生することである。それ故、感染された細胞は組成物の糖シースに対し、天然の親和性を有しており、その解糖プロセスを続けるべく迅速に組成物を摂取する。

10

【0074】

解糖中間体のあるものは、合成目的のために使用されることがある。好気性代謝もまた、乳酸塩に先行する解糖中間体であるピルビン酸塩の、トリカルボン酸サイクルによる二酸化炭素および水素原子への異化を含む。水素原子はNAD⁺のNADHへの還元によって捕捉される。捕捉された水素からの電子は、電子伝達体の連鎖へ入れられ、最終的に分子状酸素へ伝達されて水を形成する。ATPは、酸化的リン酸化プロセスにより、電子運搬を通じてエネルギーを捕捉することによって生成される。血中にある間、プラスモディウムは、グルコースの乏しい宿主環境における以外は、完全なトリカルボン酸サイクルを示さない。それゆえ、組成物は、全てがグルコースに対する親和性を有しているマラリア

20

【0075】

いくつかのプラスモディウム種は、長期間にわたって肝臓中に生残り、数週間または数年もの後に、血流に侵入することにより再発を引き起こすことが知られている。それ故、組成物の予防的投与はまた、高リスク区域に住着いた無症状の哺乳類においても有用であるといつてよい。

【0076】

組成物がマラリア感染細胞によって貪食されるか、または他の手段によって細胞へ侵入すると、組成物は、マラリア感染細胞に共通である嫌気性解糖プロセスによって生じた乳酸を含め、細胞の酸性環境に対して暴露される。細胞中に存在してもよい任意の鉄デキストランもまた、鉄デキストラン化合物の破壊の間に周囲の酸性度の一因となる。糖シースは代謝され、開示された組成物のコアは酸性の条件下に破壊され、少なくとも遊離のイオン、フリーラジカル、および、過酸化水素化合物を含めて、反応性酸素種（「ROS」）を発生させる。遊離の遷移金属イオンと一緒に摂取されたフリーラジカルは、細胞に対して細胞毒性作用を有しており、DNA損傷性フリーラジカルおよびROSを発生させる。フリーラジカルおよびROSは細胞の複製を妨害し、最終的には細胞死を引き起こす。対照的に、正常な健康細胞は一般に、乳酸産生なしに好氣的にグルコースをプロセスする。それ故、もし正常細胞によって貪食されれば、シースは容易には破壊されず、金属コアはシース中に安全に被包されたまま残り、そのことがコアの細胞毒性を和らげる。

30

【0077】

銅は、強力な殺ウイルス剤として当業者に周知である。インビトロの試験は、銅が過酸化水素とともに、事実上あらゆる微生物に苦しんでいる哺乳類の代理モデルを殺すことを示している。（サグリパンティ（Sagripanti）ら著、「Virus Inactivation by Copper or Iron Ions alone and in the Presence of Peroxide（単独および過酸化物の存在下での銅または鉄イオンによるウイルス不活性化）」、Applied and Environ. Microbio、1993年、第59巻、第12号、p. 4374-4376；サグリパンティ（Sagripanti）ら著、「Metal-based Formulations with High Microbicidal Activity（金属を主成分とする高い抗微生物活性をもつ製剤）」、Applied and Environ. Microbio、1992年、第58巻、第9号、p. 3157-3162を参照）。開示された組成物はまた、強力な殺ウイルス剤として有効であることが示されており、特定の理論または機構に束縛され

40

50

ることがなければ、殺ウイルス作用が上述のように機能してウイルスDNAを破壊し、ウイルスエンベロープを破裂させると信じられている。開示された組成物は、たとえば、肝細胞癌に関するHBVおよびHCV、子宮頸癌に関するHPV、バーキットリンパ腫に関するEBV（エプスタイン・バーウイルス）、および白血病の一病型に関するHTLV1といった、癌を引き起こすことが公知のウイルスを破壊するために有用であることが可能である。したがって、開示された組成物は、鉄-デキストランベースを付加して、または付加なしに、細胞が完全に形質転換するようになる前の前癌期において活性がある。開示された組成物は、中枢神経系および脳を含めて、身体中を有利に往来してよい。

【非特許文献71】サグリパンティ（Sagripanti）ら著、「Virus Inactivation by Copper or Iron Ions alone and in the Presence of Peroxide（単独および過酸化物の存在下での銅または鉄イオンによるウイルス不活性化）」、Applied and Environ. Microbio、1993年、第59巻、第12号、p. 4374-4376

10

【非特許文献72】サグリパンティ（Sagripanti）ら著、「Metal-based Formulations with High Microbicidal Activity（金属を主成分とする高い抗微生物活性をもつ製剤）」、Applied and Environ. Microbio、1992年、第58巻、第9号、p. 3157-3162

【0078】

鉄組成物および／または鉄デキストラン組成物の投与は、増強された細胞毒性のため、銅と鉄との間の相乗的相互作用を提供するべく、開示された組成物と組合されてよい。銅と鉄との間の相乗作用は当業者に周知であり、文献に記述されている。たとえば、その全てが本文中に含まれている、殺真菌剤および殺細菌剤としての使用のための銅組成物と鉄組成物との相乗作用の使用を開示している米国特許第5,202,353号を参照のこと。鉄組成物および／または鉄デキストラン組成物はまた、開示された組成物を再分布させかつ、組成物に患者の血漿中でのより長い滞留時間を可能にするべく投与されてもよい。より優れた細胞毒性および、引き延ばされた血漿滞留時間のためには、元素の鉄塩のものよりもはるかに高い用量の鉄デキストランが用いられてよい。鉄レベルが大きいほど、組成物の相乗的細胞毒性は大きい。この技術においては、食作用系がより小さい粒子を最初に血漿循環から除去することは周知であることから、組成物よりも直径の小さい鉄デキストランの組合せが、より長い血漿滞留時間を可能にする。鉄デキストランおよび開示された組成物のコアの直径は、これらの粒子の血漿時間を所望のように操作するべく変更されてよい。一つの態様においては、鉄デキストランは、食作用系のクリアランスレベルを超えて投与されることが可能であり、それがデコイ、プラセボ担体、または再分布剤として役立ち、延長された期間にわたり組成物が血漿中に残存できるようにする。（ヘンダーソン（Henderson）&ヒルマン（Hillman）著、「Characteristics of Iron Dextran Utilization in Man（ヒトにおける鉄デキストラン利用の特徴づけ）」、Blood、1969年、第34巻、第3号、p. 357-375を参照）。開示された組成物が延長された期間にわたり血漿中に残存できるようにするための、食作用系のクリアランス速度を超えた用量における鉄デキストランのこの使用は、この技術では再分布（肝臓および脾臓から離れて血漿への）として公知である。一般に、少用量（50～500mg）の鉄デキストランは、約3日以内に取除かれ、大用量（>500mg）の鉄デキストランは、しかしながら、10～20mg／時間という一定速度で取除かれ、典型的には3週間もの長さにわたり、鉄デキストランの増大された血漿濃度に対応づけられる。開示された組成物を血漿へ再分布するための、食作用系のためのデコイとして役立ってもよい他の薬剤は、これに制限されないが、プルラン、デキストラン硫酸、空のリポソーム、および、その全てが本文中に含まれている、米国特許第6,506,405号、および米国特許第6,096,331号によって教示されたものを含む。

20

30

40

【特許文献14】米国特許第5,202,353号

【特許文献15】米国特許第6,506,405号

【特許文献16】米国特許第6,096,331号

【非特許文献73】ヘンダーソン（Henderson）&ヒルマン（Hillman）著、「Characteri

50

stics of Iron Dextran Utilization in Man (ヒトにおける鉄デキストラン利用の特徴づけ)」、Blood、1969年、第34巻、第3号、p. 357-375

【0079】

カニクイザル (*Macaca fascicularis*種) について行なわれた代謝クリアランス速度の実験は、鉄デキストランから派生した大量の元素鉄の安全な使用を示している。(全ての実験は、動物の権利保護法および規則 (Animal Welfare Act and Regulations) を遵守して行なわれた。) 鉄デキストランから派生された、体重1kgあたり400mgおよび500mg用量の元素鉄は、静脈内注入によりカニクイザルへ安全に投与された。鉄デキストランは、延長された血漿滞留時間を示しており、このことは、開示された組成物をほとんど負の副作用なしに血漿へ再分布するための食作用系のデコイとして役立つ。図15A、B、およびCに示されるように、投与された鉄デキストランは、サル血漿中に少なくとも120時間にわたり、ミリグラムレベルで残存した。一回量の鉄デキストランもまた、図16に示されるように、負の副作用、すなわち腹部の腫脹がほとんどなく、別々にサルへ投与された。サルモデルは、高い代謝速度の故に、ヒトに比較してはるかに素早く系から鉄デキストランを取除く。それ故ヒトでは、たとえばヘンダーソン (Henderson) & ヒルマン (Hillman) (1969年) のような研究において示されているように、より長い血漿滞留時間が期待される。

10

【0080】

鉄デキストラン化合物を用いるか、または用いない組成物の副作用は、標準的に投与された化学療法の周知の副作用に比較してはるかに少ないが、開示された組成物は付加的な治療薬と併用して使用されることが可能である。開示された組成物および鉄デキストランは、銅および鉄の分解副産物を有しており、それは赤血球、白血球、および血小板の生物生産を支援している。組成物は造血系を支援することから、その使用は、一般に使用される化学療法薬によって標準的に引き起される、周知の痛烈な疲労、感染のリスク、および骨髄 (および他の素早く増殖する細胞) に対する細胞毒性の化学療法の副作用を制限するか、または取除く。さらに、骨髄回復を加速するためのコロニー刺激因子、および重い骨髄抑制の防止のための、赤血球のためのコロニー刺激増殖因子、エリスロポエチンといった、補助的医薬品の使用およびそれらの重篤な副作用が制限されることが可能である。こうした薬物の使用の必要性が制限され得ることから、患者の生活の質が改善されてよい。

20

【0081】

診断目的のためには、組成物は、標的化された磁性の担体で標識されてもよく、癌細胞のイメージングを可能にし、かつ外来の磁石により腫瘍を標的化することを含めたさらなる医学的治療を決定するための情報を提供できるようにする。(ジョンソン (Johnson) 著、「An Innovative Drug Delivery Technology (革新的な薬物送達技術)」、Magnetic s Business & Technology Magazine, (2002年))。放射性核種、蛍光体、酵素、酵素基質、酵素コファクター、酵素阻害剤、リガンド (特にハプテン) などといった、広く多様な他の標識が使用されてよく、かつ当業者には周知である。

30

【非特許文献74】ジョンソン (Johnson) 著、「An Innovative Drug Delivery Technology (革新的な薬物送達技術)」、Magnetic s Business & Technology Magazine, (2002年)

40

【0082】

開示された組成物、鉄デキストラン、および空のリポソームは、全て生体適合性の材料から形成されることから、他の化学療法薬に比較して、延長された期間にわたり、全てが投与されてよい。有効な用量または有効な量は、癌の特定のタイプ、投与のレジメン、被験者の体重、細胞増殖の攻撃性、および前の化学療法によって被験者が負に影響された程度についての当業者の評価次第で変更することが可能である。一般に、治療上有効な量は、原発性または転移性の腫瘍を減少させるか、または、最少量でさらなる増殖を防止する量である。

【0083】

開示された組成物は、薬剤組成物として、製薬上の担体と組合せて患者へ投与されるこ

50

とが可能である。製薬上の担体は、医学的に適格の患者への組成物送達に適した、任意の適合性の非毒性物質であることが可能である。滅菌水、アルコール、脂肪、ワックス、および不活性固体が、担体に含められてよい。製薬上許容されるアジュバント（緩衝剤、分散剤）もまた薬剤化合物中へ取込まれてよい。一つの態様においては、組成物は、滅菌水、または脱イオン水、および遊離のデキストラン、薬物なしのデキストランと組み合わせられ、無菌のコロイド懸濁液を形成してもよい。

【0084】

開示された組成物は、経口、静脈内、皮下、腹膜内、包膜内、筋肉内、頭蓋内、吸入、局所、トランスデルマール（transdermal）、座剤（直腸）、ペッサリー（膣）、または、移植可能なポリマーの開示された組成物で飽和されたデポー剤、またはウエハ、たとえばギラデル・ウエハ（Giladeru water（登録商標））といった、多様な方法で患者へ投与されてよい。好ましくは、薬剤化合物は非経口的に、たとえば、皮下、筋肉内、または静脈内へ投与されてよい。したがって、開示された組成物は、非経口投与のために、許容される担体、好ましくは水性担体中に溶解された溶液を含んでもよい。多様な水性担体、たとえば、水、緩衝化された水、0.4%食塩水、および0.3%グリシンなどが使用可能である。これらの溶液は無菌であり、一般に粒子状物質がない。これらの化合物は、通常の周知の滅菌技術によって滅菌されてよい。組成物は、pH調整剤および緩衝剤、および、もし感受性の患者に必要であれば、たとえば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、および乳酸ナトリウムなどの毒性調整剤などといった、生理的条件に近づけるために必要とされるような、製薬上許容される補助的物質を含有してもよい。これらの製剤中の開示された組成物の濃度は、幅広く可変であって、たとえば、約0.1mg未満から約5mgまでの、担体1mlあたりの組成物に由来する元素銅の相当量であり、10mgまたは15mg以上程度までに達する。開示された組成物の好ましい濃度は、1mlの担体あたりの組成物に由来する元素銅の相当量で約5mgであり、選ばれた投与の特定の方式に従って、主として液体の体積、および粘度などにに基づき選択されることとなる。開示された組成物による使用のために好ましいpH範囲は、約7と約8.5の間であり、さらに好ましいpH範囲は、約7.5と約8.0の間である。

【0085】

非経口的に投与可能な化合物を調製するための実際の方法、および患者、典型的には哺乳類への投与のために必要な調整は、当業者には周知かまたは明らかであろうが、さらに詳細には、たとえば、参考文献として本文中に含まれている、「Remington's Pharmaceutical Science: The Science and Practice of Pharmacy（レミントンの薬学：調剤の科学および実践）」、第20版、Lippincott, Williams & Wilkins、(2000年)、に記述されている。

【0086】

開示された組成物は、特異性のために癌療法を標的化するという非常に切迫した問題を扱っている一方で、化学療法の恐ろしい副作用を大いに制限するかまたは除去していることが認識されるであろう。さらに、開示された組成物は、特に鉄デキストランとともに使用された場合、薬剤耐性という問題を克服することができる。開示された組成物は、鉄デキストラン負荷を用いて、または用いずに使用されてよく、充実性腫瘍、液性腫瘍（血液）、ならびに転移癌に対し非常に有効な治療を達成する一方、低用量で高い活性および結果を生じることから、コスト効果の高い薬剤を提供する。開示された組成物は、化学療法薬としてそれだけで、鉄デキストランとともに、および／または通常の治療法と併用して、投与されるべくデザインされている。最も重要なことには、組成物の、高度に標的化されかつ高度に効率的な、細胞を殺す割合が、任意の医療施設に利用可能とされ得る高いコスト効率で、数えきれない生命を救うことが可能である。たとえば、開示された組成物は、鉄負荷を用いて、または用いずに、肝細胞癌を治療するために非常によく適合している。肝細胞癌（「HCC」）は最も一般的な、肝臓の原発性癌であり、世界中で毎年550,000を超える死を引き起している。これまで、HCCには有意に効果的な治療法が存在していなかった。（ナカムラ（Nakamura）& チョティ（Choti）著、「Management of H

10

20

30

40

50

epatocellular Carcinoma (肝細胞癌の管理)」、Oncology, 14(7) (2000))。開示された組成物は、しかしながら、血流中へ投入され、肝動脈を通行してよく、正常な肝細胞および癌性肝細胞を組成物に対し暴露させる。肝細胞はデキストランを、使用するためまたは、グルコースをグリコゲンとして貯蔵するために分解し、組成物に由来する銅および鉄もまた貯蔵してもよい。したがってHCC細胞は、開示された組成物によって引き起される細胞毒性の対象である。貯蔵されないいかなる過剰の銅も、胆管および他の身体系を通して排出されてよい。肝細胞からの銅および鉄は、患者の身体の細胞を養うためのトランスフェリンおよびセルロプラスミンを含む、各々のタンパク質担体へ結合される。

【非特許文献75】ナカムラ (Nakamura) & チョティ (Choti) 著、「Management of Hepatocellular Carcinoma (肝細胞癌の管理)」、Oncology, 14(7) (2000)

10

【0087】

開示された組成物が、効率のよい安全な治療を提供するマラリア療法という非常に切迫した問題を扱っている一方で、概して最も高い率のベクターおよび微生物媒介性の疾病に苦しんでいる開発途上領域に対し、コストを利用可能なままにしていることもまた認識されよう。開示された組成物は鉄デキストラン負荷を用いるか、または用いずに、マラリア、他の、原虫、細菌、真菌、またはウイルス起源の寄生虫症に対する高度に有効な治療を達成するべく使用されてよい。開示された組成物は、抗マラリア薬としてそれだけで、鉄デキストランとともに、および／または通常の療法と併用して、投与されるべくデザインされている。最も重要なことには、組成物は高度に効率的であり、冒された細胞に向けて高度に標的化されており、任意の医療施設に利用可能とされ得る高いコスト効率で、数えきれない生命を救うことが可能である。マラリア原虫のライフサイクルは、宿主の肝臓内で48時間以内に複製すること、および組成物は肝臓を介して処理されることから、組成物は、感染がさらなる段階へ進行できる以前に、微生物を制限および／または除去することができる。貯蔵されないいかなる過剰の銅も、胆管または他の身体系を通して排出されてよい。肝臓の肝細胞からの銅および鉄は、患者の身体の細胞を養うためのトランスフェリンおよびセルロプラスミンを含む、各々のタンパク質担体へ結合される。

20

【0088】

以下の実施例は、本発明を例証することを意図したものであって、制限するためのものではない。それらは使用できたものの中で典型的なものではあるが、当業者に周知の他の方法も代替えとして使用されてよい。

30

実施例

【実施例1】

【0089】

インビトロのヒトの腫瘍のスクリーンが、開示された組成物、および鉄デキストランのベース化合物と組合わされた組成物の、抗増殖効果を評価するべく用いられた。最大の発生率、発生率の最大の増加、最大の死亡率をもつ癌か、または治療に対し高度に耐性のある癌のモデルを表しているヒト腫瘍細胞系が選ばれた。試験は、当業者に周知の標準的な組織培養技術および、分析用の³H-チミジンアッセイを用いて行なわれた。

(実験デザイン)

【0090】

40

本実験は、開示された組成物単独の、および、ベース化合物との組合せにおける、および、種々の化学療法と併用して用いられる、多くの癌の治療における主力である陽性対照としての、商品名アドリアマイシン (Adriamycin) によっても知られているドキソルビシンの、抗増殖および細胞毒性効果を評価するべくデザインされた (ヒト腫瘍細胞系、CAKI-1 腎臓、DLD-1 結腸、LOX IMVI 黒色腫、MCF7 乳房、NCI-H23 肺、NCI-H460 肺、OVCA9-3 卵巣、PC-3 前立腺、SNB-75 CNS、ZR-75-1 乳房、およびCEM-S5 白血病細胞、については、チュー (Chu) およびデビータ (Devita)、「Cancer Chemotherapy Drug Manual (癌化学療法薬マニュアル) 2003」、Jones and Bartlett Publishers、2003年、p. 138-139を参照のこと)。図14を参照のこと。全ての実験について、細胞は収穫され、遠心分離され

50

て培地が除去され、新鮮な完全培地中に懸濁された。試料が採取され、細胞密度が測定された。全ての細胞カウントは、コールター (Coulter) ・モデル Z₁ セルカウンター (ベックマン・コールター・インク (Beckman Coulter, Inc.)、カリフォルニア州、フラートン (Fullerton)) を用いて測定され、生存率はヨウ化プロピジウム染色および、それに続くコールター E P I C S X L フローサイトメーター (ベックマン・コールター・インク、カリフォルニア州、フラートン) での分析により測定された。全ての細胞系は、各々完全培地中に、ウェルあたり 5×10^3 細胞で播種された。翌日、細胞は、8つの希釈度の、組成物のみ、および鉄デキストランのベース組成物と組合された組成物 ($60 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、これは鉄デキストランに由来する元素鉄の相当量である) を投薬された。全ての鉄デキストラン量は、鉄デキストランに由来する元素鉄のおよその相当量として測定される。鉄デキストランのベース化合物もまた、対照として単独で行なわれた。プレートは処理の開始4日後に分析された。

10

【非特許文献76】チュー (Chu) およびデビータ (Devita)、「Cancer Chemotherapy Drug Manual (癌化学療法薬マニュアル) 2003」、Jones and Bartlett Publishers、2003年、p. 138-139

【0091】

組成物は以下のように形成された：硝酸銅 (99.999%) の無機銅塩、4.854 g は、20 ml の脱イオン水 (シグマ・アルドリッチ (Sigma-Aldrich) からの分子生物学試薬) 中に溶解されるか、または蒸留水もまた使用可能であった。この溶液は約2時間還流された。銅塩溶液は、2 g の酸化デキストランか、または2 g の水素化されたデキストランと低温で反応された。(臨床グレードのデキストラン、平均分子量64,000~78,000のD4751は、シグマ・アルドリッチから購入された。) この溶液は、0.2 ml の、該溶液中0.5 M の NaOH の添加に先立ち、1時間還流された。さらに2時間の還流の後、溶液は半分に分けられた。溶液の半分は、2 g の酸化デキストランと混ぜ合わされ、40 ml の水が添加され、その後に2時間の還流段階が続けられた。溶液の2番目の半分は、水素化されたデキストランと混ぜ合わされ、40 ml の水が添加され、その後に2時間の還流段階が続けられた。溶液は次いで、各々0.1 ml の0.5 NaOH と混ぜ合わされ、還流はさらに2時間続けられた。溶液は静置されて室温に冷却された。結果として得られた $\text{Cu}(\text{OH})_2$ -デキストランナノ粒子の溶液は、制御された方式で沈殿され、これにおいて各 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ナノ粒子は、最終溶液への120 cc の0.25 M NaOH の添加により、デキストラン分子によってカバーされる。溶液の水分は真空中で蒸発されて、溶液中の銅濃度を増加した。大きい粒子をもつ沈殿は遠心分離され、 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ -デキストランナノ粒子の水溶液を調製した。溶液中の最終銅濃度は、典型的には約 $5 \text{ mg}/\text{ml}$ であり、最終 pH は約7.5から約8.5の範囲であり、原子吸光分析法および/または誘導結合プラズマ分光法によってアッセイされた。 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ -デキストランナノ粒子の粒子サイズは、レーザー光散乱により測定された。粒子サイズは、酸化デキストランについては約150 nm~約200 nmの範囲内であり、水素化デキストランについては約20 nm~50 nmの範囲内であった。粒子サイズを測定した後、溶液は遊離の銅イオンについて、銅電極を用いて検査された。銅特異電極は、4つの既知の銅濃度溶液でキャリブレーションされた。これらの濃度は以下の通りであった：
.1 mol / リットル、.01 mol / リットル、.001 mol / リットル、および
.0002 mol / リットル (~1 ppm)。4つの標準の Cu^{2+} 溶液のミリボルトの読取り値は、各々：

20

30

40

【表 1】

Cu ²⁺ 濃度	mV
0.1 M	239
0.01M	206
0.001 M	175
0.0002 M (1 ppm)	163

であった。

これらの銅溶液のmVの読取り値は、典型的には130mV未満であり、そのことは溶液中の遊離Cu²⁺の濃度が1ppm未満であって、検出のレベルよりもしばしば低いことを示唆している。（一つの参考点として、環境保護局は飲料水中の1.3ppmの銅を許可しており、たとえば、安全な水、および銅を含む飲料水の可能な汚染物質についての米国環境保護局のウェブサイトを参照のこと。）全ての試料中の開示された組成物のコロイド懸濁液には、ほとんど遊離の銅は検出されず、典型的には検出のレベル1ppmをほぼ下回っていた。酸化デキストランと用いて調製された水酸化銅溶液は、pH8.5であった。水素化デキストランを用いて形成された溶液は、何ら遊離の銅イオンを示さず、典型的には検出レベル1ppmを下回っていた。

（水酸化銅－水酸化鉄ナノ粒子の調製）

（a）試料1の調製

【0092】

銅塩、2.428gの硝酸銅（99.999%純粋、アルファ・エイサー（Alfa Aesar）、カタログ#10699）は、0.2gのFeCl₃・6H₂O（純度97～102%、アルファ・エイサー、カタログ#12497）、および4.0gの水素化デキストランと混ぜ合わされた。これらの成分は70mlの脱イオン水（シグマ・アルドリッチからの分子生物学試薬）中に溶解された。この溶液は次に、約3時間還流された。溶液は92.8ccの0.25M NaOH（フィッシャー（Fisher）ACS、カタログ#S318-3）の、溶液への添加に先立ち、静置して冷却された。溶液の最終pHは、8.5であった。6日後、pHは6.85に低下し、1.7ccの0.25M NaOH溶液が添加されてpHを8.5に調整した。溶液中の銅および鉄濃度の分析は、原子吸光分析法（「AA」）および／誘導結合プラズマ分光法（「ICP」）によって行なわれた。溶液はシリンジフィルタで濾過され、暗緑色の溶液が無菌のバイアル内へ貯蔵された。鉄オキシ水酸化物もまた、この、または任意の試料中の水酸化鉄のための基質として用いられてよい。

（b）試料2の調製

【0093】

銅塩、2.428gの硝酸銅（99.999%純粋、アルファ・エイサー、カタログ#10699）は、0.4gのFeCl₃・6H₂O（純度97～102%、アルファ・エイサー、カタログ#12497）、および4.2gの水素化デキストランと混ぜ合わされた。これらの成分は75mlの脱イオン水（シグマ・アルドリッチからの分子生物学試薬）中に溶解された。この溶液は次に、約3時間還流された。溶液は102.2ccの0.25M NaOH（フィッシャーACS、カタログ#S318-3）の溶液中の添加に先立ち、静置して冷却された。溶液の最終pHは、8.5であった。6日後、pHは7.4に低下し、1.6ccの0.25M NaOH溶液が添加されてpHを8.5に調整した。溶液中の銅および鉄濃度の分析は、AAおよび／ICPによって行なわれた。溶液は遠心分離され、わずかにくもりのある暗緑色の溶液が無菌のバイアル内へ貯蔵された。

（c）試料3の調製

【0094】

銅塩、2.428gの硝酸銅（99.999%純粋、アルファ・エイサー、カタログ#10699）は、0.2gのFeCl₃・6H₂O（純度97～102%、アルファ・エイサー、カタログ#12497）、1.2gの水素化デキストラン、および2.8gのデキ

ストラン (MW = 15,000) と混ぜ合わされた。これらの成分は 70 ml の脱イオン水 (シグマ・アルドリッチからの分子生物学試薬) 中に溶解された。この溶液は次に、約 3 時間還流された。溶液は 83.2 cc の 0.25 M NaOH (フィッシャー ACS、カタログ # S318-3) の、溶液への添加に先立ち、静置して冷却された。溶液の最終 pH は、8.5 であった。6 日後、pH は 7.64 に低下し、0.6 cc の 0.25 M NaOH 溶液が添加されて pH を 8.5 に調整した。溶液中の銅および鉄濃度の分析は、AA および / ICP によって行なわれた。溶液は遠心分離され、暗緑色の溶液が無菌のバイアル内へ貯蔵された。

(実験デザイン I)

(細胞系および標準的な薬剤)

10

【0095】

細胞系は、標準的な組織培養法を用いて増殖され、投薬に先立ちマイクロタイタープレートに播種された。対照群は、ベース化合物 (60 µg/mL) のみの処理、完全培地の対照、および陽性対照 (ドキソルピシン、1 µM) を含んでいた。組成物の各濃度レベルにつき、各細胞系の 8 つの重複試料が処理された。

(細胞培養)

【0096】

以下の実験に使用された細胞系は、以下の表 1 にリストされている。組成物は、挙げられた充実性腫瘍および液性腫瘍について試験されたが、しかし任意のタイプの癌に有効に使用されてよい。細胞系は無菌条件下に増殖され、HEPA 濾過 CO₂ 組織培養インキュベータ中で、5% CO₂ および湿度 95% を用いて、37°C においてインキュベートされた。各細胞系は、実験での使用のため、毎週～週 2 回か、またはそれより頻繁に継代培養された。

20

(³H (トリチウム) -チミジンアッセイ)

【0097】

腫瘍系に対する化合物の抗細胞効果は、³H-チミジンの DNA 取込みアッセイにより査定された。トリチウムチミジンは、1 mCi のストックとして購入され、培地中で 1:25 に希釈された。収穫の 1 日前に、25 µL (1 µCi) の希釈された ³H-チミジンが各ウェルへ添加され、プレートは一晩インキュベートされた。翌朝、細胞はスカトロン・セルハーベスター (Skatron cell harvester) (モレキュラー・デバイス・コーポレーション (Molecular Device Corporation)、カリフォルニア州、サニーバール (Sunnyvale)) を用いて、グラスファイバーフィルター上に収穫された。フィルターは次に、シンチレーションバイアルに入れられ、シンチレーションカクテルが添加された (ベックマン・コールター・インク、カリフォルニア州、フラートン)。バイアルは次にベックマン LS 6000 IC 液体シンチレーションカウンター (ベックマン・コールター・インク、カリフォルニア州、フラートン) で読取られ、データは 1 分間あたりのカウント (CPM) として記録された。データは、処理のためロータス (Lotus) 123 へ移された。

30

【0098】

全ての細胞系について、細胞は収穫され、遠心分離されて培地が除去され、新鮮な完全培地中に懸濁された。試料が採取され、細胞密度が測定された。全ての細胞カウントは、コールター・モデル Z₁ セルカウンター (ベックマン・コールター・インク、カリフォルニア州、フラートン) を用いて測定され、生存率はヨウ化プロピジウム染色で測定された。分析は次いで、コールター EPIC S XL フローサイトメーター (ベックマン・コールター・インク、カリフォルニア州、フラートン) で行なわれた。全ての細胞系は、各々完全培地中に、ウェルあたり 5 × 10³ 細胞で播種された。2 日目、細胞は、8 つの希釈度の、開示された組成物のみで、または、60 µg/mL の濃度のベース組成物と組合されて洗浄された。対照は、ベース化合物のみを用いた洗浄により行なわれた。最初の処理の 4 日後に、プレートが分析された。結果は、下に要約されている：

40

【表 2】

表 1		
細胞系	IC ₅₀ (μg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)
	組成物	組成物およびベース化合物 (60μg/mL)
CAKI-1 腎臓	1.440	1.138
DLD-1 結腸	1.430	0.196
NCI-H23 肺	>10	1.718
NCI-H 460 肺	1.183	0.131
LOX IMVI 黒色腫	6.718	0.513
MCF7 乳房	2.213	0.972
OVCAR-3 卵巣	3.662	0.299
PC-3 前立腺	>10	1.869
SNB-75 CNS	0.895	0.095
ZR-75-1 乳房	>10	2.031
CEM-SS 白血病 1	5.87	
CEM-SS 白血病 2	4.975	

10

【0099】

20

以下に記述された、腫瘍細胞系に対して行なわれた実験は、HT29ヒト結腸腺癌細胞を除いて、表1の結果とともに呈示されている。組成物プラス、60 μg/mLのベース化合物は、100%の細胞を殺す結果を生じたが、CAKI-1腎臓系は例外であり、それは99%の細胞を殺す結果となった。さらに、必要であれば、増加されたベース化合物のさらなる添加は、細胞毒性を増大させる。10 μg/mLまでの組成物のみに対して耐性であった3つの細胞系、すなわち、NCI-H23肺、ZR-75-1乳房、およびPC-3前立腺においては、組成物に対する60 μg/mLのベース化合物の添加により、耐性は完全に克服され、100%の細胞を殺す結果となった。ベース化合物に対し暴露された全ての細胞系について、開示された組成物と併用されたベース化合物の、相乗性の細胞毒性効果により、IC₅₀は有意に低下され、ベース化合物の添加による増強された細胞殺生を証明した。ベース化合物に対し暴露された全ての細胞系について、ベース化合物を用いた組成物は、乳癌および他の癌の治療における主力の化学療法薬であって当業者には多くの重い副作用をもつことが周知の、ドキソルビシンの細胞殺生に等しいか、または上回っていた。

30

(実施例2)

【0100】

図1、24時間のインキュベーションの後のHT29ヒト結腸腺腫細胞系によるROS(反応性酸素種)の放出。

【0101】

データは、HT29細胞の、10 μg/mLの開示された組成物、60 μg/mLの組成物プラスベース化合物、および、60 μg/mLの鉄デキストランベース化合物単独を用いた、24時間のインキュベーション後に得られた。アッセイは、細胞がその中で増殖しているウェルへ添加された、非蛍光性基質の添加に左右される。ROSが存在すれば、基質は破壊されて蛍光性の産物を形成する。図1のデータは、組成物が、対照の新鮮な培地およびベース化合物のレベルを超えて、ROSを産生することを証明している。データはさらに、ベース化合物と併用された開示された組成物による、開示された組成物またはベース化合物単独のそれを超えた、増大されたROSの産生を証明している。開示された組成物およびベース化合物の組合せは、がん患者に対し放射線療法がそうするように、有意な量のROSを生成したが、それは一般にDNA損傷性のフリーラジカルの発生によりその細胞毒性作用を及ぼすと信じられている。放射線療法との併用可能な、開示された組

40

50

成物とベース化合物との併用は、放射線によって発生される、癌を殺すフリーラジカルの量を増加させることが可能であり、放射線単独を上回る細胞殺生を及ぼす。このことはこの技術において、放射線の細胞毒性作用を増幅および強化する化合物、放射線増感剤として公知である。

(実施例 3)

【0102】

図 2 A は、NCI-H23 肺細胞に対する開示された組成物の平均阻害濃度のグラフを開示している。阻害濃度 50 (「IC₅₀」) は、実験処置において使用された細胞の 50 % 以上に対して阻害性または有効性である、使用された組成物または化合物の濃度として定義される。開示された組成物は、NCI-H23 肺細胞へ適用された場合、約 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の非常に有効な IC₅₀ レベルを有する。図 2 B は、開示された組成物、ベース化合物、ドキソルビシン、および対照の、培地および MTS 試薬 (プロメガ (Promega)、米国ウィスコンシン州マジソン) の双方における、NCI-H23 肺細胞の吸収値を提供する。MTS 試薬はテトラゾリウム塩であり、約 490 nm における光の放射を用いて、生きた細胞へ適用されると、着色された化合物、ホルマザンへ転換される。開示された組成物は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量において、培養された NCI-H23 肺細胞の 40 パーセントを阻害した。ドキソルビシンは高い阻害活性を示すが、インビボで用いられた場合多くの有害な副作用をもつこともまた公知であり、開示された組成物はこれを引き起こすことがない。吸収値の単位もまた示されており、いくつかのバックグラウンドの吸収も生じることが推定され、典型的には 4 時間のインキュベーションの後で 0.2 ~ 0.4 単位の間の範囲内である。図 2 C は、異なる IC レベルに関して開示された組成物の予測される理論的な吸収レベルを開示している。

【0103】

図 2 D に示されるように、NCI-H23 肺細胞は、ベース化合物の添加された 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用量の組成物の双方に対し、ほとんどまた全く耐性を示さなかった。ベース化合物の添加された組成物のこの組合せは、結果として、インビトロでの 99 ~ 100 % を超える細胞阻害を生じる結果となり、それはドキソルビシンのものと等しい。ベース化合物と合わせた組成物の濃度は、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。図 2 E は、組成物プラスベース化合物の組合せについての吸収値および阻害パーセントを示しており、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の低用量において NCI-H23 肺細胞の 100 % 阻害を示した。図 2 F は、実験に関する回帰アウトプットの統計的結果を示している。

(実施例 4)

【0104】

図 3 A は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度における、開示された組成物の高い活性および細胞毒性による、NCI-H460 肺細胞の 90 % を超える阻害を示している。開示された組成物はまた 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において高度に有効であって、90 % の阻害率があり、わずか 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でほぼ 50 % の細胞阻害があった。開示された組成物はまた、非常に低い用量で有意な阻害パーセントを示す。図 3 B は、示されているように、多様な用量からの吸収値単位、ならびにいろいろな用量についての阻害パーセントを提供しており、それらは非常に高かった。図 3 C は、組成物の 1.183 $\mu\text{g}/\text{mL}$ という低い用量における IC₅₀、および回帰アウトプットの統計解析を開示している。

【0105】

本実施例は、NCI-H460 肺細胞に対する組成物プラスベース化合物の毒性の効果を試験する。これらの試験の結果は、図 3 D、3 E、および 3 F に示されている。図 3 D は、開示された組成物にベース化合物が添加されている NCI-H460 肺細胞の、組成物それ自体の結果に比較して、増大された細胞殺生を示している。図 3 A に示されるように、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の化合物が、結果として 100 % の細胞殺生を生じるために適用された。ベース化合物が組成物へ添加された場合、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の組成物プラスベース化合物が、図 3 D に示されるように、結果として 100 % の細胞殺生を生じた。組成物プラスベース化合物の濃度は、非常に効率的な 0.131 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で IC₅₀ 阻害を生じる結果と

なり、結果として実験細胞の IC_{50} 阻害を生じるための組成物単独の濃度は、 $1.183 \mu g/ml$ であった。図 3 E は、示されているように、多様な用量からの吸収値単位、ならびにいろいろな用量についての阻害パーセントを提供しており、それらは非常に高かった。組成物とベース化合物との併用は、NCI-H 460 肺細胞に対する毒性活性においては非常に有効であることが示された。

(実施例 5)

【0106】

本実施例は、MCF 7 乳房細胞に対する組成物単独の毒性の効果を試験する。図 4 A は、開示された組成物の、MCF 7 乳房細胞に対する非常に高い活性を示している。組成物は、 $10 \mu g/mL$ において 90 % を超える細胞の阻害を、 $3 \mu g/mL$ で 60 % を超える阻害を示した。図 4 B は、開示された組成物プラス培地および MTS に関する吸収値を提供する。図 4 C は、計算された IC_{50} 、 $2.213 \mu g/mL$ 、および 3.000 および 1.000 濃度に関する回帰アウトプットを提供する。

10

【0107】

図 4 D、4 E、および 4 F は、ベース化合物と併用された組成物の、MCF 7 乳房細胞に対する毒性作用を試験している。これらの試験は、図 4 A、4 B、および 4 C に示されたような開示された組成物単独に比較して、この細胞系へのベース化合物の添加による増強された細胞殺生を示している。図 4 A は、 $10 \mu g/mL$ が 90 % 細胞殺生に必要であったことを示している。ベース化合物との併用において試験された場合には、わずか $3 \mu g/mL$ 組成物が 100 % の細胞殺生に必要とされ、同じ細胞系について IC_{50} を $0.972 \mu g/mL$ に低下させる。

20

(実施例 6)

【0108】

図 5 A は、ZR-75-1 乳房細胞に対する、開示された組成物の毒性作用を図式化している。これらの試験は、 $10 \mu g/mL$ で約 35 % の、ZR-75-1 乳房細胞の阻害を示している。この細胞系は、約 $10 \mu g/mL$ までの濃度において、組成物に対する耐性を示した。吸収値および阻害パーセントは、図 5 B および 5 C に示されている。

【0109】

図 5 D は、ZR-75-1 乳房細胞に対する、開示された組成物とベース化合物との組合せの、非常に高い活性を開示している。この組合せの IC_{50} は、驚くべき濃度であることが見出され、約 $2.031 \mu g/mL$ と計算された。ZR-75-1 乳房細胞の耐性は、組成物へのベース化合物の添加により本質的に除去された。 $10 \mu g/mL$ の組成物プラスベース化合物は、この細胞系に関し、結果として約 100 % の細胞殺生を生じ、ほとんど副作用やマイナスの面がなく治療上非常に有効である。図 5 E は、 $3 \mu g/mL$ および $10 \mu g/mL$ 用量において有意な阻害をもつ、本実験の吸収値および阻害パーセントを提供する。図 5 F は、約 $2.031 \mu g/mL$ という低濃度の、計算された IC_{50} 率および、実験についての回帰アウトプットを開示している。

30

(実施例 7)

【0110】

図 6 A は、PC-3 前立腺細胞に対する、組成物の毒性試験の結果を示している。PC-3 前立腺細胞は、約 $10 \mu g/mL$ までの濃度の組成物に対し耐性を、 $0.01 \mu g/mL$ ではいくらかの細胞阻害を示す。 $10 \mu g/mL$ の用量は、結果として前立腺細胞の 17 % 阻害を生じる。図 6 B および 6 C は、前立腺細胞に対する組成物の実験について、吸収値および統計的結果を提供する。

40

【0111】

図 6 D は、PC-3 前立腺細胞に対する、組成物プラスベース化合物の毒性の効果を示している。PC-3 前立腺細胞の耐性は、ベース化合物の添加により本質的に除去される。ベース化合物の添加は、図 6 A の組成物単独に比較して増強された細胞殺生を、この細胞系に対するこれらの試験において示している。ベース化合物と併用された組成物の $10 \mu g/mL$ の濃度は、結果として 100 % の細胞殺生を生じ、 IC_{50} は $1.869 \mu g/mL$

50

ml の濃度で極めて低かった。3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のように低い濃度が、結果としてこの細胞系の約 90 % の障害を生じた。図 6 E および 6 F は、この実験の吸収値および統計的結果を提供する。

【0112】

0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度レベルにおいて、図 6 A および 6 D の双方において見出される異常な結果の原因は決定されなかった。

(実施例 8)

【0113】

図 7 A は、DLD-1 結腸細胞に対する、組成物の高い毒性効果を示している。組成物は、非常に低い濃度を含め、全ての濃度において有意な細胞殺生を示した。結果として生じる障害パーセントは、図 7 B に示されたように、非常に高く、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 95 % の DLD-1 結腸細胞の障害であった。図 7 C は、実験結果の統計解析を提供する。

10

【0114】

図 7 D は、DLD-1 結腸細胞に対する、ベース化合物と併用された組成物による、毒性実験の結果を提供する。これらの試験は、組成物単独に比較して、ベース化合物の添加による増強された細胞殺生を示した。図 7 A および 7 B に示された、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の組成物単独による 95 % の細胞殺生に比較して、図 7 D および E に示されるように、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という極めて低い濃度の組成物プラスベース化合物が、100 % の細胞殺生に必要とされた。IC₅₀ は、ベース化合物の添加により、同じ細胞系について、組成物単独の 1.430 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の IC₅₀ から、0.196 $\mu\text{g}/\text{ml}$ へ低下された。

20

(実施例 9)

【0115】

図 8 A は、OVCAR-3 卵巣細胞に対する、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のかなり低い濃度における組成物の、90 % 障害率を超える高い毒性の効果を開示している。これらの実験の吸収値および統計的結果は、図 8 B および 8 C に示されている。

【0116】

OVCAR-3 卵巣細胞に対する、ベース化合物と併用された組成物の毒性効果は、図 8 D に示されている。これらの試験は、組成物単独に比較して、ベース化合物の添加による増強された細胞殺生を示した。組成物とベース化合物との組合せは、結果として 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 100 % の細胞殺生を生じたのに対し、組成物単独では、結果として 95 % の細胞殺生を生じるために 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を要した。組成物およびベース化合物の組合せについての IC₅₀ は、非常に低い濃度の 0.299 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで低下された。

30

(実施例 10)

【0117】

CAKI-1 腎細胞に対する組成物の毒性効果は、図 9 A に示されている。組成物はこの細胞系に対し、低い用量であっても非常に高い活性を示した。障害パーセントは、20.3 % 障害には 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のような低い濃度で、細胞系の 83.6 % 障害には 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度において、組成物の有意な活性を示した。図 9 B および 9 C 参照。

40

【0118】

組成物プラスベース化合物の併用は、図 9 D に示されたように、CAKI-1 腎細胞に対し非常に高い活性を示した。これらの試験は、図 9 A に示されたような組成物単独の使用に比較して、ベース化合物の添加による増強された細胞殺生を示している。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の組成物は、結果として 99 % の細胞殺生を生じた。IC₅₀ は、この細胞系について、1.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった組成物単独の IC₅₀ とは異なり、ベース化合物の添加により、1.138 $\mu\text{g}/\text{mL}$ へ低下された。CAKI-1 腎細胞に対する実験においては、組成物および、組成物プラスベース化合物の双方が、低い IC₅₀ 率で非常に有意な活性を示した。

(実施例 11)

50

【0119】

図10Aは、LOX IMVI 黒色腫細胞に対する組成物の毒性効果を示す。実験は、組成物の高い活性を示し、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において、この細胞系の約82%の阻害を生じる結果となった。図10Bは、実験についての吸収率および阻害パーセントと、 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ におけるいくつかの阻害を示している。図10Cは、 $6.718 \mu\text{g}/\text{mL}$ の計算された IC_{50} を含め、結果についての統計的解析を提供している。

【0120】

図10Dは、LOX IMVI 黒色腫細胞に対する、組成物プラスベース化合物の高い活性を示している。ベース化合物と組合された組成物には、非常に低い用量におけるものを含めて、この細胞系に対し高い毒性作用があった。これらの試験は、図10Aに示された組成物単独の使用に比較して、この細胞系へのベース化合物の添加によって増強された細胞殺生を示している。 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度の組成物は、結果として100%の細胞殺生を生じたが、図10Aに示されたように、組成物単独による82%の細胞殺生には $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ を要した。組成物単独の IC_{50} は $6.718 \mu\text{g}/\text{mL}$ であったが、ベース化合物の添加により、同じ細胞系について $0.513 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで低下された。

(実施例12)

【0121】

組成物の毒性は、SBN-75 CNS細胞に対して試験された。結果は図11Aに示されており、組成物の非常に高い活性を示す。 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度は、結果として100%のSBN-75 CNS細胞の阻害を生じ、わずか $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度が、この細胞系の約85%の阻害を生じる結果となった。図11Bおよび11Cは、吸収値および結果の統計的解析を提供する。

【0122】

図11Dは、組成物プラスベース化合物の、SBN-75 CNS細胞に対する高い毒性効果を開示している。組成物とベース化合物との組合せは、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、および $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の用量において、非常に好首尾の100%阻害率を生じる結果となった。これらの結果は、この細胞系へのベース化合物の添加により、組成物単独の使用に比較して増強された細胞殺生を示している。 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の化合物プラスベース組成物は、100%細胞殺生のための $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の組成物単独の濃度に比較して、100%の細胞殺生を生じる結果となった。 IC_{50} は、同じ細胞系について、ベース化合物の添加により、 $0.095 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで低下された。

(実施例13)

【0123】

CEM-SS細胞は、エイズ研究および参照試薬貯蔵所 (EIDS Research and References Reagent Repository) (メリーランド州ベセスダ) から入手された。これらの細胞は、T-75 フラスコ内で、10%ウシ胎児血清 (熱不活性化)、2 mMのL-グルタミン、 $100 \text{U}/\text{mL}$ のペニシリン、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ のストレプトマイシン、および $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ のゲンタマイシンとともに、RPMI-1640培地 (フェノールレッドなし) を含む組織培養液中で継代された。トリチウムチミジンアッセイの1日前に、細胞は1:2に分割され、細胞毒性試験の時間にそれらが対数増殖期にあることを確認した。アッセイの日に、細胞は遠心分離により収集され、上記の組織培養液で2回洗浄され、 mL あたり 5×10^4 細胞に再懸濁され、新鮮な組織培養液中に再懸濁された。全細胞および生存率の計数は、血球計を用いて行なわれた。アッセイに先立つ細胞生存率は、トリパンブルー色素排出により測定され、そうであるべき95%を超えていた。培養物は、 37°C 、5% CO_2 において、6日間インキュベートされた。

【0124】

組成物単独の、CEM-SS白血病細胞に対する高い毒性効果は、図12A、12B、12Cに示されている。これらの図は、 $5.87 \mu\text{g}/\text{mL}$ の IC_{50} および、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の用量における約98%の高度に有効な細胞殺生率を示している。

(実施例14)

【0125】

組成物単独の、CEM-S S白血病細胞に対する高い活性は、図13A、13B、13Cに示されている。これらの図は、 $4.975 \mu\text{g}/\text{mL}$ の IC_{50} および、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の用量における約100%の高度に有効な細胞殺生率を示している。

【0126】

(実験デザインII)

本実験は、単独および、鉄デキストランのベース化合物との組合せにおける開示された組成物の、抗ウイルス効果および細胞毒性効果を、HCV RNAレプリコンを用いてインビトロで評価するべくデザインされた。全ての鉄デキストラン量は、鉄デキストランから由来する元素鉄のおよその相当量として測定された。鉄デキストランのベース化合物はまた、対照として単独で実施された。このプロトコールはまた、所望により、哺乳類の治療のために有効な濃度を測定するべく、他のウイルス、細菌、および原虫の実験にも適用されてよい。

【実施例2】

【0127】

(材料および方法)

以下の実験は、無菌のコロイド溶液中に $4.527 \text{mg}/\text{ml}$ の組成物を含んでいる組成物「HP」バリエーションと $\text{pH}7.8$ ；および、無菌のコロイド溶液中に $4.939 \text{mg}/\text{ml}$ の組成物を含んでいる組成物「4」バリエーションを用いて行なわれた。組成物-HPおよび組成物-4の双方は、使用に先立ち、水酸化ナトリウムを用いて $\text{pH}7.8 \sim 8.0$ に調整された。ベース化合物は、 $50 \text{mg}/\text{ml}$ の無菌のコロイド溶液であった。

(HCV RNAレプリコン)

【0128】

細胞系ET (luc-ubi-neo/ET) が使用された。ETは、安定なルシフェラーゼ (「LUC」) レポーターを含んでいる新規なHCV RNAレプリコンであって、この特殊な構築物はまだ学術文献に記述されていない。それは細胞系5-2 (1) に類似しているが、細胞系をより強健にし、かつ、抗ウイルススクリーニング用の安定なLUC発現を提供する付加的な修飾を含んでいる。このレプリコンの構造は、以下に図によって示されている。

【0129】

細胞系ETのHCV RNAレプリコンの構造は、HCV (5') の5' 非翻訳領域 (「NTR」) (「IRES」) を含んでおり、それはホタルルシフェラーゼ (「Luc」) 、ユビキチン (「Ubiquitin」) 、およびネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (「Neo」) 融合タンパク質の産生を駆動する。ユビキチン切断は、LUCおよびNeo遺伝子を放出する。EMCV IRESエレメント (E-I) は、HCV構造タンパク質、NS3-NS5の翻訳を制御する。NS3タンパク質はHCVポリプロテインを切断し、成熟したNS3、NS4A、NS4B、NS5A、およびNS5Bを放出し、それらはHCVの複製に必要である。レプリコンの3' 末端には、HCVの基準の3' NTRがある。

(一定の縮尺で描かれていない)。

【0130】

LUCレポーターは、HCV複製の間接的な目安として使用される。LUCレポーターの活性はHCV RNAレベルに正比例し、かつ陽性対照、抗ウイルス化合物は、LUCまたはRNAエンドポイントのいずれかを用いて同等に挙動する。LUCエンドポイントの使用は、HCV RNAよりもさらに経済的であり、化合物のライブラリをスクリーンするためのハイスループット適用に使用可能である。

【0131】

HCV RNAレプリコン抗ウイルス評価アッセイは、5つの半対数濃度の各々における化合物の影響を調べた。プレートレイアウトは、以下の図17および18に示されている。ヒトインターフェロンアルファ2bは、陽性対照化合物として実施毎に含まれてい

た。E T系のサブコンフルエントな培養物は、細胞数の分析（細胞毒性）または抗ウイルス活性専用の、96 ウェルプレート内へ播種され、翌日、組成物およびベース化合物の双方のバリエーションが適当なウェルへ添加された。細胞は、まだ細胞がサブコンフルエントである72時間後に処理された。化合物の IC_{50} および IC_{90} 値は、HCV RNAレプリコン誘導性のLUC活性から、ステディ・グロー試薬（steady-glo reagent）（プロメガ（Promega））を用いて得られた。化合物の TC_{50} および TC_{90} 値は、細胞数および細胞毒性の比色指示薬、サイト・トックス-1細胞増殖アッセイ（Cyto Tox-1 cell proliferation assay）（プロメガ）を用いて計算された。化合物の TI_{50} および TI_{90} 値は、スプレッドシートから計算された。

（結果）

10

（HCV RNAレプリコンの抗ウイルス評価）

【0132】

組成物「HP」のバラエティは、HCV RNAレプリコンに対し、ベース化合物の添加なしに、弱い～中程度の抗ウイルス活性を有していた。結果は、 IC （阻害濃度） $\sim 0 = 0.77 \sim \mu g/ml$ ； TC （毒性濃度） $\sim 0 = 6.23 \mu g/ml$ 、および TI （治療指数、これにおいて $TI = TC_{50} / IC_{50}$ ） $= 8.1$ において検出された。図20参照。組成物4バリエーションは、HCV RNAレプリコンに対し、ベース化合物の添加なしに、弱い～中程度の抗ウイルス活性を示し、 $IC \sim 0 = 0.84 \mu g/ml$ ； $TC \sim 0 = 6.52 \sim \mu g/ml$ ；および $TI = 7.7$ を有した。図19参照。陽性対照、ヒトインターフェロンアルファ-2bの結果は、図21に示されている。また図22も参照のこと。

20

（組成物4およびベース化合物の至適濃度の実験）

【0133】

組成物4はベース化合物と組合わされ、HCV RNAレプリコンにおいて抗ウイルス活性および細胞毒性を測定した。薬物希釈のマトリックス（組成物4およびベース化合物）は、 $1.563 \sim 50 \mu g/ml$ のベース化合物に対し、 $0.195 \sim 50 \sim \mu g/ml$ の組成物4の範囲にわたり、プレート上に配列された。この実験の結果は、図23から37までに示されている。包括的効果曲線（ $-100 \sim 100\%$ 有効性プロット）においては、抗ウイルス効果は $6.25 \mu g/ml$ 以上の用量において明白であった。

【0134】

30

組成物4は、HCV RNAレプリコンルシフェラーゼ（「LUC」）の50～75%阻害範囲を示した。組成物の用量 $p f$ が $12.5 \sim \mu g/ml$ を超えて増加されると、レプリコンLUC活性の75～100%を阻害する。

【0135】

ベース化合物と一緒に組成物の活性範囲が分析される場合（50～100%有効性プロット）、組成物が $6.25 \mu g/ml$ を超えて増加されると、活性に用量依存性の増加があることが明らかに示されており、ベース化合物の濃度が約 $12.5 \sim \mu g/ml$ 以上から増加するにつれ、傾向はより高い活性に向かうことが示された（3D曲線のピーク、コンタープロットの左上の4つのボックス）。図22、24、26、28、および32参照。

40

【0136】

化合物毒性の包括的な評価（0～150%生存率/毒性曲線）においては、組成物は $12.5 \sim \mu g/ml$ を超えると毒性となり、さらに濃度が増すにつれ、50%～0%の生存率となるように見える。

【0137】

曲線の細胞毒性部分（0～50%生存率）は、用量が $6.25 \sim \mu g/ml$ を超えるにつれて、ベース化合物の濃度に関係なく明らかな組成物用量依存性が、毒性において増加するかどうかを測定するべく分析された。 12.5% を超える組成物濃度では、大多数の細胞が死んだ。

【0138】

50

生存率／毒性曲線の生存部分（50～100％生存率）は、組成物が12.5～ $\mu\text{g}/\text{ml}$ から6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで低減された際のますます増える生存率の増加と、それに続く、薬物濃度がさらに低減される際の生存率のさらに劇的な増加を測定するべく分析された。

（組成物4およびベース化合物の至適濃度の実験）

【0139】

本発明者らが興味をもったものについて用量濃度の範囲が試験された。化合物4とベース化合物との組合せのマトリックスは、5.5～13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の組成物4と、50～1050 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のベース化合物とを用いて配列された。図33から36までを参照。HCV RNAレプリコンシフェラーゼ活性のパーセント阻害は、8.5～ $\mu\text{g}/\text{ml}$ から5.5～ $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの組成物4では着々と増加し、550～ $\mu\text{g}/\text{ml}$ のベース化合物と併用されると正に影響された。

10

【0140】

細胞生存率は、特に組成物4のより高い濃度において、組成物ベース化合物の濃度が50～ $\mu\text{g}/\text{ml}$ を超えて増加すると素早く低下した。

（結論）

【0141】

組成物HP（TI＝8.1）および組成物4（TI＝7.7）は、HCV RNAレプリコンに対し、インビボにおいて弱い～中程度の活性があった。これらの薬物の併用が結果としてそれらの活性の増加を生じるかどうかを調べるため、組成物4およびベース化合物の濃度を変えるマトリックスが利用された。これらの実験の結果は、組成物4およびベース化合物の至適混合物が、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のベース化合物と一緒に約6～7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の組成物4、となることを見出した。

20

【実施例3】

【0142】

（材料および方法）

以下の実験は、無菌のコロイド溶液中に4.527 mg/ml の組成物を含んでいる組成物「HP」バリエーション、およびpH7.8；および、無菌のコロイド溶液中に4.939 mg/ml の組成物を含んでいる組成物「4」バリエーションを用いて行なわれた。組成物－HPおよび組成物－4の双方は、使用に先立ち、水酸化ナトリウムを用いてpH7.8～8.0に調整された。ベース化合物は、50 mg/ml の無菌のコロイド溶液であった。

30

（テトラゾリウム色素還元アッセイ）

【0143】

細胞生存率は、テトラゾリン含有色素混合物セル・タイター（Cell Titer）96（登録商標）（プロメガ、ウィスコンシン州マジソン）を用いて染色することにより測定された。混合物は、代謝活性のある細胞のミトコンドリア酵素により、可溶性のホルマザン産物へ代謝され、細胞数の迅速な量的分析を可能にする。培地はプレートから除去され、100 μL の新鮮な培地および10 μL のセル・タイター96（登録商標）で置換えられた。プレートは37℃で4時間再インキュベートされ、モレキュラー・デバイズ（Molecular Device）Vmaxプレートリーダーにより、490nmおよび650nmにおいて分光光度法により読取られた。組成物の添加のない対照ウエルに比較した、組成物処理されたウエルのパーセント細胞生存率は、社内のコンピュータプログラムを用いて計算された。

40

（HBV抗ウイルス評価アッセイ）

【0144】

HBV（B型肝炎ウイルス）ayw1株を産生するHepG2 2.2.15細胞は、コラーゲンコートされた96ウエルマイクロタイタープレートに、2％ウシ胎児血清を補足されたDMEM培地を用いて、2.5×10⁴/ウエルの密度で播種された。細胞の播種の1日後、ウエルは洗浄され、培地は、半対数シリーズで培地中に希釈された試験化合物を含有する完全培地で置換えられた（代表的なプレートレイアウトについては図37を

50

参照のこと）。培地は、組成物の最初の添加の3日後に、新たに希釈された化合物を含有する新鮮な培地で一度置換えられた。3TC（ラミブジン）は、陽性対照化合物として使用された。

【0145】

試験化合物の最初の投与の6日後、細胞培養上清が収集された。組織培養上清中に存在するビリオン関連HBV DNAは次に、HBV a y w l 株由来のプライマーを用いてPCR増幅された。続いて、PCR増幅されたHBV DNAは、増幅されたHBV DNAへのプローブのハイブリダイゼーションに続く、クエンチされた蛍光プローブ分子のエキソ型核酸分解から結果として生じる蛍光シグナルの増加をモニターすることにより、タクマン（TaqMan）量的PCRアッセイにおいてリアルタイムで検出された。標準曲線は、HBV a y w l プラスミドDNAを用いて作成された。試料はPCRにより二重に分析され、標準曲線の範囲内に入る試料の平均値が、HBV DNAのコピー数を割当てて使用された。

10

【0146】

OD（光学密度）値は、細胞生存率の結果から得られ、リアルタイムのPCRによって得られたビリオンDNAのコピー数は、DNAコピー数のパーセントを計算する社内のコンピュータプログラムを用いて分析され、試料IC₅₀の抗ウイルス活性を計算するべく使用された。細胞生存率データは、TC₅₀を計算するべく使用された。治療指数（TI）は、TC/ICから計算された。これらの結果は、グラフにより表示されている。図39～40参照。付加的なスプレッドシートが、データからIC₅₀、TC₉₀、およびTI₉₀値を測定するべく用いられた。

20

（BVDV抗ウイルス評価アッセイ）

【0147】

マディン・ダービー（Madin-Darby）ウシ腎臓（「MDBK」）細胞は、T-75フラスコ内へ継代された。アッセイの前日、細胞はトリプシン処理され、ペレット化され、計数され、96ウェル平底組織培養プレート内の組織培養液中に、ウェルあたり100μlの体積中に1×10⁴/ウェルで再懸濁された。細胞の播種の1日後、ウェルは洗浄され、培地は、半対数シリーズで培地中に希釈された種々の濃度の試験化合物を含有する完全培地（2%リンパ液）で置換えられた（代表的なプレートレイアウトについては図22を参照のこと）。あらかじめ力価の測定された、ウシウイルス性下痢ウイルス（BVDV）のアリコートは、各実験の直前にフリーザー（-80℃）から移された。ウイルスは組織培養液中へ希釈されて、各ウェルへ添加されるウイルスの量が、感染後6～7日で完全な細胞殺生を生じるようにした。

30

【0148】

細胞の生存率は、薬物添加後6～7日に、テトラゾリン含有色素混合物セル・タイター（Cell Titer）96（登録商標）（プロメガ、ウィスコンシン州マジソン）を用いて染色することにより測定された。混合物は、代謝活性のある細胞のミトコンドリア酵素により、可溶性のホルマザン産物へ代謝され、細胞数の迅速な量的分析を可能にする。培地はプレートから除去され、100g lの新鮮な培地および10p. lのセル・タイター96（登録商標）で置換えられた。プレートは37℃で4時間再インキュベートされ、モレキュラー・デバイズ（Molecular Device）Vmaxプレートリーダーにより、490nmおよび650nmにおいて分光光度法により読取られた。組成物の添加のない対照ウェルに比較した、組成物処理されたウェルのパーセント細胞生存率は、社内のコンピュータプログラムを用いて計算され、それはウイルスの細胞変性性効果におけるパーセント減少と、対照値に比較された各薬物濃度における細胞数とを図表化する。プログラムは、BVDVの細胞変性性効果を50%まで減少させる薬物の阻害濃度（IC₅₀）、および細胞の50%を殺す毒性濃度（TC₅₀）を内挿する。

40

（Cymolgousサルの一次肝細胞培養物における組成物の細胞毒性）

【0149】

高い生存率および代謝活性をもつカニクイザルの一次肝細胞の24ウェルプレートは、

50

セドラ・コーポレーション (Cedra Corporation) によって調製された。実験が開始されたとき、細胞は～85%コンフルエントであった。組成物の細胞毒性は、半対数シリーズで無血清培地 (SFM) 中に希釈された、薬物の6つの濃度において査定され、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ は高い試験濃度として使用された。4つの未処理の対照ウエルは、SFMのみを含有していた。組成物および培地は、添加後2および5日に交換された。添加後7日に、組成物および培地は除去され、ウエルは培地ですすがれた。セル・タイター96 (登録商標) (プロメガ) が、ウエル中の新鮮な培地へ添加され、吸収は上記のように測定された。各組成物濃度のウエルの平均吸収は、未処理の細胞対照と相対的にプロットされ、 TC_{50} 値が、これらの曲線から外挿された。図58参照。

(結果)

10

(HBV抗ウイルス評価)

【0150】

化合物組成物HPは、HepG2 2.2.15アッセイにおいて、HBVに対し多少の抗ウイルス活性を示し、 $\text{IC}_{50} = 11 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $\text{TC}_{50} = 64 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、および $\text{TI} = 5.8$ であった。HBV抗ウイルス評価実験の生データは、図39～41に示されている。

【0151】

ベース化合物を組成物HPと一緒に組合せることの効果は、図42～50に示されている。ベース化合物は、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、または $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ において、各々3つの濃度、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $3.16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、および $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の組成物HPとともに使用された。ベース化合物単独および組成物HP単独もまた試験された。抗ウイルス活性または細胞毒性はほとんど識別されなかった。

20

【0152】

上記の実験において抗HBV抗ウイルス活性が期待されたことから、ベース化合物の濃度を変更された。組成物HPの抗HBV抗ウイルス活性に対する、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のベース化合物の効果が試験された。抗ウイルス活性はほとんど識別されなかった。 $\text{TC}_{50} = 26 \mu\text{g}/\text{ml}$ の組成物HPプラス $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のベース、が観察された。この実験に関する生のデータは、図49～50に示されている。化合物-4の抗HBV抗ウイルス活性もまた試験された。化合物は、アッセイにおいてほんのわずかばかり活性があった、図41～43参照。

30

(BVDV抗ウイルス評価)

【0153】

組成物HPはMDBK細胞において毒性であり、 $\text{TC}_{50} = 0.97 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。組成物4は、BVDVに対し、妥当な抗ウイルス活性を示し (図40～41参照)、 $\text{TC}_{50} = 17.3$ 、 $\text{IC}_{50} = 2.6$ 、 $\text{TI} = 6.7$ であった。組成物-HPは、BVDVに対し低い抗ウイルス活性を示し、 IC_{50} は達成されなかった。図54～55参照。

(カニクイザルの一次肝細胞における細胞毒性)

【0154】

組成物HPは、カニクイザルの一次肝細胞培養物により、中程度の $\text{TC}_{50} = 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ を示した。一次肝細胞実験に関する生のデータは、図58に示されている。

40

【0155】

図59～85は、ベースの添加のある、またはない、種々の濃度の組成物の効果を実証するためのさらなる実験を開示している。

【0156】

たとえば、図59～61は、結核菌 (mycobacterium tuberculosis) を用いた、組成物のインビトロの活性の実験結果を示している。

【0157】

さらに、図62～77は、C型肝炎ウイルスに関するような、抗ウイルス評価を示す。

【0158】

さらに、図78～120は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に関する抗ウイルス活性

50

を示す。

(議論)

【0159】

組成物HPおよび組成物4は、弱い～中程度の抗HBV抗ウイルス活性をインビトロで示した。組成物－HPに対するベースの添加は、その抗ウイルス活性をほとんど増強しなかった。化合物組成物－HPは、BVDVに対しインビトロでほとんど抗ウイルス活性を示さなかったが、一方組成物4は、BVDVに対し中程度の抗ウイルス活性を示した。組成物HPは、カニクイザルの一次肝細胞培養物を用いて、 $TC_{50} = 20 \mu g/ml$ を示した。

【実施例4】

10

【0160】

組成物の抗ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)活性は、標準的なPBMCに基づく細胞ウイルスアッセイ系か、またはCEMSSに基づく抗HIV-1細胞ウイルスアッセイ系において、種々の濃度のベースの不在および存在下に評価された。組成物、ベース、および組成物プラスベースの抗ウイルス活性は、HIV-1RF感染されたCEMS細胞において評価された。組成物を用いた、または用いないベースは、抗ウイルス活性については、本発明者らの標準的な慢性HIV-1感染(CEMSK1またはCEMRF)アッセイにおいて、また細胞(CEMSK1)が長期間処理された場合には活性について評価された。TNF α による誘導に先立ち、化合物で前処理され、後にHIV-1で感染されたU1細胞に対する活性もまた評価された。

20

(材料および方法)

(新鮮なヒト末梢血細胞における組成物の抗HIV活性の評価)

(PBMC単離およびプラスティング)

【0161】

末梢血単核球(PBMC)は、正常な、肝炎およびHIV-1陰性のドナーから、フィコール・ハイパック勾配分離によって得られる。簡単にいえば、抗凝固血は、Ca++およびMg++のないダルベッコ(Dulbecco)リン酸緩衝食塩水(PBS)で1:1に希釈され、50mlの遠心管内の14mLのリンパ球分離用培地上に重層される。管は次に600 $\times$ gで30分間遠心分離される。層状のPBLは、結果として生じた境界面から静かに吸引され、続いて低速遠心分離によりPBSで2回洗浄された。単核細胞は計数されトリパンブルー色素排除により生存率が測定され、15%FBS(熱不活化)、2mM Lグルタミン、100U/mLペニシリン、100 $\mu g/mL$ ストレプトマイシン、および10 $\mu g/mL$ ゲンタマイシンを、2 $\mu g/mL$ のフィトヘマグルチニン(PHA)とともに補足された、RPMI-1640培地中に、 1×10^6 細胞/mLで再懸濁される。細胞は37 $^{\circ}C$ 、5CO $_2$ において、48～72時間培養される。インキュベーションの後、細胞は遠心分離により集められ、15%FBS(熱不活化)、2mM Lグルタミン、100U/mLペニシリン、100 $\mu g/mL$ ストレプトマイシン、および10 $\mu g/mL$ ゲンタマイシンを、20U/mLの組換えIL-2(R&Dシステムズ(R&D Systems)、ミネソタ州ミネアポリス)とともに補足されたRPMI-1640中で洗浄され、再懸濁される。IL-2は、PHA細胞誘発刺激により開始される細胞分裂を維持するべく、培地中に含まれる。培養物は次いで、新鮮なIL-2含有培地を用いた3日毎の、1/2培養体積の交換まで維持される。

30

(PBMCアッセイ)

【0162】

最低2名のドナーからの、PHAおよびIL-2でプラストされたヒト末梢血単核細胞は、計数され、トリパンブルー色素排除により生存率が測定され、同じ比率に混合される。HIV感染と、一次リンパ球集団のPHAおよびIL-2に対する全体的な応答とにおける、量的および質的差異からの結果として生じる個々のドナー間に見られる変動性を最少化するべく、プールされたドナーが使用される。細胞は、15%ウシ胎児血清(熱不活化)、2mM Lグルタミン、100U/mLペニシリン、100 $\mu g/mL$ ストレプト

40

50

マイシン、および $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシン、および IL-2 ($20 \text{ U}/\text{mL}$ 、R&D システムズ、ミネソタ州ミネアポリス) を補足された、フェノールレッドなしの RPMI-1640 中に 1×10^6 細胞/ mL で再懸濁される。50 マイクロリットルの細胞は、次に、96 ウェル丸底マイクロタイター培養プレート内の内側の 60 ウェルへ、サザンリサーチ研究所 (Southern Research Institute) の感染症研究部 (Infectious Disease Research department) によって開発された標準的なフォーマットで分配される。各プレートは、細胞対照ウェル (細胞のみ)、ウイルス対照ウェル (細胞プラスウイルス)、および実験ウェル (薬物プラス細胞プラスウイルス) を含有する。連続的に希釈された化合物がマイクロタイタープレートへ、それに続き、適当にプレタイターされた HIV-1 株が添加される。本文に提示された研究は、HIV の ROJO 株を使用した。ROJO はサザンリサーチ研究所の研究室において特別に分離および開発された、HIV の低継代の小児科臨床分離株である。化合物の毒性試験用には、全ての試料は、ウイルスなしの重複測定プレートを用いて三重にアッセイされる。ウェルあたりの最終体積は $200: \mu\text{L}$ である。検定物は、加湿された雰囲気下に 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ において 6 日間インキュベートされ、その後に、RT 活性の分析用に上清が集められ、シスタープレートは MTS 色素還元により細胞生存率用に分析される。ウェルはまた顕微鏡検査され、任意の異常が記録された。

(確立された細胞系における化合物の抗 HIV 活性の評価)

(修正された HIV サイトプロテクションアッセイ)

【0163】

CEM-SS 細胞 (1 mL あたり 5×10^4 細胞) は、T25 フラスコ内で化合物の存在下に、 $0.005 \sim 0.01$ の範囲にわたる感染多重度で、HIV-1_{RF} ウイルスにより感染された。 1 、 2.5 、 5 、 10 、 20 、 $32 \mu\text{g}/\text{mL}$ の組成物、 $0.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ のベース 1、および組成物プラスベース 1 の濃度が評価された。感染 6 日後に、ウイルス複製は、RT の検定により無細胞上清において査定された。細胞は次に洗浄され、化合物の非存在下および存在下に再懸濁された。続く、洗浄後 6 日および 12 日に、ウイルス複製は、RT および細胞外 p24 の検定により、無細胞上清において査定された。

(慢性的に感染された細胞における化合物の抗 HIV 活性の評価)

(標準的な慢性アッセイ)

【0164】

2 万 5 千 (2.5×10^3) 個の慢性的に感染された CEMRF 細胞は、96 ウェルマイクロタイタープレートのウェルあたり $100 \mu\text{L}$ の組織培養液中に播種された。旧来の、および新規の組成物は、 0.1 、 1 、および $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ のベース 1 の非存在下および存在下に評価された。 37°C における、 $5\% \text{ CO}_2$ インキュベータ内での 6 日間のインキュベーションの後、ウイルス複製は RT の検定により無細胞上清において査定され、細胞生存率はトリチウムチミジン取込みにより査定された。

(修正された慢性アッセイ)

【0165】

慢性的に感染された CEMSK1 細胞は、 1 、 2.5 、 5 、 10 、 20 、および $32 \mu\text{g}/\text{mL}$ の組成物、 $0.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ ベース 1、および組成物プラスベース 1 を用いて、 7 、 14 、 21 、および 28 日のいずれかにわたり培養された。処理の後、ウイルス複製は RT および細胞外 p24 の検定により無細胞上清において査定され、細胞生存率はトリチウムチミジン取込みにより査定された。この同時点で細胞は収集され、洗浄されて化合物を除去し、薬物の不在下にさらに 14 日間培養された。洗浄後 7 日に、トリチウムチミジン取込みによりウイルス複製が査定された。洗浄後 14 日に、ウイルス複製は、RT および細胞外 p24 の検定により、無細胞上清において査定され、細胞生存率はトリチウムチミジン取込みにより査定された。

(潜伏感染された細胞における組成物の抗 HIV 活性の評価)

【0166】

U1 細胞は、エイズ研究および参照試薬プログラム (AIDS Research and Reference Re

10

20

30

40

50

agent Program) から入手され、標準的な培養条件下に維持された。アッセイの24時間前、細胞は、10%ウシ胎児血清(熱不活化)、2 mM L グルタミン、100 U/mL ペニシリン、および100 μg/mL ストレプトマイシンを補足された培地(フェノールレッドなしのRPMI-1640培地)中で1:2に分割された。U1細胞はT25フラスコ内で、1、2.5、5、10、20、および32 μg/mLの組成物、0.75 μg/mL ベース1、組成物プラスベース1の存在下に、1、3、6、9、および12日間にわたり培養された。アッセイ時には、 2.5×10^4 細胞/mLは、10 ng/mL TNFαを含有する培地を用いて、96 ウエルプレート中に播種された。培養物は5日間インキュベートされ、無細胞上清が収穫された。化合物の毒性は、トリチウムチミジンの取込みにより測定された。ウイルス複製は、RT、細胞内p24、および細胞外p24の検定

10

(トリチウムチミジン捕捉に対する化合物の効果の評価)

【0167】

慢性CEMSK1細胞(10^5)は、37℃で一晩のインキュベーションの前か、またはインキュベーションに続くチミジン取込みの検定のための収穫に先立ち、96 ウエルマイクロタイタープレートの適当なところへ播種された。組成物(32 μg/mL)、ベース1(1 μg/mL)、および組成物プラスベース1が評価された。評価された変動条件は、以下の表に要約されている。

【表3】

条件	目的
培地 + ^3H 一晩; 収穫	陰性対照
細胞 + ^3H 一晩; 収穫	陽性対照
細胞 + 薬物 一晩; 収穫	ベースライン薬物対照
細胞 + 薬物 + ^3H 一晩; 収穫	薬物対照
薬物 + ^3H 一晩; 収穫	薬物は ^3H を捕捉するか?
薬物 + ^3H 一晩; 細胞を添加した後収穫	細胞が存在すると薬物は ^3H を捕捉するか?
培地 + ^3H 一晩; 薬物を添加した後収穫	ベースライン対照
培地 + ^3H 一晩; 薬物および細胞を添加した後収穫	ベースライン対照

20

30

(^3H チミジン取込み)

【0168】

特別の実験において、細胞の生存率は、 $[\text{}^3\text{H}]$ チミジンの細胞DNAへの取込みにより測定された。アッセイ終了の24時間前、ウエルあたり0.1 μCi (5 mCi/mL) の $[\text{}^3\text{H}]$ チミジンが添加された。取込みは、 H_2O による細胞の溶解および、スカトロ・ハーベスタ(Skatron harvester)を用いたガラス繊維フィルタ上への捕捉の後に、ウォラク・マイクロベータ・カウンター(Wallac Microbeta counter)で測定された。

(細胞生存率のためのMTS染色)

40

【0169】

特定のアッセイには、アッセイの終わりに、プレートは可溶性のテトラゾリウムを主成分とする色素MTS(セルタイター(CellTiter(登録商標)))試薬プロメガ、ウィスコンシン州マジソン)で染色され、細胞生存率を測定し、化合物の毒性を定量化した。MTSは、代謝活性のある細胞のミトコンドリア酵素により、可溶性のホルマザン産物へ代謝され、細胞生存率および化合物の細胞毒性の迅速な量的分析を可能にする。この試薬は単一な安定した溶液であり、使用前に調製を必要としない。アッセイの終わりに、ウエルあたり20 μLのMTS試薬が添加される。ウエルはHIVサイトプロテクションアッセイ用には一晩、単核細胞/マクロファージおよびPBMC用には37℃で4時間インキュベーションされる。インキュベーション時間は、各細胞タイプにおける最適な色素還元

50

ため、経験的に決められた時間に基づき選択された。接着性のプレートシーラーが蓋の代わりに使用され、シールされたプレートは数回反転されて可溶性のホルマザン産物を混合し、プレートはモレキュラー・デバイシズ・Vマックス・プレートリーダー (Molecular Devices Vmax Plate reader) により、490 nmにおいて分光光度法により読取られた。

(逆転写酵素アッセイ)

【0170】

逆転写酵素活性は、無細胞上清において測定された。トリチウムチミジン三リン酸 (NEN) (TTP) は、蒸留されたH₂O中に5 Ci/mLで再懸濁された。ポリ r Aおよびオリゴ d Tは、-20℃に保持された保存溶液として調製された。RT反応緩衝液は、毎日新たに調製され、125 μLの1.0 M EGTA、125 μLのdH₂O、110 μLの10% SDS、50 μLの1.0 M トリス (pH 7.4)、50 μLの1.0 M DTT、および40 μLの1.0 M MgCl₂からなる。これら3つの溶液は、TTP 2、ポリ r A：オリゴ d T 1、および反応緩衝液 1の割合で混ぜ合わされた。この反応混合物10 μLは丸底マイクロタイタープレートに入れられ、15 μLのウイルス含有上清が添加され、混合された。プレートは37℃において、プレートの水没を防ぐための堅固な支えのついた水槽中で、60分間インキュベートされた。反応の後、反応体積はDE81紙の紙片上へスポットされ、各々5%リン酸ナトリウム緩衝液中で5分間にわたり5回、各々蒸留水中で1分間にわたり2回、各々70%エタノール中で1分間にわたり2回洗浄され、次に乾燥された。オブティーフルオルO (Opti-Fluor O) が各試料へ添加され、取込まれた放射能はウォラク (Wallac) 1450 マイクロベータプラス (Mirobetaplus) 液体シンチレーションカウンタを利用して定量された。

(P24抗原ELISA)

【0171】

ELISAキットは、コールター・エレクトロニクス (Coulter Electronics) から購入された。アッセイは製造業者の指示に従って行なわれる。各試料中のp24項減の量を正確に定量化するため、対照曲線は、アッセイ毎に描かれる。データは、モレキュラー・デバイシズ・Vマックス・プレートリーダーを用いて、450 nmにおける分光光度法により得られる。終濃度は、モレキュラー・デバイシズ・ソフト・マックス (Molecular Devices Soft Max) ソフトウェアパッケージを用いて、光学密度から計算される。

(データ解析)

【0172】

自社のコンピュータプログラムを用いて、IC₅₀ (ウイルス複製の50%阻害)、TC₅₀ (細胞生存率における50%減少)、および治療指数 (TI、IC₅₀/TC₅₀) が与えられる。データのグラフ表示付きの、抗ウイルス活性および毒性の双方に関する生のデータは、個々の化合物の活性を要約したプリントアウトにおいて提供された。本発明者らは、AZTを個々のアッセイのための適切な陽性対照化合物とした。

(結果)

(予備実験)

(CEM-SS培養物における細胞毒性)

【0173】

組成物は単独で、およびベースまたは水素化されたベースと一緒に、CEM-SS細胞に対する毒性について評価された。2つの方法が細胞毒性を測定するべく用いられた：MTS色素の添加の後に光学密度の測定変更、および [³H] チミジン取込み。化合物の細胞毒性は、以下の表1に提示されている。これらのアッセイにおいて得られた生のデータは、付録1に提示されている。

【表 4】

表1: ベース不在下または存在下における組成物の細胞毒性

化合物	MTSC ₅₀ (μg/ml)	[³ H] チミジン取込み TC ₅₀ (μg/ml)
ターミネーター	1.5	22.2
ターミネーター + ベース (1mg/ml)	0.01	7.0
ターミネーター + 水素化されたベース (1mg/ml)	0.003	2.7

10

(P BMC 培養物における有効性)

【0174】

組成物、ベース1、ベース2、ベース3、および組成物プラス各々の個々のベース（1000、300、200、100、60、30、20、10、5、1 μg/ml）は、野生型ウイルスに感染されたP BMCにおいて活性に関し評価された。AZTは陽性の抗ウイルス対照化合物として各アッセイにおいて使用され、予想された抗HIV活性を示した（1～10 nM）。抗ウイルス効果は化合物の、無細胞上清中のウイルス関連性の逆転写酵素活性の発現を低減する能力の検定によって評価された。組成物は、ROJO臨床HIV-1分離株に対し、0.07～1.4 μg/mlの範囲のEC₅₀で、HIVの複製を阻害した。単一療法として評価された場合、ベース1から3までが、ある範囲の抗ウイルス活性を見せ、各々14870、1、および8260の治療指数を与えた。

20

【0175】

上記の記述においては、いくつかの用語が好ましい態様を説明するべく使用されている。しかしながら、この用語は単に代表的であるに過ぎないこと、および本発明の範囲を制限することを意図していないことから、使用された用語によって何ら無用の制限が造られるべきではない。

【0176】

添付された特許請求の範囲において言及されているように、本発明の範囲を離れることなく、本発明に対し他の変更が行なわれてよいことがさらに理解される。

30

【図面の簡単な説明】

【0177】

【図1】鉄デキストラン単独および組成物単独および併用による、24時間の前培養の後の、HT29ヒト結腸腺腫細胞系によるROSの放出のグラフである。

【図2A】NCI-H23肺細胞の平均パーセント阻害に対しプロットされた、組成物単独の濃度のグラフである。

【図2B】NCI-H23肺細胞の、対照、組成物単独、ベース化合物単独、およびドキシソルビシン単独による、用量反応の図表である。

【図2C】組成物単独を用いたNCI-H23肺細胞の、IC₅₀値についての図表である。

40

【図2D】NCI-H23肺細胞の平均%阻害に対しプロットされた、組成物プラスベース化合物の濃度のグラフである。

【図2E】対照、組成物プラスベース化合物、ベース化合物単独、およびドキシソルビシン単独による、NCI-H23肺細胞の図表である。

【図2F】組成物プラスベース化合物を用いたNCI-H23肺細胞の、IC₅₀値についての図表である。

【図3A】NCI-H460肺細胞の平均%阻害に対してプロットされた、組成物単独の濃度のグラフである。

【図3B】NCI-H460肺細胞の、対照、組成物単独、ベース化合物単独、およびドキシソルビシン単独を用いた図表である。

50

【図 3 C】組成物単独を用いたNCI-H460肺細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 3 D】NCI-H460肺細胞の平均パーセント阻害に対しプロットされた、組成物プラスベース化合物の濃度のグラフである。

【図 3 E】対照、組成物プラスベース化合物、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独による、NCI-H460肺細胞の図表である。

【図 3 F】組成物プラスベース化合物を用いたNCI-H460肺細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 4 A】MCF7乳房細胞の平均%阻害に対してプロットされた、組成物単独の濃度のグラフである。

10

【図 4 B】MCF7乳房細胞の、対照、組成物単独、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独を用いた、用量反応の図表である。

【図 4 C】組成物単独を用いたMCF7乳房細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 4 D】MCF7乳房細胞の平均パーセント阻害に対しプロットされた、組成物プラスベース化合物の濃度のグラフである。

【図 4 E】対照、組成物プラスベース化合物、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独による、MCF7乳房細胞の図表である。

【図 4 F】組成物プラスベース化合物を用いたMCF7乳房細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 5 A】ZR-75-1乳房細胞の平均%阻害に対してプロットされた、組成物単独の濃度のグラフである。

20

【図 5 B】ZR-75-1乳房細胞の、対照、組成物単独、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独を用いた、用量反応の図表である。

【図 5 C】組成物単独を用いたZR-75-1乳房細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 5 D】ZR-75-1乳房細胞の平均パーセント阻害に対しプロットされた、組成物プラスベース化合物の濃度のグラフである。

【図 5 E】対照、組成物プラスベース化合物、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独による、ZR-75-1乳房細胞単独の図表である。

【図 5 F】組成物プラスベース化合物を用いたZR-75-1乳房細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

30

【図 6 A】PC-3前立腺細胞の平均%阻害に対してプロットされた、組成物単独の濃度のグラフである。

【図 6 B】PC-3前立腺細胞の、対照、組成物単独、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独を用いた、用量反応の図表である。

【図 6 C】組成物単独を用いたPC-3前立腺細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 6 D】PC-3前立腺細胞の平均パーセント阻害に対しプロットされた、組成物プラスベース化合物の濃度のグラフである。

【図 6 E】対照、組成物プラスベース化合物、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独による、PC-3前立腺細胞の図表である。

40

【図 6 F】組成物プラスベース化合物を用いたPC-3前立腺細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 7 A】DL D-1結腸細胞の平均%阻害に対してプロットされた、組成物単独の濃度のグラフである。

【図 7 B】DL D-1結腸細胞の、対照、組成物単独、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独を用いた、用量反応の図表である。

【図 7 C】組成物単独を用いたDL D-1結腸細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 7 D】DL D-1結腸細胞の平均パーセント阻害に対しプロットされた、組成物プラスベース化合物の濃度のグラフである。

【図 7 E】対照、組成物プラスベース化合物、ベース化合物単独、およびドキソルビシン

50

単独による、DL D-1 結腸細胞の図表である。

【図 7 F】組成物プラスベース化合物を用いたDL D-1 結腸細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 8 A】OV CAR-3 卵巣細胞の平均%阻害に対してプロットされた、組成物単独の濃度のグラフである。

【図 8 B】OV CAR-3 卵巣細胞の、対照、組成物単独、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独を用いた、用量反応の図表である。

【図 8 C】組成物単独を用いたOV CAR-3 卵巣細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 8 D】OV CAR-3 卵巣細胞の平均パーセント阻害に対しプロットされた、組成物
10
プラスベース化合物の濃度のグラフである。

【図 8 E】対照、組成物プラスベース化合物、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独による、OV CAR-3 卵巣細胞の図表である。

【図 8 F】組成物プラスベース化合物を用いたOV CAR-3 卵巣細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 9 A】CAKI-1 腎細胞の平均%阻害に対してプロットされた、組成物単独の濃度のグラフである。

【図 9 B】CAKI-1 腎細胞の、対照、組成物単独、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独を用いた、用量反応の図表である。

【図 9 C】組成物単独を用いたCAKI-1 腎細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。
20

【図 9 D】CAKI-1 腎細胞の平均パーセント阻害に対しプロットされた、組成物プラスベース化合物の濃度のグラフである。

【図 9 E】対照、組成物プラスベース化合物、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独による、CAKI-1 腎細胞の図表である。

【図 9 F】組成物プラスベース化合物を用いたCAKI-1 腎細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 10 A】LOX IMVI 黒色腫細胞の平均%阻害に対してプロットされた、組成物単独の濃度のグラフである。

【図 10 B】LOX IMVI 黒色腫細胞の、対照、組成物単独、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独を用いた、用量反応の図表である。
30

【図 10 C】組成物単独を用いたLOX IMVI 黒色腫細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 10 D】LOX IMVI 黒色腫細胞の平均パーセント阻害に対しプロットされた、組成物プラスベース化合物の濃度のグラフである。

【図 10 E】対照、組成物プラスベース化合物、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独による、LOX IMVI 黒色腫細胞の図表である。

【図 10 F】組成物プラスベース化合物を用いたLOX IMVI 黒色腫細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 11 A】SBN-75 CNS細胞の平均%阻害に対してプロットされた、組成物単独の濃度のグラフである。
40

【図 11 B】SBN-75 CNS細胞の、対照、組成物単独、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独を用いた、用量反応の図表である。

【図 11 C】組成物単独を用いたSBN-75 CNS細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。

【図 11 D】SBN-75 CNS細胞の平均パーセント阻害に対しプロットされた、組成物プラスベース化合物の濃度のグラフである。

【図 11 E】対照、組成物プラスベース化合物、ベース化合物単独、およびドキソルビシン単独による、SBN-75 CNS細胞の図表である。

【図 11 F】組成物プラスベース化合物を用いたSBN-75 CNS細胞の、 IC_{50} 値についての図表である。
50

【図 1 2 A】C E M－S S 白血病細胞の平均%阻害に対してプロットされた、組成物単独の濃度のグラフである。

【図 1 2 B】C E M－S S 白血病細胞データの、アッセイされた毒性値の図表である。

【図 1 2 C】C E M－S S 白血病細胞データの、I C₅₀を提供する。

【図 1 3 A】C E M－S S 白血病細胞の平均%阻害に対してプロットされた、組成物単独の濃度のグラフである。

【図 1 3 B】C E M－S S 白血病細胞データの、アッセイされた毒性値を示す。

【図 1 3 C】C E M－S S 白血病細胞データの、I C₅₀を提供する。

【図 1 4】使用された細胞系および本開示の結果の表である。

【図 1 5 A】サル血漿において時間を追って検出された、鉄デキストランから派生された元素鉄の相当量の濃度についての表の部分である。 10

【図 1 5 B】サル血漿において時間を追って検出された、鉄デキストランから派生された元素鉄の相当量の濃度についての表の部分である。

【図 1 5 C】サル血漿において時間を追って検出された、鉄デキストランから派生された元素鉄の相当量の濃度についての表の部分である。

【図 1 6】サル血漿において時間を追って検出された、鉄デキストランから派生された元素鉄の一回量の投与の表である。

【図 1 7】標準化された 5－2 細胞系抗ウイルス評価用の 9 6 ウエルプレートフォーマットの表である。

【図 1 8】抗ウイルス評価のための、標準化された 5－2 細胞系抗ウイルス評価 9 6 ウエルプレートフォーマットの表である。 20

【図 1 9】ルシフェラーゼに基づく評価を用いた、H C V に対する組成物 4 の、インビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図 2 0】ルシフェラーゼに基づく評価を用いた、H C V R N A レプリコンに対する組成物 H P の、インビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図 2 1】ルシフェラーゼに基づく評価を用いた、H C V に対するヒトインターフェロンアルファ 2 b の、インビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図 2 2】ルシフェラーゼに基づく評価を用いた、H C V に対するリバビリンの、インビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図 2 3】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。 30

【図 2 4】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。

【図 2 5】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。

【図 2 6】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。

【図 2 7】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。

【図 2 8】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。

【図 2 9】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。

【図 3 0】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。

【図 3 1】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。

【図 3 2】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。

【図 3 3】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。 40

【図 3 4】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。

【図 3 5】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。

【図 3 6】組成物 4 およびベース化合物の効果についての 3 D グラフ表示を示している。

【図 3 7】抗ウイルス H B V 評価用の、標準化された 5－2 細胞系抗ウイルス評価 9 6 ウエルプレートフォーマットの表である。

【図 3 8】抗ウイルス B V D V 評価用の、標準化された 5－2 細胞系抗ウイルス評価 9 6 ウエルプレートフォーマットの表である。

【図 3 9】H e p G 2 . 1 5 細胞におけるウイルス産生に対する、組成物のインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図 4 0】H e p G 2 . 1 5 細胞におけるウイルス産生に対する、3 T C のインビトロの 50

抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図41】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、ベース化合物のインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図42】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、組成物およびベース化合物のインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図43】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、組成物およびベース化合物のインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図44】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、組成物およびベース化合物のインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図45】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、組成物およびベース化合物のインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。 10

【図46】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、組成物のインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図47】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、3TCのインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図48】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、3TCのインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図49】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、組成物HPおよびベース化合物のインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図50】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、3TCのインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。 20

【図51】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、組成物4のインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図52】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、3TCのインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図53】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、3TCのインビトロの抗ウイルススクリーンの結果を示している。

【図54】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、組成物のインビトロの抗ウイルススクリーンおよびXTTアッセイの結果を示している。

【図55】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、インターフェロナルファ2bのインビトロの抗ウイルススクリーンおよびXTTアッセイの結果を示している。 30

。【図56】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、組成物4のインビトロの抗ウイルススクリーンおよびXTTアッセイの結果を示している。

【図57】HepG2.15細胞におけるウイルス産生に対する、インターフェロナルファ2bのインビトロの抗ウイルススクリーンおよびXTTアッセイの結果を示している。

【図58】カニクイザル一次肝細胞の細胞毒性評価実験の抗ウイルススクリーンの結果を示す。

【図59】マイコバクテリウム・tuberculosisを用いた、組成物のインビトロの活性についての、10 μ g/mlの組成物が90%のバチルスを生じている実験結果の表を示す。 40

。【図59A】マイコバクテリウム・tuberculosisを用いた、組成物のインビトロの活性についての、10 μ g/mlの組成物が90%のバチルスを生じている実験結果の表を示す。

【図60】マイコバクテリウム・tuberculosis桿菌の阻害のパーセントを、組成物の濃度に関して示している。

【図61】ベースと一緒に使用された組成物濃度の表を示している。

【図62】HCV RNAレプリコンシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価を示す。

【図62A】HCV RNAレプリコンシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価を示す。 50

【図 6 3】H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価のための、パラメータの表を示す。

【図 6 4】H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価の、抗ウイルス試験の値を示す。

【図 6 5】図 6 2、6 2 A、6 3、および 6 4 に表示されたデータのグラフを示している。

【図 6 6】2 番目のプレートに関する、H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価を示す。

【図 6 6 A】2 番目のプレートに関する、H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価を示す。

【図 6 7】図 6 6 および 6 6 A のデータに関する、H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価のための、パラメータの表を示す。

【図 6 8】2 番目のプレートに関する、H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価のための、抗ウイルス試験の値を示す。

【図 6 9】図 6 6、6 6 A、6 7、および 6 8 に表示されたデータのグラフを示している。

【図 7 0】3 番目のプレートに関する、H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価を示す。

【図 7 0 A】3 番目のプレートに関する、H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価を示す。

【図 7 1】図 7 0 および 7 0 A のデータに関する、H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価のための、パラメータの表を示す。

【図 7 2】2 番目のプレートに関する、H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価についての、抗ウイルス試験の値を示す。

【図 7 3】図 7 0、7 0 A、7 1、および 7 2 に表示されたデータのグラフを示している。

【図 7 4】4 番目のプレートに関する、H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価を示す。

【図 7 4 A】4 番目のプレートに関する、H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価を示す。

【図 7 5】図 7 4 および 7 4 A のデータに関する、H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価のための、パラメータの表を示す。

【図 7 6】2 番目のプレートに関する、H C V R N A レプリコンルシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価についての、抗ウイルス試験の値を示す。

【図 7 7】図 7 4、7 4 A、7 5、および 7 6 に表示されたデータのグラフを示している。

【図 7 8】4 μ g / m l の # 2 5 および 0 . 8 μ g / m l の # 4 によってスパイクされた、化合物 # 2 3 6 の、新鮮なヒト P B M C の H I V - 1 臨床分離株に対する活性を示す。

【図 7 9】# 2 5 および # 4 のスパイクを用いた、または用いない、ウイルス対照の比較である。

【図 8 0】4 μ g / m l の化合物 # 2 5 および 0 . 8 μ g / m l の化合物 # 4 と一緒に化合物 # 2 3 6 による、P B M C における H I V - 1 R O J O 複製の阻害を示す。

【図 8 0 A】4 μ g / m l の化合物 # 2 5 および 0 . 8 μ g / m l の化合物 # 4 と一緒に化合物 # 2 3 6 による、P B M C における H I V - 1 R O J O 複製の阻害を示す。

【図 8 1】図 8 0 および 8 0 A のデータについての評価を示す。

【図 8 2】4 μ g / m l の化合物 # 2 5 および 0 . 8 μ g / m l の化合物 # 4 と一緒に化合物 # 2 3 6 による、P B M C における H I V - 1 R O J O 複製の阻害の図表である。

【図 8 3】A Z T 対照による、P B M C における H I V - 1 R O J O 複製の阻害のデータである。

【図 8 3 A】A Z T 対照による、P B M C における H I V - 1 R O J O 複製の阻害のデ

10

20

30

40

50

ータである。

【図 8 4】図 8 3 および 8 3 A のデータについての評価を示す。

【図 8 5】A Z T 対照による、P B M C における H I V - 1 R O J O 複製の障害のグラフである。

【図 8 6】 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 2 5 および $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 4 と一緒に化合物 # 2 3 6 による、P B M C における H I V - 1 R O J O 複製の障害である。

【図 8 6 A】 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 2 5 および $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 4 と一緒に化合物 # 2 3 6 による、P B M C における H I V - 1 R O J O 複製の障害である。

【図 8 7】図 8 6 および 8 6 A のデータについての評価を示す。

【図 8 8】 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 2 5 および $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 4 と一緒に化合物 # 2 3 6 による、P B M C における H I V - 1 R O J O 複製の障害のグラフである。

10

【図 8 9】デキストラン硫酸対照による、P B M C における H I V - 1 m d r 複製の障害を示しているデータである。

【図 8 9 A】デキストラン硫酸対照による、P B M C における H I V - 1 m d r 複製の障害を示しているデータである。

【図 9 0】図 8 9 および 8 9 A のデータについての評価を示す。

【図 9 1】デキストラン硫酸対照による、P B M C における H I V - 1 R O J O 複製の障害のグラフである。

【図 9 2】 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 2 5 および $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 4 と一緒に化合物 # 2 3 6 による、P B M C における H I V - 1 g 9 1 0 . 6 . 2 . 3 複製の障害の図表である。

20

【図 9 2 A】 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 2 5 および $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 4 と一緒に化合物 # 2 3 6 による、P B M C における H I V - 1 g 9 1 0 . 6 . 2 . 3 複製の障害の図表である。

【図 9 3】図 9 2 および 9 2 A のデータについての評価を示す。

【図 9 4】 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 2 5 および $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 4 と一緒に化合物 # 2 3 6 による、P B M C における H I V - 1 g 9 1 0 . 6 . 2 . 3 複製の障害のグラフである。

【図 9 5】デキストラン硫酸対照による、P B M C における H I V - 1 g 9 1 0 . 6 . 2 . 3 複製の障害についてのデータである。

30

【図 9 5 A】デキストラン硫酸対照による、P B M C における H I V - 1 g 9 1 0 . 6 . 2 . 3 複製の障害についてのデータである。

【図 9 6】図 9 5 および 9 5 A のデータについての評価を示す。

【図 9 7】デキストラン硫酸対照による、P B M C における H I V - 1 g 9 1 0 . 6 . 2 . 3 複製の障害についてのグラフである。

【図 9 8】 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 2 5 および $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 4 と一緒に化合物 # 2 3 6 による、P B M C における H I V - 1 5 2 - 5 2 複製の障害を示している。

【図 9 8 A】 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 2 5 および $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 4 と一緒に化合物 # 2 3 6 による、P B M C における H I V - 1 5 2 - 5 2 複製の障害を示している。

40

【図 9 9】図 9 8 および 9 8 A のデータについての評価を示す。

【図 1 0 0】 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 2 5 および $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物 # 4 と一緒に化合物 # 2 3 6 による、P B M C における H I V - 1 5 2 - 5 2 複製の障害のグラフである。

【図 1 0 1】デキストラン硫酸対照による、P B M C における H I V - 1 5 2 - 5 2 複製の障害のグラフである。

【図 1 0 1 A】デキストラン硫酸対照による、P B M C における H I V - 1 5 2 - 5 2 複製の障害のグラフである。

50

【図102】図101および101Aのデータについての評価を示す。

【図103】デキストラン硫酸対照による、PBMCにおけるHIV-1 52-52複製の阻害のグラフである。

【図104】4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#25および0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#4と一緒に化合物#236による、PBMCにおけるHIV-1 52-52複製の阻害である。

【図104A】4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#25および0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#4と一緒に化合物#236による、PBMCにおけるHIV-1 52-52複製の阻害である。

【図105】図104および104Aのデータについての評価を示す。

【図106】4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#25および0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#4と一緒に化合物#236による、PBMCにおけるHIV-1 52-52複製の阻害の図表である。

10

【図107】AZTによる、PBMCにおけるHIV-1 52-52複製の阻害。

【図107A】AZTによる、PBMCにおけるHIV-1 52-52複製の阻害。

【図108】図107および107Aのデータについての評価を示す。

【図109】AZT対照による、PBMCにおけるHIV-1 52-52複製の阻害のグラフである。

【図110】4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#25および0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#4と一緒に化合物#236による、PBMCにおけるHIV-1 tek複製の阻害についてのデータである。

【図110A】4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#25および0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#4と一緒に化合物#236による、PBMCにおけるHIV-1 tek複製の阻害についてのデータである。

20

【図111】図110および110Aのデータについての評価を示す。

【図112】4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#25および0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#4と一緒に化合物#236による、PBMCにおけるHIV-1 br/92/026複製の阻害のグラフである。

【図113】AZT対照による、PBMCにおけるHIV-1 tek複製の阻害についてのデータである。

【図113A】AZT対照による、PBMCにおけるHIV-1 tek複製の阻害についてのデータである。

30

【図114】図113および113Aのデータについての評価を示す。

【図115】AZT対照による、PBMCにおけるHIV-1 tek複製の阻害を示している。

【図116】4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#25および0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#4と一緒に化合物#236による、PBMCにおけるHIV-1 br/92/026複製の阻害についてのデータである。

【図116A】4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#25および0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#4と一緒に化合物#236による、PBMCにおけるHIV-1 br/92/026複製の阻害についてのデータである。

【図117】図116および116Aのデータについての評価を示す。

40

【図118】4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#25および0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物#4と一緒に化合物#236による、PBMCにおけるHIV-1 br/92/026複製の阻害のグラフである。

【図119】AZT対照による、PBMCにおけるHIV-1 br/92/026複製の阻害についてのデータである。

【図119A】AZT対照による、PBMCにおけるHIV-1 br/92/026複製の阻害についてのデータである。

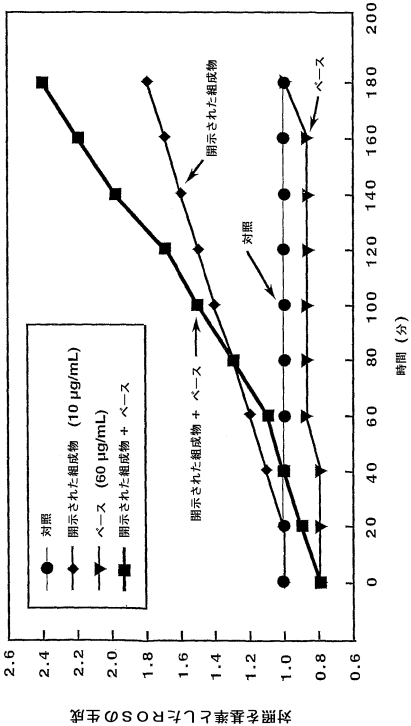
【図120】図119および119Aのデータについての評価を示す。

【図121】AZT対照による、PBMCにおけるHIV-1 br/92/026複製の阻害のグラフである。

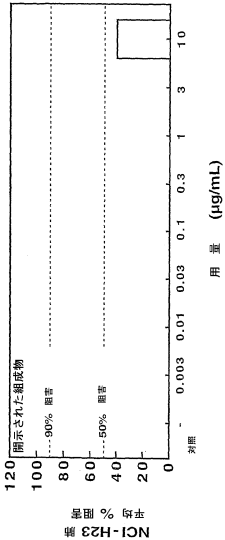
50

【図 1】

24時間のインキュベーション後のHT29ヒト結腸癌細胞系によるROSの放出



【図 2 A】



【図 2 B】

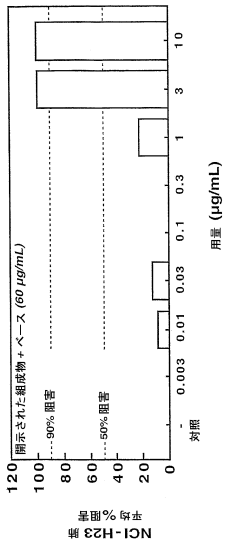
細胞系 : NCI-H23 株
開示された組成物 : 5.0E-03 細胞/ウェル
開示後 1 日の処理、連続培養

開示された組成物

(増殖 + MTS [バックグラウンド] = 708 ± 98)

処 理	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	生の吸収値		平均 バックス/バック グラウンド		% 阻害	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
対照	-	239280	83933	238572	83933	0	35
開示された 組成物	0.003	327938	34095	327230	34095	0	14
	0.01	289465	82990	288757	82990	0	26
	0.03	269840	82815	269132	82815	0	35
	0.1	273782	88132	273074	88132	0	37
	0.3	243639	73717	242991	73717	0	31
	1	338981	43708	338273	43708	0	18
ベース DOX (ドキソビシン)	3	273100	126786	272392	126786	0	53
	10	143339	64012	142631	64012	40	27
	1 μM	297824	50646	297116	50646	0	21
		1334	245	626	245	100	0

【図 2 D】



【図 2 C】

IC50 > 10 $\mu\text{g/mL}$
計算された理論的な吸収値
IC10 = 214715
IC50 = 119286
IC90 = 23857

【図 2 E】

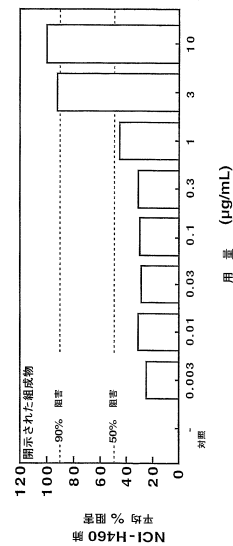
細胞系 : NCI-H23 株
照射された細胞 : 5.0E+03 細胞/ウェル
照射後 1 日の処理、連続培養
照射された組成物 + ベース (60 µg/mL)
(増殖 + MTS [バックグラウンド] = 596 ± 198)

処 理 薬剤	用量 (µg/mL)	生の吸収値		平均 マイナス バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	280621	45419	280026	45419	0	16
照射された 組成物 + ベース	0.003	293828	44679	293233	44679	0	16
	0.01	297853	62646	257257	62646	8	22
	0.03	246812	67879	246216	67879	12	24
	0.1	296383	46767	297788	46767	0	17
	0.3	288622	28595	288025	28595	9	10
	1	217760	38288	217165	38288	22	14
	3	2942	256	2347	256	99	0
	10	566	185	-30	185	100	0
ベース							
DOX (ドキソルビシン)	1 µM	254632	44431	254037	44431	9	16
		1703	429	1107	429	100	0

【図 2 F】

IC50 = 1.718 µg/mL (計算された理論的な IC50 吸収値 = 140013)	
照射に使用された濃度 3.000 および 1.000 µg/mL	
図解アウトプット	
定数	324573
Y 評価値の標準偏差	27074
R ² 乗数	1
測定値	16
自由度	14
X 係数	-107409
係数の標準偏差	6768

【図 3 A】



【図 3 B】

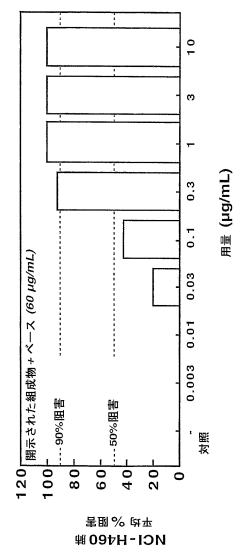
細胞系 : NCI-H460 株
照射された細胞 : 5.0E+03 細胞/ウェル
照射後 1 日の処理、連続培養
照射された組成物
(増殖 + MTS [バックグラウンド] = 869 ± 298)

処 理 薬剤	用量 (µg/mL)	生の吸収値		平均 マイナス バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	114212	21835	113403	21835	0	19
照射された 組成物	0.003	85678	43980	84859	43980	25	39
	0.01	78261	28129	78472	28129	31	25
	0.03	82290	25422	81481	25422	28	22
	0.1	81258	32786	80449	32786	29	29
	0.3	79020	29100	78211	29100	31	26
	1	62277	6501	61468	6501	46	6
	3	10113	4953	9304	4953	92	4
	10	1047	356	238	356	100	0
ベース							
DOX (ドキソルビシン)	1 µM	80453	31751	79644	31751	30	28
		1210	207	401	207	100	0

【図 3 C】

IC50 = 1.183 µg/mL (計算された理論的な IC50 吸収値 = 56701)	
照射に使用された濃度 3.000 および 1.000 µg/mL	
図解アウトプット	
定数	87550
Y 評価値の標準偏差	5779
R ² 乗数	1
測定値	16
自由度	14
X 係数	-26082
係数の標準偏差	1445

【図 3 D】

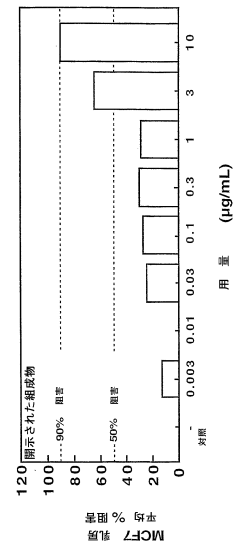


【図 3 E】

細胞系 : NCI-H460 肺
調製された細胞 : 5.0E+03 細胞/ウェル
接種後 1 日の処理、連続培養
測定された組成物 + ベース (80 µg/mL)
(増殖 + MTS [バックグラウンド] = 837 ± 284)

処 理	用量 (µg/mL)	生の吸収値		平均 マイナス バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	63981	24027	63124	24027	0	38
測定された 組成物+ベース	0.003	65444	19769	64607	19769	0	31
	0.01	57834	19699	67057	19699	8	31
	0.03	51046	20762	50209	20762	20	33
	0.1	37264	14885	36427	14885	42	24
	0.3	5783	1720	4951	1720	92	3
	1	641	171	-196	171	100	0
	3	450	181	-387	181	100	0
	10	578	167	-260	167	100	0
ベース		92220	18472	91383	18472	0	29
DOX (ドキシソルビン)	1 µM	883	247	46	247	100	0

【図 4 A】



【図 3 F】

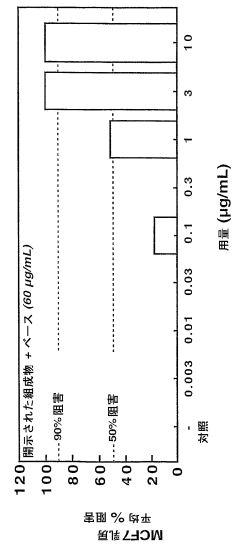
IC50 = 0.131 µg/mL (計算された理論的な IC50 吸収値 = 31562)	
図解に使用された濃度 0.300 および 0.100 µg/mL	
図解アウトプット	
定数	52165
Y 評価値の標準偏差	10596
R 2 乗数	1
測定値	16
自由度	14
X 係数	-157381
係数の標準偏差	26489

【図 4 B】

細胞系 : MCF7 乳癌
調製された細胞 : 5.0E+03 細胞/ウェル
接種後 1 日の処理、連続培養
測定された組成物
(増殖 + MTS [バックグラウンド] = 672 ± 83)

処 理	用量 (µg/mL)	生の吸収値		平均 マイナス バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	183388	68486	182918	68466	0	42
測定された 組成物	0.003	142381	71697	141719	71697	13	44
	0.01	179067	60307	178395	60307	0	37
	0.03	124765	62644	124093	62644	24	38
	0.1	119549	67326	118977	67326	27	35
	0.3	114224	48706	113552	48706	30	30
	1	118291	34321	117618	34321	28	21
	3	58604	29044	58012	29044	64	18
	10	16646	3030	15973	3030	90	2
ベース		125715	61249	125043	61249	23	38
DOX (ドキシソルビン)	1 µM	732	60	60	60	100	0

【図 4 D】



【図 4 C】

IC50 = 2.213 µg/mL (計算された理論的な IC50 吸収値 = 81458)	
図解に使用された濃度 3.000 および 1.000 µg/mL	
図解アウトプット	
定数	147421
Y 評価値の標準偏差	31792
R 2 乗数	1
測定値	16
自由度	14
X 係数	-29803
係数の標準偏差	7948

【図 4 E】

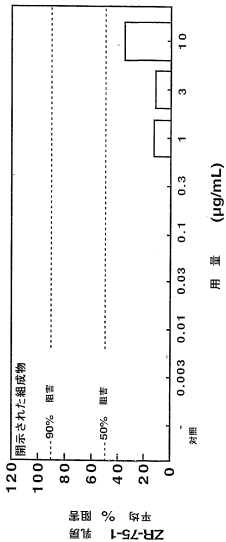
細胞系：MCF7 乳房
接種された細胞：5.0E+03 細胞/ウェル
接種後 1 日の処理、連続暴露
測定された組成物 + ベース (60 µg/mL)
(処理 + MTS [バックグラウンド] = 1450 = 1255)

処 理	用 量 (µg/mL)	生の吸収値		平均 マイナス バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	180297	67048	178847	67048	0	37
測定された組成物	0.003	200182	40578	198732	40578	0	23
組成物 + ベース	0.01	202789	64075	201339	64075	0	36
	0.03	197598	28199	196148	28199	0	16
	0.1	150016	66716	148567	66716	17	37
	0.3	195335	28074	193885	28074	0	16
	1	86500	36955	85190	36955	52	22
	3	1046	212	-404	212	100	0
ベース	10	482	146	-968	146	100	0
DOX (ドキソルビシン)	1 µM	283739	80230	282289	80230	0	45
		555	233	-895	233	100	0

【図 4 F】

IC50 = 0.972 µg/mL (計算された理論的な IC50 吸収値 = 89423)	
図解に使用された濃度 1.000 および 0.300 µg/mL	
図解アウトプット	
定数	240494
Y 軸値の標準偏差	33953
R ² 値	1
測定値	16
自由度	14
X 係数	-155363
係数の標準偏差	24252

【図 5 A】



【図 5 B】

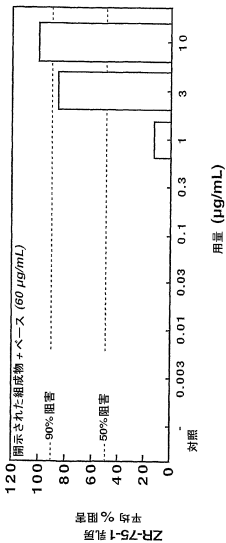
細胞系：ZR-75-1 乳房
接種された細胞：5.0E+03 細胞/ウェル
接種後 1 日の処理、連続暴露
測定された組成物
(処理 + MTS [バックグラウンド] = 592 = 178)

処 理	用 量 (µg/mL)	生の吸収値		平均 マイナス バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	108193	43069	107510	43069	0	40
測定された組成物	0.003	132348	14569	131755	14569	0	14
組成物 + ベース	0.01	119250	30534	118658	30534	0	28
	0.03	124791	29590	124199	29590	0	28
	0.1	113021	40121	112429	40121	0	37
	0.3	112641	21194	112049	21194	0	20
	1	94331	8863	93736	8863	13	8
	3	97565	17244	96972	17244	10	16
ベース	10	70952	24346	70359	24346	35	23
DOX (ドキソルビシン)	1 µM	127525	14303	126933	14303	0	13
		937	171	345	171	100	0

【図 5 C】

IC50 > 10 µg/mL	
計算された理論的な吸収値	
IC10 =	96759
IC50 =	53755
IC90 =	10751

【図 5 D】



【図 5 E】

細胞系 : ZR-75-1 乳癌
経理された細胞 : 5.0E+03 細胞/ウェル
経理後1日の処理、連続培養
開示された組成物 + ベース (60 µg/mL)

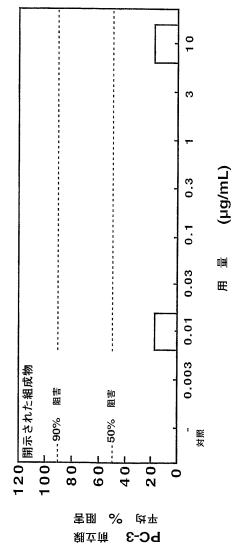
(増殖 + MTS [バックグラウンド] = 655 ± 149)

処 理	用量 (µg/mL)	生の吸収値		平均 マイナス バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	76148	14755	75493	14755	0	20
開示された組成物 + ベース	0.003	94190	22989	93535	22989	0	30
	0.01	102592	21922	101927	21922	0	29
	0.03	94237	25930	93592	25930	0	34
	0.1	89610	16748	88955	16748	0	22
	0.3	89812	13449	89157	13449	0	18
	1	86566	10830	85913	10830	13	14
	3	11946	1708	11291	1708	85	2
ベース	10	663	169	8	169	100	0
DOX (ドキソルビシン)	1 µM	93992	23394	93337	23394	0	31
		607	175	-48	175	100	0

【図 5 F】

IC50 = 2.031 µg/mL (計算された理論的なIC50吸収値 = 37746)	
図解に使用された濃度 3.000 および 1.000 µg/mL	
図解アウトプット	
定数	93223
Y 軸変数の標準偏差	7753
R 2 乗値	1
測定値	16
自由度	14
X 係数	-27311
係数の標準偏差	1538

【図 6 A】



【図 6 B】

細胞系 : PC-3 乳癌
経理された細胞 : 5.0E+03 細胞/ウェル
経理後1日の処理、連続培養
開示された組成物

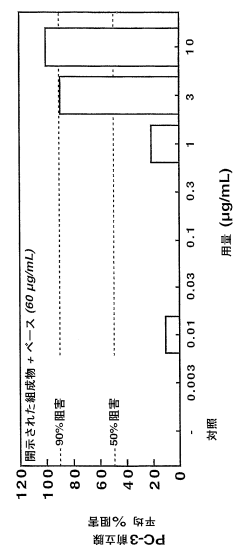
(増殖 + MTS [バックグラウンド] = 912 ± 286)

処 理	用量 (µg/mL)	生の吸収値		平均 マイナス バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	49491	15714	48579	15714	0	32
開示された組成物	0.003	56721	19439	55806	19439	0	40
	0.01	41732	17624	40819	17624	0	36
	0.03	57453	21988	56540	21988	0	45
	0.1	57074	24963	56161	24963	16	51
	0.3	55819	22170	55006	22170	0	46
	1	80203	19183	79290	19183	0	39
	3	90242	20098	89329	20098	0	41
	10	41161	9452	40249	9452	17	19
ベース		53951	15624	53039	15624	0	32
DOX (ドキソルビシン)	1 µM	1801	382	889	382	98	1

【図 6 C】

IC50 > 10 µg/mL
計算された理論的な吸収値
IC10 = 43721
IC50 = 24289
IC90 = 4858

【図 6 D】



【図 6 E】

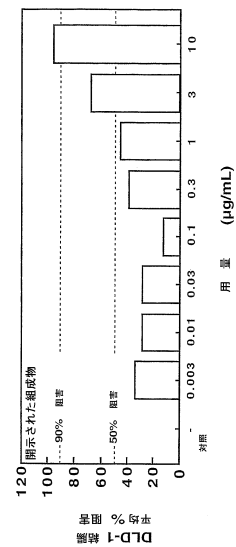
細胞系 : PC-3 前立腺
接種された細胞 : 5.0E+03 細胞/ウェル
接種後 1 日の処理、連続算出
開示された組成物 + ベース (60 $\mu\text{g/mL}$)
(増地 + MTS [バックグラウンド] = 982 ± 328)

処 理	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	生の吸収値		平均 マイナス バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	75060	6681	74078	6681	0	9
開示された 組成物+ベース	0.003	76246	12881	75263	12881	0	17
	0.01	76914	8723	66317	28367	10	38
	0.03	76769	15501	75786	15501	0	21
	0.1	75635	6312	74653	6312	0	9
	0.3	75745	10158	74763	10158	0	14
	1	69357	9393	59375	9393	20	13
	3	8963	1479	7980	1479	89	2
	10	844	420	-138	420	100	1
ベース		76812	6491	75829	6491	0	9
DOX (ドキシソルビン)	1 μM	1942	210	990	210	99	0

【図 6 F】

IC50 = 1.869 $\mu\text{g/mL}$ (計算された理論的な IC50 吸収値 = 37039)	
図解に使用された濃度 3.000 および 1.000 $\mu\text{g/mL}$	
図解アウトプット	
定数	85072
Y 群標準の標準偏差	6723
R 2 乗数	1
測定値	16
自由度	14
X 係数	-25697
係数の標準偏差	1681

【図 7 A】



【図 7 B】

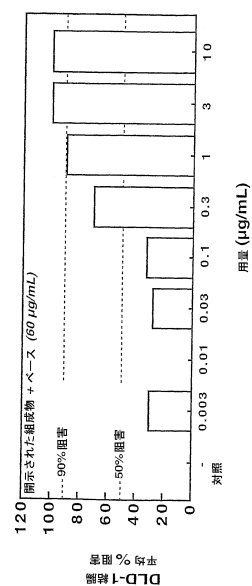
細胞系 : DLD-1 細胞
接種された細胞 : 5.0E+03 細胞/ウェル
接種後 1 日の処理、連続算出
開示された組成物
(増地 + MTS [バックグラウンド] = 768 ± 118)

処 理	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	生の吸収値		平均 マイナス バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	162684	18161	161917	18161	0	11
開示された 組成物	0.003	107941	77665	107174	77595	34	48
	0.01	117770	65709	117003	65709	28	41
	0.03	117510	55001	116742	55001	28	34
	0.1	144969	38297	144222	38297	11	24
	0.3	100932	64511	100164	64511	38	40
	1	89095	58265	88327	58265	45	36
	3	54829	19219	54062	19219	67	12
	10	9397	4907	8629	4907	95	3
ベース		161024	20930	160256	20930	1	13
DOX (ドキシソルビン)	1 μM	1322	279	554	279	100	0

【図 7 C】

IC50 = 1.430 $\mu\text{g/mL}$ (計算された理論的な IC50 吸収値 = 80958)	
図解に使用された濃度 3.000 および 1.000 $\mu\text{g/mL}$	
図解アウトプット	
定数	105460
Y 群標準の標準偏差	43383
R 2 乗数	0
測定値	16
自由度	14
X 係数	-17133
係数の標準偏差	10846

【図 7 D】



【図 7 E】

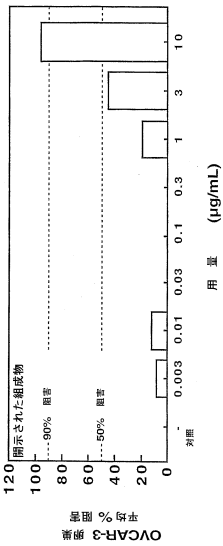
細胞系 : DLD-1 結腸
接種された細胞 : 5.0E+03 細胞/ウェル
接種後 1 日の処理、連続培養
測定された組成物 + ベース (60 µg/mL)
(処理 + MTS [バックグラウンド] = 433 ± 168)

処 理	用 量 (µg/mL)	生の収収値		平均 マイナス バック グラウンド		% 阻害	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
対照	-	60191	22276	59753	22276	0	37
測定された組成物	0.003	42077	20759	41644	20759	30	35
組成物+ベース	0.01	70053	29529	69620	29529	0	49
	0.03	44258	20110	43835	20110	27	34
	0.1	41289	25848	40857	25848	32	43
	0.3	18399	7678	17966	7678	70	13
	1	7224	3177	6792	3177	89	5
	3	564	129	131	129	100	0
	10	550	328	117	328	100	1
ベース		103470	32460	103037	32460	0	54
DOX (ドキシダシジン)	1 µM	1481	248	1049	248	98	0

【図 7 F】

IC50 = 0.196 µg/mL (計算された理論的な IC50 収収値 = 29879)	
図解に使用された濃度 0.300 および 0.100 µg/mL	
図解アウトプット	
変数	52302
Y 評価値の標準偏差	19067
R 2 乗数	1
測定値	16
自由度	14
X 係数	-114452
係数の標準偏差	47667

【図 8 A】



【図 8 B】

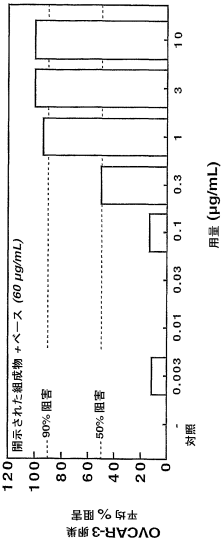
細胞系 : OVCA3-3 卵巣
接種された細胞 : 5.0E+03 細胞/ウェル
接種後 1 日の処理、連続培養
測定された組成物
(処理 + MTS [バックグラウンド] = 793 ± 114)

処 理	用 量 (µg/mL)	生の収収値		平均 マイナス バック グラウンド		% 阻害	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
対照	-	21419	14475	20626	14475	0	70
測定された組成物	0.003	19835	15417	19042	15417	8	75
	0.01	19879	12780	18086	12780	12	62
	0.03	25350	8809	24557	8809	0	43
	0.1	25419	10790	24626	10790	0	52
	0.3	23016	8915	22223	8915	0	43
	1	17291	12124	16498	12124	20	59
	3	12085	5735	11292	5735	45	28
	10	1725	634	932	634	95	3
ベース		25258	12252	24465	12252	0	59
DOX (ドキシダシジン)	1 µM	1441	207	648	207	97	1

【図 8 C】

IC50 = 3.662 µg/mL (計算された理論的な IC50 収収値 = 10313)	
図解に使用された濃度 10.300 および 3.000 µg/mL	
図解アウトプット	
変数	15733
Y 評価値の標準偏差	4080
R 2 乗数	1
測定値	16
自由度	14
X 係数	-1480
係数の標準偏差	291

【図 8 D】



【図 8 E】

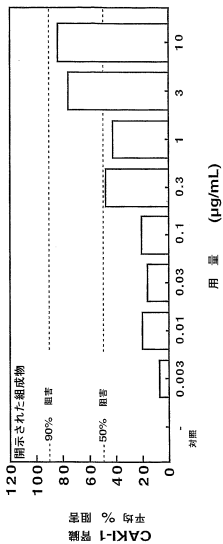
細胞系：OVCA8-3 単株
接種された細胞：5.0E+03 細胞/ウェル
接種後 1 日の処理、連続露光
開示された組成物 + ベース (60 µg/mL)
(増地 + MTS [バックグラウンド] = 635 ± 156)

処 理		生の吸収値				阻 害	
薬剤	用量 (μg/mL)	平均		平均 マイナス バック グラウンド	標準偏差	%阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	18870	7517	18235	7517	0	41
開示された組成物 + ベース	0.003	16804	4167	16169	4167	11	23
	0.01	21353	6899	20718	6899	0	38
	0.03	19334	4315	18699	4315	0	24
	0.1	16488	5282	15853	5282	13	29
	0.3	9722	2501	9087	2501	50	14
	1	1903	510	1268	510	93	3
	3	422	69	-214	69	100	0
	10	596	105	-39	105	100	1
ベース	-	17687	4190	17052	4190	6	23
DOX (ドキソビルシン)	1 μM	1090	233	455	233	98	1

【図 8 F】

IC50 = 0.299 µg/mL (計算された理論的な IC50 吸収値 = 9118)	
回輸に使用された濃度 0.300 および 0.100 µg/mL	
回輸アウトプット	
定数	19237
Y 評価値の標準偏差	4133
R 2 係数	0
測定数	16
自由度	14
X 係数	-33834
係数の標準偏差	10332

【図 9 A】

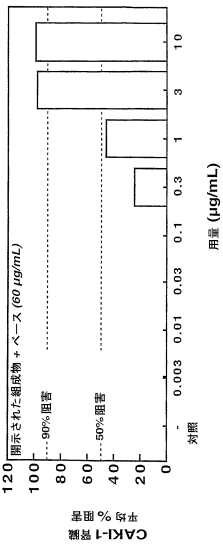


【図 9 B】

細胞系：CAKI-1 腎臓
接種された細胞：5.0E+03 細胞/ウェル
接種後 1 日の処理、連続露光
開示された組成物
(増地 + MTS [バックグラウンド] = 870.000 ± 235.511)

処 理	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	生の吸収値		平均 マイナス/ バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	45398	5160	44528	5160	0.0	11.6
開示された組成物	0.003	42038	5884	41168	5884	7.5	13.2
	0.01	36374	14961	35504	14961	20.3	33.6
	0.03	38682	9289	37812	9289	15.1	20.9
	0.1	35966	15199	35096	15199	21.2	34.1
	0.3	24042	7441	23172	7441	48.0	16.7
	1	26367	7624	25497	7624	42.7	17.1
	3	11765	7206	10895	7206	75.5	16.2
	10	8181	919	7311	919	83.6	2.1
ベース		42672	6530	41702	6530	6.3	14.7
DOX (ドキソビルシン)	1 μM	730	195	-140	195	100.0	0.4

【図 9 D】



【図 9 C】

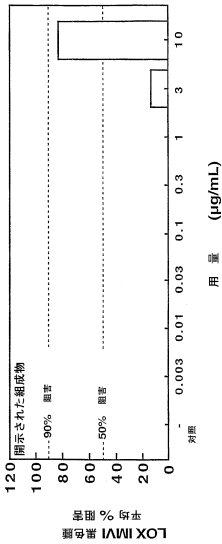
IC50 = 1.44 µg/mL (計算された理論的な IC50 吸収値 = 22263.938)	
回輸に使用された濃度 3.00 および 1.00 µg/mL	
回輸アウトプット	
定数	3.28E+04
Y 評価値の標準偏差	7.42E+03
R 2 係数	5.26E-01
測定数	16
自由度	14
X 係数	-7.30E+03
係数の標準偏差	1.85E+03

【図 9 E】

細胞系：CAKI-1 腎臓
獲得された細胞：5.0E+03 細胞/ウェル
獲得後 1 日の処理、連続培養
ターミネーター + ベース (60 µg/mL)
(細胞 + MTS [バックグラウンド] = 522 ± 198)

処 理	用量 (µg/mL)	生の吸収値		平均 マイナス/ バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	24112	1386	23590	1386	0	6
阻害された 組成物+ベース	0.003	26995	4082	26473	4082	0	17
	0.01	24148	3290	23626	3290	0	14
	0.03	24409	3976	23867	3976	0	17
	0.1	25371	5959	24849	5959	0	25
	0.3	18333	3081	17811	3081	24	13
	1	13138	4040	12616	4040	47	17
	3	1223	261	701	261	97	1
	10	757	194	235	194	99	1
ベース		27013	3311	26491	3311	0	14
DOX (ドキソビルジン)	1 µM	513	126	-9	126	100	1

【図 1 0 A】



【図 9 F】

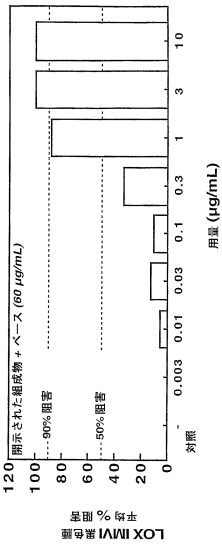
IC50 = 1.138 µg/mL (計算された理論的な IC50 吸収値 = 11795)	
阻害に使用された濃度 3.000 および 1.000 µg/mL	
阻害アウトプット	
定数	18573
Y 評価値の標準偏差	2863
R 2 乗値	1
決定数	16
自由度	14
X 係数	-5957
係数の標準偏差	716

【図 1 0 B】

細胞系：LOX IMVI 消化管
獲得された細胞：5.0E+03 細胞/ウェル
獲得後 1 日の処理、連続培養
阻害された組成物
(細胞 + MTS [バックグラウンド] = 1902 ± 639)

処 理	用量 (µg/mL)	生の吸収値		平均 マイナス/ バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	243895	44414	241994	44414	0	18
阻害された 組成物	0.003	258286	19215	256384	19215	0	8
	0.01	254659	36627	252757	36627	0	15
	0.03	254844	47365	252942	47365	0	20
	0.1	266290	15768	264388	15768	0	6
	0.3	260996	45040	259094	45040	0	19
	1	290330	53822	288429	53822	0	22
	3	209898	39408	207996	39408	14	16
	10	46118	11089	44216	11089	82	5
ベース		242585	36793	240683	36793	1	15
DOX (ドキソビルジン)	1 µM	2613	906	711	906	100	0

【図 1 0 D】



【図 1 0 C】

IC50 = 6.718 µg/mL (計算された理論的な IC50 吸収値 = 120997)	
阻害に使用された濃度 10.000 および 3.000 µg/mL	
阻害アウトプット	
定数	278187
Y 評価値の標準偏差	28948
R 2 乗値	1
決定数	16
自由度	14
X 係数	-23397
係数の標準偏差	2868

【図 1 0 E】

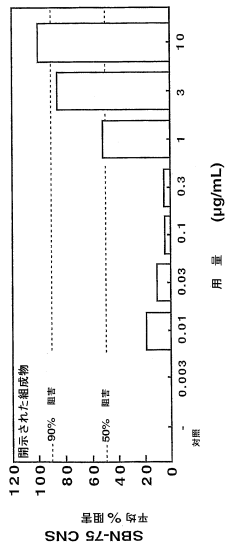
細胞系：LOX HAVI 黒色株
接種された細胞：5.0E+03 細胞/ウェル
接種後 1 日の処理、連続培養
開示された組成物 + ベース (60 µg/mL)
(地盤 + MTS [バックグラウンド] = 789 ± 398)

処 理	用量 (µg/mL)	生の吸収値		平均 マイナス バック グラウンド		% 阻害	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
対照	-	285056	33838	213002	135019	0	63
開示された 組成物+ベース	0.003	288119	15624	215524	134163	0	63
	0.01	268852	46465	200850	130503	6	61
	0.03	247435	26154	184824	116676	13	65
	0.1	257474	29499	192316	121767	10	57
	0.3	190485	32458	142075	92346	33	43
	1	34952	6888	25424	17195	88	8
ベース	3	1591	700	404	845	100	0
	10	1029	259	-17	525	100	0
	DOX (ドキシソシン) 1 µM	306550	29632	229123	144099	0	68
		2221	293	877	1058	100	0

【図 1 0 F】

IC50 = 0.513 µg/mL (計算された理論的な IC50 吸収値 = 106501)	
回帰に使用された濃度 1.000 および 0.300 µg/mL	
回帰アウトプット	
定数	192068
Y 評価値の標準偏差	66421
R 2 乗積	0
決定係	16
自由度	14
X 係数	-166643
係数の標準偏差	47443

【図 1 1 A】



【図 1 1 B】

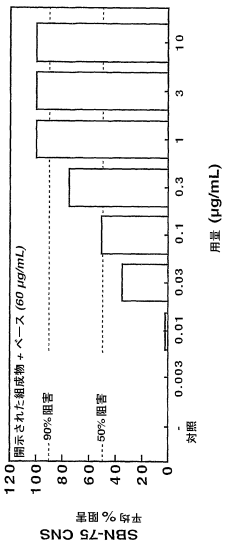
細胞系：SND-75 CNS
接種された細胞：5.0E+03 細胞/ウェル
接種後 1 日の処理、連続培養
開示された組成物
(地盤 + MTS [バックグラウンド] = 672 ± 302)

処 理	用量 (µg/mL)	生の吸収値		平均 マイナス バック グラウンド		% 阻害	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
対照	-	48412	19367	47739	19367	0	41
開示された 組成物	0.003	48690	12158	48018	12158	0	25
	0.01	36743	8449	36071	8449	24	18
	0.03	43415	15428	42743	15428	10	32
	0.1	46415	12022	45743	12022	4	25
	0.3	46134	10910	45462	10910	5	23
	1	23478	12579	22806	12579	52	26
ベース	3	7921	1545	7249	1545	85	3
	10	809	123	137	123	100	0
	DOX (ドキシソシン) 1 µM	58888	20011	58196	20011	0	42
		1288	302	615	302	99	1

【図 1 1 C】

IC50 = 0.895 µg/mL (計算された理論的な IC50 吸収値 = 23870)	
回帰に使用された濃度 1.000 および 0.300 µg/mL	
回帰アウトプット	
定数	56348
Y 評価値の標準偏差	12549
R 2 乗積	1
決定係	16
自由度	14
X 係数	-36287
係数の標準偏差	8954

【図 1 1 D】



【図 1 1 E】

細胞系：SNB-75 CNS
接種された細胞：5.0E+03 細胞/ウェル
接種後1日の処理、連続培養
開示された組成物 + ベース (60 µg/mL)
(増地 + MTS [パツタグラウンド] = 591 ± 131)

薬剤	用量 (µg/mL)	生の吸収値		平均 マイナス バック グラウンド	標準偏差	% 阻害	
		平均	標準偏差			平均	標準偏差
対照	-	76631	13201	76640	13201	0	17
開示された 組成物+ベース	0.003	84362	17247	83761	17247	0	23
	0.01	76032	9649	75441	9649	1	13
	0.03	43393	18208	42802	18208	44	24
	0.1	38209	12752	37618	12752	51	17
	0.3	19327	30859	18736	30859	75	41
	1	793	204	202	204	100	0
	3	257	73	-334	73	100	0
ベース	10	452	119	-139	119	100	0
	DOX (ドキソルビシン)	59124	15254	58533	15254	23	20
	1 µM	1005	169	415	169	99	0

【図 1 1 F】

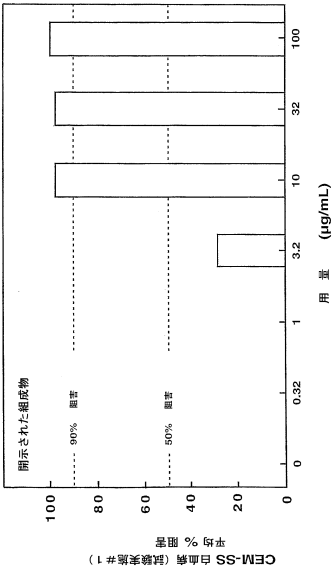
IC50 = 0.095 µg/mL (計算された理論的なIC50の吸収値 = 38020)	
回線に使用された濃度 0.100 および 0.030 µg/mL	
回線アウトプット	
定数	45023
Y 予測値の標準偏差	15719
R 2 乗数	0
測定値	16
自由度	14
χ 係数	-74055
係数の標準偏差	112276

【図 1 2 B】

毒性値 (トリチウムチミン取り込み)

濃度 (µg/mL)	0	0.32	1	3.2	10	32	100
試料 1	187251	238620	247533	147690	4675	7905	1100
試料 2	215975	249276	208674	168000	6001	4214	44
試料 3	251706	243978	228104	157458	5483	6214	57
平均	218311	243958	228104	157716	5453	6111	70
標準偏差	14.8	2.4	8.9	4.7	0.3	0.8	0.0
平均 % 阻害	0	0	0	27.8	97.5	97.2	100

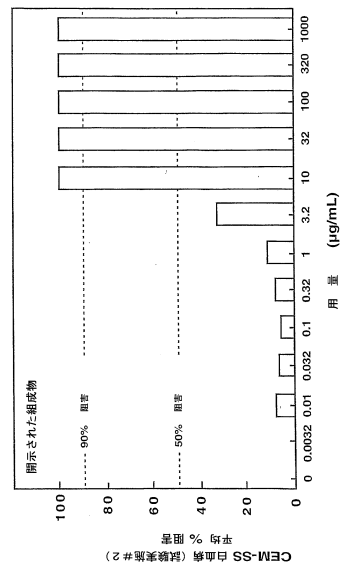
【図 1 2 A】



【図 1 2 C】

IC50 (µg/mL) = 5.87

【図 1 3 A】



【図 1 3 B】

毒性値（トリウムチミン取込み）												
濃度 (μg/mL)	10000	320	100	32	10	3.2	1	0.32	0.1	0.032	0.01	0
試験 1	44	62	36	40	395208	468933	470859	484091	482276	478960	520568	522374
試験 2	264	480	1281	184	1974	361141	461751	477896	480045	483336	475935	509500
平均	154	265	669	112	1267	348676	460342	475279	487043	483806	477148	515937
平均%阻害	100	99.9	99.9	99.9	99.9	32.4	10.8	7.9	6.6	6.2	7.5	0

【図 1 3 C】

IC50 (μg/mL)

=

4.975

【図 1 4】

細胞系	IC50 (μg/mL)	IC50 (μg/mL)
	開示された組成物のみ	開示された組成物 + ベース (60 μg/mL)
NCI-H23 肺	> 10	1.718
NCI-H460 肺	1.183	0.131
MCF7 乳房	2.213	0.972
ZR-75-1 乳房	> 10	2.031
PC-3 前立腺	> 10	1.869
DLD-1 結腸	1.430	0.196
OVCAR-3 卵巣	3.662	0.299
CAKI-1 腎臓	1.440	1.138
LOX IMVI 黒色腫	6.718	0.513
SNB-75 CNS	0.895	0.095
CEM-SS 白血病 (#1)	5.87	-
CEM-SS 白血病 (#2)	4.975	-

【図 1 5 A】

サル血漿中の鉄デキストラン由来の元素鉄						
管理番号	識別/日	時間	分析物 / 限界	値	単位	
413223	AD51, DAY1	PRE	IRON	0.0	mg/ml	
413223	AD51, DAY1	PRE	RL	0.1		
413224	AH3B, DAY1	PRE	IRON	0.0	mg/ml	
413224	AH3B, DAY1	PRE	RL	0.1		
413225	AD51, DAY1	POST	IRON	6.8	mg/ml	
413225	AD51, DAY1	POST	RL	0.1		
413226	AH3B, DAY1	POST	IRON	11.2	mg/ml	
413226	AH3B, DAY1	POST	RL	0.1		
413227	AD51, DAY1	10 MIN	IRON	7.1	mg/ml	
413227	AD51, DAY1	10 MIN	RL	0.1		
413228	AH3B, DAY1	10 MIN	IRON	11.8	mg/ml	
413228	AH3B, DAY1	10 MIN	RL	0.1		
413229	AD51, DAY2	24 HR	IRON	4.7	mg/ml	
413229	AD51, DAY2	24 HR	RL	0.1		
413230	AH3B, DAY2	24 HR	IRON	7.0	mg/ml	
413230	AH3B, DAY2	24 HR	RL	0.1		
413231	AD51, DAY3	48 HR	IRON	3.2	mg/ml	
413231	AD51, DAY3	48 HR	RL	0.1		
413232	AH3B, DAY3	48 HR	IRON	6.4	mg/ml	
413232	AH3B, DAY3	48 HR	RL	0.1		
413233	AD51, DAY4	72 HR	IRON	1.6	mg/ml	
413233	AD51, DAY4	72 HR	RL	0.1		
413234	AH3B, DAY4	72 HR	IRON	5.5	mg/ml	
413234	AH3B, DAY4	72 HR	RL	0.1		

【図 15 B】

サル血漿中の鉄デキストラン由来の元素鉄（続き）

管理番号	識別ノ日	時間	分析物 ／ 限界	値	単位
413235	AD51, DAY5	96 HR	IRON	0.7	mg/ml
413235	AD51, DAY5	96 HR	RL	0.1	
413236	AH3B, DAY5	96 HR	IRON	3.9	mg/ml
413236	AH3B, DAY5	96 HR	RL	0.1	
413237	AD51, DAY6	120 HR	IRON	0.1	mg/ml
413237	AD51, DAY6	120 HR	RL	0.1	
413238	AH3B, DAY6	120 HR	IRON	2.6	mg/ml
413238	AH3B, DAY6	120 HR	RL	0.1	
413239	AD51, DAY7	N/A	IRON	0.0	mg/ml
413239	AD51, DAY7	N/A	RL	0.1	
413240	AH3B, DAY7	N/A	IRON	1.4	mg/ml
413240	AH3B, DAY7	N/A	RL	0.1	
413241	AD51, DAY8	N/A	IRON	0.0	mg/ml
413241	AD51, DAY8	N/A	RL	0.1	
413242	AH3B, DAY8	N/A	IRON	0.8	mg/ml
413242	AH3B, DAY8	N/A	RL	0.1	
413243	AH3B, DAY9	N/A	IRON	0.0	mg/ml
413243	AH3B, DAY9	N/A	RL	0.1	
413244	AD51, DAY9	N/A	IRON	0.0	mg/ml
413244	AD51, DAY9	N/A	RL	0.1	
413245	AH3B, DAY10	N/A	IRON	0.0	mg/ml
413245	AH3B, DAY10	N/A	RL	0.1	
413246	AD51, DAY10	N/A	IRON	0.0	mg/ml
413246	AD51, DAY10	N/A	RL	0.1	

【図 15 C】

サル血漿中の鉄デキストラン由来の元素鉄（結束）

管理番号	識別ノ日	時間	分析物 ／ 限界	値	単位
413247	AD51, DAY15	N/A	IRON	0.0	mg/ml
413247	AD51, DAY15	N/A	RL	0.1	
413248	AH3B, DAY38	N/A	IRON	0.0	mg/ml
413248	AH3B, DAY38	N/A	RL	0.1	
413249	AD51, DAY22	N/A	IRON	0.0	mg/ml
413249	AD51, DAY22	N/A	RL	0.1	
413250	AH3B, DAY22	N/A	IRON	0.0	mg/ml
413250	AH3B, DAY22	N/A	RL	0.1	

KEY

AD51 = 体重 kg あたり 400 mg の元素鉄相当量を投与されたサル

AH3B = 体重 kg あたり 500 mg の元素鉄相当量を投与されたサル

RL = 記録限界

TIME = 静脈内注入後試料が採られた時間

PRE = 処理前のレベル

POST = 注入直後

10 MIN = 注入後 10 分

【図 16】

1 回の静脈内投与
サル血漿中の鉄デキストラン由来の元素鉄

グループ 番号	動物の番号	投与投与				観察期間
		物質	服用レベル	ルート	服用規制	
1	1	鉄デキストラン 複合体	500 mg 元素鉄/kg	IV	1日目 3時間 1分間/ml	10日
2	1		500 mg 元素鉄/kg			

【図 17】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
B	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
C	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
D	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
E	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
F	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
G	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
H	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出

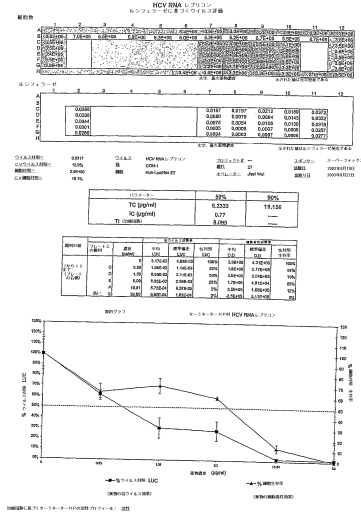
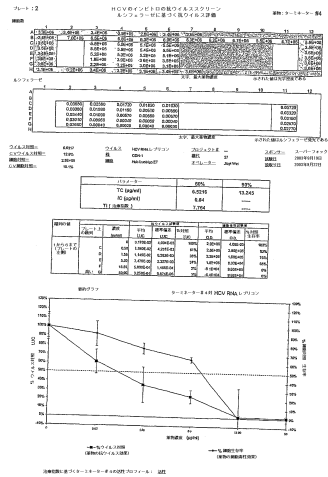
細胞培養定用の標準化された 96 ウェルプレートフォーマット
96 ウェルプレートフォーマット

【図 18】

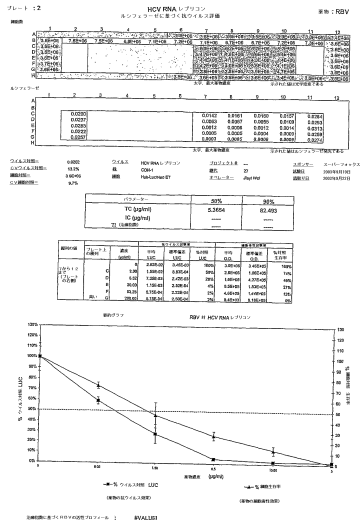
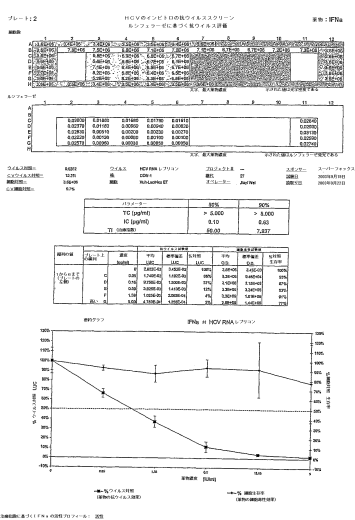
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
B	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
C	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
D	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
E	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
F	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
G	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出
H	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出	ウイルス 検出

抗ウイルス活性測定用の標準化された 96 ウェルプレートフォーマット
96 ウェルプレートフォーマット

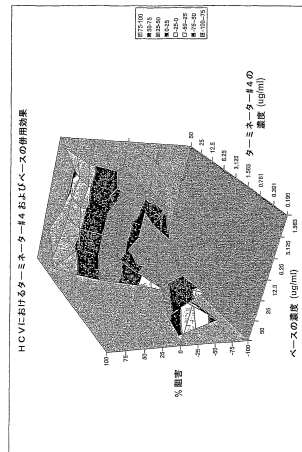
【図 20】



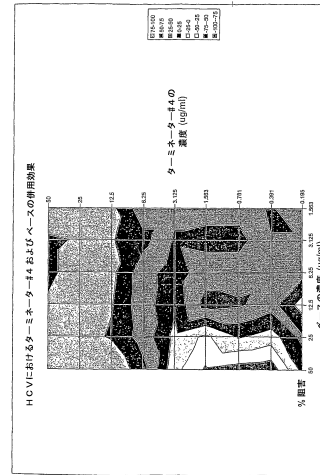
【图 2 2】



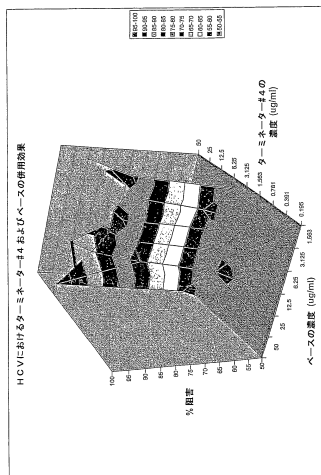
【図 2 3】



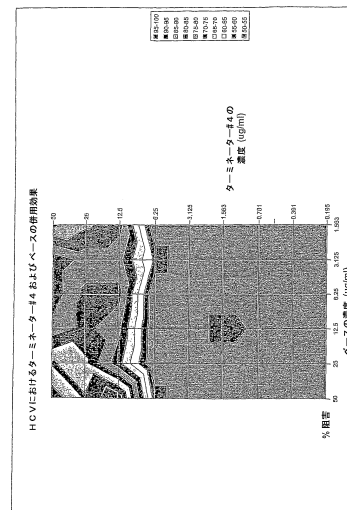
【図 2 4】



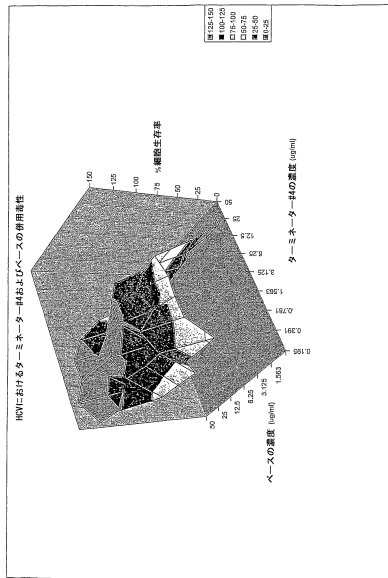
【図 2 5】



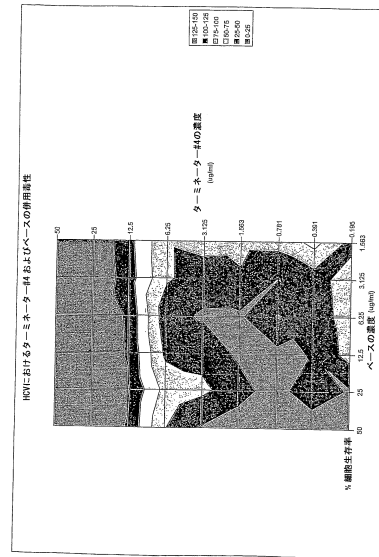
【図 2 6】



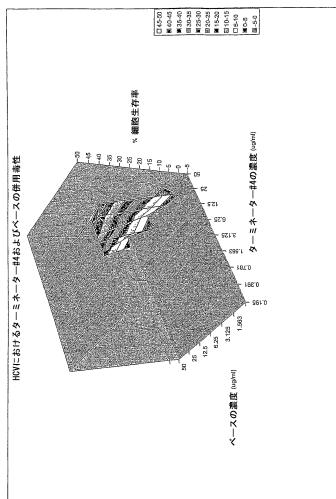
【図 27】



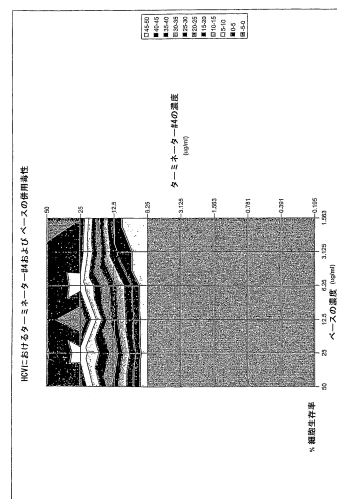
【図 28】



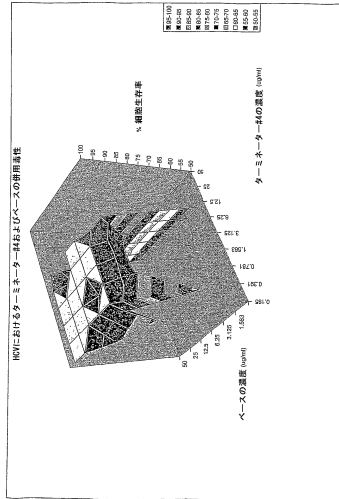
【図 29】



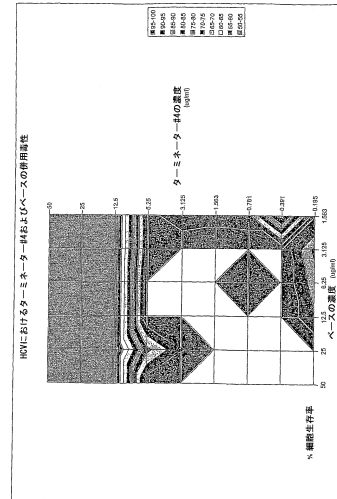
【図 30】



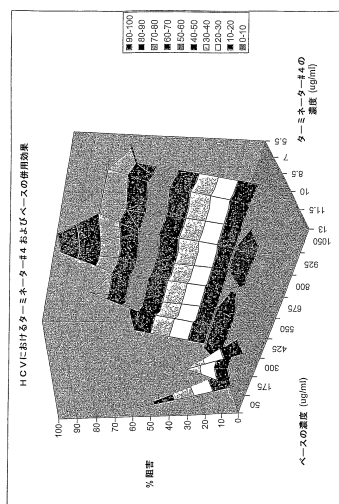
【図 3 1】



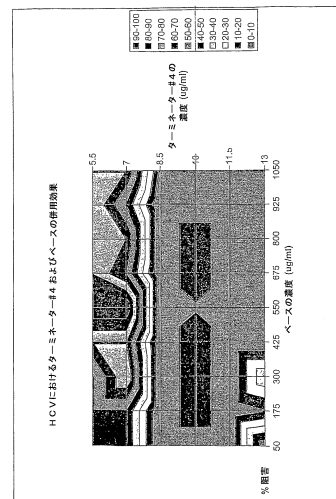
【図 3 2】



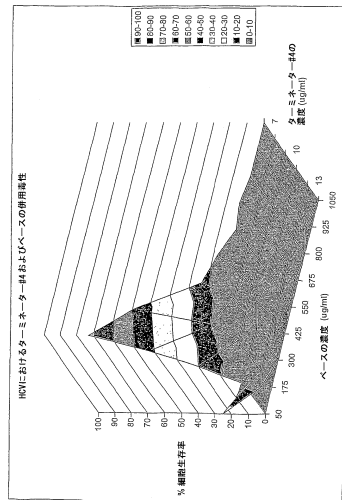
【図 3 3】



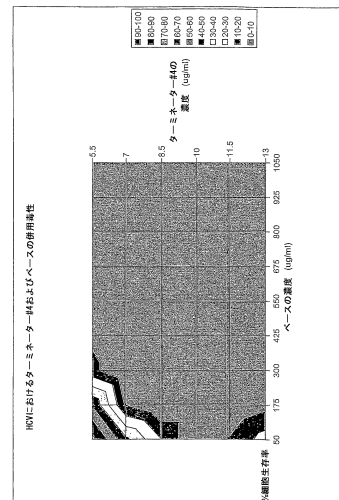
【図 3 4】



【図 3 5】



【図 3 6】



【图 3 7】

[illegible]

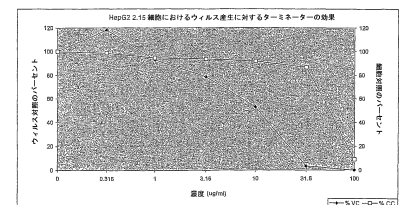
【図 39】

HepG2 2.3細胞におけるウイルス産生に対するターミネーターの効果

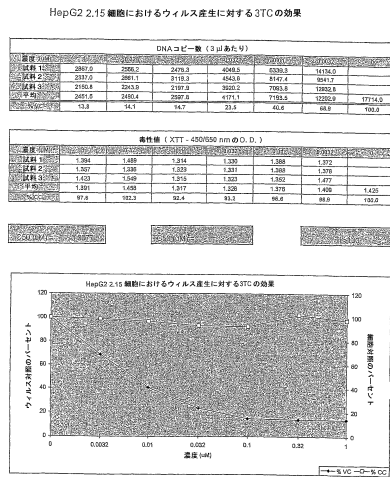
DNAコピー数 (3日あたり)							
濃度	0.0	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0	5.0
濃度 10 ⁵ CFU	0.0	101.0	101.0	101.0	130.0	1700.0	2107.0
濃度 10 ⁴ CFU	0.0	149.0	104.0	101.0	143.0	1430.0	2041.0
濃度 10 ³ CFU	0.3	301.0	771.0	1300.0	1430.0	1850.0	2718.0
濃度 10 ² CFU	0.4	267.0	230.0	74.0	94.0	94.0	2603.0
濃度 10 ¹ CFU	0.0	2.0	62.0	70.0	91.0	115.0	100.0

遺伝子長 (XTT + 450nm)							
濃度	0.0	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0	5.0
濃度 10 ⁵ CFU	0.137	1.207	1.309	1.233	1.349	1.415	
濃度 10 ⁴ CFU	0.127	1.247	1.294	1.242	1.301	1.391	
濃度 10 ³ CFU	0.117	1.107	1.249	1.249	1.412	1.412	1.412
濃度 10 ² CFU	0.126	1.267	1.294	1.297	1.301	1.405	1.420
濃度 10 ¹ CFU	0.126	1.267	1.294	1.297	1.301	1.405	1.420

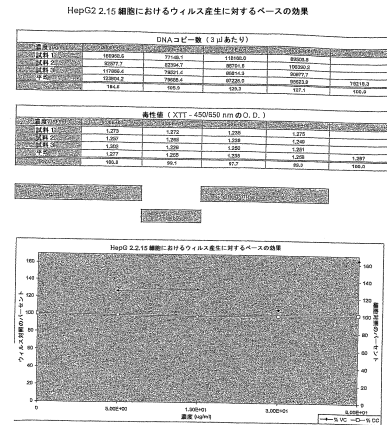
【图 3 8】

[illegible]

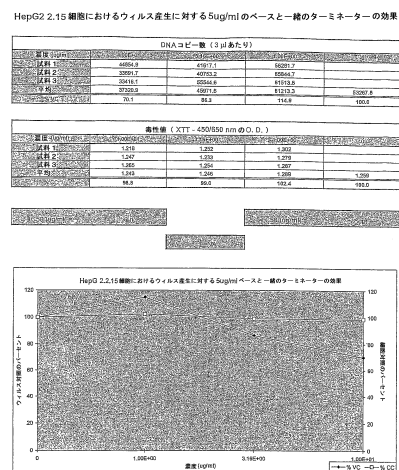
【図 40】



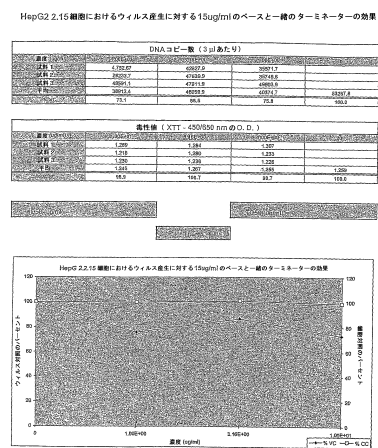
【図 41】



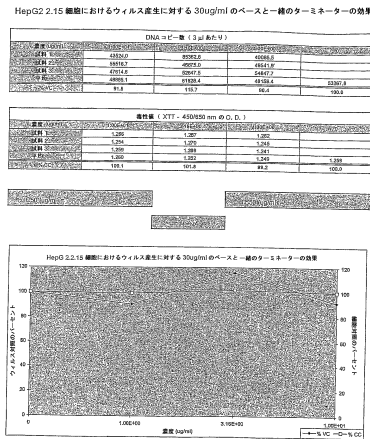
【図 42】



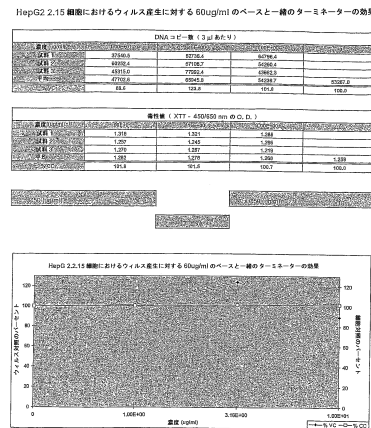
【図 43】



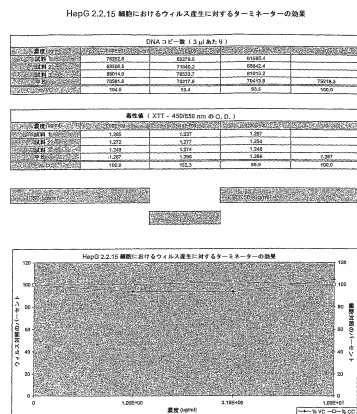
【図 4 4】



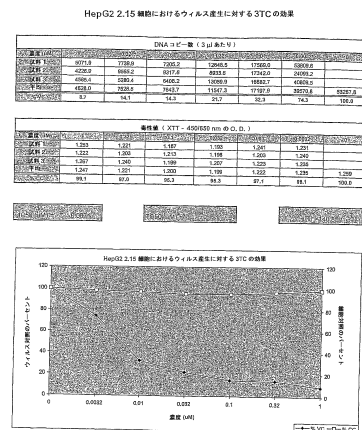
【図 4 5】



【図 4 6】



【図 4 7】

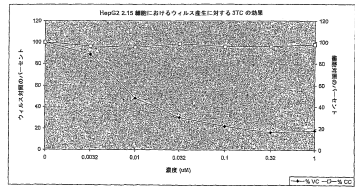


【図 49】

HepG2 2.15 細胞におけるウイルス産生に対する3TCの効果

DNAコピー数 (3回あたり)						
濃度 (ng)	10.0	1.0	0.1	0.01	0.001	0.0001
検体	14769.0	1466.6	19227.5	21075.4	38183.3	59463.0
標準	13540.0	12554.6	14933.2	26292.7	36572.6	46114.3
検出	12687.3	8641.8	91726.4	16189.6	35258.9	75071.2
平均	13425.9	12214.6	15964.5	23252.2	38997.3	66438.9
SD	77.2	16.2	22.0	25.3	47.5	83.3

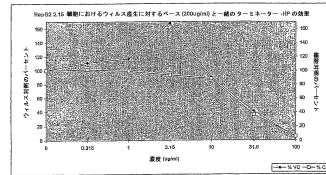
特性値 (XTT = 450/550 nm の D. D.)							
濃度 (ppm)	1.222	1.166	1.265	1.244	1.192	1.240	
原料 (50%)	1.222	1.227	1.214	1.245	1.193	1.235	
原料 (25%)	1.244	1.288	1.228	1.247	1.225	1.250	
水	1.238	1.216	1.214	1.245	1.203	1.212	1.267
平均	97.5	96.0	95.8	98.3	95.0	96.2	100.0



HepG2 2.15細胞におけるウイルス産生に対するベース (200ug/ml) と一連のターミネーター、HP の効果

産地(産年)	2011	2012	2013	2014	2015	2016
岡山県	339.1	4439.3	8669.2	56233.1	114385.4	10444.7
岡山県	445.4	5335.0	18104.2	23864.8	50180.8	13517.3
愛媛県	455.6	4436.5	13300.8	25471.5	32888.5	16820.5
平均	556.1	5572.8	19264.4	35354.4	54293.0	33597.2
	4.9	61.3	50.2	60.7	117.5	115.4

濃度	0.001	0.01	0.1	1	10	100
溶媒	0.067	0.221	1.789	1.366	1.625	1.647
溶媒	0.056	0.490	1.250	1.703	1.650	1.660
溶媒	0.302	0.882	1.285	1.937	1.613	1.609
平均	0.308	0.591	1.274	1.686	1.626	1.613
標準偏差	0.6	36.3	27.3	33.5	39.0	107.8

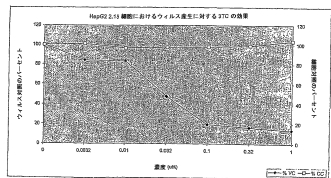


【図 5 1】

HepG2 2.15 細胞におけるウイルス産生に対する 3TC の効果

[illegible]

要素	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
立筋	1,453	1,553	1,490	1,438	1,407	1,480	1,460	1,490	1,460	1,460
立筋	1,584	1,644	1,427	1,429	1,405	1,405	1,435	1,435	1,435	1,435
立筋	1,494	1,468	1,401	1,383	1,387	1,387	1,404	1,404	1,404	1,404
立筋	1,294	1,434	1,416	1,411	1,358	1,363	1,363	1,363	1,363	1,363
立筋	1,370	1,400	1,371	1,374	1,369	1,369	1,369	1,369	1,369	1,369

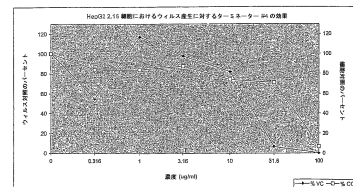


Ag-HEV Testing

HepG2 2.15 細胞におけるウィルス産生に対するターミネーター #4 の効果

	DNAコピー数(3回あたり)				
患者No.	1	2	3	4	5
症例1	34.6	1193.3	6407.4	41735.5	26986.5
症例2	130.9	3268.1	32606.6	42026.4	56891.0
症例3	26.5	6201.1	47923.0	83248.1	67465.0
症例4	16.0	2647.7	44274.4	63656.8	64777.5
対照	0.1	0.6	81.6	87.4	118.8

處理 (mm)	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50
材料	0.051	0.058	0.067	0.076	0.086	0.097	0.108
加工	0.100	0.108	0.117	0.127	0.138	0.149	0.160
材料	0.117	0.128	0.139	0.151	0.163	0.175	0.187
加工	0.069	0.076	0.083	0.091	0.099	0.107	0.115

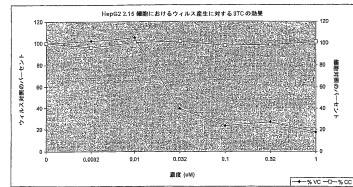


【図 5 3】

HepG2 2.15 細胞におけるウィルス産生に対する 3TC の効果

遺伝子	12.2	12.3	12.4	12.5	12.6	12.7
複製 (SVI)	8705.9	15881.4	12637.2	24796.1	50396.9	47071.7
2 対	14280.5	18940.7	18000.0	17820.7	39545.4	26900.0
3 対	8434.8	11068.7	1272.2	22991.2	43977.7	31768.2
4 対	5689.2	14720.5	12833.0	23466.0	27728.0	54272.9
5 対	17.4	13.3	23.3	28.8	94.4	102.0

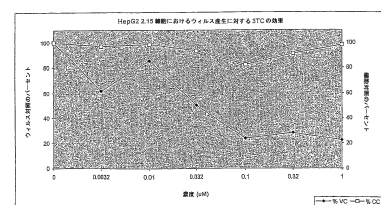
要素	1200	1400	1600	1800	2000	2200
要素	1.200	1.400	1.600	1.800	2.000	2.200
要素	1.400	1.600	1.800	2.000	2.200	2.400
要素	1.600	1.800	2.000	2.200	2.400	2.600
要素	1.800	2.000	2.200	2.400	2.600	2.800
要素	2.000	2.200	2.400	2.600	2.800	3.000
要素	2.200	2.400	2.600	2.800	3.000	3.200
要素	2.400	2.600	2.800	3.000	3.200	3.400
要素	2.600	2.800	3.000	3.200	3.400	3.600
要素	2.800	3.000	3.200	3.400	3.600	3.800
要素	3.000	3.200	3.400	3.600	3.800	4.000
要素	3.200	3.400	3.600	3.800	4.000	4.200
要素	3.400	3.600	3.800	4.000	4.200	4.400
要素	3.600	3.800	4.000	4.200	4.400	4.600
要素	3.800	4.000	4.200	4.400	4.600	4.800
要素	4.000	4.200	4.400	4.600	4.800	5.000
要素	4.200	4.400	4.600	4.800	5.000	5.200
要素	4.400	4.600	4.800	5.000	5.200	5.400
要素	4.600	4.800	5.000	5.200	5.400	5.600
要素	4.800	5.000	5.200	5.400	5.600	5.800
要素	5.000	5.200	5.400	5.600	5.800	6.000
要素	5.200	5.400	5.600	5.800	6.000	6.200
要素	5.400	5.600	5.800	6.000	6.200	6.400
要素	5.600	5.800	6.000	6.200	6.400	6.600
要素	5.800	6.000	6.200	6.400	6.600	6.800
要素	6.000	6.200	6.400	6.600	6.800	7.000
要素	6.200	6.400	6.600	6.800	7.000	7.200
要素	6.400	6.600	6.800	7.000	7.200	7.400
要素	6.600	6.800	7.000	7.200	7.400	7.600
要素	6.800	7.000	7.200	7.400	7.600	7.800
要素	7.000	7.200	7.400	7.600	7.800	8.000
要素	7.200	7.400	7.600	7.800	8.000	8.200
要素	7.400	7.600	7.800	8.000	8.200	8.400
要素	7.600	7.800	8.000	8.200	8.400	8.600
要素	7.800	8.000	8.200	8.400	8.600	8.800
要素	8.000	8.200	8.400	8.600	8.800	9.000
要素	8.200	8.400	8.600	8.800	9.000	9.200
要素	8.400	8.600	8.800	9.000	9.200	9.400
要素	8.600	8.800	9.000	9.200	9.400	9.600
要素	8.800	9.000	9.200	9.400	9.600	9.800
要素	9.000	9.200	9.400	9.600	9.800	10.000
要素	9.200	9.400	9.600	9.800	10.000	10.200
要素	9.400	9.600	9.800	10.000	10.200	10.400
要素	9.600	9.800	10.000	10.200	10.400	10.600
要素	9.800	10.000	10.200	10.400	10.600	10.800
要素	10.000	10.200	10.400	10.600	10.800	11.000
要素	10.200	10.400	10.600	10.800	11.000	11.200
要素	10.400	10.600	10.800	11.000	11.200	11.400
要素	10.600	10.800	11.000	11.200	11.400	11.600
要素	10.800	11.000	11.200	11.400	11.600	11.800
要素	11.000	11.200	11.400	11.600	11.800	12.000



HepG2 2.15 細胞におけるウィルス産生に対する 3TC の効果

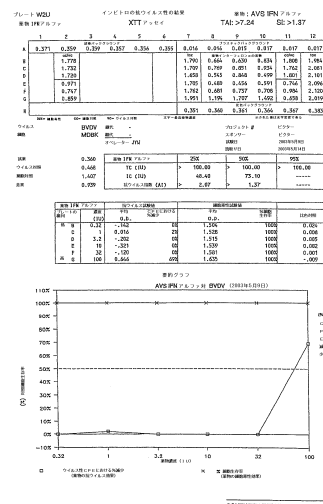
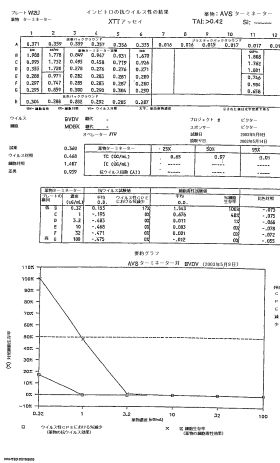
菌株	19847.3	18941.7	12241.0	33856.8	70148.7	29410.2
2974	12979.8	12413.3	77929.7	77820.9	27940.2	22211.1
2976	5086.0	16725.8	8681.2	13105.6	4363.5	50385.7
2978	12345.4	15651.9	13063.0	21685.9	68829.4	35565.3
平均	22.4	26.2	23.7	50.4	85.4	61.8
標準偏差	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5

材料	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005
材料 1	1.641	1.252	1.209	1.337	1.437
材料 2	1.441	1.325	1.194	1.386	1.428
材料 3	1.462	1.406	1.321	1.411	1.466
材料 4	1.468	1.341	1.211	1.378	1.446
材料 5	93.2	91.0	82.2	93.5	96.7
材料 6					97.1
材料 7					93.0

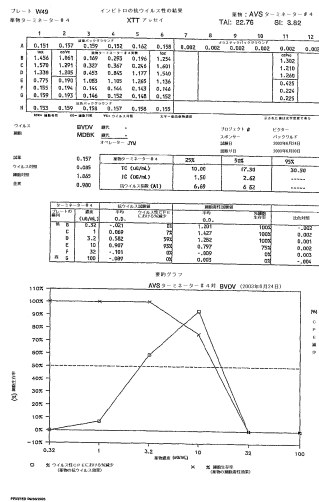


【図 5 4】

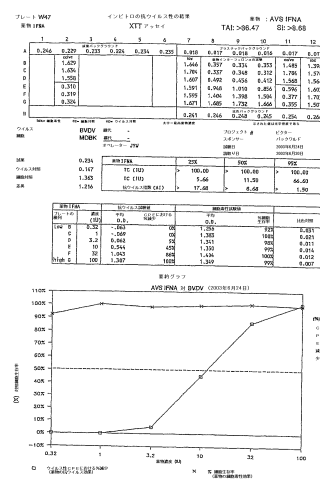
【図 5 5】



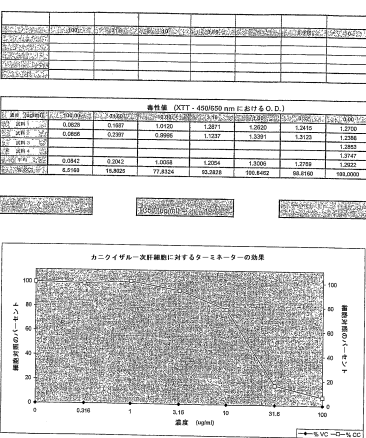
【図 5 6】



【図 5 7】



【図 5 8】



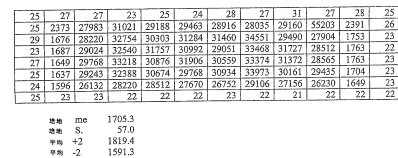
【図 5 9 A】

Table 59A: A table showing the relationship between the concentration of the active ingredient (X-axis, 0.01 to 100) and the effect (Y-axis, -100 to 100). The table is titled "XTTプロット" and includes a table of data points. The data points are as follows:

濃度 (mg/ml)	効果 (%)
0.01	-100
0.02	-100
0.05	-100
0.1	-100
0.2	-100
0.5	-100
1	-100
2	-100
5	-100
10	-100
20	-100
50	-100
100	-100

【図 6 0】

【図 5 9】



【図 6 6 A】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

96,0000												
112,6000												
115,7000												
131,9000												
153,2000												

ウイルス濃度 = 123.3300 ウイルス = 108.8000 83.8000 107.4000 101.1000 102.8000
 CV ウイルス対照 = 4.3% 検体 = 71.2000 68.3000 66.9000 57.3000 126.0000
 細胞対照 = 77 細胞 = 41.7000 42.4000 40.0000 44.4000 108.2000
 検体 = 25.8000 19.4000 21.7000 24.2000 141.1000
 CV 細胞対照 = 6.3% 検体 = 0.1000 0.0000 0.7000 1.8000 115.1000

示された値はルシフェラーゼルミネッセンスである

ウイルス濃度 = 123.3300 ウイルス = 108.8000 83.8000 107.4000 101.1000 102.8000
 CV ウイルス対照 = 4.3% 検体 = 71.2000 68.3000 66.9000 57.3000 126.0000
 細胞対照 = 77 細胞 = 41.7000 42.4000 40.0000 44.4000 108.2000
 検体 = 25.8000 19.4000 21.7000 24.2000 141.1000
 CV 細胞対照 = 6.3% 検体 = 0.1000 0.0000 0.7000 1.8000 115.1000

【図 6 7】

パラメータ	50%	90%
細胞毒性 = IC (ug/ml)	6.8732	16.369
抗ウイルス活性 = EC (ug/ml)	0.18	----
選択指数 = SI (IC/EC)	38.18	----

【図 6 8】

系列の値	プレートの特列	濃度 (ug/ml)	抗ウイルス試験値			細胞毒性試験値		
			平均 LUC	標準偏差 LUC	% 対照 LUC	平均 O.O.	標準偏差 O.O.	% 対照 生存率
7から12まで (プレート の右側)	C	0	1.22E+02	1.81E+01	100%	1.1E+07	6.87+05	100%
	D	0.03	9.97E+01	1.10E+01	82%	1.0E+07	1.72E+05	96%
	E	0.13	6.59E+01	6.02E+00	54%	1.1E+07	2.04E+05	113%
	F	0.04	4.21E+01	1.82E+00	34%	1.0E+07	3.10E+05	93%
	G	0.20	3.8E+01	2.81E+00	31%	9.6E+05	7.03E+05	89%
	H	16.00	6.50E+01	0.27E+01	1%	8.6E+05	8.5E+05	8%

【図 7 0】

HCV RNA レプリコンシリアルファクターに基づいた抗ウイルス評価

細胞番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

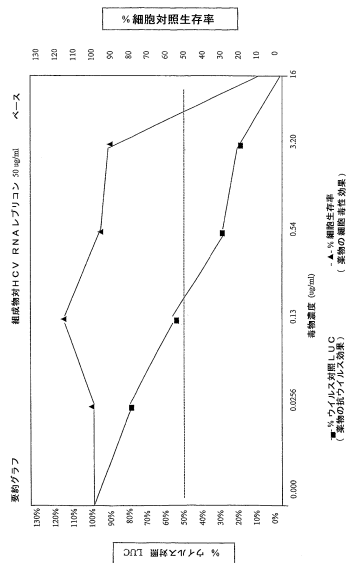
259,8000												
228,9000												
282,4000												
206,1000												
238,4000												

ウイルス濃度 = 234.4000 ウイルス = 214.1000 196.6000 218.6000 224.4000 205.5000
 CV ウイルス対照 = 13.4% 検体 = 155.9000 166.6000 194.8000 155.0000 199.8000
 細胞対照 = 1.4E+07 細胞 = 130.5000 152.4000 130.0000 112.3000 280.8000
 検体 = 74.3000 68.2000 73.1000 58.5000 199.6000
 CV 細胞対照 = 7.2% 検体 = 1.8000 1.5000 2.0000 4.7000 253.9000

示された値はルシフェラーゼルミネッセンスである

ウイルス濃度 = 234.4000 ウイルス = 214.1000 196.6000 218.6000 224.4000 205.5000
 CV ウイルス対照 = 13.4% 検体 = 155.9000 166.6000 194.8000 155.0000 199.8000
 細胞対照 = 1.4E+07 細胞 = 130.5000 152.4000 130.0000 112.3000 280.8000
 検体 = 74.3000 68.2000 73.1000 58.5000 199.6000
 CV 細胞対照 = 7.2% 検体 = 1.8000 1.5000 2.0000 4.7000 253.9000

【図 6 9】



【図 7 0 A】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

259,8000												
228,9000												
282,4000												
206,1000												
238,4000												

ウイルス濃度 = 234.4000 ウイルス = 214.1000 196.6000 218.6000 224.4000 205.5000
 CV ウイルス対照 = 13.4% 検体 = 155.9000 166.6000 194.8000 155.0000 199.8000
 細胞対照 = 1.4E+07 細胞 = 130.5000 152.4000 130.0000 112.3000 280.8000
 検体 = 74.3000 68.2000 73.1000 58.5000 199.6000
 CV 細胞対照 = 7.2% 検体 = 1.8000 1.5000 2.0000 4.7000 253.9000

示された値はルシフェラーゼルミネッセンスである

ウイルス濃度 = 234.4000 ウイルス = 214.1000 196.6000 218.6000 224.4000 205.5000
 CV ウイルス対照 = 13.4% 検体 = 155.9000 166.6000 194.8000 155.0000 199.8000
 細胞対照 = 1.4E+07 細胞 = 130.5000 152.4000 130.0000 112.3000 280.8000
 検体 = 74.3000 68.2000 73.1000 58.5000 199.6000
 CV 細胞対照 = 7.2% 検体 = 1.8000 1.5000 2.0000 4.7000 253.9000

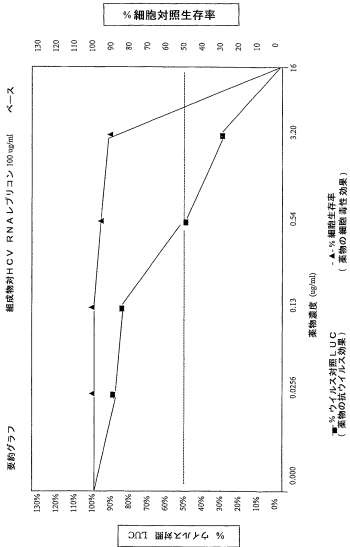
【図 7 1】

パラメータ	50%	90%
細胞毒性 = IC (ug/ml)	6.8864	14.820
抗ウイルス活性 = EC (ug/ml)	0.73	----
選択指数 = SI (IC/EC)	8.433	----

【図 7 2】

細胞の種	プレートの種別	濃度 (μg/ml)	抗ウイルス試験値			細胞毒性試験値		
			平均 LIC	標準偏差 LIC	%対照 LIC	平均 O.O.	標準偏差 O.O.	%対照 生存率
7から12まで (プレートの 右側)	C	0	2.34E+02	3.14E+01	100%	1.4E+07	1.01E+06	100%
	D	0.03	2.13E+02	1.56E+01	92%	1.4E+07	8.5E+05	100%
	E	0.64	1.21E+02	1.03E+01	52%	1.5E+07	8.15E+05	98%
	F	3.20	6.83E+01	7.19E+00	29%	1.3E+07	5.9E+05	96%
	G	16.00	2.62E+01	1.47E+01	14%	9.1E+05	2.5E+05	8%

【図 7 3】



【図 7 4】

HCV RNAレプリコンシフェラーゼに基づく抗ウイルス評価

細胞番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2171564	1737582	1720258	1743844	1702452	1746030	1687040	1684103	1750164	1627815	1705740	2174831
B	2171564	1737582	1720258	1743844	1702452	1746030	1687040	1684103	1750164	1627815	1705740	2174831
C	2227805	1725805	1594524	1603524	1729512	1725805	1594524	1603524	1729512	1725805	1594524	2173807
D	2171564	1737582	1720258	1743844	1702452	1746030	1687040	1684103	1750164	1627815	1705740	2174831
E	2171564	1737582	1720258	1743844	1702452	1746030	1687040	1684103	1750164	1627815	1705740	2174831
F	2078638	1474179	1435991	1348943	1487570	1474179	1435991	1348943	1487570	1474179	1435991	2180609
G	2171564	1737582	1720258	1743844	1702452	1746030	1687040	1684103	1750164	1627815	1705740	2174831
H	2171564	1737582	1720258	1743844	1702452	1746030	1687040	1684103	1750164	1627815	1705740	2174831

示された値は平均値である

【図 7 5】

パラメータ	50%	90%
細胞毒性 = IC (μg/ml)	6.1415	13.873
抗ウイルス活性 = EC (μg/ml)	0.05	---
選択指数 = SI (IC/EC)	9.448	---

【図 7 6】

細胞の種	プレートの種別	濃度 (μg/ml)	抗ウイルス試験値			細胞毒性試験値		
			平均 LIC	標準偏差 LIC	%対照 LIC	平均 O.O.	標準偏差 O.O.	%対照 生存率
7から12まで (プレートの 右側)	C	0	2.78E+02	3.41E+01	100%	1.5E+07	3.78E+05	100%
	D	0.03	2.58E+02	2.55E+01	94%	1.5E+07	3.78E+05	98%
	E	0.64	1.38E+02	1.58E+01	50%	1.4E+07	2.03E+05	101%
	F	3.20	8.03E+01	7.36E+00	29%	1.2E+07	6.24E+05	92%
	G	16.00	3.05E+01	1.70E+01	14%	3.0E+07	6.52E+04	2%

【図 7 4 A】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	226.1000						252.9000	228.8000	290.7000	259.9000	225.6000	
B	278.6000						171.1000	186.7000	218.8000	218.5000	254.1000	
C	283.0000						131.5000	147.4000	154.5000	119.5000	242.1000	
D	298.0000						77.0000	71.6000	88.4000	84.0000	257.3000	
E	352.9000						1.7000	2.7000	4.7000	5.3000	241.3000	
F												
G												
H												

太字 - 最高濃度

示された値は平均値である

ウイルス対照 = 275.5900

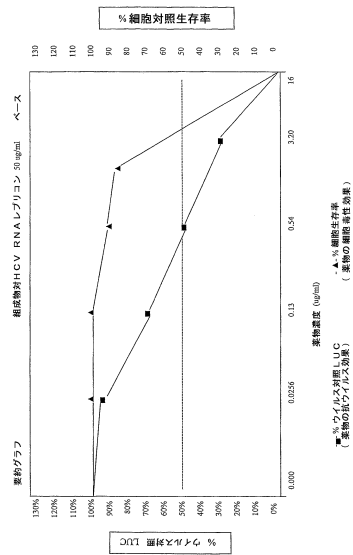
ウイルス株 = CON-1

CVウイルス対照 = 12.4%

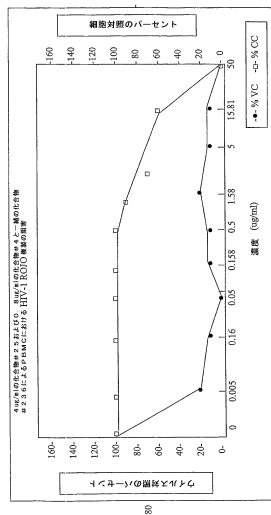
細胞 = Hub-Luc/Neo ET

CV細胞対照 = 2.5%

【図 77】



【図 8 2】



【図 8 3 A】

濃度 (nM)	0.00	0.010	0.3200	1.000	3.160	10.00	31.62	100.00	316.20	1000.0
試料 1	12798.6	13051.0	14358.0	16024.0	17637.0	19342.0	21001.0	22754.0	24500.0	26250.0
試料 2	12798.6	13051.0	14358.0	16024.0	17637.0	19342.0	21001.0	22754.0	24500.0	26250.0
試料 3	12798.6	13051.0	14358.0	16024.0	17637.0	19342.0	21001.0	22754.0	24500.0	26250.0
平均	12798.6	13051.0	14358.0	16024.0	17637.0	19342.0	21001.0	22754.0	24500.0	26250.0
%VC	100.0	95.2	108.4	94.5	99.0	88.2	55.9	77.5	68.5	66

【図 8 3】

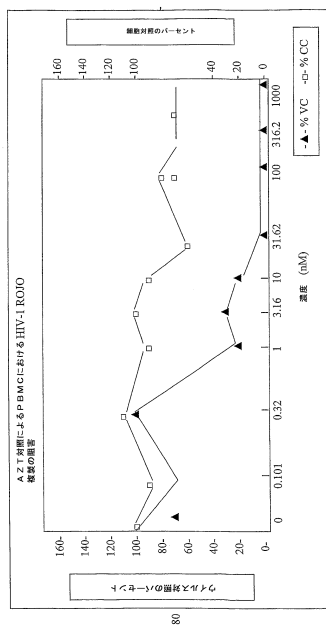
AZ T 剤による P BMC における HIV-1 ROJO 複製の阻害

濃度 (nM)	0.00	0.010	0.3200	1.000	3.160	10.00	31.82	100.00	316.20	1000.00
試料 1	30053	4144	28402	12344	5487	9011	377	198	330	190
試料 2	34402	25089	19258	2636	9004	5389	670	190	168	168
試料 3	10739	19146	16642	2599	9091	354	258	300	300	242
平均	21418.0	16119.7	21434.0	5859.7	8080.7	4318.0	418.3	229.3	266.0	200.0
%VC	100.0	75.3	100.1	27.4	37.6	20.2	2.0	1.1	1.2	0.9

【図 8 4】

TC50 (nM) = 0.70	TC50 (nM) = >1000.0	TI = >1428.57
------------------	---------------------	---------------

【図 8 5】



【図 8 6】

4 ug/ml の化合物# 2 5 および 0.8 ug/ml の化合物# 4 と一緒の化合物# 2 3 6 による P BMC における HIV-1 ROJO 複製の阻害

濃度 (ug/ml)	0.00	0.005	0.02	0.05	0.16	0.50	1.58	5.00	15.81	50.00
試料 1	1961	1713	1920	1493	1449	2056	878	785	231	180
試料 2	2005	1071	450	849	1090	659	688	829	295	231
試料 3	3970	1278	702	1361	1032	578	1045	519	216	216
平均	2345.3	1354.0	1024.0	1234.3	1153.7	1449.0	714.7	886.3	348.3	209.0
%VC	100.0	57.7	43.7	52.6	49.2	61.8	30.5	37.8	14.9	8.9

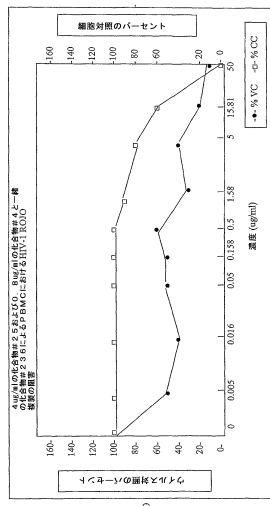
【図 8 6 A】

濃度 (ug/ml)	0.00	0.005	0.02	0.05	0.16	0.50	1.58	5.00	15.81	50.00
試料 1	12798.6	13051.0	14358.0	16024.0	17637.0	19342.0	21001.0	22754.0	24500.0	26250.0
試料 2	12798.6	13051.0	14358.0	16024.0	17637.0	19342.0	21001.0	22754.0	24500.0	26250.0
試料 3	12798.6	13051.0	14358.0	16024.0	17637.0	19342.0	21001.0	22754.0	24500.0	26250.0
平均	12798.6	13051.0	14358.0	16024.0	17637.0	19342.0	21001.0	22754.0	24500.0	26250.0
%VC	100.0	111.5	114.8	115.9	118.0	121.2	110.2	90.0	6.6	0

【図 8 7】

IC50 (ug/ml) =0.009	TC50 (ug/ml) =20.5	TI =2277.78
---------------------	--------------------	-------------

【図 8 8】



【図 8 9】

デキストラン硫酸対照による PBMC における HIV-1 MDR 複製の阻害

	RT 値 (cpm)									
濃度 (ug/ml)	0.00	0.0100	0.0320	0.101	0.320	1.00	3.16	10.00	31.62	100.00
試料 1	1961	2101	2397	1691	1888	1676	1499	762	403	288
試料 2	2006	2526	2974	2193	2038	1506	1174	586	418	359
試料 3	3070	3011	2027	2319	1432	1617	561	681	469	374
平均	2345.3	2646.0	2466.0	2067.7	1779.3	1599.7	1078.0	676.3	430.0	339.7
%VC	100.0	112.8	105.1	88.2	75.9	68.2	48.0	28.8	18.3	14.5

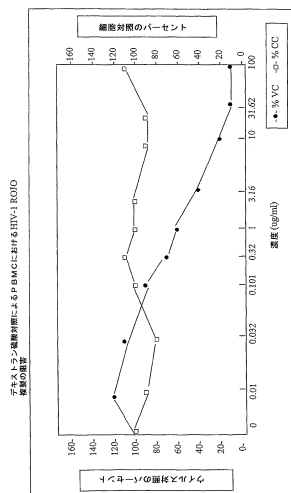
【図 8 9 A】

	毒性値 (オミジン数込み (CPM))									
濃度 (ug/ml)	0.00	0.0100	0.0320	0.101	0.320	1.00	3.16	10.00	31.62	100.0
試料 1	128798.6	112637.0	100000.6	110051.2	117448.8	129012.8	115722.6	105502.6	113566.6	123518
試料 2	114086.4	114123.8	111911.8	122434.2	131352.2	117167.4	110507.8	107314.2	110475.4	131567
試料 3	110182.8	115521.8	112239.0	113265.6	127331.4	116953.2	119954.8	108235.4	112574.0	142906
平均	117689.3	113427.5	108057.1	113250.3	125377.5	121044.5	115395.0	107017.4	112205.3	133697
%CC	100.0	96.4	91.8	97.9	106.5	102.7	98.1	90.9	95.3	112

【図 9 0】

IC50 (ug/ml) = 2.56	TC50 (ug/ml) = >100.0	TI = >39.06
---------------------	-----------------------	-------------

【図 9 1】



【図 9 2 A】

	毒性値 (オミジン数込み (CPM))									
濃度 (ug/ml)	0.00	0.005	0.02	0.05	0.16	0.50	1.57	5.00	15.81	50.00
試料 1	128798.6	140620.0	138480.5	143193.3	137954.2	128584.0	126653.4	8462.6	385.0	185.0
試料 2	114086.4	118852.8	130044.0	128571.0	128661.7	131560.7	130729.7	131605.7	65929.2	269.3
試料 3	110182.8	117882.3	135068.2	136421.8	138886.3	126688.6	129490.0	105004.8	75920.7	238.6
平均	117689.3	131220.7	135068.2	136421.8	138886.3	126688.6	129490.0	105004.8	75920.7	238.6
%CC	100.0	111.5	114.8	115.9	118.0	121.2	110.2	90.0	64.6	0.2

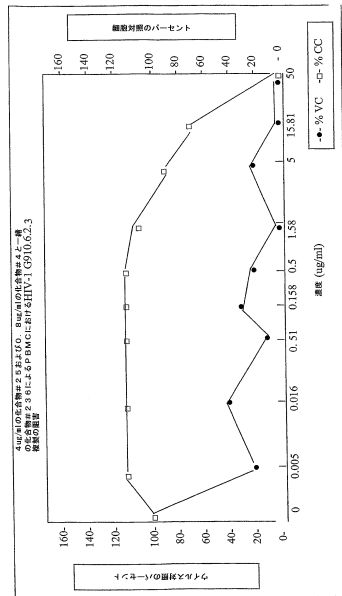
【図 9 2】

	RT 値 (cpm)									
濃度 (ug/ml)	0.00	0.005	0.02	0.05	0.18	0.50	1.58	5.00	15.81	50.00
試料 1	4824	716	5087	1295	2517	2291	212	1614	281	166
試料 2	5349	1753	2871	1420	2064	1522	688	490	360	166
試料 3	7577	1765	1337	600	1625	768	256	1369	317	159
平均	5916.7	1413.0	2452.3	1105.0	2068.7	1527.0	385.3	1157.7	319.3	163.7
%VC	100.0	23.9	41.1	16.7	35.0	25.8	6.5	19.6	5.4	2.8

【図 9 3】

IC50 (ug/ml) = <0.00500	TC50 (ug/ml) = 20.5	TI = >4100.00
-------------------------	---------------------	---------------

【図 9 4】



【図 9 5】

デキストラン硫酸ナトリウムによる PBMC における HIV-1 G910.6.2.3 複製の阻害

濃度 (ug/ml)	0.00	0.0100	0.0320	0.101	0.320	1.00	3.16	10.00	31.62	100.00
試料 1	4824	3655	3655	2929	2929	2370	1831	1263	344	132
試料 2	5349	4683	4632	3574	3463	3123	1093	527	176	66
試料 3	7577	5231	4062	5435	3153	2961	1181	483	190	95
平均	5916.7	4523.0	4116.3	3882.7	3265.3	2638.3	1179.0	451.3	200.0	97.7
%VC	100.0	76.4	69.6	67.3	50.6	44.6	19.9	7.6	3.4	1.7

【図 9 5 A】

濃度 (ug/ml)	0.00	0.0100	0.0320	0.101	0.320	1.00	3.16	10.00	31.62	100.00
試料 1	12879.6	12637.0	10000.6	11051.2	11744.8	12901.8	11572.6	10562.6	11356.6	12518.6
試料 2	14086.4	14123.8	11911.8	12544.2	13135.2	17167.4	11057.6	10214.2	11847.4	14387.6
試料 3	17689.3	13427.5	10697.3	11254.3	12357.5	12104.5	11557.0	10712.4	11203.3	13697.7
平均	15184.8	13396.1	10569.3	11436.8	12412.5	13724.6	11228.1	10643.1	11120.8	13538.3
%VC	100.0	86.4	69.4	91.8	97.9	108.7	102.9	98.1	90.9	95.3

【図 9 6】

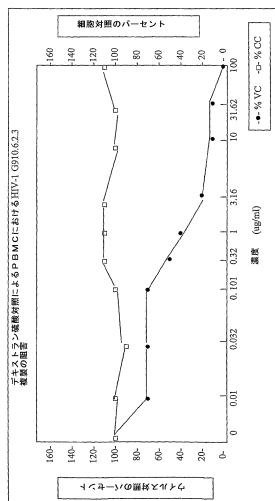
IC50 (ug/ml) = 0.36	TC50 (ug/ml) =>100.0	TI =>277.78
---------------------	----------------------	-------------

【図 9 8】

4 UG/ML の化合物 #25 および 0.8 UG/ML の化合物 #4 と一緒の化合物 #236 による PBMC における HIV-1 S2-S2 複製の阻害

濃度 (ug/ml)	0.00	0.005	0.02	0.05	0.16	0.50	1.58	5.00	15.81	50.00
試料 1	7844	2829	1351	1668	1285	1471	1141	872	410	281
試料 2	8928	2378	2393	1800	1507	1529	1185	720	346	360
試料 3	10087	1817	2445	1595	2064	1237	498	901	267	267
平均	8953.0	2341.3	2063.0	1697.7	1622.0	1412.3	941.3	831.0	341.0	302.7
%VC	100.0	26.2	23.0	18.9	18.1	15.8	10.5	9.3	3.8	3.4

【図 9 7】



【図 9 8 A】

濃度 (ug/ml)	0.00	0.005	0.02	0.05	0.16	0.50	1.58	5.00	15.81	50.00
試料 1	12879.6	12637.0	10000.6	11051.2	11744.8	12901.8	11572.6	10562.6	11356.6	12518.6
試料 2	14086.4	14123.8	11911.8	12544.2	13135.2	17167.4	11057.6	10214.2	11847.4	14387.6
試料 3	17689.3	13427.5	10697.3	11254.3	12357.5	12104.5	11557.0	10712.4	11203.3	13697.7
平均	15184.8	13396.1	10569.3	11436.8	12412.5	13724.6	11228.1	10643.1	11120.8	13538.3
%VC	100.0	86.4	69.4	91.8	97.9	108.7	102.9	98.1	90.9	95.3

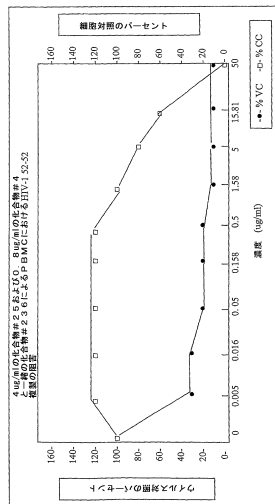
【図 99】

IC50 (ug/ml) = <0.00500

TC50 (ug/ml) = 20.5

TI =>4100.00

【図 100】



【図 101】

デキストラン凝縮剤によるPRMCにおけるHIV-1 S2-S2複製の阻害

	試料 量 (ug/ml)									
濃度 (ug/ml)	0.00	0.0100	0.0320	0.101	0.320	1.00	3.18	10.00	31.62	100.00
試料 1	7844	5853	4402	4741	4423	3773	1122	586	381	264
試料 2	8828	6845	6795	4807	5904	2688	1248	469	307	381
試料 3	10087	8059	6541	5354	3603	1595	1233	535	330	205
平均	8953.0	6919.0	5912.0	4987.3	4343.3	2685.3	1201.0	530.0	339.3	283.3
%VC	100.0	77.3	66.0	55.7	48.7	30.0	13.4	5.9	3.8	3.2

【図 101A】

	試料 量 (ug/ml)									
濃度 (ug/ml)	0.00	0.0100	0.0320	0.101	0.320	1.00	3.16	10.00	31.62	100.00
試料 1	128798.6	172637.0	100000.6	110051.2	117448.8	129012.8	119722.6	105502.6	113566.6	124518.6
試料 2	114086.4	14123.8	11193.8	12258.2	13135.2	11767.4	11972.6	11994.4	11994.4	11994.4
試料 3	117689.3	119427.3	108957.1	115250.3	123377.5	121044.5	113594.0	107014.4	112205.3	126997.6
平均	117689.3	119427.3	108957.1	115250.3	123377.5	121044.5	113594.0	107014.4	112205.3	126997.6
%CC	100.0	96.4	91.8	97.9	108.5	102.7	98.1	90.7	95.3	112.8

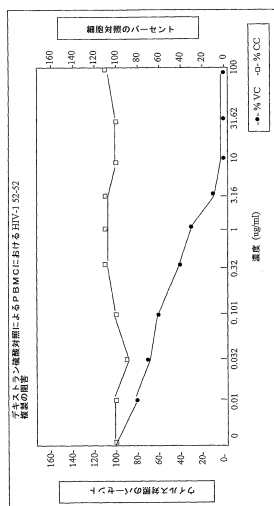
【図 102】

IC50 (ug/ml) = 0.25

TC50 (ug/ml) =>100.0

TI =>400.00

【図 103】



【図 104】

4 UG/MILの化合物#25および0.8 UG/MILの化合物#4と一緒の化合物#236によるPRMCにおけるHIV-1 S2-S2複製の阻害

	試料 量 (ug/ml)									
濃度 (ug/ml)	0.00	0.005	0.02	0.05	0.16	0.50	1.58	5.00	15.81	50.00
試料 1	6570	1152	1484	1120	1434	1910	959	395	216	223
試料 2	9613	1418	1448	1178	1112	1595	1098	389	259	252
試料 3	8725	3043	2223	1749	1112	1632	1112	365	317	321
平均	8302.7	1871.0	1718.3	1349.0	1219.3	1712.3	1056.3	550.0	264.0	268.7
%VC	100.0	22.5	20.7	18.2	14.7	20.6	12.7	8.6	3.2	3.2

【図 104A】

	試料 量 (ug/ml)									
濃度 (ug/ml)	0.00	0.005	0.02	0.05	0.16	0.50	1.58	5.00	15.81	50.00
試料 1	128798.6	172637.0	100000.6	110051.2	117448.8	129012.8	119722.6	105502.6	113566.6	124518.6
試料 2	114086.4	14123.8	11193.8	12258.2	13135.2	11767.4	11972.6	11994.4	11994.4	11994.4
試料 3	117689.3	119427.3	108957.1	115250.3	123377.5	121044.5	113594.0	107014.4	112205.3	126997.6
平均	117689.3	119427.3	108957.1	115250.3	123377.5	121044.5	113594.0	107014.4	112205.3	126997.6
%CC	100.0	97.1	100.0	101.0	102.8	105.6	95.9	78.4	56.2	0.

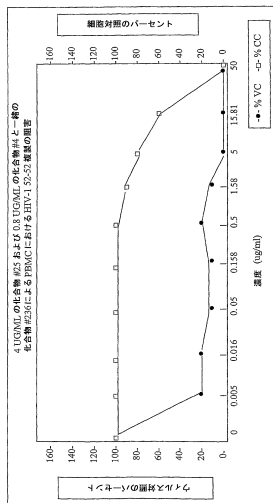
【図105】

IC50 (ug/ml) = <0.00500

TC50 (ug/ml) = 18.0

TI =>3600.00

【図106】



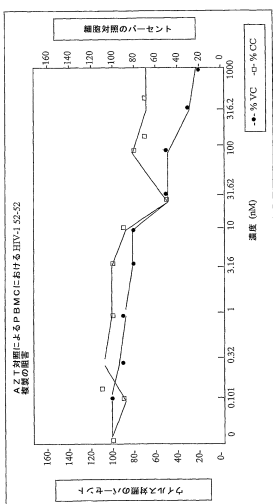
【図108】

IC50 (nM) = 106.9

TC50 (nM) =>1000.0

TI =>9.35

【図109】



【図107】

AZT 対照による PBMC における HIV-1 RT 阻害の阻害

	RT 量 (cpm)									
濃度 (nM)	0.00	0.010	0.2200	1.005	3.160	10.00	31.62	100.00	316.20	1000.00
試料 1	5570	7318	6319	6868	7142	4999	4970	3457	2339	455
試料 2	9613	7163	7496	7438	5805	7230	4366	5092	3384	2600
試料 3	8725	10472	8369	7068	7186	7799	4741	4168	2461	3128
平均	8305.7	8317.7	7394.7	7124.7	6711.0	6676.0	4699.0	4239.0	2724.7	2051.0
%VC	100.0	100.2	89.1	85.8	80.8	80.4	56.6	51.1	32.8	24.7

【図107A】

	濃度 (ug/ml)									
濃度 (nM)	0.00	0.0101	0.3200	1.0012	3.1623	10.000	31.623	100.00	316.23	1000.00
試料 1	128798.6	130012.0	143385.0	160628.0	176377.0	134520.0	128041.0	107554.0	79973.0	10495.0
試料 2	128599.3	136075.0	165458.0	104025.0	128243.0	125306.0	278.0	97411.0	114861.0	89040.0
試料 3	128599.3	136075.0	165458.0	104025.0	128243.0	125306.0	278.0	97411.0	114861.0	89040.0
平均	128599.3	136075.0	165458.0	104025.0	128243.0	125306.0	278.0	97411.0	114861.0	89040.0
%CC	100.0	95.2	108.4	94.5	99.0	89.2	55.7	77.5	68.5	66.1

【図110】

4 UG/mL の化合物 25 および 0.8 UG/mL の化合物 4 と一様の化合物 236 による PBMC における HIV-1 RT 阻害の阻害

	RT 量 (cpm)									
濃度 (ug/ml)	0.00	0.005	0.02	0.05	0.16	0.50	1.58	5.00	15.71	50.00
試料 1	18509	5054	8038	6281	7245	4705	6448	2313	1146	86
試料 2	13857	5806	4868	3535	3388	3915	2803	1751	1038	101
試料 3	17286	8939	4993	4150	5738	6727	2664	2565	1427	151
平均	16580.7	6899.7	5986.3	4657.3	5687.0	5116.0	3711.7	2309.7	1263.7	112.7
%VC	100.0	41.7	36.0	28.1	34.4	30.9	24.0	13.4	7.3	0.7

【図110A】

	濃度 (ug/ml)									
濃度 (nM)	0.00	0.005	0.02	0.05	0.16	0.50	1.58	5.00	15.81	50.00
試料 1	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5
試料 2	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5
試料 3	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5
平均	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5	134800.5
%CC	100.0	97.1	100.0	101.0	102.8	105.6	94.9	78.4	56.2	0.2

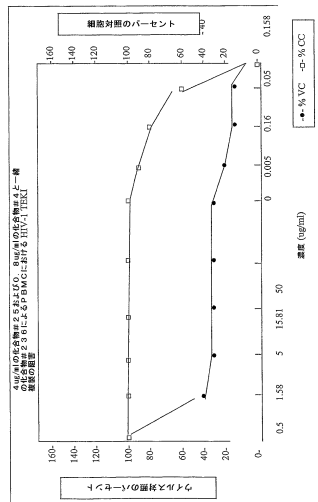
【図 1 1 1】

IC50 (ug/ml) = <0.00500

TC50 (ug/ml) = 18.0

TI =>3600.00

【図 1 1 2】



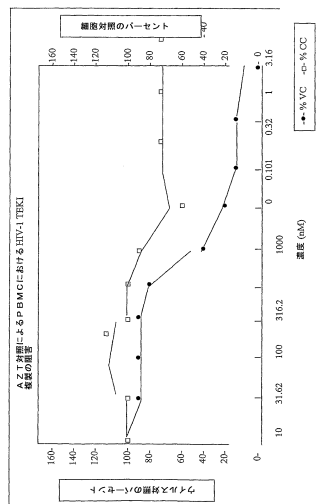
【図 1 1 4】

IC50 (nM) = 8.21

TC50 (nM) =>1000.0

TI =>121.80

【図 1 1 5】



【図 1 1 3】

A 2 T 列順による PBMC における
HIV-1 RTase の阻害

	RTase (cpm)											
濃度 (nM)	0.00	0.1010	0.3200	1.000	3.160	10.00	31.62	100.00	316.20	1000.00		
試料 1	18509	16575	12057	12052	14081	9404	2113	1139	608	249		
試料 2	13857	12857	15960	14570	11058	7088	2030	1773	344	188		
試料 3	17286	14827	17701	15509	14126	5412	2895	798	557	125		
平均	16550.7	14753.0	15239.3	14123.7	13088.3	7284.7	2646.0	1236.7	505.0	190.7		
%VC	100.0	89.1	92.1	85.3	79.1	44.0	18.0	7.5	3.0	1.2		

【図 1 1 3 A】

	RTase (cpm)											
濃度 (nM)	0.00	0.1010	0.3200	1.000	3.162	10.00	31.62	100.00	316.20	1000.00		
試料 1	128798.6	130312.0	143385.0	160628.0	176377.0	132452.0	128041.0	107554.0	79975.0	104693.0		
試料 2	128599.8	130075.0	165485.0	104326.0	128245.0	122508.0	278.0	97411.0	114861.0	80940.0		
試料 3	150287	3641	2888	2554	2337	1778	1171	778	375	245		
平均	131313.7	126888.0	146546.0	127030.7	133830.7	129504.7	25533.7	106716.0	95566.7	89324.7		
%CC	100.0	95.2	108.4	94.5	89.2	55.9	77.5	68.5	66.1			

【図 1 1 6】

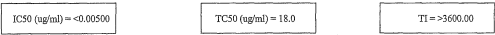
4 ug/mlの化合物を25 ug/mlと見做し、8 ug/mlの化合物を4 ug/mlと見做す。

	RTase (cpm)											
濃度 (ug/ml)	0.00	0.005	0.02	0.05	0.16	0.50	1.58	5.00	15.81	50.00		
試料 1	18768	3331	2607	3037	2649	1749	995	735	216	166		
試料 2	13939	2282	2585	1742	1281	1829	1354	1052	156	216		
試料 3	150287	3641	2888	2554	2337	1778	1171	778	375	245		
平均	17331.3	3084.7	2693.3	2444.3	2095.3	1785.3	1173.3	855.0	252.3	209.0		
%VC	100.0	17.8	15.5	14.1	12.1	10.3	6.7	4.9	1.5	1.2		

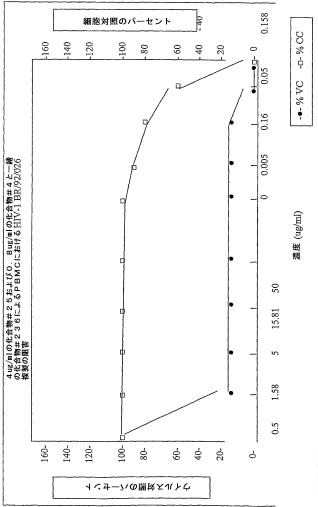
【図 1 1 6 A】

	RTase (cpm)											
濃度 (nM)	0.00	0.005	0.02	0.05	0.16	0.50	1.58	5.00	15.81	50.00		
試料 1	128798.6	130312.0	143385.0	160628.0	176377.0	132452.0	128041.0	107554.0	79975.0	104693.0		
試料 2	128599.8	130075.0	165485.0	104326.0	128245.0	122508.0	278.0	97411.0	114861.0	80940.0		
試料 3	150287	3641	2888	2554	2337	1778	1171	778	375	245		
平均	131313.7	126888.0	146546.0	127030.7	133830.7	129504.7	25533.7	106716.0	95566.7	89324.7		
%CC	100.0	97.1	100.0	101.0	102.8	105.6	95.9	78.4	56.2	0.2		

【図 1 1 7】



【図 1 1 8】



【図 1 1 9】

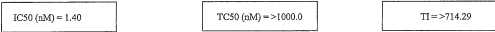
AZ T 対照による PBMCI における HIV-1 BR/92/026 複製の阻害

濃度 (nM)	R ₂ 値 (50nM)									
	0.00	0.1010	0.3200	1.000	3.162	10.00	31.62	100.00	316.20	1000.00
試料 1	18768	11228	12339	9028	5155	2791	546	330	256	286
試料 2	13939	15561	10220	10313	4150	1469	438	432	271	242
試料 3	19287	15512	10649	11265	5391	613	354	308	256	154
平均	17331.3	14133.7	13069.3	10201.3	4898.7	1624.3	452.7	356.7	281.0	227.3
%VC	100.0	81.5	75.4	58.9	28.3	9.4	2.6	2.1	1.5	1.3

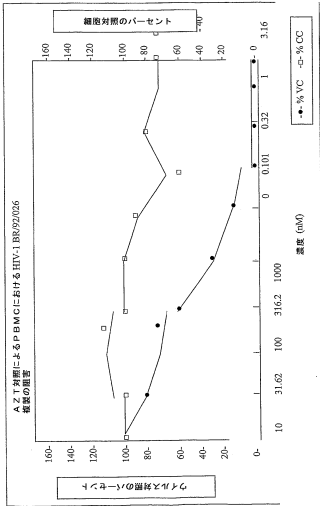
【図 1 1 9 A】

濃度 (nM)	0.00	0.1010	0.3200	1.000	3.162	10.00	31.62	100.00	316.20	1000.00
試料 1	128798.6	139512.0	143585.0	160658.0	176377.0	132452.0	128941.0	107554.0	79975.0	104695.0
試料 2	128599.8	139075.0	160458.0	176356.0	176356.0	132452.0	128941.0	107554.0	79975.0	104695.0
試料 3	128599.8	139075.0	160458.0	176356.0	176356.0	132452.0	128941.0	107554.0	79975.0	104695.0
平均	128599.8	139075.0	160458.0	176356.0	176356.0	132452.0	128941.0	107554.0	79975.0	104695.0
%VC	100.0	95.2	108.4	94.5	99.0	89.2	55.9	77.5	68.5	66.1

【図 1 2 0】



【図 1 2 1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 31/12 (2006.01) A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

(31)優先権主張番号 60/666,135

(32)優先日 平成17年3月29日(2005.3.29)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 スカンダン, ガネッシュ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 18045 イーストン クロスウィンズ ドライブ 429
0

合議体

審判長 内田 淳子

審判官 安藤 倫世

審判官 前田 佳与子

(56)参考文献 特表平1-503548 (JP, A)
米国特許出願公開第2003/0104043 (US, A1)
ポーランド国特許発明第134562 (PL, B1)
特表2002-521339 (JP, A)
Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1983, Vol. 31, No
. 5, p. 707-713
Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1983, Vol. 31, No
. 5, p. 701-705
NATO ASI Series, Series 3:High Technology, 19
95, Vol. 5, p. 211-213
Zhongghuo Yaowu Huaxue Zazhi, 2003, Vol. 13., N
o. 1, p. 12-15
Indian J Exp Biol, 1985, Vol. 23, No. 7, p. 393-39
6
Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 1
994, Vol. 56, No. 2, p. 37-40
Journal of Applied Physics, 2003, Vol. 93, No. 1
0, Pt. 3, p. 8444-8446

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00-33/44

CA (STN)

MEDLINE (STN)

BIOSIS (STN)

EMBASE (STN)