

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2022-512785
(P2022-512785A)

(43)公表日 令和4年2月7日(2022.2.7)

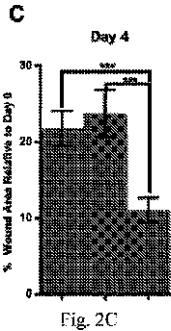
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105		4 C 0 7 6
A 6 1 K	8/65 (2006.01)	A 6 1 K	8/65	Z N A	4 C 0 8 3
A 6 1 K	8/85 (2006.01)	A 6 1 K	8/85		4 C 0 8 6
A 6 1 K	8/86 (2006.01)	A 6 1 K	8/86		
A 6 1 K	47/10 (2006.01)	A 6 1 K	47/10		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全35頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-521952(P2021-521952)	(71)出願人	515314797		
(86)(22)出願日	令和1年10月23日(2019.10.23)		アルバート アインシュタイン カレッジ		
(85)翻訳文提出日	令和3年6月8日(2021.6.8)		オブ メディシン		
(86)国際出願番号	PCT/US2019/057611		アメリカ合衆国 1 0 4 6 1 ニューヨー		
(87)国際公開番号	WO2020/086688		ク、ブロンクス、モリス パーク アベニ		
(87)国際公開日	令和2年4月30日(2020.4.30)		ュー 1 3 0 0		
(31)優先権主張番号	62/749,325	(71)出願人	520141449		
(32)優先日	平成30年10月23日(2018.10.23)		マイクロキュアーズ, インコーポレイ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		テッド		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 0		
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		6 0・サンタ クルズ・シルヴァー スト		
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A	(74)代理人	110001379		
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		特許業務法人 大島特許事務所		
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(72)発明者	シャープ、デーヴィッド・ジェームズ		
	最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 創傷治癒のための f i d g e t i n 様 2 s i R N A 強化ポロキサマーベースのヒドロゲル

(57)【要約】

創傷皮膚におけるコラーゲンⅠに対するコラーゲンⅠⅠの比率を低減させ、創傷を治療し、治癒を促進するための方法及び構造体が、F L 2 s i R N A、コラーゲン及びポロキサマーを含む界面活性剤ポリマードレッシングによって提供される。

【選択図】 図 2 C



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

界面活性剤ポリマードレッシングと、
前記界面活性剤ポリマードレッシング中のコラーゲンの粒子と、
前記コラーゲンの粒子に結合または吸着される、f i d g e t i n様2を対象とするs i
RNAと、を含む、化粧品構造体または医薬構造体。

【請求項 2】

前記界面活性剤ポリマードレッシングがポロキサマーを含む、請求項 1 に記載の化粧品構造体または医薬構造体。

【請求項 3】

前記コラーゲンの粒子が、コラーゲンを含む微粒子、マイクロエマルションまたはミセルである、請求項 1 に記載の化粧品構造体または医薬構造体。

【請求項 4】

前記コラーゲンがコラーゲン I である、請求項 1 に記載の化粧品構造体または医薬構造体。

【請求項 5】

1 以上の抗生物質、消毒剤、抗炎症性化合物、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、請求項 1 に記載の化粧品構造体または医薬構造体。

【請求項 6】

化粧品成分若しくは医薬成分、化粧品構成要素若しくは医薬構成要素、または医薬担体をさらに含む、請求項 1 に記載の化粧品構造体または医薬構造体。

【請求項 7】

s i RNA が、ヒト f i d g e t i n様2をコードするDNAまたはRNAを対象とする、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の化粧品構造体または医薬構造体。

【請求項 8】

s i RNA が少なくとも1つの2'糖修飾を有する、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の化粧品構造体または医薬構造体。

【請求項 9】

前記 f i d g e t i n様2が配列番号2に記載のアミノ酸を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の化粧品構造体または医薬構造体。

【請求項 10】

s i RNA が配列番号3、4、5、6、7、8、9、10、11または12に記載の配列を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の化粧品構造体または医薬構造体。

【請求項 11】

熱傷を含む哺乳動物の皮膚創傷の治癒中に、創傷皮膚におけるコラーゲン I に対するコラーゲン I I I の比率を低減する方法であって、
熱傷創傷の治癒中の前記コラーゲン I に対する前記コラーゲン I I I の前記比率を低減するために有効な量の請求項 1 に記載の化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む方法。

【請求項 12】

哺乳動物の皮膚創傷を治療するために有効な量の請求項 1 に記載の化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む、哺乳動物の皮膚創傷を治療する方法。

【請求項 13】

哺乳動物の皮膚創傷の治癒を促進するために有効な量の請求項 1 に記載の化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む、哺乳動物の皮膚創傷の治癒を促進する方法。

【請求項 14】

皮膚創傷部位での炎症を減少させ、及び／または血管再生を向上させる方法であって、前記皮膚創傷部位での前記炎症の減少、及び／または前記血管再生の向上のために有効な量の請求項 1 に記載の化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記皮膚創傷が擦過傷を含む、請求項 12～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記皮膚創傷が切り傷を含む、請求項 12～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記皮膚創傷が切除を含む、請求項 12～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記皮膚創傷が複数の裂傷を含む、請求項 12～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記皮膚創傷が熱傷を含む、請求項 12～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

界面活性剤ポリマードレッシング中のコラーゲン微粒子によってカプセル化された f i d g e t i n 様 2 を対象とする s i R N A を含む構造体を有する部分を含む、創傷ドレッシング構造。

【請求項 21】

前記界面活性剤ポリマードレッシングがポロキサマーを含む、請求項 20 に記載の創傷ドレッシング構造。

【請求項 22】

前記コラーゲンがコラーゲン I である、請求項 20 に記載の創傷ドレッシング構造。

【請求項 23】

1 以上の抗生物質、消毒剤、抗炎症性化合物またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、請求項 20 に記載の創傷ドレッシング構造。

【請求項 24】

前記 s i R N A が、ヒト f i d g e t i n 様 2 をコードする D N A または R N A を対象とする、請求項 20 に記載の創傷ドレッシング構造。

【請求項 25】

前記 s i R N A が少なくとも 1 つの 2' 糖修飾を有する、請求項 20 に記載の創傷ドレッシング構造。

【請求項 26】

前記 f i d g e t i n 様 2 が配列番号 2 に記載のアミノ酸を含む、請求項 20 に記載の創傷ドレッシング構造。

【請求項 27】

前記 s i R N A が配列番号 3、4、5、6、7、8、9、10、11 または 12 に記載の配列を含む、請求項 20 に記載の創傷ドレッシング構造。

【請求項 28】

哺乳動物の皮膚への接着剤による接着を可能にする 1 以上の接着部分をさらに含む、請求項 20 に記載の創傷ドレッシング構造。

【請求項 29】

構造が、織物、プラスチック、PVC、ポリエチレン、ポリウレタンまたはラテックスを含む、請求項 20 に記載の創傷ドレッシング構造。

【請求項 30】

前記接着剤が、アクリル酸、メタクリル酸またはエポキシジアクリレートを含む、請求項 28 に記載の創傷ドレッシング構造。

【請求項 31】

前記界面活性剤ポリマードレッシング中の前記コラーゲン微粒子によってカプセル化された f i d g e t i n 様 2 を対象とする s i R N A を含む構造体が、前記界面活性剤ポリマードレッシング上の皮膚に接着しないパッドに配されているか、または当該パッドに吸着されている、請求項 20 に記載の創傷ドレッシング構造。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

(関連出願への相互参照)

本出願は、2018年10月23日に出版された米国特許仮出願第62/749,325号の優先権を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

創傷治癒は複雑な生理学的プロセスであり、効果的に完了しない場合、慢性創傷、感染症、そして最終的には切断などの深刻な合併症を引き起こす可能性がある。急性創傷治癒における現在のアプローチは、一般に、受動的なドレッシング、皮膚様のマトリックス、及び治癒プロセスの初期の炎症段階のみに対処する成長因子ベースのアプローチに限定されている。改善された創傷治癒方法及び構造体が必要とされている。

10

【0003】

本発明は、この必要性に対処し、創傷治癒を促進する際の新規の標的を特定し、それに基づく治療及びアッセイを提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

(i) 界面活性剤ポリマードレッシングと、界面活性剤ポリマードレッシング中のコラーゲンの粒子と、コラーゲンの粒子に結合または吸着される、fidgetin様2を対象とする(i) siRNAと、を含む、化粧品構造体または医薬構造体を提供される。

【0005】

熱傷を含む哺乳動物の皮膚創傷の治癒中に、創傷皮膚におけるコラーゲンIに対するコラーゲンIIIの比率を低減する方法であって、熱傷創傷の治癒中のコラーゲンIに対するコラーゲンIIIの比率を低減するために有効な量の、(i) 界面活性剤ポリマードレッシング中のコラーゲン粒子に結合または吸着される、fidgetin様2 (FL2) を対象とする(i) siRNAを含む化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む方法が提供される。

20

【0006】

哺乳動物の皮膚創傷を治療するために有効な量の、(i) 界面活性剤ポリマードレッシング中のコラーゲン粒子に結合または吸着される、fidgetin様2 (FL2) を対象とする(i) siRNAを含む化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む、哺乳動物の皮膚創傷を治療する方法が提供される。

30

【0007】

哺乳動物の皮膚創傷の治癒を促進するために有効な量の、(i) 界面活性剤ポリマードレッシング中のコラーゲン粒子に結合または吸着される、fidgetin様2 (FL2) を対象とする(i) siRNAを含む化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む、哺乳動物の皮膚創傷の治癒を促進する方法が提供される。

【0008】

皮膚創傷部位での炎症を減少させ、及び／または血管再生を向上させる方法であって、皮膚創傷部位での炎症の減少、及び／または血管再生の向上のために有効な量の、(i) 界面活性剤ポリマードレッシング中のコラーゲン粒子に結合または吸着される、fidgetin様2 (FL2) を対象とする(i) siRNAを含む化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む方法が提供される。

40

【0009】

(i) 界面活性剤ポリマードレッシング中のコラーゲン微粒子によってカプセル化されたfidgetin様2 (FL2) を対象とする(i) siRNAを含む構造体を有する部分を含む、創傷ドレッシング構造が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1A】 FL2レベルは、SPD-FL2-siRNAで治療された損傷皮膚において減少する。SPDへのsiRNA微粒子の組み込みの概略図。

50

【図 1 B】FL2 レベルは、SPD-FL2-siRNA で治療された損傷皮膚において減少する。マウスに熱傷を与え、0 日目と 2 日目に指定の薬剤で治療した。熱傷を 3 日目に採取し、その後の qPCR 分析のために RNA を単離した。SPD-FL2-siRNA 治療は、SPD-Control-siRNA 治療と比較して、FL2 mRNA を大幅に減少させる。N ≥ 8 ; ノンパラメトリックなマン・ホイットニー検定。p = 0.026 ; エラーバー = S.E.M.

【図 2 A】SPD-FL2-siRNA 治療は、マウス全層切除モデルにおいて治癒を刺激する。BALB/c マウスに界面活性剤ポリマー治療を適用した後の治癒の代表的な時間経過。

【図 2 B】SPD-FL2-siRNA 治療は、マウス全層切除モデルにおいて治癒を刺激する。経時的な残存創傷面積を定量化したグラフ。赤色のバーは SPD 治療、青色のバーは SPD-Control-siRNA 治療、緑色のバーは SPD-FL2-siRNA 治療である。N = 22 の創傷 / 群 ; スチューデントの t 検定 ; *** p ≤ 0.0008 ; エラーバー = S.E.M. 有意差は、個々の時点で、かつ双方向 ANOVA で確認された。

10

【図 2 C】SPD-FL2-siRNA 治療は、マウス全層切除モデルにおいて治癒を刺激する。4 日目の残存創傷面積を定量化したグラフ。赤色のバーは SPD 治療、青色のバーは SPD-Control-siRNA 治療、緑色のバーは SPD-FL2-siRNA 治療である。N = 22 の創傷 / 群 ; スチューデントの t 検定 ; *** p ≤ 0.0008 ; エラーバー = S.E.M. 有意差は、個々の時点で、かつ双方向 ANOVA で確認された。

20

【図 3 A】SPD-FL2-siRNA 治療はマウス全層切除モデルにおいて創傷サイズを縮小する。創傷の 8 日後に採取された、二分された創傷の代表的な H & E 染色。対照群の上皮には上皮肥厚が認められるが、FL2-siRNA で治療された動物は、さらに進行し、十分に治癒した創傷を示す再上皮形成を示している。矢印は、観察可能な創傷領域を示している。挿入図は、創傷領域内の keratin 14 陽性の毛包を強調している。

【図 3 B】SPD-FL2-siRNA 治療はマウス全層切除モデルにおいて創傷サイズを縮小する。8 日目の創傷長を定量化したグラフ。N ≥ 4 ; スチューデントの t 検定 ; p = 0.0252 ; ** = 0.0079 ; エラーバー = S.E.M.

【図 4 A】SPD-FL2-siRNA 治療は、マウス全層熱傷モデルの治癒を刺激する。熱傷の 14 日後に採取された、二分された傷の代表的な H & E 染色。FL2-siRNA で治療された動物は、さらに進行し、十分に治癒した火傷を示す再上皮形成を示している。矢印は、観察可能な創傷の縁を示している。

30

【図 4 B】SPD-FL2-siRNA 治療は、マウス全層熱傷モデルの治癒を刺激する。0 日目に対する経時的な創傷面積を定量化したグラフ。N ≥ 14 ; 有意差は、個々の時点で、かつ双方向 ANOVA で確認された。

【図 4 C】SPD-FL2-siRNA 治療は、マウス全層熱傷モデルの治癒を刺激する。4 日目の創傷面積を定量化したグラフ。赤色のバーは SPD 治療、青色のバーは SPD-Control-siRNA 治療、緑色のバーは SPD-FL2-siRNA 治療。N ≥ 8 ; スチューデントの t 検定。* p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.005 ; *** p ≤ 0.0005 ; **** p ≤ 0.00005 ; エラーバー = S.E.M.

40

【図 4 D】SPD-FL2-siRNA 治療は、マウス全層熱傷モデルの治癒を刺激する。14 日目の上皮の厚さを定量化したグラフ。赤色のバーは SPD 治療、青色のバーは SPD-Control-siRNA 治療、緑色のバーは SPD-FL2-siRNA 治療。N ≥ 8 ; スチューデントの t 検定。* p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.005 ; *** p ≤ 0.0005 ; **** p ≤ 0.00005 ; エラーバー = S.E.M.

【図 5 A】FL2 ノックダウンは、細胞増殖に影響を与えることなく血行再生を強化し、炎症を軽減する。熱傷、及び、PCNA、PECAM1 または CD45 抗体のいずれかを使用した治療の、それぞれの 14 日後の皮膚の免疫組織化学的染色。熱傷の中央領域を 20 倍または 40 倍の倍率で画像化し、染色イベントの数を定量化した。

50

【図5B】FL2ノックダウンは、細胞増殖に影響を与えることなく血行再生を強化し、炎症を軽減する。PCNA染色は、治療群間で有意差を示さなかった。条件毎に $N \geq 4$ の創傷、創傷毎に ≥ 3 フィールド；スチューデントのt検定；n.s.=非有意。

【図5C】FL2ノックダウンは、細胞増殖に影響を与えることなく血行再生を強化し、炎症を軽減する。PECAM1染色後、両方の対照群とSPD-FL2-siRNA治療群との間で有意差が観察された。 $N \geq 5$ ；スチューデントのt検定；** $p = 0.0092$ 。

【図5D】FL2ノックダウンは、細胞増殖に影響を与えることなく血行再生を強化し、炎症を軽減する。CD45染色後、対照群とSPD-FL2-siRNA治療群の間で有意差が観察された。 $N \geq 10$ ；スチューデントのt検定； $p = **0.0027$ ；*** 0.0003 ；エラーバー=S.E.M。

【図6A】SPD-FL2-siRNA治療は、マウス全層熱傷モデルにおけるコラーゲン再形成を強化する。熱傷の14日後に採取された二分された創傷の代表的なHerovici染色。FL2-siRNAで治療された動物は、コラーゲンIII（青）対コラーゲンI（赤）の比率が減少し、コラーゲンの成熟が改善されている。挿入図は、創傷領域の40倍の拡大図を示している。

【図6B】SPD-FL2-siRNA治療は、マウス全層熱傷モデルにおけるコラーゲン再形成を強化する。創傷内のコラーゲン比を定量化するグラフ。 $N \geq 11$ ；スチューデントのt検定；*** $p = 0.001$ ；エラーバー=S.E.M。

【発明を実施するための形態】

【0011】

治癒が遅く、傷口（創傷）が開いていることは、世界中の患者が直面している深刻な医学的問題である。適切な再上皮形成がないと、これらの創傷には感染のリスクがあり、切断または死亡のリスクが高まる。治癒が遅い創傷は、瘢痕化や皮膚の変形のリスクももたらす。より迅速に創傷を閉じることができる治療法は、これらの問題に直接対処するであろう。

【0012】

本明細書の実施例に見られるように、界面活性剤ポリマードレッシング（SPD）を用いた創傷の治療は、創傷部位に有意な水和反応を提供し、抗菌効果を高め、治癒結果を改善する。本明細書に示すデータは、FL2-siRNAを界面活性剤ポリマードレッシングに組み込むと、創傷治癒の結果がさらに改善されることを実証している。

【0013】

本明細書に提示される治療された創傷の臨床的特徴及び組織学的特徴は、FL2-siRNA（SPD-FL2-siRNA）を含む界面活性剤ポリマードレッシングが、対照よりも迅速に、より有効な再上皮形成を刺激し、創傷をその後の治癒（炎症の解消）及び再生（コラーゲン成熟、血管新生）段階へ進行させることを示している。

【0014】

損傷後の炎症反応の程度は、潜在的な創傷結果の最初の指標である。SPD-FL2-siRNAで治療された創傷が、初期の時点で炎症の迅速な解消を示し、後の時点でCD45+染色の減少を示すことは注目に値する。現在、より効果的な再上皮形成は炎症期間の短縮と相関しており、損傷後7日でのCD45+レベルの低下は創傷のさらなる進行を示しているというエビデンスがある。次に、再上皮形成が続くと、前縁細胞（leading edge cells）が創傷ゾーンに「治癒」骨格を生成する。この構造は、細胞が創傷の中心に効率的に移動し、ECMマトリックスのリモデリングを開始するための経路を作成する。ここでの発見は、FL2ノックダウンが創傷ゾーン内のコラーゲン組織に影響を及ぼし、治療された創傷におけるコラーゲンIに対するコラーゲンIIIの比率を低減させることを示している。コラーゲンIIIの堆積の増加は創傷内の血管密度を低下させることが知られているが、コラーゲンIは内皮細胞の最適な基質であり、これはSPD-FL2-siRNAで治療した創傷に見られる血管新生の増加を説明し得る。

【0015】

上皮幹細胞などの追加の細胞タイプも、この新たに形成された構造を利用して、創傷ゾーンに移動する。FL2 siRNAで治療された創傷のみが創傷ゾーン内に幹細胞由来の毛包を示したことがわかったが、これは、これらの創傷が再生プロセスにおいてさらに進行したことを示唆している。再上皮形成はまた、創傷ゾーン内の局所的な細胞シグナル伝達に影響を及ぼす。次第に増加するケラチノサイトは、VEGFを放出し、内皮細胞を創傷ゾーンに駆り立て、SPD-FL2-siRNAで治療された創傷に見られる血管新生の増加について別の説明を提供する。

【0016】

一実施形態では、局所的に適用され、切除創及び熱傷を治療するために使用され得る新たなSPD-siRNAプラットフォームが提供される。SPD-FL2-siRNAによる治療はFL2レベルを枯渇させ、SPD単独による治療と比較して、再上皮形成を促進し、最終的に真皮構造を改善する。SPD-FL2-siRNA製品は、その好ましい化学組成及び適用の容易さに起因して、様々な皮膚損傷に苦しむ患者の生活を改善し得る。

10

【0017】

本発明は、いくつかの実施形態では、(ii)界面活性剤ポリマードレッシング中のコラーゲン粒子に結合または吸着されるfidgetin様2 (FL2; fidgetin-like 2)を対象とする(i) siRNAを含む化粧品構造体または医薬構造体に関する。

【0018】

いくつかの実施形態では、化粧品構造体は、化粧品を含む。

20

【0019】

いくつかの実施形態では、医薬構造体は、医薬担体を含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、コラーゲン粒子は、可逆的なミセルを含む。いくつかの実施形態では、コラーゲン粒子は、AOTを含む。

【0021】

いくつかの実施形態では、界面活性剤ポリマードレッシングは、ポロキサマーを含む。いくつかの実施形態では、ポロキサマーは、親水性ポリエチレンオキシド及び疎水性ポリプロピレンオキシドを含む。一実施形態では、ポロキサマーは、重量比が4:2:4であるポリオキシエチレンの2つの親水性鎖がその両側に隣接するポリオキシプロピレンの中央疎水性鎖からなる合成トリブロックコポリマーである。一実施形態では、ポロキサマーは、ポロキサマー188である。一実施形態では、ポロキサマーは、8400ダルトンの平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、界面活性剤ポリマードレッシングは、PluroGel (商標)を含む。

30

【0022】

いくつかの実施形態では、ポロキサマーは、水性媒体中に約10%で存在する。いくつかの実施形態では、水性媒体は水である。

【0023】

いくつかの実施形態では、界面活性剤ポリマードレッシングは、4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェニル-ポリエチレングリコールをさらに含む。いくつかの実施形態では、4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェニル-ポリエチレングリコールは、10個の繰り返しポリエチレンオキシド基が存在する約647の分子量を有する。いくつかの実施形態では、平均9.5個のポリエチレンオキシド基が存在する。いくつかの実施形態では、界面活性剤ポリマードレッシングは、Triton (登録商標)-100をさらに含む。

40

【0024】

いくつかの実施形態では、界面活性剤ポリマードレッシングは、ポロキサマー、メロキサポールまたはポロキサミンである。

【0025】

ポロキサマーの非限定的な例には、ポロキサマー-101、-105、-105安息香酸エステル、-108、-122、-123、-124、-181、-182、-182ジ

50

ベンゾアート、-183、-184、-185、-212、-215、-217、-231、-234、-235、-237、-238、-282、-284、-288、-331、-333、-334、-335、-338、-401、-402、-403及び-407が含まれる。別の実施形態では、ポロキサマーはポロキサマー-407である。

【0026】

例示的なメロキサポールには、以下に限定しないが、例えばメロキサポール105、108、171、172、174、178、251、252、254、258、311、312及び314が含まれる。

【0027】

例示的なポロキサミンには、以下に限定しないが、例えばポロキサミン304、504、701、702、704、707、901、904、908、1101、1102、1104、1301、1302、1304、1307、1501、1502、1504及び1508が含まれる。

【0028】

いくつかの実施形態では、コラーゲン微粒子は、ビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸ナトリウム(AOT; ドクサートナトリウム)膜中にコラーゲンIを含む。いくつかの実施形態では、酢酸中のコラーゲン溶液は、ヘキサン中のAOTの溶液に溶解される。いくつかの実施形態では、得られたマイクロエマルションは、蒸発させられ、水に懸濁され、凍結乾燥される。

【0029】

いくつかの実施形態では、微粒子はミセルを含む。いくつかの実施形態では、微粒子は、以下に限定しないが、例えばアラビアゴム、アルギン酸、セトステアリルアルコール、セチルアルコール、グルコース脂肪酸エステル、モノオレイン酸グリセリル、モノステアリン酸グリセリル、ヒドロキシプロピルセルロース、中鎖トリグリセリド、低分子量メチルセルロース、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンステアレート、ポリビニルアルコール、ソルビタン脂肪酸エステル若しくはスクロース脂肪酸エステルなどの非イオン性化合物、またはそれらの混合物を含む。いくつかの実施形態では、微粒子膜は、以下に限定しないが、例えばセトリミド、モノエタノールアミン若しくはトリエタノールアミンなどのカチオン性化合物、またはそれらの混合物を含む。いくつかの実施形態では、微粒子は、以下に限定しないが、例えばコール酸誘導体、カルボマー、オレイン酸、アルギン酸プロピレングリコール、ドデシル硫酸ナトリウム、ステアリン酸、白色ワックスまたは黄色ワックスなどのアニオン性化合物、またはそれらの混合物を含む。いくつかの実施形態では、微粒子は、前述の選択肢のうちのいずれかからの適合性化合物の混合物を含む。

【0030】

いくつかの実施形態では、コラーゲン微粒子には、FL2 siRNAがロードされている。いくつかの実施形態では、凍結乾燥された微粒子粉末は、ヌクレアーゼを含まない水中で、siRNA溶液によって処理される。いくつかの実施形態では、siRNAがロードされた粒子は、その後凍結乾燥される。

【0031】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥されたsiRNAがロードされたコラーゲン粒子は、界面活性剤ポリマードレッシングと混合される。一実施形態では、凍結乾燥粒子は、等量の水と界面活性剤ポリマードレッシングとの組み合わせによって所望の濃度に混合される。

【0032】

いくつかの実施形態では、siRNA-コラーゲン微粒子-SPD構造体は、1以上の追加の成分を含み得る。いくつかの実施形態では、追加の成分には、抗生物質、消毒剤、ビタミン、麻酔薬、抗ヒスタミン剤、抗炎症剤、保湿剤、浸透促進剤、日焼け止め剤及び/または抗刺激剤のうちの1以上が含まれる。一実施形態では、構造体は、皮膚創傷からの回復を促進するのに適したさらなる有効成分(例えば、1以上の抗生物質、消毒剤、ビタ

10

20

30

40

50

ミン、麻酔薬、抗ヒスタミン剤、抗炎症剤、保湿剤、浸透促進剤、日焼け止め剤及び／または抗刺激剤)を含まない。

【0033】

いくつかの実施形態では、コラーゲン粒子は微粒子である。いくつかの実施形態では、微粒子は、約1 μm から約1000 μm のサイズを有する。いくつかの実施形態では、微粒子は、約1 μm から約100 μm のサイズを有する。いくつかの実施形態では、微粒子は、約1 μm から約50 μm のサイズを有する。いくつかの実施形態では、微粒子は、約1 μm から約40 μm のサイズを有する。いくつかの実施形態では、微粒子は、約3 μm から約100 μm のサイズを有する。いくつかの実施形態では、微粒子は、約3 μm から約40 μm のサイズを有する。いくつかの実施形態では、微粒子は、約1 μm から約5 μm のサイズを有する。いくつかの実施形態では、微粒子は、約3 μm から約5 μm のサイズを有する。これらの実施形態のうちのいくつかでは、サイズは、微粒子の平均寸法または平均直径である。

10

【0034】

いくつかの実施形態では、コラーゲン粒子はマイクロエマルションである。いくつかの実施形態では、粒子は、約1 nmから約1000 nmのサイズを有する。いくつかの実施形態では、粒子は、約1 nmから約500 nmのサイズを有する。いくつかの実施形態では、粒子は、約1 nmから約300 μm のサイズを有する。いくつかの実施形態では、粒子は、約10 nmから約500 nmのサイズを有する。いくつかの実施形態では、粒子は、約10 nmから約300 nmのサイズを有する。いくつかの実施形態では、粒子は、約10 nmから約100 nmのサイズを有する。いくつかの実施形態では、粒子は、約10 nmから約30 μm のサイズを有する。これらの実施形態のうちのいくつかでは、サイズは、粒子の平均寸法または平均直径である。

20

【0035】

いくつかの実施形態では、s i R N A / コラーゲン / S P D は、損傷部位に適用される。いくつかの実施形態では、損傷は、創傷または熱傷（以下、そのすべての実施形態を包含するために創傷と呼ぶ）である。いくつかの実施形態では、創傷は、擦過傷、切り傷、切除創または複数の裂傷である。

【0036】

本明細書で医薬構造体と呼ばれる F L 2 s i R N A - コラーゲン微粒子 - 界面活性剤ポリマードレッシングは、いくつかの実施形態で使用され、治癒を促進するために創傷または熱傷に適用される。いくつかの実施形態では、医薬構造体は、1回若しくは2回以上、毎日、1日2回、1日3回、1日4回、または1日5回以上、創傷に適用され得る。いくつかの実施形態では、医薬構造体は、特定の日、創傷が治癒するまでの期間、または或る日から創傷が治癒するまでの期間にわたって、毎日、またはそれより頻繁に適用され得る。いくつかの実施形態では、医薬構造体は、1日1回よりも少ない頻度で創傷に適用され、適用日において、その日の適用頻度は、前述の頻度のうちのいずれかである。一実施形態では、適用日は、1日おき、3日ごと、4日ごと、またはそれより少ない頻度である。いくつかの実施形態では、医薬構造体は、創傷が治癒するまでの期間、または或る日から創傷が治癒するまでの期間にわたって、毎日よりも少ない頻度で、及び適用日の間さらに頻繁に、適用日に適用され得る。1日あたりの適用回数、少なくとも1回の適用が行われる日数、及び治療期間は、創傷の治癒速度、創傷の外観、医薬構造体の適用の刺激または他の望ましくない側面、または他の任意の要因によって左右され得る。

30

40

【0037】

創傷が医薬構造体によって治療されていない日、またはその期間に、湿潤剤、抗生物質軟膏、抗炎症軟膏、または他の任意の創傷ケア製品などの様々な医薬構造体が適用され得る。s i R N A 無しであっても、コラーゲン微粒子の有無にかかわらず、界面活性剤ポリマードレッシングをs i R N A の適用の間に使用することにより、創傷の一貫した被覆が維持される。

【0038】

50

いくつかの実施形態では、医薬構造体の適用後、閉塞性または非閉塞性のドレッシングを治療された創傷上に配置することにより、医薬構造体の不注意な除去から部位が保護されるか、または医薬構造体が所定の位置に維持される。ガーゼにテープで留められた絆創膏、ヒドロゲルドレッシングまたは他のタイプの創傷ドレッシングを適用することにより、医薬構造体と創傷との接触が維持され、かつ、除去、汚染、その他の要因を防いで治療プロセス中の直接的な外部接触から創傷が保護される。

【0039】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬構造体は、化粧品構造体と呼ばれる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬構造体は、医薬構造体と呼ばれる。医薬構造体は、任意の生体適合性ポリマーなどの医薬担体をさらに含み得る。医薬構造体は、以下に限定しないが、例えば抗生物質、抗菌剤及び抗炎症剤などの、創傷の治療に有用な1以上の他の成分を含み得る。化粧品構造体は、医薬構造体なし、または医薬構造体の任意の1以上の追加の成分、並びに、対象の肌の色を覆うか、または肌の色に一致させるための顔料または染料などの、創傷の治療及び化粧品用途に有用な1以上の他の成分を含み得る。いくつかの実施形態では、医薬構造体または化粧品構造体は、日焼け止め剤または他のUV光遮断剤または吸収剤を含み得る。

【0040】

したがって、いくつかの実施形態では、医薬化合物は、創傷を治療するため、創傷の治療を促進するため、創傷の瘢痕形成を低減するため、創傷の強度を向上させるため、またはケロイド形成を低減するために使用され得る。

【0041】

いくつかの実施形態では、本発明の構造体が使用される場合、創傷の治療は、本発明の構造体が使用されない場合と比較して、より早く、またはより迅速に発生する。いくつかの実施形態では、本発明の構造体が使用される場合、創傷は、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10日早く治療したと見なされる。いくつかの実施形態では、本発明の構造体が使用される場合、創傷は、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20日前に治療したと見なされる。一実施形態では、本発明の構造体によって治療される創傷領域は、当該構造体によって治療されていない同様の創傷と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%または50%減少する。一実施形態では、創傷領域は、本発明の構造体で治療した場合、治療されていない場合よりも30~40%小さい。前述の実施形態のいずれかでは、創傷面積の減少は、以下に限定しないが、例えば損傷後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20または21日後以降などの損傷後の任意のときに観察され得る。

【0042】

前述の実施形態のいずれかでは、創傷治療は、以下に限定しないが、例えば巨視的観察、組織学的評価または創傷内容物の評価などの1以上の基準によって評価され得る。いくつかの実施形態では、炎症または血管新生の程度は、創傷治療を評価するための他の基準である。一実施形態では、創傷の外観は、創傷治療を評価するための基準である。一実施形態では、開放創領域の測定は、創傷治療を評価するための基準である。一実施形態では、組織学的評価による創傷サイズの測定は、創傷治療を評価するための基準である。一実施形態では、上皮肥厚 (epithelial thickening) の測定は、創傷治療を評価するための基準である。一実施形態では、再上皮形成の測定は、創傷治療を評価するための基準である。一実施形態では、毛包の測定は、創傷治療を評価するための基準である。一実施形態では、keratin 14 陽性毛包の測定は、創傷治療を評価するための基準である。一実施形態では、創傷長の測定は、創傷治療を評価するための基準である。一実施形態では、顕微鏡視野あたりの血管数の測定は、創傷治療を評価するための基準である。一実施形態では、顕微鏡視野あたりのCD45 陽性クラスターの測定は、創傷治療を評価するための基準である。一実施形態では、Herovici 染色の尺度は、創傷治療を評価するための基準である。一実施形態では、損傷後の創傷サイズ拡大の測定は、創傷治療を評価する

10

20

30

40

50

ための基準である。一実施形態では、上皮の厚さの測定は、創傷治癒を評価するための基準である。前述の基準のいずれかについて、負傷後の任意の日における評価が提供される。前述の基準のいずれかについて、本発明の構造体を使用した創傷治癒の改善を示すために、負傷後 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 または 21 日以降における評価が提供される。

【0043】

一実施形態では、正常な皮膚におけるコラーゲンⅢの比率は約 20% であり、損傷した皮膚におけるコラーゲンⅢの比率は最大約 50% である。いくつかの実施形態では、熱傷を含む哺乳動物の皮膚創傷の治癒中に、創傷皮膚におけるコラーゲンⅢに対するコラーゲンⅢの比率を低減する方法が提供され、当該方法は、熱傷創傷の治癒中のコラーゲンⅢに対するコラーゲンⅢの比率を低減するのに有効な量の、本明細書に記載の化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む。一実施形態では、コラーゲンⅢ：コラーゲンⅢの比率は、最大約 50% から約 20% に減少する。

10

【0044】

いくつかの実施形態では、熱傷を含む哺乳動物の皮膚創傷の治癒中に、創傷皮膚におけるコラーゲンⅢの含有量を減少させる方法が提供され、当該方法は、熱傷創傷の治癒中にコラーゲンⅢを減少させるのに有効な量の、本明細書に記載の化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む。一実施形態では、コラーゲンⅢの含有量は、最大 50% から約 20% に減少する。

【0045】

いくつかの実施形態では、熱傷を含む哺乳動物の皮膚創傷の治癒中に、創傷皮膚におけるコラーゲンⅢに対するコラーゲンⅢの比率を低減する方法が提供され、当該方法は、熱傷創傷の治癒中にコラーゲンⅢに対するコラーゲンⅢの比率を低減するのに有効な量の、本明細書に記載の化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む。一実施形態では、コラーゲンⅢ：コラーゲンⅢの比率は、本発明の構造体によって治療されていない熱傷創傷における比率と比較して、約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、またはそれ以上、低減している。

20

【0046】

前述の実施形態のいずれかでは、コラーゲンⅢに対するコラーゲンⅢの比率は、H e r r o v i c i 染色定量化によって決定され得る。他の実施形態では、任意の他の方法が使用され得る。

30

【0047】

哺乳動物の皮膚創傷を治療するのに有効な量の、本明細書に記載の化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む、哺乳動物の皮膚創傷を治療する方法が提供される。

【0048】

哺乳動物の皮膚創傷の治癒を促進するのに有効な量の、本明細書に記載の化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む、哺乳動物の皮膚創傷の治癒を促進する方法が提供される。

【0049】

皮膚創傷部位での炎症を減少させ、及び／または血管再生を向上させる方法であって、皮膚創傷部位での炎症の減少、及び／または血管再生の向上のために有効な量の、本明細書に記載の化粧品構造体または医薬構造体を適用するステップを含む方法が提供される。

40

【0050】

本方法の実施形態では、皮膚の創傷は、擦過傷を含む。

【0051】

本方法の実施形態では、皮膚の創傷は、切り傷を含む。

【0052】

本方法の実施形態では、皮膚創傷は、切除を含む。

【0053】

本方法の実施形態では、皮膚創傷は、複数の裂傷を含む。

50

【0054】

本方法の実施形態では、皮膚創傷は、熱傷を含む。

【0055】

本方法の実施形態では、s i R N Aは、ヒトf i d g e t i n様2をコードするD N AまたはR N Aを対象とする。本方法の実施形態には、s i R N Aは、少なくとも1つの2'糖修飾を有する。本方法の実施形態では、f i d g e t i n様2は、配列番号2に記載されるアミノ酸を含む。本方法の実施形態では、s i R N Aは、配列番号3、4、5、6、7、8、9、10、11または12に記載される配列を含む。

【0056】

化粧品構造体または医薬構造体の実施形態では、s i R N Aは、ヒトf i d g e t i n様2をコードするD N AまたはR N Aを対象とする。化粧品構造体または医薬構造体の実施形態では、s i R N Aは、少なくとも1つの2'糖修飾を有する。化粧品構造体または医薬構造体の実施形態では、f i d g e t i n様2は、配列番号2に記載されるアミノ酸を含む。化粧品構造体または医薬構造体の実施形態では、s i R N Aは、配列番号3、4、5、6、7、8、9、10、11または12に記載される配列を含む。

10

【0057】

いくつかの実施形態では、(i i)界面活性剤ポリマードレッシング中のコラーゲン微粒子によってカプセル化されたf i d g e t i n様2 (F L 2)を対象とする(i) s i R N Aを含む構造体を有する部分を含む、創傷dreッシング構造が提供される。

【0058】

いくつかの実施形態では、創傷dreッシング構造は、哺乳動物の皮膚への接着剤による接着を可能にする1以上の接着部分をさらに含む。

20

【0059】

いくつかの実施形態では、創傷dreッシング構造は、(i i)界面活性剤ポリマードレッシング中のコラーゲン微粒子によってカプセル化されたf i d g e t i n様2 (F L 2)を対象とする(i) s i R N Aを含む構造体と混合された抗菌性または消毒性化合物をさらに含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、創傷dreッシング構造は、織物、プラスチック、P V C、ポリエチレン、ポリウレタンまたはラテックスを含む。

30

【0061】

いくつかの実施形態では、創傷dreッシング構造は、1以上の接着部分を含み、接着剤は、アクリル酸、メタクリル酸またはエポキシジアクリレートを含む。

【0062】

いくつかの実施形態では、創傷dreッシング構造は、接着部分を有していない。いくつかの実施形態では、創傷dreッシング構造は、テープまたは他の手段を用いて所定の位置に固定される。

【0063】

いくつかの実施形態では、(i i)界面活性剤ポリマードレッシング中のコラーゲン微粒子によってカプセル化されたf i d g e t i n様2 (F L 2)を対象とする(i) s i R N Aを含む創傷dreッシング構造体は、当該界面活性剤ポリマードレッシング上の皮膚に接着しないパッドに配されているか、または当該パッドに吸着されている。

40

【0064】

一実施形態では、界面活性剤ポリマードレッシングは、ポロキサマーを含む。一実施形態では、ポロキサマーは、重量比が4:2:4であるポリオキシエチレンの2つの親水性鎖がその両側に隣接するポリオキシプロピレンの中央疎水性鎖からなる合成トリブロックコポリマーである。一実施形態では、ポロキサマーは、ポロキサマー188である。一実施形態では、ポロキサマーは、8400ダルトンの平均分子量を有する。

【0065】

いくつかの実施形態では、界面活性剤ポリマードレッシングは、4-(1,1,3,3-

50

テトラメチルブチル) フェニル-ポリエチレングリコールをさらに含む。いくつかの実施形態では、4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル) フェニル-ポリエチレングリコールは、10個の繰り返しポリエチレンオキシド基が存在する約647の分子量を有する。いくつかの実施形態では、平均9.5個のポリエチレンオキシド基が存在する。いくつかの実施形態では、界面活性剤ポリマードレッシングは、Triton (登録商標) -100をさらに含む。

【0066】

いくつかの実施形態では、界面活性剤ポリマードレッシングは、ポロキサマー、メロキサポールまたはポロキサミンである。

【0067】

一実施形態では、fidgetin様2は、配列番号2に記載のアミノ酸を含む。一実施形態では、siRNAが投与される。一実施形態では、shRNAが投与される。一実施形態では、ヒトfidgetin様2をコードするDNAまたはRNAを対象とするsiRNAは、少なくとも1つの2'糖修飾を有する。一実施形態では、ヒトfidgetin様2をコードするDNAまたはRNAを対象とするshRNAは、少なくとも1つの2'糖修飾を有する。一実施形態では、siRNAまたはshRNAは、ヒトfidgetin様2をコードするmRNAを対象とする。一実施形態では、siRNAまたはshRNAは、ヒトfidgetin様2をコードするDNAを対象とする。一実施形態では、siRNAは、配列番号3、4、5、6、7、8、9、10、11または12に記載の配列を含む。

【0068】

一実施形態では、本明細書に記載の方法または構造体において使用されるsiRNA (低分子干渉RNA) は、fidgetin様2タンパク質をコードするmRNA配列に対して相補的な部分を含む。一実施形態では、fidgetin様2タンパク質は、ヒトfidgetin様2タンパク質である。一実施形態では、mRNAは、DNA配列NCBI参照配列: NM_001013690.4 (配列番号1) によってコードされ、siRNAは、fidgetin様2タンパク質の発現を阻害するのに有効である。一実施形態では、fidgetin様2タンパク質は、配列番号2に記載の配列を有する連続したアミノ酸残基を含む。

【0069】

一実施形態では、siRNAは、二本鎖部分 (二本鎖) を含む。一実施形態では、siRNAは、19-25ヌクレオチドの長さである。一実施形態では、siRNAは、20-25ヌクレオチドの長さである。一実施形態では、siRNAは、一方または両方の鎖に、独立して、1または2のヌクレオチド3'オーバーハングを有する19-21コアのRNA二本鎖を含む。一実施形態では、siRNAは、一方または両方の鎖に、独立して、1または2のヌクレオチド3'オーバーハングを有する19-25のRNA二本鎖を含む。siRNAは5'末端がリン酸化されている場合とされていない場合があり、ヌクレアーゼ分解に対する有効性及び/または耐性を向上させるために、当該技術分野で知られている修飾のうちのいずれかで修飾され得る。一実施形態では、siRNAは、1以上の細胞にトランスフェクトされるように投与され得る。一実施形態では、siRNAは5'末端がリン酸化されている。一実施形態では、siRNAの重複しない部分の全長は、fidgetin様2タンパク質をコードするmRNAの部分に対して完全に相補的である。

【0070】

一実施形態では、siRNAの鎖の5'末端残基はリン酸化されている。一実施形態では、siRNAのアンチセンス鎖の5'末端残基はリン酸化されている。一実施形態では、本発明のsiRNAは二本鎖RNAを含み、二本鎖RNAの一本鎖は、fidgetin様2タンパク質をコードする遺伝子のRNA転写物の一部に対して80、85、90、95または100%相補的である。一実施形態では、fidgetin様2タンパク質をコードする遺伝子のRNA転写物は、mRNAである。一実施形態では、fidgetin様2タンパク質は、ヒトfidgetin様2タンパク質である。一実施形態では、本発

10

20

30

40

50

明の s i R N A は二本鎖 R N A を含み、R N A の一本鎖は f i d g e t i n 様 2 タンパク質をコードする遺伝子の R N A 転写物の 1 8 2 5 の連続するヌクレオチドの一部と同一の配列を有する部分を含む。さらに別の実施形態では、本発明の s i R N A は、R N A の両方の鎖が非ヌクレオチドリinkerによって接続されている二本鎖 R N A を含む。あるいは、本発明の s i R N A は、R N A の両方の鎖が、ループまたはステムループ構造などのヌクレオチドリinkerによって接続されている二本鎖 R N A を含むことができる。一実施形態では、R N A の両方の鎖は、ループまたはステムループ構造などのヌクレオチドリinkerによって接続されていない。

【0071】

一実施形態では、本発明の s i R N A の一本鎖構成要素は、14 から 50 ヌクレオチドの長さである。別の実施形態では、本発明の s i R N A の一本鎖構成要素は、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 または 28 ヌクレオチドの長さである。さらに別の実施形態では、本発明の s i R N A の一本鎖構成要素は、21 ヌクレオチドの長さである。さらに別の実施形態では、本発明の s i R N A の一本鎖構成要素は、22 ヌクレオチドの長さである。さらに別の実施形態では、本発明の s i R N A の一本鎖構成要素は、23 ヌクレオチドの長さである。一実施形態では、本発明の s i R N A は、28 から 56 ヌクレオチドの長さである。別の実施形態では、本発明の s i R N A は、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51 または 52 ヌクレオチドの長さである。

【0072】

別の実施形態では、本発明の s i R N A は、少なくとも 1 つの 2' 糖修飾を含む。別の実施形態では、本発明の s i R N A は、少なくとも 1 つの核酸塩基修飾を含む。別の実施形態では、本発明の s i R N A は、少なくとも 1 つのリン酸骨格修飾を含む。実施形態では、本発明の s i R N A は、少なくとも 1 つの 2'-O-メチル修飾を含む。実施形態では、本発明の s i R N A は、少なくとも 1 つのジオチリン酸 (P S 2) を含む。

【0073】

別の実施形態では、本発明の s i R N A は、以下に限定しないが、例えば、2'-アジド-2'-デオキシシチジンリボ核酸、2'-アジド-2'-デオキシウリジンリボ核酸、2'-アジド-2'-デオキシアデノシンリボ核酸、2'-アジド-2'-デオキシグアノシンリボ核酸、2'-フルオロ-2'-デオキシアデノシンリボ核酸、2'-フルオロ-2'-デオキシシチジンリボ核酸、2'-フルオロ-2'-デオキシウリジンリボ核酸、2'-フルオロチミジンリボ核酸、2'-O-メチルアデノシンリボ核酸、2'-O-メチルシチジンリボ核酸、2'-O-メチルグアノシンリボ核酸または 2'-O-メチルウリジンリボ核酸などの、少なくとも 1 つの 2' 糖修飾を含む。他のヌクレオチド修飾は、参照により本明細書に組み込まれる「Chiu et al., 2003, RNA 9(9):1034-1048」及び「Peacock et al., 2011, J Org Chem 76(18):7295-7300」に記載されている。

【0074】

本明細書で使用される場合、「少なくとも 1 つ」は、1 以上を意味する。

【0075】

一実施形態では、F L 2 は、N C B I 参照配列：N M _ 0 0 1 0 1 3 6 9 0 . 4 (配列番号 1) (ヒト f i d g e t i n 様 2 をコードする核酸) によってコードされている。

【0076】

1 a g t g a g c t a t g g g g a c a c t a c t g c a c t g t a g c c t g
g g c a a c a g a g c a a g a c c t t g t c t c a

【0077】

61 a a a a t g t a t a t a t a t t t t g g g c t t t t t t t c c t a a
a a c g g g a a c t a c a a c a g c a t a t t t g c

【0078】

121 g a g c t g a t g a g a g t g a c c c a g c a g a g a g g g a a a
t g g a t c a g c t c t g t t g a a g a t g c a c t g

10

20

30

40

50

【0079】

181 g a c a c c a g a a c a c g c c c a g c c c c t c a a c c a g t g
g c c a g a g c a g c a c c t g g a c g t c t c c t c

【0080】

241 c a c c a c c c c g t c g c c g g c c c a c a a g t t g g a g t t
g c c c c c t g g g g g t c g c c a a c g c t g c c a

【0081】

301 c t a c g c t t g g g c a c a c g a c g a c a t c t c a g c c c t
c a c t g c c t c c a a c c t c c t a a a g c g c t a

【0082】

361 t g c a g a g a a g t a c t c t g g g g t c t t g g a t t c t c c
c t a c g a g c g t c c g g c c c t g g g c g g g t a

【0083】

421 c a g c g a c g c c t c c t t c c t c a a c g g c g c c a a a g g
g g a t c c c g a g c c c t g g c c a g g g c c g g a

【0084】

481 g c c a c c c t a c c c c t t g g c c t c a c t c c a c g a a g g
c c t c c c a g g a a c c a a a t c g g g c g g t g g

【0085】

541 c g g c g g t t c c g g g g c c c t g g g g g c t c c c c a g t
t t t a g c c g g g a a c c t c c c t g a a c c c c t

【0086】

601 c t a c g c c g g c a a t g c g t g c g g g g g c c c a t c g g c
g g c g c c c g a g t a c g c g g c c g g c t a c g g

【0087】

661 c g g g g g g t a c c t g g c g c c g g g t t a c t g c g c g c a
g a c g g g c g c c g c g c t g c c c c c g c c g c c

【0088】

721 c c c g g c c g c g c t c c t g c a g c c c c a c c g c c t c c
g g g g t a c g g g c c c t c a g c g c c g c t g t a

【0089】

781 c a a c t a t c c c g c a g g g g g c t a c g c a g c g c a g c c
c g g c t a t g g c g c g c t c c c g c c g c c c c c

【0090】

841 a g g c c c a c c c c c g g c c c c c t a c c t g a c c c c g g g
c c t g c c c g c g c c c a c g c c c c t g c c c g c

【0091】

901 g c c g g c a c c g c c c a c c g c c t a t g g c t t c c c c a c
g g c c g c g c c g g g t g c c g a a t c c g g g c t

【0092】

961 g t c g c t g a a g c g c a a g g c c g c c g a c g a g g g g c c
c g a g g g c c g c t a c c g c a a g t a c g c g t a

【0093】

1021 c g a g c c c g c c a a g g c c c c c g t g g c t g a c g g a g
c c t c c t a c c c c g c c g c g g a c a a c g g c g a

【0094】

1081 a t g t c g g g g c a a c g g g t t c c g g g c c a a g c c g c
c a g g a g c c g c g g a g g a g g c g t c g g g c a a

【0095】

1141 g t a c g g t g g c g g c g t c c c c c t c a a g g t c c t g g

10

20

30

40

50

g c t c c c c c g t c t a c g g c c c g c a a c t g g a
[0096]
1201 g c c c t t t g a a a a g t t c c c g g a g c g g g c c c c g g
c t c c t c g t g g g g g g t t c g c c g t g c c g t c
[0097]
1261 g g g g g a g a c t c c c a a a g g c g t g g a c c c t g g g g
c c c t g g a g c t g g t g a c g a g c a a g a t g g t
[0098]
1321 g g a c t g c g g g c c c c c g g t g c a g t g g g c g g a t g
t g g c g g g c c a g g g c g c g c t c a a g g c g g c
[0099]
1381 g c t g g a g g a g g a g c t g g t g t g g c c c c t g c t c a
g g c c g c c c g c c t a c c c g g g c a g c c t g c g
[0100]
1441 c c c g c c g c g g a c c g t c c t g c t c t t t g g g c c g c
g g g g c g c g g g c a a a g c g c t g c t g g g c c g
[0101]
1501 c t g c c t c g c c a c g c a g c t g g g c g c c a c g c t g t
t g c g c c t g c g c g g c g c g a c c c t g g c t g c
[0102]
1561 g c c c g g c g c c g c c g a g g g c g c g c g c c t c c t c c
a g g c c g c c t t c g c g g c c g c g c g c t g c c g
[0103]
1621 c c c a c c c t c c g t a c t c c t c a t c a g c g a g c t a g
a g g c g c t g c t c c c c g c c c g g g a c g a c g g
[0104]
1681 c g c g g c g g c a g g g g g c g c g c t g c a g g t g c c g c
t c c t g g c c t g c c t g g a c g g g g g c t g c g g
[0105]
1741 c g c g g g g g c t g a c g g c g t g c t g g t t g t g g g c a
c c a c c t c g c g g c c c g c g g c t c t g g a c g a
[0106]
1801 g g c g a c c c g c c g g c g c t t c t c t c t c c g c t t c t
a c g t g g c g c t g c c c g a c a g c c c g g c c c g
[0107]
1861 c g g g c a g a t c c t g c a g c g g g c g c t g g c c c a g c
a g g g c t g c g c g c t c a g t g a g c g g g a a c t
[0108]
1921 g g c g g c g c t g g t g c a g g g c a c g c a g g g c t t c t
c t g g g g g c g a g c t g g g g c a g c t g t g c c a
[0109]
1981 g c a g g c g g c g g c c g g g g c g g g c c t c c c g g g g c
t g c a g c g c c c c c t c t c c t a c a a g g a c c t
[0110]
2041 g g a g g c g g c g c t g g c c a a g g t g g g c c c t a g g g
c c t c t g c c a a g g a a c t g g a c t c g t t c g t
[0111]
2101 g g a g t g g g a c a a a a t g t a c g g c t c c g g a c a c t
g a c g g c g c g c g g g g g a g g c c g c g g g a g c
[0112]

10

20

30

40

50

2 1 6 1 c g c a g t c c c t c c g t c c c c g c c g c c t c c g c g t g
 g g a g g g a t g t c a c t g a c t a a a c c c g g c t
 [0 1 1 3]
 2 2 2 1 g g c a g g g g c t g g a g t g g t g a a t g t g g g a t c g g
 g g a c a g g a g g g g t c t g c c g g t g g a t a t t
 [0 1 1 4]
 2 2 8 1 t t t t t t t t c g t g g g a a g g a a a a t g c t t c t g c c
 a g g c a g a t g c c a t a t g c g c c g t g t a c t c
 [0 1 1 5]
 2 3 4 1 a g g t t t t t c c t a t t t a t t g t g g a c t g g a a g c t
 c g c c a t c t c c g c c c g g c a g a c c g g g c a g
 [0 1 1 6]
 2 4 0 1 a t c c g g c a t g g g c t g g c a c c c g g g g c c t t a a g
 a a c t c c t g c t c t c t t g c c a c a a c g c t t t
 [0 1 1 7]
 2 4 6 1 t g t c t c c t c g c t a t c t g a a t g g c a c c c t c c t t
 c t c c c t c a c t c t c t c c a t c c c a t t c t c t
 [0 1 1 8]
 2 5 2 1 g c a t t c t c t t t g g t t t t c t c t c c c t t t t g c t t t
 g t c g c t g a c a c c c c t g c c c a c c c c a t g c
 [0 1 1 9]
 2 5 8 1 t g g c c c t g t t t c t c t c c t g c c c c t c c c t c c c c
 a g c t c t c c a t c c c t c a c c c t c t g t g c t t
 [0 1 2 0]
 2 6 4 1 c t g t c t c c a t c c c t g g c t c t c c a g c g t c c c t g
 g c c t t t t g g t c c c t g a g c t t t a a t g c c t
 [0 1 2 1]
 2 7 0 1 t t c c c t g c c t t c t g t t c t t a t t t g g a c t g c a g
 t g g c c c t t t g c a g g a g c t c t g g a g g c c c
 [0 1 2 2]
 2 7 6 1 a g g g g c t g a g g a g g a g g g t t a c c c c t c t a c c c
 a t c t g a a a c c t a g g g t c t a g g g g g a t c a
 [0 1 2 3]
 2 8 2 1 a g g a a a a a a a g t c c c c a a a g a a g g g g a a t t t t
 t t g t t t g t t t t t g a g g g g a g a t c c c a g a
 [0 1 2 4]
 2 8 8 1 a a t g t a g c t t g t t t c a t a t t t t a g t c t t c t t a
 t t t t t g t a a a a t g t g t a g a a t t t g c t g t
 [0 1 2 5]
 2 9 4 1 t t t t c t t t t t c t t t t g a c a a c t c a g g a a g a a a
 c t g a c c t c a g a a a g a a t g t t a g a c t t t g
 [0 1 2 6]
 3 0 0 1 g c t g c t c t c c t g t g t g c c c c t c a c a c c t g c c c
 c c t c c c c c c c a c t c c a t c c a g g g g a c c a
 [0 1 2 7]
 3 0 6 1 a a t t c t c c c a g a c a c t c a a a a a a t g a g a c t t a
 c g g g g a a g g g g a g a g g a a g a c c c a g a g g
 [0 1 2 8]
 3 1 2 1 c c t c a g t g a a a c c c c a g c t a t t c c t g g t c a g a
 a g c a g a a t g t a t t c c t a a g g g c t t c c t c

10

20

30

40

50

[0129]

3181 c c c a g g g g c c g a g g c c t a g g c a t g a a t g t g g g g
a g t g g g c t g t g g g g t t t g a g a g a a g g g a

[0130]

3241 g g c c t t a t t c c t c t c c t g c t g c t c c c c a c c c c
c t g c c c c a c c c a a c c c c t c c g c t g a g t g

[0131]

3301 t t t t c t g t g a a g g g c t a t c c a g a g t t a g g a t g
c c c t t g c c c a a t t c c t t c c t g a g a c c c a

[0132]

3361 g a a g g t a g g g t g g g a g g g c c c a a a t g g g a a g g
t g a c c t a a g c a g a a a g t c t c c a g a a a g g

[0133]

3421 t c a t g t c c c c t g g c c c t g c c t t g g c a g a g g t c
c c c a g t g a c t t a t g c t a g g a g g a t t c c a

[0134]

3481 t c t g g g t a g a c a g t c t g g c c a c a a a t c a g c t
a c t g g a c c t c a g c c a t c t c t g c t g g a g g

[0135]

3541 c t c t g a g g a g g a g t g a g c a t c c c t c a c t t g t g
g g g g c t c t g t g a g g a a a t g t g c c t t c c c

[0136]

3601 c a t t c c c c c g g a g t c c t a g g t c t g g a g c t c c a
g g g c t g g g a g a g g g t g a g g g a g a t g g g c

[0137]

3661 a g g g g t g t t t t c t c t g a c c t t g g g g g c t t a g t
c t c a g t c c t g c c t g a a c t t t c c a c t a g g

[0138]

3721 c t t g g a a c c c t t c c a a g a a c c a t a t t t c t c t c
c t t c c c a c c a a t t t t c c c t t g a t g a g g c

[0139]

3781 t t t a g c a g t t t g c t c c c a c c a c c c c a g c c c a
t t t c a c a a c t c t g a t c t t a g t c c a a a g c

[0140]

3841 a g g g g a c a c g c c c c c c c a c c a c c a c t t t t t c t
c t c t c c c a t c t c a g c c t c c t g t g c a g t t

[0141]

3901 c c t t g c c t g c c c g t g c a t t t c c t a g a g t c t a c
t g c c t c c c c c c t g g c t g g g a g g g t g t c t

[0142]

3961 g g g g g g g a t c t t t c a g g g g c c c t g g c a c c c a g
g g c c t g t g c t g g c c t a g g a g t g c t g a c c

[0143]

4021 a g a a g g c t g c t c t g t t c c c c c c c a c c c c g t t
g c t t t c t g g c c c c c t c t t t g g a g c c a g c

[0144]

4081 c a c c c a c a g g g c t t t g g t g c c t c a g a a g c a g t
g g g c t g c c g g g t c a c a g c c g c a g g c t g c

[0145]

4141 a a a a g a c c c t c g g a g g g a g c a t g g a g t g a g g g

10

20

30

40

50

40

50

は、FL2は、NCBI参照配列：NM__001013690.4（配列番号1）に対して96%以上の同一性を有する天然に存在する変異体である。一実施形態では、FL2は、NCBI参照配列：NM__001013690.4（配列番号1）に対して97%以上の同一性を有する天然に存在する変異体である。一実施形態では、FL2は、NCBI参照配列：NM__001013690.4（配列番号1）に対して98%以上の同一性を有する天然に存在する変異体である。一実施形態では、FL2は、NCBI参照配列：NM__001013690.4（配列番号1）に対して99%以上の同一性を有する天然に存在する変異体である。

【0158】

実施形態では、siRNAは、以下のセンス／アンチセンス配列の対のうちの1つを含む。

【0159】

センス：UUACACAGUAUUAAGCGAUU（配列番号3）

【0160】

アンチセンス：5'UCGCUUUAUAACUGUGUAAUU（配列番号4）；

【0161】

センス：CAUCUGAAACCUAGGGUCUUU（配列番号5）

【0162】

アンチセンス：5'AGACCCUAGGUUUCAGAUGUU（配列番号6）；

【0163】

センス：GUGACUUAUGCUAGGAGGAUU（配列番号7）

【0164】

アンチセンス：5'UCCUCCUAGCAUAAGUCACUU（配列番号8）；

【0165】

センス：GGUCAGAAGCAGAAUGUAUUU（配列番号9）

【0166】

アンチセンス：5'AUACAUUCUGCUUCUGACCUU（配列番号：10）；

または

【0167】

センス：CAGCUCGAGCCCUUUGACA[dT][dT]（配列番号11）

【0168】

アンチセンス：5'UGUCAAGGGCUCGAGCUG[dT][dT]（配列番号12）。

【0169】

一実施形態では、siRNAは二本鎖であり、配列番号3及び4、配列番号5及び6、配列番号7及び8、配列番号9及び10または配列番号11及び12を含む。

【0170】

一実施形態では、siRNAの鎖の5'末端残基はリン酸化されている。一実施形態では、siRNAのアンチセンス鎖の5'末端残基はリン酸化されている。一実施形態では、siRNAの鎖の5'末端残基はリン酸化されていない。一実施形態では、siRNAのアンチセンス鎖の5'末端残基はリン酸化されていない。

【0171】

一実施形態では、構造体は、皮膚創傷からの回復を促進するのに適したさらなる有効成分（例えば、1以上の抗生物質、消毒剤、ビタミン、麻酔薬、抗ヒスタミン剤、抗炎症剤、保湿剤、浸透促進剤及び／または抗刺激剤）を含む。一実施形態では、構造体は、皮膚創傷からの回復を促進するのに適したさらなる有効成分（例えば、1以上の抗生物質、消毒剤、ビタミン、麻酔薬、抗ヒスタミン剤、抗炎症剤、保湿剤、浸透促進剤及び／または抗刺激剤）を含まない。

【0172】

本明細書に記載の方法及び構造体の一実施形態では、対象は哺乳動物である。一実施形態

10

20

30

40

50

では、対象はヒトである。

【0173】

本明細書に記載の様々な要素のすべての組み合わせは、本明細書に別段の指示がない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、本発明の範囲内にある。

【0174】

本出願で言及されるすべての刊行物、特許、特許出願刊行物及び本の開示は、対象の発明が関係する技術をより完全に説明するために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0175】

本発明は、以下の実験の詳細からよりよく理解されるであろう。しかしながら、当業者は、議論される特定の方法及び結果が本発明の単なる例示であり、その後続く特許請求の範囲においてより完全に説明されることを容易に理解するであろう。

【0176】

実験の詳細

【0177】

FL2 siRNAコラーゲン微粒子をSPD (SPD-FL2-siRNA) に組み込むと、2つのマウス創傷治癒モデル（すなわち、全層切除及び全層熱傷）において臨床的かつ組織学的に測定した場合、対照（微粒子を含まないSPD及びSPD-Control-siRNA）と比較して、治癒結果が大幅に向上することが示されている。SPD-FL2-siRNA処置後、炎症が減少し、創傷部位の血管再生は増加したが、細胞増殖は影響を受けなかった。創傷治癒はより迅速かつ忠実に発生し、適切に組織化されたコラーゲン下部構造が得られた。まとめると、これらの発見は、FL2 siRNAを既存の治療オプションに組み込むことが、新たな創傷管理療法であることを示している。

【0178】

対象と手法

【0179】

界面活性剤ポリマードレッシング (SPD)：非イオン性界面活性剤ポリマードレッシング (SPD; PluroGel (商標)、Medline Industries, Inc. 社) を siRNA 送達に使用した。

【0180】

siRNA：マウス FL2 (Sigma-Aldrich 社、SASI_Mm02_00354635) を標的とする配列、または標的としない陰性対照の siRNA (Sigma-Aldrich 社、SIC001) を使用した。

【0181】

5'-3'：

【0182】

センス：CAGCUCGAGCCCUUUGACA [dT] [dT] (配列番号 11)

【0183】

アンチセンス：UGUCAAGGGCUCGAGCUG [dT] [dT] (配列番号 12)

【0184】

コラーゲン微粒子及び SPD の取り込み：ビス (2-エチルヘキシル) スルホコハク酸ナトリウム (AOT) (Sigma-Aldrich 社) 10 g を n-ヘキサン 34 mL 中で溶解し、酢酸中で溶解した 5% コラーゲン I 2 mL を加えた。得られたマイクロエマルジョンを、透明になるまで 45 分間攪拌した。次に、この溶液を蒸発させてヘキサンを除去した。残留物を洗浄した後、ヌクレアーゼを含まない水に懸濁し、凍結乾燥した。次に、100 mg の凍結乾燥粉末を 1000 μ L の 25 μ M siRNA 溶液で処理し、再凍結乾燥した。次に、この物質を 1.25 mL の SPD に 4 度で 2 時間懸濁した後、凍結乾燥した。次に、凍結乾燥粉末に、ヌクレアーゼを含まない 1.25 mL の水及び 1.25 mL の SPD を加えた。

10

20

30

40

50

【0185】

インビボ試験：全米研究評議会の研究用動物資源協会（Institute of Laboratory Animal Resources）によって公表されたガイドラインにしたがって動物実験を実施し、この研究のための動物管理は、アルバートアインシュタイン医科大学の動物実験委員会（Institutional Animal Care and Use Committee）によって承認された。

【0186】

パンチ生検切除：手術の前に、マウスをケタミンーキシラジンカクテルで麻酔した。雌のB a l b / cマウス（6－8週齢、米国国立がん研究所、メリーランド州フレデリック所在）を剃毛した後、5 mmのパンチ生検ツールを使用して背部に均一に傷をつけた。マウスに典型的に見られる創傷収縮を打ち消すために、確立されたシリコンスプリント法を使用して、肉芽組織の形成及び再上皮形成を促進した(Dunn et al., 2013, J Vis Exp 75:e50265)。試験中、スプリントを1日に複数回チェックし、必要に応じて交換した。0、2及び4日目に、10 u LのSPD、SPD－Control－s i R N AまたはSPD－FL2－s i R N Aのいずれかによって創傷を治療した。

【0187】

熱傷プロトコル：手術の前に、マウスをケタミンーキシラジンカクテルで麻酔した。雌のB a l b / cマウス（6－8週間、米国国立がん研究所、メリーランド州フレデリック所在）を剃毛した後、100 ° Cに加熱した5 mmの真鍮製プローブを使用して背部を均一に熱傷させた。損傷後、必要に応じてマウスにブプレノルフィンを与えた。0、2、及び4日目に、10 μ LのSPD、SPD－Control－s i R N AまたはSPD－FL2－s i R N Aのいずれかによって創傷を治療した。

【0188】

創傷測定：治療群を知らされていない研究者が、外科用ノギスを使用して創傷を測定した。4つの平面（N－S、WE、NE－SW、NW－SE）で測定を行い、表にまとめ、0日目と比較した。組織学的に、創傷の両端に最も近い位置の毛包間の距離によって、創傷の縁を定義した。

【0189】

組織化学：創傷部位を採取し、H i s t o C h o i c e（商標）中で一晚固定し、創傷の中心で二分し、パラフィンブロック中に包埋した。7 μ mの切片を切り取り、スライドを脱パラフィンし、PBS－0.01% T r i t o n（商標）X100で洗浄し、抗原回復バッファT r i s / E D T A p H 9.0でアンマスキングした後、PBS中の5% N G Sでブロックした。切片をそれぞれの抗体で一晚染色し、D A Bキット（V e c t o r L a b s社）を使用して視覚化した。

【0190】

顕微鏡学：創傷の切片全体を、20倍の空気対物レンズ（NA＝0.8）の明視野を使用するP250大容量スライドスキャナ（3D H i s t e c h社）、及びCMOSカラーカメラ（VCC－FC60FR19CL、C I S C o r p .社）によって画像化した。創傷サイズの測定を、C a s e V i e w e r分析ソフトウェア（3D H i s t e c h社）を使用して行った。創傷のサイズを、創傷の縁の間の最大長を測定することによって決定した。PCNA、CD45及びPECAM1の定量化を、他で記載されているように実施した「Jeschke et al., 2000; Lab Invest 80:151-158; Suga et al., 2014; Stem Cells 32:1347-1360」。H e r o v i c i分析を、前述のアプローチにしたがって実施した「Turner et al., 2013, J Tissue Eng Regen Med 7:139-148; Rawlins et al., 2006; J Burn Care Res 27:60-65」。

【0191】

統計分析：データを平均±SEMとして表す。治療群間の差異を、対応のないスチューデントのt検定、マン・ホイットニーのノンパラメトリックt検定、または二元配置分散分析を使用して計算した。有意性をp<0.05に設定した。

【0192】

市販の抗体及び染色：免疫組織化学において使用される市販の抗体には、P E C A M－1

(1:50) (Abcam社、ab28364)、CD45 (1:200) (Abcam社、ab10558)、PCNA (1:1000) (Abcam社、ab152112)、Keratin14 (1:500) (BioLegend社、906004)が含まれる。あるいは、製造業者の提案するプロトコルにしたがって、Hematoxylin (Ricca Chemical Company社、#3530-32) 及びEosin (Acros Organics社、#17372-87-1)、またはHerovici (American MasterTech社、#K THER) で切片を染色した。

【0193】

定量的PCR: SPD、SPD-Control-siRNA及びSPD-FL2-siRNAで処置したマウスの皮膚を、創傷後の設定された時点で切除した。Next Advance Bullet Blenderを使用して組織を粉碎し、RNAをTrizol (登録商標) 試薬 (Invitrogen社、15596-026) で抽出した。相補的DNAを、SuperScript IV First-strand合成システム (Invitrogen社、18091050) を使用して同一の日に合成した。定量的PCRを、Life Technologies Universal Master Mix II (4440040) をFIGNL2プライマー (Mm. PT. 58. 21940655、IDT Technologies社) と共に使用して実施した。ActB (アクチン) を参照遺伝子として使用した (Mm. PT. 58. 33540333、IDT Technologies社)。得られたデータを、比較 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を使用して定量化した。対照の皮膚創傷の平均を1に正規化し、相対的な定量化に使用した。

【0194】

結果

【0195】

SPD-FL2-siRNAは、FL2 mRNAの存在量をノックダウンした。創傷領域内の細胞へのFL2を標的とするsiRNAの送達は、siRNA微粒子を含有する治療用界面活性剤ポリマーの直接的な局所適用によって達成された (図1A)。FL2レベルの減少は、最初の治療の3日後に、損傷した皮膚のqPCR分析によって確認された (図1B)。FL2 siRNAを投与された創傷は、対照 (標的ではないsiRNAを含有するコラーゲン微粒子を含むSPD (SPD-Control-siRNA)) と比較して、FL2 mRNAレベルが51%減少した。これらのデータは、FL2 siRNAが効果的に送達され、適用部位でFL2 mRNA転写物の分解を引き起こしていることを示している。

【0196】

SPD-FL2-siRNAは、切除創の再上皮形成を促進した。全層切除後、創傷サイズの有意な改善が、創傷の3日後、SPD-FL2-siRNAで治療した創傷において最初に認められた (図2A、2B)。4日目に、SPD単独及びSPD-Control-siRNA処置マウスの開放創傷領域 (それぞれ、21.8%及び23.7%の開放) は、SPD-FL2-siRNA処置マウスの開放創傷領域 (11.04%の開放) のほぼ2倍のサイズであった ($n=22$ 創傷/群) (図2C)。治療を6日目まで続け、その時点で、創傷は小さくなり測定できなくなった。

【0197】

創傷の組織学的分析により、SPD-FL2-siRNA治療後の創傷サイズの有意な減少が確認された。SPD-FL2-siRNAによって治療された創傷は対照の約半分の長さに縮小した (それぞれの平均創傷長は、SPDは 2.5 ± 0.2 mm、SPD-Control-siRNAは 2.4 ± 0.3 mm、SPD-FL2-siRNAは 1.2 ± 0.3 mm) (図3A、3B)。さらに、keratin14染色で確認されたように、いくつかのケース (2/7) において、SPD-FL2-siRNA治療創傷の創傷領域内に毛包が存在することがわかった (図3A挿入図)。対照では、そのような構造は観察されなかった。これらの臨床的及び組織学的評価は、SPD-FL2-siRNAが、対照と比較して、全層切除後の再上皮形成及び再生をより効果的に刺激してい

ることを示している。

【0198】

SPD-FL2-siRNAは熱傷創傷の治癒を改善した。創傷治癒に対するSPD-FL2-siRNAの効果、全層熱傷モデルでさらにテストした。治療群を知らされていない2人の調査員が、外科用ノギスを使用して熱傷を毎日測定し、閉鎖まで追跡した（図4A、4B）。損傷後4日間、創傷部位のサイズが拡大し、対照群における最初の熱傷領域のサイズに対して最大215%まで増大した。しかし、SPD-FL2-siRNAで治療された熱傷はそれほど劇的には拡大せず、最初の熱傷領域に対して最大160%のサイズに達した。熱傷の拡大の減少後、4日目から9日目まで、SPD及びSPD-Control-siRNAで治療した熱傷と比較して治癒が著しく改善された（図4B、4C）。痂皮形成が原因で、9日目以降、外科用ノギスを使用して熱傷を測定することが困難になった。損傷から14日後の創傷組織の組織学的分析により、SPD-FL2-siRNAで治療された熱傷が、熱傷創傷領域の有意な減少を受けたことが示された（SPD及びSPD-Control-siRNAは、それぞれ35.5%及び39.3%大きかった。データは図示せず）。SPD-FL2-siRNAで治療された熱傷はすべて14日目に完全に閉じたが、SPD及びSPD-Control-siRNAで治療された創傷のそれぞれ25%及び30%は治癒されていないままであった（データは図示せず）。さらに、SPD-FL2-siRNAで治療された熱傷は、対照と比較して、上皮の厚さが大幅に減少し、正常な皮膚により近くなった（図4D）。これらの臨床的及び組織学的評価は、SPD-FL2-siRNAが全層熱傷後の創傷組織の再上皮形成及び再生を促進することを示している。

10

20

【0199】

SPD-FL2-siRNAは、皮膚の再生を改善した。次に特徴付けられたのは、免疫組織化学的染色による再生組織の質であった。細胞増殖の増加が再上皮形成時間の短縮を説明する可能性があったため、細胞増殖における最初のFL2の役割を調査した。熱傷創傷切片の増殖細胞核抗原（PCNA）染色により、3つの治療群間でPCNA陽性細胞の割合に有意差がないことが明らかになった（図5A、5B）。これらのデータは、FL2ノックダウンが治癒中の細胞増殖に影響を与えないことを示し、対照と比較して、細胞移動が再上皮形成を促進する可能性が高いことを示唆していた。

30

【0200】

炎症を管理することは、効果的な創傷治癒のために不可欠なプロセスである。14日目の炎症細胞の存在に対するFL2ノックダウンの影響を評価するために、白血球及び他の免疫細胞のマーカーであるCD45について切片を染色した。CD45染色は3つの治療群すべてに認められた。しかし、SPD-FL2-siRNAで治療された創傷では、燃焼領域内に含まれるCD45陽性細胞の明確なクラスターが、SPD及びSPD-Control-siRNA群よりも少ないことが観察された（図5A、5C）。7日後、CD45陽性細胞の減少は、ベースライン状態に戻ったことを示していた。

【0201】

熱傷領域の血管再生を、血小板内皮細胞接着分子-1（PECAM1）染色によって定量化した。フィールドあたりの血管は、SPD-FL2-siRNAで治療された創傷（99.5+/-4.3血管/フィールド）において、SPD及びSPD-Control-siRNA治療（それぞれ、73.5+/-6.8及び62.7+/-7.9血管/フィールド）よりも有意に多く認められた（図5A、5D）。このデータは、FL2ノックダウンが創傷皮膚における血管新生を促進することにより、急速に再生する創傷領域で使用するために、創傷部位に酸素及び栄養素を提供し得ることを示唆している。

40

【0202】

SPD-FL2-siRNAは、熱傷瘢痕におけるコラーゲンIII:Iの比率に影響を与えた。創傷治癒の初期段階では、筋線維芽細胞がコラーゲンIIIを創傷領域に沈着させ、コラーゲンIに対するコラーゲンIIIの比率を増加させた。コラーゲンIIIは、創傷治癒の初期段階で総コラーゲンの最大50%を占めており、これは無傷の皮膚のレベ

50

ルから約 20% 増加していた。瘢痕が成熟するにつれて、コラーゲン I に対するコラーゲン III の比率は、正常なレベルに近づくまで減少した。

【0203】

FL2 ノックダウンが熱傷治癒中のコラーゲン III 対コラーゲン I の比率に影響を与えるかどうかを決定するために、Herovici 染色を使用して熱傷を分析した。Herovici は、マルチスペクトル画像化によってコラーゲン I（赤く染色される）とコラーゲン III（青く染色される）との比率を定量化するために通常使用されている。本発明者らの結果は、SPD-FL2-siRNA で治療された熱傷組織において、成熟コラーゲンのレベルが増加したこと（コラーゲン I に対するコラーゲン III の比率の低下）を示しており、これは、FL2 ノックダウンが創傷治癒を促進するという仮説をさらにサポートする。

10

【0204】

略語及び頭字語

【0205】

ActB - アクチン

【0206】

ANOVA - 分散分析

【0207】

AOT-1, 4-ビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸ナトリウム

【0208】

20

CD45 - 分化抗原群 45

【0209】

CMOS - 相補型金属酸化膜半導体

【0210】

DAB-3, 3'-ジアミノベンジジン

【0211】

ECM - 細胞外マトリックス

【0212】

EDTA - エチレンジアミン四酢酸

【0213】

30

FIGNL2-fidgetin 様 2

【0214】

FL2-fidgetin 様 2

【0215】

MT - 微小管

【0216】

mRNA - メッセンジャーリボ核酸

【0217】

NA - 開口数

【0218】

40

NGS - 正常なヤギ血清

【0219】

N.S. - 非有意

【0220】

PBS - リン酸緩衝生理食塩水

【0221】

PCNA - 増殖性細胞核抗原

【0222】

PECAM1 - 血小板内皮細胞接着分子-1

【0223】

50

P C R－ポリメラーゼ連鎖反応

【 0 2 2 4 】

q P C R－定量的ポリメラーゼ連鎖反応

【 0 2 2 5 】

S E M－平均の標準誤差

【 0 2 2 6 】

s i R N A－低分子干渉リボ核酸

【 0 2 2 7 】

S P D－界面活性剤ポリマードレッシング

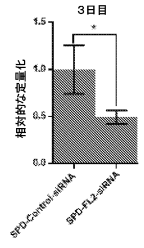
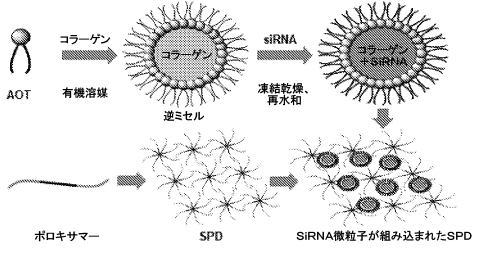
【 0 2 2 8 】

T r i s－トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン

【 図 面 】

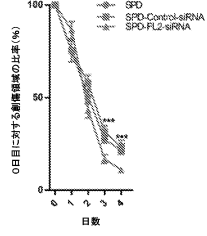
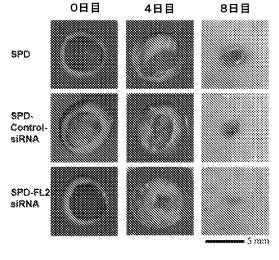
【 図 1 A 】

【 図 1 B 】

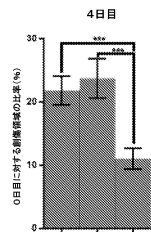


【 図 2 A 】

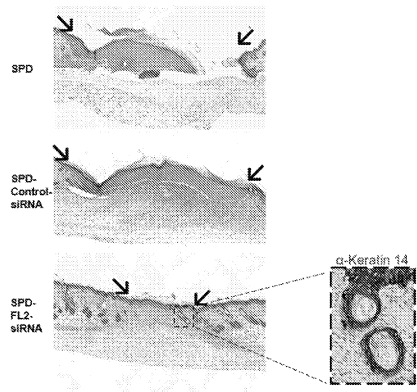
【 図 2 B 】



【図 2 C】

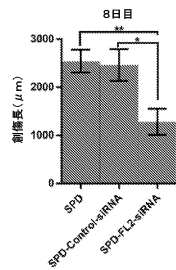


【図 3 A】

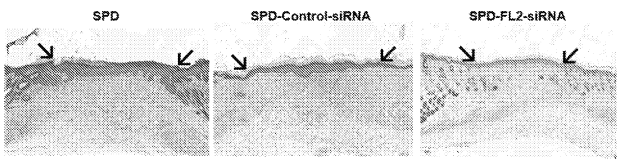


10

【図 3 B】

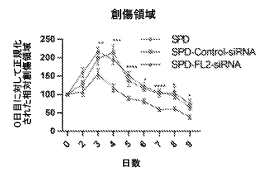


【図 4 A】

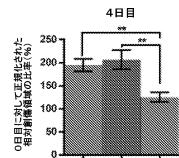


20

【図 4 B】



【図 4 C】

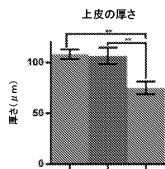


30

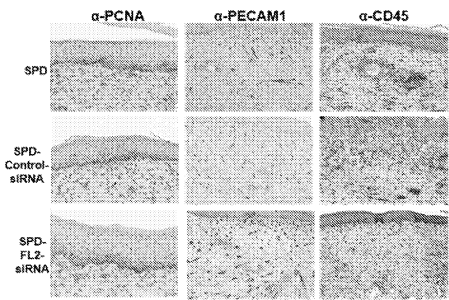
40

50

【図 4 D】

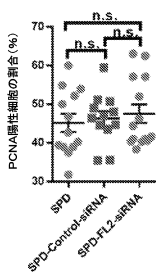


【図 5 A】

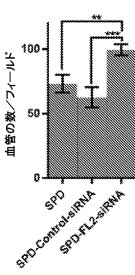


10

【図 5 B】

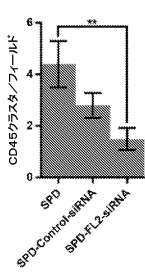


【図 5 C】

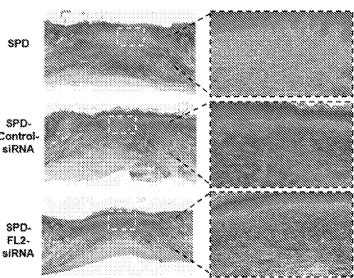


20

【図 5 D】



【図 6 A】

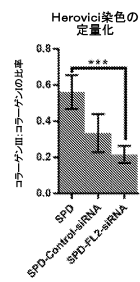


30

40

50

【図 6 B】



10

【配列表】

202251278500001.app

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/57611

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61L 15/10, 15/26, 15/44, 27/12, 27/18, 27/54, 27/56, 27/58, 27/60; A61K 9/06, 9/127 (2020.01)

CPC - A61L 15/10, 15/26, 15/44, 27/12, 27/18, 27/54, 27/56, 27/58, 27/60; A61K 9/06, 9/127, 31/713, 31/711, 31/7115, 31/7105, 33/42, 47/10; C12N 15/113

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	(O'ROURKE, BP et al.) Fidgetin-Like 2 siRNA Enhances the Wound Healing Capability of a Surfactant Polymer Dressing. 07 September 2018, Vol. 8, No. 3, pages 91-100; abstract; page 91, 2nd column, 1st paragraph; page 92, 1st column, 3rd paragraph; page 92, 2nd column, 2nd paragraph; page 92, 2nd column, 5th paragraph; page 96, 2nd column, 2nd paragraph; page 97, 1st column, 1st paragraph; page 97, 2nd column, 1st paragraph; page 98, 2nd column, 2nd paragraph; DOI: 10.1089/wound.2018.0827	1-6, 7/1-6, 11-14, 15/12-14, 17/12-14, 18/12-14, 19/12-14, 20-24 8/1-6, 9/1-6, 10/1-6, 16/12-14, 25-31
Y	US 9,914,926 B2 (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE, INC.) 13 March 2018; column 1, line 60; column 4, line 17; column 6, lines 34-35; column 11, line 32; column 20, line 47	8/1-6, 9/1-6, 10/1-6, 25-27
Y	(CHARAFEDDINE, RA et al.) Fidgetin-like 2: a microtubule-based regulator of wound healing. Journal of Investigative Dermatology. September 2015, Vol. 135, No. 9, pages 2309-2318; abstract; page 6, 3rd paragraph; doi:10.1038/jid.2015.94	16/12-14
Y	WO 2013/022898 A1 (BOYDEN, J) 14 February 2013; abstract; paragraphs [0005], [0019], [0023], [0071]; claim 23	28-31
A	US 2017/0056468 A1 (CODA THERAPEUTICS, INC.) 02 March 2017; entire document	1-6, 7/1-6, 8/1-6, 9/1-6, 10/1-6, 11-14, 15/12-14, 16/12-14, 17/12-14, 18/12-14, 19/12-14, 20-31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 February 2020 (12.02.2020)

Date of mailing of the international search report

10 MAR 2020

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/57611

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016/004212 A1 (VICUS THERAPEUTICS, LLC) 07 January 2016; entire document	1-6, 7/1-6, 8/1-6, 9/1-6, 10/1-6, 11-14, 15/12-14, 16/12-14, 17/12-14, 18/12-14, 19/12-14, 20-31
A	US 2016/0030624 A1 (IMBED BIOSCIENCES, INC.) 04 February 2016; entire document	1-6, 7/1-6, 8/1-6, 9/1-6, 10/1-6, 11-14, 15/12-14, 16/12-14, 17/12-14, 18/12-14, 19/12-14, 20-31
P, X	WO 2019/083771 A1 (MICROCURES, INC.) 02 May 2019; entire document	1-6, 7/1-6, 8/1-6, 9/1-6, 10/1-6, 11-14, 15/12-14, 16/12-14, 17/12-14, 18/12-14, 19/12-14, 20-31

Form PCT/ISA/Z10 (continuation of second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/57611

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***-CONTINUED WITHIN THE NEXT SUPPLEMENTAL BOX-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-6, 7/1-6, 8/1-6, 9/1-6, 10/1-6, 11-14, 15/12-14, 16/12-14, 17/12-14, 18/12-14, 19/12-14, 20-31; SEQ ID NOs: 2-3

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US19/57611

---Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking---

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+, Claims 1-31 and SEQ ID NO: 3 (siRNA sequence) are directed toward a siRNA directed to fidgetin-like 2 (FL2) and methods and compositions for reducing a ratio of collagen III to collagen I in wounded skin, and treating wounds and accelerating healing with a surfactant polymer dressing comprising FL2 siRNA, collagen and a poloxamer.

The siRNA, compositions, and methods will be searched to the extent that they encompass SEQ ID NO: 3 (first exemplary siRNA sequence). Applicant is invited to elect additional siRNA sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable bases or substituents), to be searched. Additional siRNA sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-9, 10 (in-part), 11-26, 27 (in-part), and 29-31 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 3 (siRNA sequence). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected siRNA sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 4 (siRNA sequence).

No technical features are shared between the siRNA sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a cosmetic composition or pharmaceutical composition comprising (i) a siRNA directed to fidgetin-like 2 (FL2) associated with, or adsorbed to, a collagen particle in (ii) surfactant polymer dressing; a method of reducing a ratio of collagen III to collagen I in wounded skin during healing of a mammalian skin wound comprising a burn, the method comprising applying an amount of the cosmetic composition or pharmaceutical composition effective in reducing the ratio of collagen III to collagen I during healing of a burn wound; a method of treating a mammalian skin wound comprising applying an amount of the cosmetic composition or pharmaceutical composition effective to treat a mammalian skin wound; a method of accelerating healing of a mammalian skin wound comprising applying an amount of the cosmetic composition or pharmaceutical composition effective to decrease inflammation and/or increase re-vascularization at a skin wound site, comprising applying an amount of the cosmetic composition or pharmaceutical composition effective to decrease inflammation and/or increase re-vascularization at a skin wound site; a wound dressing structure comprising a portion having thereon a composition comprising (i) a siRNA directed to fidgetin-like 2 (FL2) encapsulated by collagen microparticles in (ii) surfactant polymer dressing; these shared technical features are previously disclosed by US 9,914,926 B2 (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE, INC.) (hereinafter "Einstein") in view of US 2017 /0056468 A1 to CoDa Therapeutics, Inc. (hereinafter "CoDa").

Einstein discloses a cosmetic composition or pharmaceutical composition (pharmaceutical composition; abstract) comprising (i) a siRNA directed to fidgetin-like 2 (FL2) (abstract; column 4, lines 5-7) associated with a particle (encapsulated in a nanoparticle; column 3, lines 4-6) in (ii) a dressing (in a wound dressing; column 13, lines 48-50); a method of reducing a ratio of collagen III to collagen I in wounded skin during healing of a mammalian skin wound comprising a burn (topical application of FL2 siRNA (a method of reducing a ratio of collagen III to collagen I in wounded skin during healing of a mammalian skin wound comprising a burn); column 3, lines 4-6; an agent having the structure, as disclosed in abstract; column 3, lines 4-6 of the Einstein publication, may be implemented for use in reducing a ratio of collagen III to collagen I in wounded skin during healing of a mammalian skin wound comprising a burn; since the structure of a previously known compound, and its structure/activity are inseparable and inextricably-linked), the method comprising applying an amount of the cosmetic composition or pharmaceutical composition effective in reducing the ratio of collagen III to collagen I during healing of a burn wound (topical application of FL2 siRNA (a method of reducing a ratio of collagen III to collagen I in wounded skin during healing of a mammalian skin wound comprising a burn); column 3, lines 4-6; an agent having the structure, as disclosed in abstract; column 3, lines 4-6 of the Einstein publication, may be implemented for use in reducing a ratio of collagen III to collagen I in wounded skin during healing of a mammalian skin wound comprising a burn; since the structure of a previously known compound, and its structure/activity are inseparable and inextricably-linked); a method of treating a mammalian skin wound comprising applying an amount of the cosmetic composition or pharmaceutical composition effective to treat a mammalian skin wound (a method of treating a mammalian skin wound comprising applying an amount of the pharmaceutical composition effective to treat a mammalian skin wound; abstract; column 12, lines 10-13); a method of accelerating healing of a mammalian skin wound (column 3, lines 60-61) comprising applying an amount of the cosmetic composition or pharmaceutical composition effective to accelerate healing of a mammalian skin wound (comprising applying an amount of the pharmaceutical composition effective to accelerate healing of a mammalian skin wound; column 3, lines 60-61; column 12, lines 10-13); a method of decreasing inflammation (composition further comprises anti-inflammatory agents; column 14, lines 24-34) and/or increasing in re-vascularization at a skin wound site, comprising applying an amount of the cosmetic composition or pharmaceutical composition effective to decrease inflammation and/or increase re-vascularization at a skin wound site (comprising applying an amount of the pharmaceutical composition effective to decrease inflammation and/or increase re-vascularization at a skin wound site; column 12, lines 10-13; column 14, lines 24-34); a wound dressing structure (a wound dressing; column 13, lines 48-50) comprising a portion having thereon a composition comprising (i) a siRNA directed to fidgetin-like 2 (FL2) encapsulated by microparticles (comprising a portion having thereon a composition comprising (i) a siRNA directed to fidgetin-like 2 (FL2) encapsulated by microspheres; abstract; column 3, lines 4-6; column 4, lines 5-7; column 12, lines 49-53) in (ii) a dressing (in a wound dressing; column 13, lines 48-50).

---Continued on Next Supplemental Page---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/57611

-Continued from Previous Page-

Einstein does not disclose a collagen microparticle and a surfactant polymer dressing.

CoDa discloses a collagen vehicle and a surfactant polymer dressing (paragraph {0044}).

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Einstein, to include a collagen vehicle and a surfactant polymer dressing, as disclosed by CoDa, in order to provide a superior method for siRNA delivery.

Since none of the special technical features of the Groups I+ Inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Einstein and CoDa references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42	
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K	9/107(2006.01)	A 6 1 K	9/107	
A 6 1 K	31/713(2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 K	9/50 (2006.01)	A 6 1 K	9/50	
A 6 1 K	9/70 (2006.01)	A 6 1 K	9/70	4 0 1
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 8 3 ・ スカーズデール ・ アルデン コート 3 8

(72)発明者

オルーク、ブライアン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 2 1 5 ・ ポストン ・ クイーンズベリー ストリート 5 5 ・
アパートメント 1 0

(72)発明者

クレイマー、アダム・ヒルドヤード

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 1 1 0 6 ・ クイーンズ ・ アストリア ・ サーティーファースト ド
ライブ 2 3 - 4 1 ・ アpartment 1 アール

F ターム (参考)

4C076 AA17 AA61 AA72 AA74 AA76 BB31 CC19 DD57F EE03 EE09
EE10 EE11 EE22 EE23F EE43H FF27 FF43
4C083 AD041 AD042 AD431 AD432 AD601 AD602 CC02 CC03 CC07 DD12
DD14 DD17 DD35 EE06 EE07 EE12 EE13
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA22 MA32 MA38 MA43 MA63
NA05 NA14 ZA89 ZC51