

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-502672

(P2005-502672A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 K 38/00
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 P 9/10
 // C 0 7 K 7/06
 C 0 7 K 16/18

F I

A 6 1 K 37/02 Z N A
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 P 9/10
 C 0 7 K 7/06

テーマコード (参考)

4 B 0 6 4
 4 C 0 8 4
 4 C 0 8 5
 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-524529 (P2003-524529)
 (86) (22) 出願日 平成14年8月29日 (2002.8.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年2月26日 (2004.2.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/027520
 (87) 国際公開番号 W02003/020215
 (87) 国際公開日 平成15年3月13日 (2003.3.13)
 (31) 優先権主張番号 60/315,347
 (32) 優先日 平成13年8月29日 (2001.8.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503334769
 リジェナークス・バイオフィーマスーティ
 カルズ・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、20814 メリーラン
 ド州、ベセスダ、ベセスダ・メトロ・セン
 ター、3、スイート・700
 (74) 代理人 100064746
 弁理士 深見 久郎
 (74) 代理人 100085132
 弁理士 森田 俊雄
 (74) 代理人 100083703
 弁理士 仲村 義平
 (74) 代理人 100096781
 弁理士 堀井 豊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイモシンβ 4、類似体、アイソフォームおよびその他の誘導体を用いて心筋障害の発生前、発
 生中または発生後に発生する炎症、損傷およびその他の変化を治癒または予防する方法

(57) 【要約】

心筋障害に関連する炎症または損傷は、サイモシン 4、サイモシン 4のアイソフォー
 ムまたは酸化サイモシン 4のような血管新生誘発性かつ抗炎症性ペプチドの投与によっ
 て治癒または予防される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

冠動脈組織への損傷の治癒または予防を促進するための治療方法であって、そのような治療を必要とする被験者に、アミノ酸配列 L K K T E T を含む有効量のポリペプチド、またはその保存的変異型を投与するステップを備える方法。

【請求項 2】

前記損傷は、有害な心筋障害の結果として生じる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ポリペプチドは、アミノ酸配列 K L K K T E T もしくは L K K T E Q、サイモシン 4 (T 4)、T 4 の N 末端変異型、T 4 の C 末端変異型、T 4 のアイソフォーム、酸化 T 4 または T 4 スルホキシドを含む請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 4】

前記組成物は、全身投与される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記組成物は、前記冠動脈組織へ直接的に投与される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ポリペプチドは、組換えまたは合成である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ポリペプチドは、抗体である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルである請求項 7 の方法。 20

【請求項 9】

冠動脈組織への損傷の治癒または予防を促進するための治療方法であって、そのような治療を必要とする被験者に、アミノ酸配列 L K K T E T を含有している血管新生誘発性かつ抗炎症性ポリペプチド、または血管新生誘発性かつ抗炎症性活性を有するその保存的変異型の産生を刺激する物質を備える有効量の組成物を投与するステップを備える方法。

【請求項 10】

前記ポリペプチドは、サイモシン 4 である請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記物質は、サイモシン 4 のアンタゴニストである請求項 9 に記載の方法。 30

【請求項 12】

冠動脈組織への損傷の治癒または予防を促進する際に使用するための組成物であって、アミノ酸配列 L K K T E T を含む血管新生誘発性かつ抗炎症性ポリペプチドまたは血管新生誘発性かつ抗炎症性活性を有するその保存的変異型を含む有効量の組成物を含有している組成物。

【請求項 13】

前記組成物は L K K T E T の N 末端または C 末端変異型を含有している請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記組成物は K L K K T E T または L K K T E T Q を含有している請求項 12 に記載の組成物。 40

【請求項 15】

前記ポリペプチドは T 4、T 4 のアイソフォーム、酸化 T 4 または T 4 スルホキシドを含有している請求項 12 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本特許出願は、2001年8月29日に出願された米国特許仮出願第60/315,347号の利益を主張する。

(発明の分野)

本発明は、心筋障害 (例、心筋梗塞) が発生する直前、発生中または直後に心臓、心臓弁および中隔において発生する炎症、損傷およびその他の変化を治癒または予防する分野に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

心筋、心血管および心組織の傷害には、心筋虚血、血液凝固、血管閉塞、感染症、発育上の欠陥もしくは異常およびその他の心筋障害を含むがそれらに限定されない多数の原因がある。心筋梗塞は、心臓内の血管疾患の結果として発生する。心筋梗塞は、心臓の一部への血液供給が (冠動脈の閉塞により惹起されて) 減少もしくは停止したときに発生する。血液供給の減少は、心筋細胞への傷害を引き起こし、さらには心筋細胞を死滅させることもある。心臓への血液供給の減少は、しばしばプラークに起因する心外膜血管の狭小化によって惹起される。これらのプラークは、破裂して出血、血栓形成、フィブリンや血小板の蓄積および血管の狭窄を引き起こすことがある。

10

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 3 】

そこで当技術分野においては、心筋障害が発生する前、発生中または直後に発生する炎症、損傷およびその他の変化を治癒または予防するための改良された方法および組成物が必要とされている。

20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 4 】

(発明の概要)

本発明によると、心筋障害に関連する損傷の治療および予防を促進するための治療方法は、当該治療を必要とする被験者もしくは患者へ、アミノ酸配列 L K K T E T を含む血管新生誘発性かつ抗炎症性ポリペプチドまたは心筋障害阻害活性を有するその保存的変異型を備える有効量の組成物の投与するステップを含んでいる。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 0 5 】

(発明の詳細な説明)

30

本発明は、サイモシン 4 (T 4) のようなアクチン重合抑制ペプチドおよびアミノ酸配列 L K K T E T もしくはそれらの保存的変異型を含有するその他のアクチン重合抑制ペプチドまたはペプチドフラグメントが心筋障害に関連する損傷およびその他の変化の治癒または予防を促進するという発見に基づいている。これには K L K K T E T および L K K T E T Q のような N 末端もしくは C 末端変異型が含まれる。T 4 は、齧歯類モデルにおける血管新生の 1 因子であると示唆されてきた。しかしこれまでのところ、このような特性が心筋梗塞、血管閉塞または心臓弁の欠陥および損傷のような心筋および冠血管の障害を治療する際に有用であるという指摘は知られていない。いかなる特定の理論にも束縛されることなく、これらのペプチドは末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (鋳型非依存性 DNA ポリメラーゼ) を誘導すること、1 つ以上の炎症性サイトカインもしくはケモカインの濃度を低下および調節すること、そして内皮細胞のための化学走化性および / または血管新生因子として機能すること、したがって心筋障害に罹患した患者における変性変化を治療および予防する能力を有することによって、修復、治療および予防を促進する能力を有する可能性がある。

40

【 0 0 0 6 】

本発明は、間葉上皮細胞分化を増強またはダウンレギュレートして、虚血、感染症、老化、およびその他の発作または傷害による作用に起因する損傷した心筋組織および血管の機能を回復させることができる因子および組成物を提供する。

【 0 0 0 7 】

サイモシン 4 は、最初は、インビトロでの内皮細胞の遊走および分化中にアップレギュ

50

レートされるタンパク質として同定された。サイモシン 4 は、胸腺から初めて単離された、様々な組織中で同定された 4.9 kDa の偏在的なポリペプチドである 43 アミノ酸である。このタンパク質には内皮細胞の分化および遊走、T 細胞の分化、アクチン重合抑制および血管新生における役割を含むいくつかの役割があると報告されている。

【0008】

1 つの実施形態によると、本発明は心筋障害に関連する損傷および炎症の治癒および予防を促進するための治療方法であり、そのような治療を必要とする被験者へ、アミノ酸配列 LKKTEET を含む血管新生誘発性かつ抗炎症性活性ポリペプチドまたは血管新生誘発性かつ抗炎症性活性を有するその保存的変異型、好ましくはサイモシン 4、サイモシン 4 のアイソフォーム、酸化サイモシン 4、サイモシン 4 スルホキシド、またはサイモシン 4 のアンタゴニストを含有している有効量の組成物を投与するステップを備える。 10

【0009】

本発明によって使用できる組成物には、サイモシン 4 (T 4)、T 4 アイソフォーム、酸化 T 4、サイモシン 4 スルホキシド、アクチン結合ドメインを有するポリペプチドもしくはその他のアクチン重合抑制もしくは束化タンパク質、または本質的にアミノ酸配列 LKKTEET もしくはその保存的変異型を含むかもしくはそれらからなる血管新生誘発性かつ抗炎症性活性を有するペプチドフラグメントが含まれる。引用によりこの明細書に援用される国際特許出願第 PCT/US 99/17282 号は、本発明に有用である T 4 のアイソフォームならびに本発明によると有用である可能性があるアミノ酸配列 LKKTEET および血管新生誘発性かつ抗炎症性活性を有するそれらの保存的変異型を開示している。引用によりこの明細書に援用される国際特許出願第 PCT/GB 99/00833 (WO 99/49883) 号は、本発明によって利用できる酸化サイモシン 4 を開示している。この発明は、主として、T 4 および T 4 のアイソフォームに関して以下に記載されるが、以下の説明はアミノ酸配列 LKKTEET、LKKTEETQ、LKKTEET もしくは LKKTEETQ を含むかもしくは本質的にそれらからなるペプチドおよびフラグメント、血管新生誘発性かつ抗炎症性活性を有するそれらの保存的変異型、ならびに酸化サイモシン 4 に同等に適用できることが意図されていると理解されなければならない。 20

【0010】

1 つの実施形態では、本発明は損傷部位を、T 4 もしくは T 4 アイソフォームを含む有効量の血管新生誘発性かつ抗炎症性活性組成物と接触させるステップにより被験者における炎症および損傷を治癒および予防する方法を提供する。接触は、局所的または全身性であってよい。損傷部位を接触させる実施例には、該部位を T 4 のみを含む組成物と、または T 4 の浸透を増強するかまたは治療される領域内への T 4 ペプチドの放出を遅延もしくは緩徐化させる少なくとも 1 つの物質と組み合わせて T 4 を含む組成物と接触させるステップが含まれる。投与経路には、例えば T 4 もしくは T 4 アイソフォーム等を含有する組成物の静脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射もしくは皮下注射、または吸入、経皮投与もしくは経口投与を挙げることができる。被験者は哺乳動物、好ましくはヒトであってよい。 30

【0011】

T 4、またはその類似体、アイソフォームもしくは誘導体は、あらゆる適切な心筋障害性損傷を阻害もしくは軽減する量で投与することができる。例えば、T 4 は、T 4 が約 0.1 ~ 50 µg の範囲内の用量で、より好ましくは約 1 ~ 25 µg の範囲内の用量で投与することができる。 40

【0012】

本発明による組成物は、毎日、1 日おき等に、投与日 1 日につき単回投与もしくは投与日 1 日につき 2、3、4 もしくは 5 回以上の投与のような複数回投与で投与することもできる。

【0013】

T 4 アイソフォームは、公知の T 4 のアミノ酸配列と約 70%、もしくは約 75%、 50

もしくは約 80% 以上の相同性を有することが同定されている。このようなアイソフォームには、例えば T₄^{a1a}、T₉、T₁₀、T₁₁、T₁₂、T₁₃、T₁₄ および T₁₅ が含まれる。T₄ と同様に、T₁₀ および T₁₅ アイソフォームはアクチンを重合抑制することが証明されている。T₄、T₁₀ および T₁₅、ならびにこれらの他のアイソフォームは、アクチンの重合抑制または結合を媒介することに関係していると思われるアミノ酸配列 L K K T E T を共有している。いかなる理論にも束縛されないことを望むが、T₄ アイソフォームの活性は、一部にはアクチンの重合を調節する能力が原因である可能性がある。 - サイモシンは、遊離の G - アクチンを重合抑制することによって F - アクチンを脱重合すると思われる。このため T₄ のアクチン重合を調節する能力は、すべてまたはその一部が L K K T E T 配列を介してアクチンに結合する、またはアクチンを重合抑制する能力に起因する可能性がある。そこで、T₄ と同様に、アミノ酸配列 L K K T E T を有する T₄ アイソフォームを含有する、アクチンに結合する、もしくはアクチンを重合抑制する、またはアクチン重合を調節する他のタンパク質は、ここで述べるように単独で、または T₄ と組み合わせて有効であると思われる。

10

20

30

40

50

【0014】

そこで、例えば T₄^{a1a}、T₉、T₁₀、T₁₁、T₁₂、T₁₃、T₁₄ および T₁₅ などの公知の T₄ アイソフォーム、ならびにまだ同定されていない T₄ アイソフォームが本発明の方法において有用であることは具体的に予期されている。T₄ アイソフォームはそれ自体が、被験者において実施される方法を含む本発明の方法において有用である。このため本方法はさらに、T₄、および T₄ アイソフォームである T₄^{a1a}、T₉、T₁₀、T₁₁、T₁₂、T₁₃、T₁₄ および T₁₅、ならびに医薬上許容される担体を含有している医薬組成物を提供する。

【0015】

加えて、アクチン重合抑制もしくは結合能力を有するか、または、アクチンを可動化し得るかもしくはアクチンの重合を調節し得る他のタンパク質は、適切な重合抑制、結合、可動化もしくは重合検定において示されるように、または、アクチン結合を媒介する、L K K T E T 等のアミノ酸配列の存在により同定されるように、本発明の方法において同様に使用できる。このようなタンパク質には、例えばゲルソリン、ビタミン D 結合タンパク質 (DBP)、プロフィリン、コフィリン、アドセベルチン、プロボミオシン、フィンシリ、デバクチン、Dnアーゼ I、ピリン、フラグミン、セベリン、キャッピングタンパク質、 - アクチンおよびアクメンチンが含まれる。このような方法には被験者において実施される方法が含まれるが、本発明はさらにここで記載したようにゲルソリン、ビタミン D 結合タンパク質 (DBP)、プロフィリン、コフィリン、デバクチン、Dnアーゼ I、ピリン、フラグミン、セベリン、キャッピングタンパク質、 - アクチンおよびアクメンチンを含有している医薬組成物を提供する。そこで、本発明にはアミノ酸配列 L K K T E T (その一次アミノ酸配列内に存在する可能性がある) およびその保存的変異型を含む血管新生誘発性かつ抗炎症性ポリペプチドの使用が含まれる。

【0016】

ここで使用する用語「保存的変異型」もしくはその文法上の変形は、生物学的に類似の別の残基によるアミノ酸残基の置換を意味する。保存的変形の例には、イソロイシン、バリン、ロイシンもしくはメチオニンのような疎水性残基の他の残基での置換、アルギニンとリジン、グルタミン酸とアスパラギン酸、またはグルタミンとアスパラギン、その他の置換のような極性残基の別の極性残基での置換が含まれる。

【0017】

T₄ は、多数の組織および細胞タイプに局在しており、したがって T₄ の産生を刺激する物質を添加することができる、あるいは組織および/または細胞からの T₄ 産生をもたらす組成物を含むことができる。このような物質には、インスリン様成長因子 (IGF - 1)、血小板由来成長因子 (PDGF)、表皮成長因子 (EGF)、型トランスフォーミング成長因子 (TGF -)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、サイモ

シン 1 (T 1) および血管内皮成長因子 (V E G F) のような成長因子ファミリーのメンバーが含まれる。より好ましくは、この物質は 型トランスフォーミング成長因子 (T G F -) または T G F - スーパーファミリーの他のメンバーである。本発明の T 4 組成物は、細胞外基質沈着、細胞遊走および皮膚の血管新生を通して結合組織の成長を達成することによって心筋障害の影響を軽減することができる。

【 0 0 1 8 】

1 つの実施形態によると、被験者は、被験者における上記に定義したような血管新生誘発性かつ抗炎症性ペプチドの産生を刺激する物質を用いて治療される。

【 0 0 1 9 】

さらに、心筋障害によって誘発された損傷の治癒を支援もしくは刺激する物質を T 4 もしくは T 4 アイソフォームと一緒に組成物に添加することができる。このような物質には、血管新生物質、成長因子、細胞の分化を指示する物質が含まれる。例えば、そして限定するためではなく、T 4 もしくは T 4 アイソフォームは単独で、または以下の物質のいずれか 1 つ以上を組み合わせることで添加することができる。すなわち有効量の V E G F 、 K G F 、 F G F 、 P D G F 、 T G F 、 I G F - 1 、 I G F - 2 、 I L - 1 、プロサイモシン およびサイモシン 1 である。

【 0 0 2 0 】

本発明には、さらにまた医薬上許容される担体中に治療有効量の T 4 もしくは T 4 アイソフォームを備える医薬組成物が含まれる。このような担体には、非経口投与に関連して上記に列挙した担体が含まれる。

【 0 0 2 1 】

心筋障害と関連する炎症、損傷および変性を治癒または予防する実際の用量、処方もしくは組成は、被験者の身体の大きさおよび健康状態を含む多数の要素に左右されることがある。しかし、当業者であれば使用するための適切な用量を決定するために、上記の国際公開特許第 P C T / U S 9 9 / 1 7 2 8 2 号に開示されているような臨床的用量を決定するための方法および技術を記述した教示、およびその中で言及された参考文献を使用することができる。

【 0 0 2 2 】

適切な調製物には、約 0 . 0 0 1 ~ 1 0 重量 % の範囲内の、より好ましくは約 0 . 0 1 ~ 0 . 1 重量 % の範囲内の、最も好ましくは約 0 . 0 5 重量 % の濃度の T 4 もしくは T 4 アイソフォームが含まれる。

【 0 0 2 3 】

ここに記載した治療アプローチには、被験者へのあらゆる従来型の投与方法を含む、本発明の T 4 もしくはその他の化合物を含有している試薬もしくは組成物の様々な投与または送達経路が含まれる。本発明の T 4 またはその他の化合物を使用もしくは含有する方法および組成物は、医薬上許容される非毒性賦形剤もしくは担体との混合によって医薬組成物内へ調製することができる。

【 0 0 2 4 】

本発明には、T 4 ペプチドもしくはその機能的フラグメントと相互作用する抗体の使用が含まれる。本質的に様々なエピトープ特異性を備えるプールされたモノクローナル抗体ならびに別個のモノクローナル抗体調製物からなる抗体が提供される。モノクローナル抗体は、上記の国際特許公開第 P C T / U S 9 9 / 1 7 2 8 2 号に開示されているように当業者にはよく知られている方法によってタンパク質のフラグメントを含有する抗原から作られる。本発明で使用する用語の抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含むことを意味する。

【 0 0 2 5 】

さらに別の実施形態では、本発明は T 4 遺伝子発現を調節する有効量の製剤を投与するステップによって被験者を治療する方法を提供する。用語「調節する」は、T 4 が過剰発現しているときは T 4 の発現の抑制または抑圧を、そして T 4 が十分に発現しない場合の発現の誘導を意味する。用語の「有効量」とは、有効な治療を生じさせる T 4 遺

伝子発現を調節することに有効である T₄ 製剤の量を意味する。T₄ もしくは T₄ アイソフォーム遺伝子発現を調節する製剤は、例えばポリヌクレオチドであってよい。そのポリヌクレオチドは、アンチセンス、三重らせん物質、またはリボザイムであってよい。例えば、T₄ の構造遺伝子領域またはプロモータ領域に向けられたアンチセンスを利用することができる。

【0026】

別の実施形態では、本発明は T₄ 活性を調節する化合物を利用する方法を提供する。T₄ 活性に影響を及ぼす化合物（例、アンタゴニストおよびアゴニスト）としては、ペプチド、ペプチドミメティック、ポリペプチド、化学的化合物、亜鉛のような鉱物、および生物学的製剤が挙げられる。

10

【0027】

いかなる特定の理論にも束縛されないが、この発明は、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（鋳型非依存性 DNA ポリメラーゼ）を誘導して、1つまたはそれ以上の炎症性サイトカインまたはケモカインのレベルを減じ、内皮細胞に対して走化性因子として作用し、これにより、心筋障害またはその他の変性もしくは環境因子によって発生した心血管および組織における変性変化を治癒または予防することを促進することにより、心筋障害に関連する炎症または損傷の治癒および予防を促進することができる。

【0028】

本発明をさらに、限定すると解釈されない以下の実施例により具体的に説明する。

【実施例】

20

【0029】

合成 T₄ および T₄ に対する抗体は、Regeneron Biopharmaceuticals, Inc. 社（3 Bethesda Metro Center, Suite 700, Bethesda, MD 20814）によって提供され、それらが心内皮細胞から間葉細胞への形質転換に及ぼす作用を決定するためにコラーゲンゲル・アッセイにおいて試験した。心臓弁およびその他の心臓組織の発達には上皮 - 間葉の形質転換によって形成されること、そしてこのプロセスにおいて血管は発達中および生涯を通しての重篤な心血管形成異常および傷害を引き起こす可能性があることは明確に確認されている。生理的濃度で、T₄ はコラーゲンゲル・アッセイにおいて内皮細胞から間葉細胞への形質転換を顕著に増強する。さらにその上、T₄ に対する抗体はこの形質転換を阻害および遮断した。房室心内膜から浸潤性間葉への形質転換は正常心組織の形成および維持ならびに心臓弁の形成において極めて重要である。

30

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/020215 A2

- (51) International Patent Classification: **A61K** (81) Designated States (*national*): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US02/27520
- (22) International Filing Date: 29 August 2002 (29.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/315,347 29 August 2001 (29.08.2001) US
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): **REGENERX BIOPHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 3 Bethesda Metro Center, Bethesda, MD 20814 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (*for US only*): **GOLDSTEIN, Allan, L.** [US/US]; 800 25th Street, N.W., Apt. 1005, Washington, DC 20037 (US); **FINKELSTEIN, Jr., Jack** [US/US]; 3703 Taylor Street, Chevy Chase, MD 20815 (US).
- (74) Agents: **REPPER, George, R.** et al.; Rudwell, Figg, Ernst & Manbeck, P.C., 1425 K Street, N.W., Suite 800, Washington, DC 20005 (US).
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/020215 A2

(54) Title: METHODS OF HEALING OR PREVENTING INFLAMMATION, DAMAGE AND OTHER CHANGES THAT OCCUR PRIOR TO, DURING OR IMMEDIATELY AFTER A MYOCARDIAL EVENT WITH THYMOSIN BETA 4, ANALOGUES, ISOFORMS AND OTHER DERIVATIVES

(57) Abstract: Inflammation or damage associated with myocardial events is treated or prevented by administration of an angiogenesis-inducing, anti-inflammatory peptide such as Thymosin β 4, an isoform of Thymosin β 4 or oxidized Thymosin β 4.

WO 03/020215

PCT/US02/27520

METHODS OF HEALING OR PREVENTING INFLAMMATION, DAMAGE AND OTHER
CHANGES THAT OCCUR PRIOR TO, DURING OR IMMEDIATELY AFTER A
MYOCARDIAL EVENT WITH THYMOSIN BETA 4, ANALOGUES, ISOFORMS AND
OTHER DERIVATIVES

BACKGROUND OF THE INVENTION

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

The present application claims the benefit of U.S. Provisional Application Serial
No. 60/315,347, filed August 29, 2001.

5 1. FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the field of healing or preventing inflammation,
damage and other changes that occur in the heart, heart valves and septa just prior to,
during or immediately after a myocardial event (e.g., myocardial infarction).

2. DESCRIPTION OF THE BACKGROUND ART

10 There are many causes of myocardial and coronary vessel and tissue injuries,
including but not limited to myocardial ischemia, clotting, vessel occlusion, infection,
developmental defects or abnormalities and other such myocardial events. Myocardial
infarction results from blood vessel disease in the heart. It occurs when the blood
supply to part of the heart is reduced or stopped (caused by blockage of a coronary
15 artery). The reduced blood supply causes injuries to the heart muscle cells and may
even kill heart muscle cells. The reduction in blood supply to the heart is often caused
by narrowing of the epicardial blood vessels due to plaque. These plaques may rupture
causing hemorrhage, thrombus formation, fibrin and platelet accumulation and
constriction of the blood vessels.

20 There remains a need in the art for improved methods and compositions for
healing or preventing inflammation, damage and other changes that occur prior to,
during or immediately after a myocardial event.

SUMMARY OF THE INVENTION

25 In accordance with the present invention, a method of treatment for promoting
healing or prevention of damage associated with myocardial events involves
administration to a subject or patient in need of such treatment an effective amount of a

WO 03/020215

PCT/US02/27520

composition comprising an angiogenesis-inducing and anti-inflammatory polypeptide comprising amino acid sequence LKKTET or a conservative variant thereof having myocardial event-inhibiting activity.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

- 5 The present invention is based on a discovery that actin-sequestering peptides such as thymosin β 4 (T β 4) and other actin-sequestering peptides or peptide fragments containing amino acid sequence LKKTET or conservative variants thereof, promote healing or prevention of damage and other changes associated with myocardial events. Included are N- or C-terminal variants such as KLKKTET and LKKTETQ. T β 4 has been
- 10 suggested as being a factor in angiogenesis in rodent models. However, there heretofore has been no known indication that such properties may be useful in treating myocardial and coronary vessel events such as myocardial infarction, vessel occlusion or heart valve defects and damage. Without being bound to any particular theory, these peptides may have the capacity to promote repair, healing and prevention by having the
- 15 ability to induce terminal deoxynucleotidyl transferase (a non-template directed DNA polymerase), to decrease and modulate the levels of one or more inflammatory cytokines or chemokines, and to act as a chemotactic and/or angiogenic factor for endothelial cells and thus heal and prevent degenerative changes in patients afflicted with myocardial events.
- 20 The present invention provides factors and compositions that can enhance or down regulate mesenchymal epithelial cell differentiation and restore the functionality of damaged myocardium tissue and vessels due to the effects of ischemia, infection, aging, and other insult or injury.
- 25 Thymosin β 4 was initially identified as a protein that is up-regulated during endothelial cell migration and differentiation *in vitro*. Thymosin β 4 was originally isolated from the thymus and is a 43 amino acid, 4.9 kDa ubiquitous polypeptide identified in a variety of tissues. Several roles have been ascribed to this protein including a role in a endothelial cell differentiation and migration, T cell differentiation, actin sequestration and vascularization.
- 30 In accordance with one embodiment, the invention is a method of treatment for promoting healing and prevention of damage and inflammation associated with myocardial events comprising administering to a subject in need of such treatment an effective amount of a composition comprising an angiogenesis-inducing, anti-

WO 03/020215

PCT/US02/27520

inflammatory peptide comprising amino acid sequence LKKTET, or a conservative variant thereof having angiogenesis-inducing, anti-inflammatory activity, preferably Thymosin β 4, an isoform of Thymosin β 4, oxidized Thymosin β 4, Thymosin β 4 sulfoxide, or an antagonist of Thymosin β 4.

5 Compositions which may be used in accordance with the present invention include Thymosin β 4 (T β 4), T β 4 isoforms, oxidized T β 4, Thymosin β 4 sulfoxide, polypeptides or any other actin sequestering or bundling proteins having actin binding domains, or peptide fragments comprising or consisting essentially of the amino acid sequence LKKTET or conservative variants thereof, having angiogenesis-inducing, anti-inflammatory activity. International Application Serial No. PCT/US99/17282, 10 incorporated herein by reference, discloses isoforms of T β 4 which may be useful in accordance with the present invention as well as amino acid sequence LKKTET and conservative variants thereof having angiogenesis-inducing, anti-inflammatory activity, which may be utilized with the present invention. International Application Serial No. 15 PCT/GB99/00833 (WO 99/49883), incorporated herein by reference, discloses oxidized Thymosin β 4 which may be utilized in accordance with the present invention. Although the present invention is described primarily hereinafter with respect to T β 4 and T β 4 isoforms, it is to be understood that the following description is intended to be equally applicable to amino acid sequence LKKTET, LKKTETQ, peptides and fragments 20 comprising or consisting essentially of LKKTET or LKKTETQ, conservative variants thereof having angiogenesis-inducing, anti-inflammatory activity, as well as oxidized Thymosin β 4.

In one embodiment, the invention provides a method for healing and preventing inflammation and damage in a subject by contacting the damaged site with an effective 25 amount of an angiogenesis-inducing, anti-inflammatory composition which contains T β 4 or a T β 4 isoform. The contacting may be direct or systemically. Examples of contacting the damaged site include contacting the site with a composition comprising T β 4 alone, or in combo with at least one agent that enhances T β 4 penetration, or delays or slows release of T β 4 peptides into the area to be treated. Administration may include, for 30 example, intravenous, intraperitoneal, intramuscular or subcutaneous injections, or inhalation, transdermal or oral administration of a composition containing T β 4 or a T β 4 isoform, etc. A subject may be a mammal, preferably human.

T β 4, or its analogues, isoforms or derivatives, may be administered in any suitable myocardial event damage-inhibiting or -reducing amount. For example, T β 4

WO 03/020215

PCT/US02/27520

may be administered in dosages within the range of about 0.1-50 micrograms of T β 4, more preferably in amounts within the range of about 1-25 micrograms.

A composition in accordance with the present invention can be administered daily, every other day, etc., with a single administration or multiple administrations per day of administration, such as applications 2, 3, 4 or more times per day of administration.

T β 4 isoforms have been identified and have about 70%, or about 75%, or about 80% or more homology to the known amino acid sequence of T β 4. Such isoforms include, for example, T β 4^{ala}, T β 9, T β 10, T β 11, T β 12, T β 13, T β 14 and T β 15. Similar to T β 4, the T β 10 and T β 15 isoforms have been shown to sequester actin. T β 4, T β 10 and T β 15, as well as these other isoforms share an amino acid sequence, LKKTET, that appears to be involved in mediating actin sequestration or binding. Although not wishing to be bound to any particular theory, the activity of T β 4 isoforms may be due, in part, to the ability to regulate the polymerization of actin. β -thymosins appear to depolymerize F-actin by sequestering free G-actin. T β 4's ability to modulate actin polymerization may therefore be due to all, or in part, its ability to bind to or sequester actin via the LKKTET sequence. Thus, as with T β 4, other proteins which bind or sequester actin, or modulate actin polymerization, including T β 4 isoforms having the amino acid sequence LKKTET, are likely to be effective, alone or in a combination with T β 4, as set forth herein.

Thus, it is specifically contemplated that known T β 4 isoforms, such as T β 4^{ala}, T β 9, T β 10, T β 11, T β 12, T β 13, T β 14 and T β 15, as well as T β 4 isoforms not yet identified, will be useful in the methods of the invention. As such T β 4 isoforms are useful in the methods of the invention, including the methods practiced in a subject. The invention therefore further provides pharmaceutical compositions comprising T β 4, as well as T β 4 isoforms T β 4^{ala}, T β 9, T β 10, T β 11, T β 12, T β 13, T β 14 and T β 15, and a pharmaceutically acceptable carrier.

In addition, other proteins having actin sequestering or binding capability, or that can mobilize actin or modulate actin polymerization, as demonstrated in an appropriate sequestering, binding, mobilization or polymerization assay, or identified by the presence of an amino acid sequence that mediates actin binding, such as LKKTET, for example, can similarly be employed in the methods of the invention. Such proteins include gelsolin, vitamin D binding protein (DBP), profilin, cofilin, adsevertin, propomyosin, ficolin, depactin, DnaseI, villin, fragmin, severin, capping protein, β -actinin and acumentin, for example. As such methods include those practiced in a subject, the

WO 03/020215

PCT/US02/27520

invention further provides pharmaceutical compositions comprising gelsolin, vitamin D binding protein (DBP), profilin, cofilin, depactin, DnaseI, villin, fragmin, severin, capping protein, β -actinin and acumentin as set forth herein. Thus, the invention includes the use of an angiogenesis-inducing, anti-inflammatory polypeptide comprising the amino acid sequence LKKTET (which may be within its primary amino acid sequence) and conservative variants thereof.

As used herein, the term "conservative variant" or grammatical variations thereof denotes the replacement of an amino acid residue by another, biologically similar residue. Examples of conservative variations include the replacement of a hydrophobic residue such as isoleucine, valine, leucine or methionine for another, the replacement of a polar residue for another, such as the substitution of arginine for lysine, glutamic for aspartic acids, or glutamine for asparagine, and the like.

T β 4 has been localized to a number of tissue and cell types and thus, agents which stimulate the production of T β 4 can be added to or comprise a composition to effect T β 4 production from a tissue and/or a cell. Such agents include members of the family of growth factors, such as insulin-like growth factor (IGF-1), platelet derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor beta (TGF- β), basic fibroblast growth factor (bFGF), thymosin α 1 (T α 1) and vascular endothelial growth factor (VEGF). More preferably, the agent is transforming growth factor beta (TGF- β) or other members of the TGF- β superfamily. T β 4 compositions of the invention may reduce the affects of myocardial events by effectuating growth of the connective tissue through extracellular matrix deposition, cellular migration and vascularization of the skin.

In accordance with one embodiment, subjects are treated with an agent that stimulates production in the subject of an angiogenesis-inducing, anti-inflammatory peptide as defined above.

Additionally, agents that assist or stimulate healing of damage caused by a myocardial event may be added to a composition along with T β 4 or a T β 4 isoform. Such agents include angiogenic agents, growth factors, agents that direct differentiation of cells. For example, and not by way of limitation, T β 4 or a T β 4 isoform alone or in combination can be added in combination with any one or more of the following agents: VEGF, KGF, FGF, PDGF, TGF β , IGF-1, IGF-2, IL-1, prothymosin α and thymosin α 1 in an effective amount.

WO 03/020215

PCT/US02/27520

The invention also includes a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of T β 4 or a T β 4 isoform in a pharmaceutically acceptable carrier. Such carriers include those listed above with reference to parenteral administration.

5 The actual dosage, formulation or composition that heals or prevents inflammation, damage and degeneration associated with myocardial events may depend on many factors, including the size and health of a subject. However, persons of ordinary skill in the art can use teachings describing the methods and techniques for determining clinical dosages as disclosed in PCT/US99/17282, *supra*, and the
10 references cited therein, to determine the appropriate dosage to use.

Suitable formulations include T β 4 or a T β 4 isoform at a concentration within the range of about 0.001 - 10% by weight, more preferably within the range of about 0.01 - 0.1% by weight, most preferably about 0.05% by weight.

15 The therapeutic approaches described herein involve various routes of administration or delivery of reagents or compositions comprising the T β 4 or other compounds of the invention, including any conventional administration techniques to a subject. The methods and compositions using or containing T β 4 or other compounds of the invention may be formulated into pharmaceutical compositions by admixture with pharmaceutically acceptable non-toxic excipients or carriers.

20 The invention includes use of antibodies which interact with T β 4 peptide or functional fragments thereof. Antibodies which consists essentially of pooled monoclonal antibodies with different epitopic specificities, as well as distinct monoclonal antibody preparations are provided. Monoclonal antibodies are made from antigen containing fragments of the protein by methods well known to those skilled in the art as
25 disclosed in PCT/US99/17282, *supra*. The term antibody as used in this invention is meant to include monoclonal and polyclonal antibodies.

In yet another embodiment, the invention provides a method of treating a subject by administering an effective amount of an agent which modulates T β 4 gene expression. The term "modulate" refers to inhibition or suppression of T β 4 expression
30 when T β 4 is over expressed, and induction of expression when T β 4 is under expressed. The term "effective amount" means that amount of T β 4 agent which is effective in modulating T β 4 gene expression resulting in effective treatment. An agent which modulates T β 4 or T β 4 isoform gene expression may be a polynucleotide for example. The polynucleotide may be an antisense, a triplex agent, or a ribozyme. For example,

WO 03/020215

PCT/US02/27520

an antisense directed to the structural gene region or to the promoter region of T β 4 may be utilized.

5 In another embodiment, the invention provides a method for utilizing compounds that modulate T β 4 activity. Compounds that affect T β 4 activity (*e.g.*, antagonists and agonists) include peptides, peptidomimetics, polypeptides, chemical compounds, minerals such as zincs, and biological agents.

10 While not be bound to any particular theory, the present invention may promote healing or prevention of inflammation or damage associated with myocardial events by inducing terminal deoxynucleotidyl transferase (a non-template directed DNA polymerase), to decrease the levels of one or more inflammatory cytokines, or chemokines, and to act as a chemotactic factor for endothelial cells, and thereby promoting healing or preventing degenerative changes in cardiac vessels and tissue brought about by myocardial event or other degenerative or environmental factors.

15 The invention is further illustrated by the following example, which is not to be construed as limiting.

Example

Synthetic T β 4 and an antibody to T β 4 was provided by RegeneRx Biopharmaceuticals, Inc. (3 Bethesda Metro Center, Suite 700, Bethesda, MD 20814) and were tested in a collagen gel assay to determine their effects on the Transformation of cardiac endothelial cells to mesenchymal cells. It is well established that development of heart valves and other cardiac tissue are formed by epithelial-mesenchymal transformation and that defects in this process can cause serious cardiovascular malformation and injury during development and throughout life. At physiological concentrations T β 4 markedly enhances the transformation of endocardial cells to mesenchymal cells in the collagen gel assay. Furthermore, an antibody to T β 4 inhibited and blocked this transformation. Transformation of atrioventricular endocardium into invasive mesenchyme is critical in the formation and maintenance of normal cardiac tissue and in the formation of heart valves.

WO 03/020215

PCT/US02/27520

CLAIMS

1. A method of treatment for promoting healing or preventing damage to coronary tissue, comprising administering to a subject in need of such treatment an effective amount of a polypeptide comprising amino acid sequence LKKTET, or a conservative variant thereof
2. The method of claim 1 wherein said damage results from an injurious myocardial event.
3. The method of claim 1 wherein said polypeptide comprises amino acid sequence KLKKTET or LKKTETQ, Thymosin β 4 (T β 4), an N-terminal variant of T β 4, a C-terminal variant of T β 4, an isoform of T β 4, oxidized T β 4 or T β 4 sulfoxide.
4. The method of claim 1 wherein said composition is administered systemically.
5. The method of claim 1 wherein said composition is administered directly to said coronary tissue.
6. The method of claim 1 wherein said polypeptide is recombinant or synthetic.
7. The method of claim 1 wherein said polypeptide is an antibody.
8. The method of claim 7 wherein said antibody is polyclonal or monoclonal.
9. A method of treatment for promoting healing or preventing damage to coronary tissue, comprising administering to a subject in need of such treatment an effective amount of a composition comprising an agent that stimulates production of an angiogenesis-inducing, anti-inflammatory polypeptide comprising amino acid sequence LKKTET, or a conservative variant thereof having angiogenesis-inducing, anti-inflammatory activity.
10. The method of claim 9 wherein said polypeptide is Thymosin β 4.

WO 03/020215

PCT/US02/27520

11. The method of claim 9 wherein said agent is an antagonist of Thymosin β 4.
12. A composition for use in promoting healing or preventing damage to coronary tissue, comprising an effective amount of a composition including an angiogenesis-inducing, anti-inflammatory polypeptide comprising amino acid sequence LKKTET or a conservative variant thereof having angiogenesis-inducing, anti-inflammatory activity.
13. The composition of claim 12 wherein said composition comprises an N- or C-terminal variant of LKKTET.
14. The composition of claim 12 wherein said composition comprises KLKKTET or LKKTETQ.
15. The composition of claim 12 wherein said polypeptide comprises T β 4, an isoform of T β 4, oxidized T β 4 or T β 4 sulfoxide.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/020215 A3

- (51) International Patent Classification: **A61K 38/00**
- (21) International Application Number:
PCT/US2002/027520
- (22) International Filing Date: 29 August 2002 (29.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/315,347 29 August 2001 (29.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **REGENERX BIOPHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 3 Bethesda Metro Center, Bethesda, MD 20814 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **GOLDSTEIN, Allan, L.** [US/US]; 800 25th Street, N.W., Apt. 1005, Washington, DC 20037 (US); **FINKELSTEIN, Jr., Jack** [US/US]; 3703 Taylor Street, Chevy Chase, MD 20815 (US).
- (74) Agents: **REPPER, George, R.** et al.; Rothwell, Figg, Ernst & Manbeck, P.C., 1425 K Street, N.W., Suite 800, Washington, DC 20005 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
25 March 2004
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2003/020215 A3

(54) Title: METHODS OF TREATING MYOCARDIAL EVENT RELATED CONDITIONS WITH THYMOSIN BETA 4

(57) Abstract: Inflammation or damage associated with myocardial events is treated or prevented by administration of an angiogenesis-inducing, anti-inflammatory peptide such as Thymosin β 4, an isoform of Thymosin β 4 or oxidized Thymosin β 4.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/27520
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 38/00 US CL : 514/17 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/17, 16, 2; 530/328, 329 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HUFF et al. Beta-Thymosins, Small Acidic Peptides with Multiple Functions. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2001, Vol. 33, pages 205-220, see whole document.	1-15
A	HUFF et al. The Dipeptidyls paracetamol and diquat attenuate the interaction of G-actin with thymosin Beta-4. FEBS Letters. 1998, Vol. 425, pages 495-498, see entire document.	1-15
A	WO 96/1016 A1 (ALPHA 1 BIOMEDICALS, INC.) 18 April 1996 (18.04.1996), see entire document.	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*P* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
B earlier application or patent published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*A* document member of the same patent family	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
24 March 2003 (24.03.2003)	23 JUL 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer D. Roberts for S. Dell C. Smith Telephone No. (703)308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/08	C 0 7 K 16/18	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100098316
弁理士 野田 久登

(74)代理人 100109162
弁理士 酒井 將行

(72)発明者 ゴールドスタイン, アラン・エル
アメリカ合衆国、2 0 0 3 7 ワシントン・ディー・シー、エヌ・ダブリュ、トゥウェンティフィ
フス・ストリート、8 0 0、アパートメント・1 0 0 5

(72)発明者 フィンケルスタイン, ジャック, ジュニア
アメリカ合衆国、2 0 8 1 5 メリーランド州、チェビー・チェイス、テイラー・ストリート、3
7 0 3

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
4C084 AA02 BA01 BA08 BA17 BA23 BA44 CA17 CA59 DA07 MA01
NA14 ZA402 ZB112
4C085 AA13 AA14 CC32 DD88 EE01 GG01
4H045 AA10 AA11 AA30 BA14 CA40 DA76 EA23