

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7645546号
(P7645546)

(45)発行日 令和7年3月14日(2025.3.14)

(24)登録日 令和7年3月6日(2025.3.6)

(51)国際特許分類

F I

C 0 8 B 37/08 (2006.01)

C 0 8 B 37/08

Z

A 6 1 K 31/728 (2006.01)

A 6 1 K 31/728

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/04

請求項の数 22 (全89頁)

(21)出願番号 特願2021-537725(P2021-537725)

(86)(22)出願日 令和1年12月23日(2019.12.23)

(65)公表番号 特表2022-516461(P2022-516461
A)

(43)公表日 令和4年2月28日(2022.2.28)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/068412

(87)国際公開番号 WO2020/139857

(87)国際公開日 令和2年7月2日(2020.7.2)

審査請求日 令和4年12月22日(2022.12.22)

(31)優先権主張番号 62/786,098

(32)優先日 平成30年12月28日(2018.12.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 501345323

ザ ユニバーシティ オブ ノース カロラ
イナ アット チャペル ヒルTHE UNIVERSITY OF N
ORTH CAROLINA AT CH
APEL HILLアメリカ合衆国 27514 ノースカロ
ライナ州 チャペル ヒル スイート 10
0, イースト ローズマリー ストリート
136, オフィス オブ テクノロジー
コマースリゼーション

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100156144

弁理士 落合 康

最終頁に続く

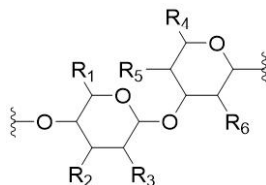
(54)【発明の名称】 一酸化窒素放出抗菌性ポリマーおよびそれから製造された足場、ならびにそれに関する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式 I I の単位構造を含む、NO 放出ヒアルロン酸由来ポリマー化合物であって：

【化1】



式 I I

式中、

R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、および R_6 は独立して、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-NHC(O)-CH_3$ 、 $-O-((CH_2)_aO)_b-H$ 、 $-O-((CH_2)_aO)_b-((CH_2)_cH$ 、 $-O-(C_{1-5}アルキル)$ 、 $-NH-((CH_2)_dNH)_e-H$ 、 $-NH-((CH_2)_dNH)_e-((CH_2)_fH$ 、 $-X^1-((CH_2)_gX^2)_h-H$ 、 $-X^1-((CH_2)_gX^2)_h-((CH_2)_iH$ 、 $-CH_2C(O)-X^1-((CH_2)_gX^2)_h-((CH_2)_jX^3)_k-((CH_2)_lH$ 、および $-X^1-((CH_2)_gX^2)_h-((CH_2)_jX^3)_k-((CH_2)_lH$ からなる群から選択され、

R_1 は $-C(O)NH-((CH_2)_gX^2)_h-H$ 、 $-C(O)NH-((CH_2)_g$

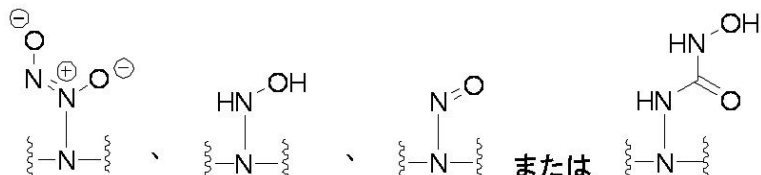
$X^2)_h - (CH_2)_i H$ または $-C(O)NH - ((CH_2)_g X^2)_h ((CH_2)_j X^3)_k - (CH_2)_l H$ であり；

$a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k$ 、および l は、各々独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の整数から選択され；

X^1, X^2 、および X^3 の各々は独立して、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $C(O)NH-$ から選択され；

ここで、 R_1 の少なくとも1個において、 h および k の両者は0であってはならず、 X^2 、および X^3 の少なくとも一つは、次のうちの一つによって表されるNO供与部分であり：

【化2】



10

；そして

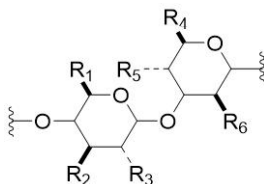
ここで、前記化合物は、水中5%w/wの濃度で20℃で、10mPa・s以上の粘度を有する、NO放出ヒアルロン酸由来ポリマー化合物。

【請求項2】

式IIが、式II'に示される立体化学的配置を有する、請求項1に記載の化合物。

20

【化3】



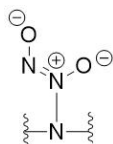
式II'，

【請求項3】

X^2 、および X^3 の少なくとも一つが、下記のうちの一つによって表されるNO供与部分である、請求項1または2に記載の化合物。

30

【化4】



【請求項4】

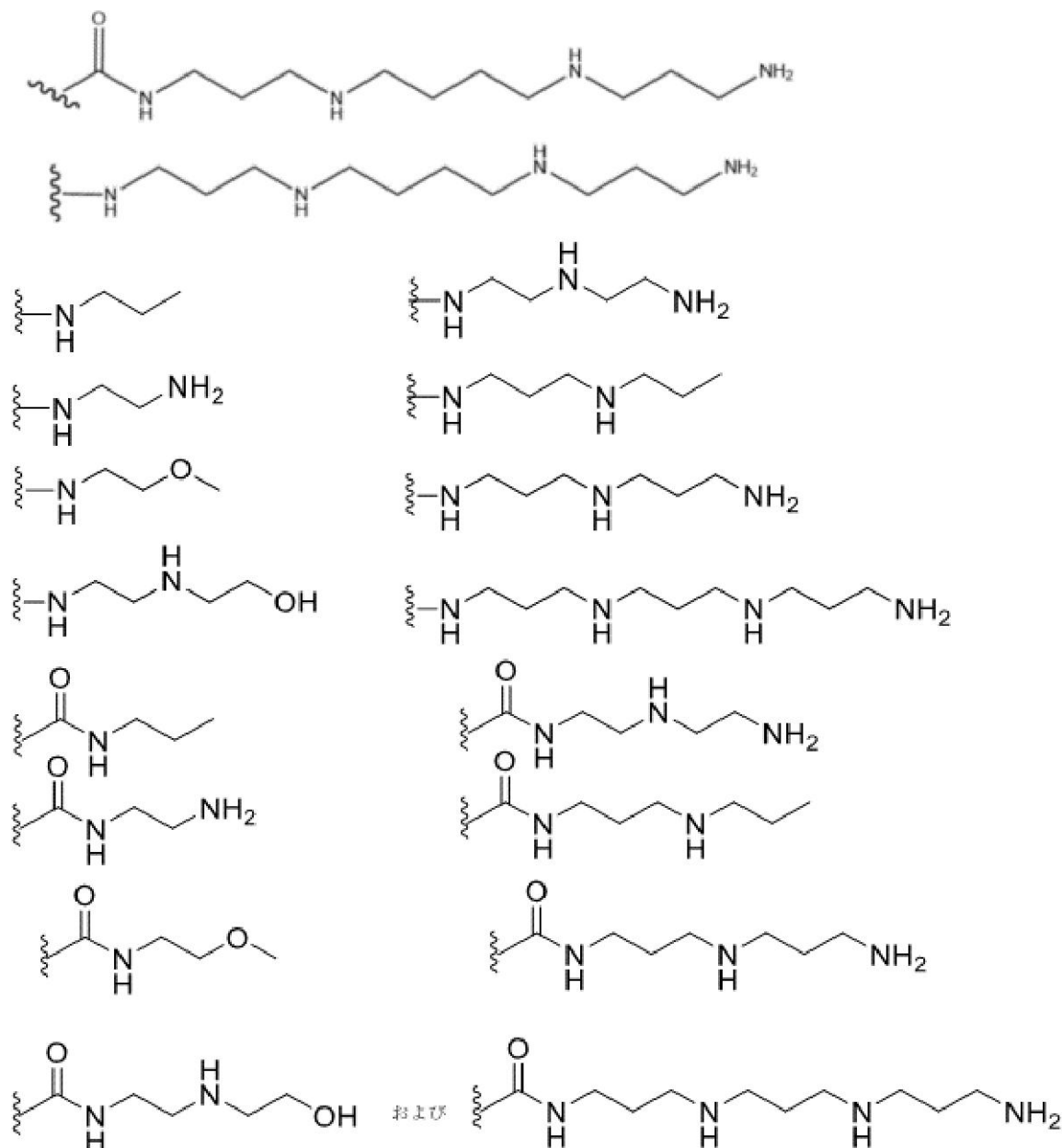
R_2 および R_3 が $-OH$ である、請求項1～3の何れかに記載の化合物。

【請求項5】

R_2, R_3, R_4, R_5 、および R_6 のうちの一つ以上が、独立して、以下からなる群から選択される、請求項1～4の何れかに記載の化合物。

40

【化 5】



【請求項 6】

前記化合物が、6 k D a ~ 9 0 k D a の範囲の分子量を有する、請求項 1 ~ 5 の何れかに記載の化合物。

【請求項 7】

前記化合物が、水中 2 0 % w / w の濃度で 2 0 ° C で、2 0 m P a ・ s 以上の粘度を有する、請求項 1 ~ 6 の何れかに記載の化合物。

【請求項 8】

前記化合物が、5 0 m g / m l の濃度で水に可溶性である、請求項 1 ~ 7 の何れかに記載の化合物。

【請求項 9】

前記化合物が、化合物 1 m g 当たり 0 . 1 ~ 1 . 0 μ m o l の N O の範囲で、合計放出可能 N O 貯蔵量を有する、請求項 1 ~ 8 の何れかに記載の化合物。

【請求項 1 0】

前記化合物が、0 . 1 ~ 2 4 時間の範囲内の N O 半減期を有する、請求項 1 ~ 9 の何れかに記載の化合物。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記化合物が、1～60時間の範囲内のNO放出の総持続時間を有する、請求項8～10の何れかに記載の化合物。

【請求項 1 2】

4時間後の合計NO放出が、化合物1mg当たり0.1～1.0μmolのNOの範囲内である、請求項8～10の何れかに記載の化合物。

【請求項 1 3】

治療を必要とする対象に一酸化窒素を送達するための医薬の製造における請求項1～12の何れかの化合物の使用。

【請求項 1 4】

化合物がハイドロゲルである、請求項13に記載の使用。

【請求項 1 5】

疾患状態を治療するための医薬の製造における、請求項1～12の何れかの化合物の使用であって、

前記疾患状態が癌、心血管疾患、微生物感染、医療機器への血液の曝露によって引き起こされる血小板凝集および血小板粘着、異常細胞増殖に起因する病的状態、移植拒絶反応、自己免疫疾患、炎症、血管疾患、瘢痕組織、創傷収縮、再狭窄、痛み、発熱、胃腸障害、呼吸器障害、性機能不全、および性感染症からなる群から選択される、使用。

【請求項 1 6】

医薬製剤であって、
請求項1～12の何れかに記載の化合物および
薬学的に許容可能な賦形剤を含む、医薬製剤。

【請求項 1 7】

無機表面上の微生物負荷を低減または防止するための請求項1～12の何れかの化合物の使用であって、

請求項1～12の何れかに記載の化合物を複数の微生物で汚染された表面に適用することを含み、

ここで、前記化合物が一酸化窒素を生成し、かつ微生物DNAおよび膜構造に酸化および／またはニトロソ化損傷を誘導し、それによって微生物負荷を予防または低減し、前記複数の微生物は、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、真菌、酵母、およびウイルスのうちの二つ以上を含む、使用。

【請求項 1 8】

前記無機表面が、医療機器の外部表面または内部表面である、請求項17に記載の使用。

【請求項 1 9】

前記医療機器が内視鏡を含む、請求項18に記載の使用。

【請求項 2 0】

前記微生物負荷が、ヒト免疫不全ウイルス、単純ヘルペスウイルス、乳頭腫ウイルス、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス、肝炎ウイルス、コクサッキーウイルス、带状疱疹ウイルス、はしかウイルス、おたふくかぜウイルス、風疹ウイルス、狂犬病ウイルス、肺炎ウイルス、出血性ウイルス熱の原因となるウイルス、A型インフルエンザウイルスH1N1亜型、寄生虫、真菌、カビ、カンジダ・アルビカンス、クロコウジカビ、大腸菌、緑膿菌、および黄色ブドウ球菌、A群連鎖球菌、肺炎球菌、結核菌、カンピロバクター・ジェジュニ、サルモネラ菌、赤痢菌、カルバペネム耐性腸内細菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、およびバークホルデリア・セパシアのうちの一つ以上の存在に関連する微生物を含む、請求項17～19の何れかに記載の使用。

【請求項 2 1】

前記微生物負荷が、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、カルバペネム耐性腸内細菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌またはバークホルデリア・セパシアを含む、請求項20に記載の使用。

【請求項 2 2】

疾患、組織損傷の治療、または微生物負荷の低減を必要とする対象へ一酸化窒素を送達

10

20

30

40

50

するように構成される薬品の製造のための、請求項 1 ～ 12 の何れかに記載の化合物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2018年12月28日に出願された米国仮特許出願第62／786,098号の優先権を主張するものであり、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府の利益

本発明は、米国国立衛生研究所により授与された助成金番号DK108318およびDE025207の下での政府の支援を用いて実施した。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0003】

本開示の主題は、概して、制御された様式で一酸化窒素を貯蔵および／または放出する一酸化窒素放出ポリマー、およびそこから作製された足場に関する。また、一酸化窒素放出ポリマーおよびそこから作製された足場の合成方法、ならびに治療方法における抗菌剤としてのその使用方法が開示される。

【背景技術】

【0004】

細菌感染は、地域社会や病院環境において、ヒトの健康に大きな課題をもたらす。バイオフィームは、宿主の免疫反応および抗生物質から細菌を保護するエキソ多糖類（EPS）マトリックスによって封入された細菌の協同コミュニティである。

【発明の概要】

【0005】

一酸化窒素（NO）は、シグナル伝達分子として様々な生理学的役割を果たし、本明細書に開示されるように、例えば、治療剤として、病態生理を治療または改善するのに重要な役割を果たしうる。治療組成物の限られたNOペイロード、所望のものよりも速いNO放出速度、および標的化されたNO送達の欠如に少なくとも部分的に基づいて、治療としてのNOは、これまで十分に活用されてこなかった。本明細書では、NO放出ポリマーおよび足場、このようなポリマーおよび足場を作製する方法、ならびに、強化されたNO放出特性および有益な物理的特性を利用するこのようなポリマーおよび足場を使用して様々な病態生理を治療する方法が提供され、NO放出薬理化合物および組成物の豊富な可能性を利用する。いくつかの実施形態では、本明細書では、抗菌剤として非常に有効な化合物および組成物が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書では、有益な抗微生物特性、および粘性およびゲル化などの物理的特性を有する化合物ならびに組成物が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるポリマーおよび／または足場は、粘度増強剤として有利な活性を有する。

【0006】

例えば、いくつかの実施形態において、NOを放出し、強力な抗微生物特性を示す一つ以上の高分子構造が提供される。いくつかの実施形態では、高分子構造はポリマーである。いくつかの実施形態において、ポリマーは希釈溶液（例えば、蒸発および吸入などのための）として使用されうるが、他の実施形態においては、ポリマーは溶液中で自己組織化されてもよく、および／または架橋されて、有利な物理的特性（三次元形状、硬さ、接着性、および粘性を含む）を有する足場を提供することができる。いくつかの実施形態では、ポリマーは、ゲルおよび粘性液体としても有益な抗微生物活性を保持する。

【0007】

いくつかの実施形態において、ポリマーの鎖に沿った構造単位を有するポリマーが提供される。いくつかの実施形態では、構造単位のうちの一つ以上は、R₁、R₂、R₃、R₄

10

20

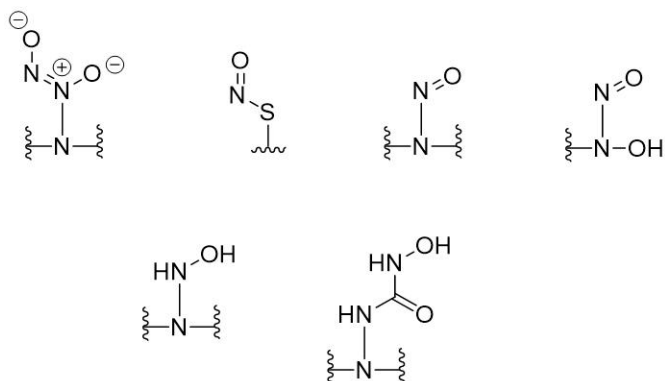
30

40

50

、 R_5 、および R_6 のそれぞれの一つ以上の例で官能化される。いくつかの実施形態では、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、および R_6 は、ポリマーに所望の特性を注入する機能的単位を含み得る。いくつかの実施形態では、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、および R_6 は、NO結合部分を含み得る。いくつかの実施形態において、ポリマー鎖に沿った R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、および R_6 の各例（例えば、一つ以上の構造単位）が、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}((\text{CH}_2)_a\text{O})_b-\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}((\text{CH}_2)_a\text{O})_b-(\text{CH}_2)_c\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-5}\text{アルキル})$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_d\text{NH})_e-\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_d\text{NH})_e-(\text{CH}_2)_f\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{X}^1-(\text{CH}_2)_g\text{X}^2)_h-(\text{CH}_2)_i\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{X}^1-(\text{CH}_2)_g\text{X}^2)_h((\text{CH}_2)_j\text{X}^3)_k-(\text{CH}_2)_l\text{H}$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_a\text{O})_b-\text{H}$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_a\text{O})_b-(\text{CH}_2)_c\text{H}$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_{1-5}\text{アルキル})$ 、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_d\text{NH})_e-\text{H}$ 、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_d\text{NH})_e-(\text{CH}_2)_f\text{H}$ 、および $-\text{X}^1-(\text{CH}_2)_g\text{X}^2)_h-(\text{CH}_2)_i\text{H}$ 、 $-\text{X}^1-(\text{CH}_2)_g\text{X}^2)_h((\text{CH}_2)_j\text{X}^3)_k-(\text{CH}_2)_l\text{H}$ のうちの一つ以上から独立して選択される。一部の実施形態では、 a 、 b 、 c 、 d 、 e 、 f 、 g 、 h 、 i 、 j 、 k 、および l の各例は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の整数から選択される。いくつかの実施形態では、 a 、 b 、 c 、 d 、 e 、 f 、 g 、 h 、 i 、 j 、 k 、および l の各々は、独立して10より大きくてもよい。いくつかの実施形態では、 X^1 、 X^2 、および X^3 の各例は独立して、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、および $\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ から選択される。いくつかの実施形態では、 X^1 、 X^2 、および X^3 の少なくとも一つの例は、NO供与部分である。いくつかの実施形態では、 X^1 、 X^2 、および X^3 の少なくとも一つの例は、次のうちの一つによって表される：

【化1】



；および

【0008】

いくつかの実施形態では、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、または R_6 の各例は独立して、以下からなる群から選択される。

10

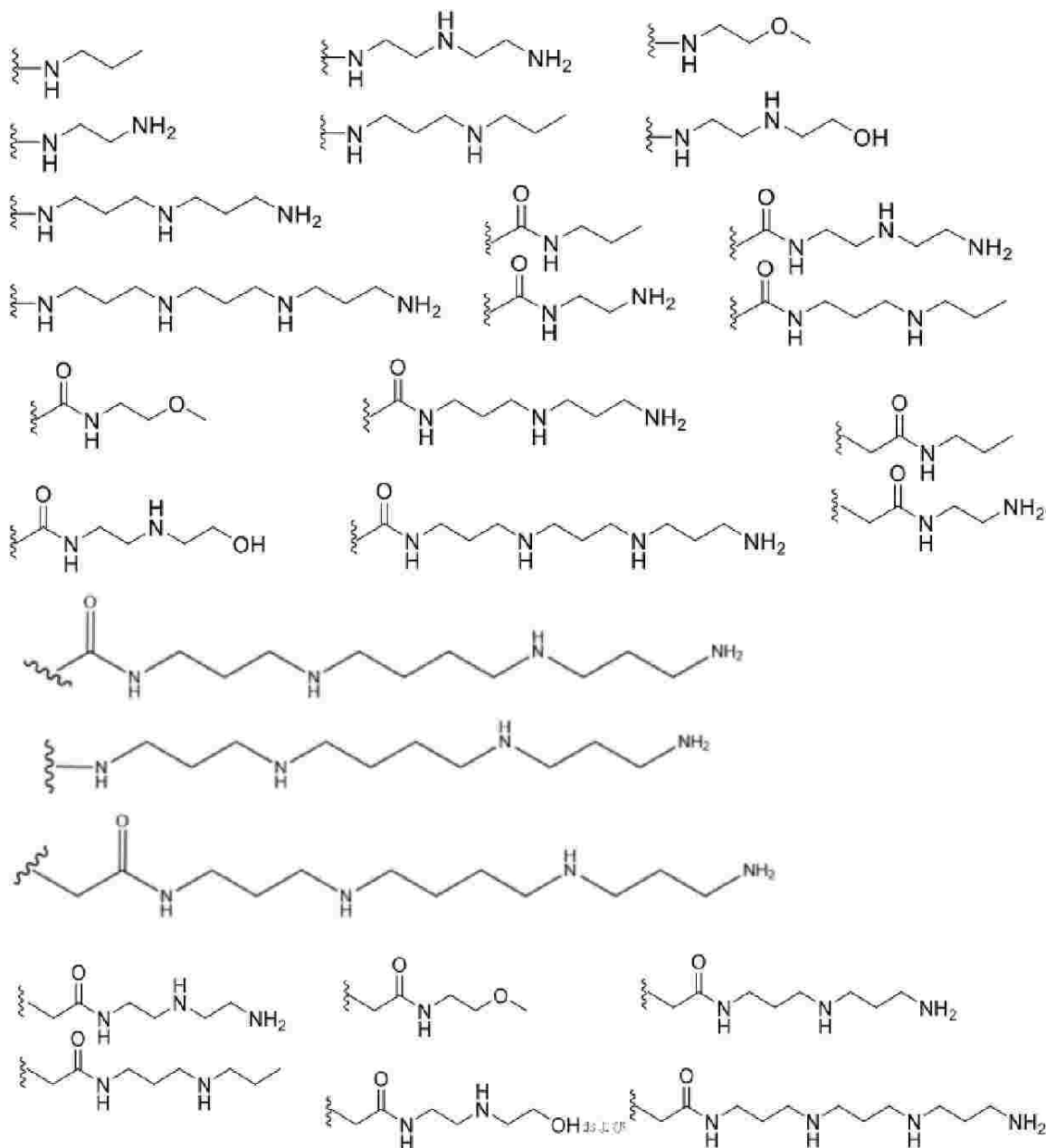
20

30

40

50

【化 2】



いくつかの実施形態では、上記構造の各二級アミンは、本明細書に開示されるNO供与基で官能化されてもよい。

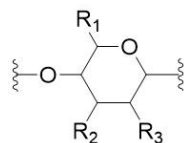
【0009】

いくつかの実施形態では、ポリマー（またはそれから作製された足場）は、5%w/wの濃度で20℃で、約10mPa・s以上の粘度を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー（またはそれから作製された足場）は、5%w/wの濃度で、約1.0Nm以上のゲルの硬さを有する。いくつかの実施形態において、粘度はより大きく、例えば、約10mPa・s、約20mPa・s、約30mPa・s、約50mPa・s、約60mPa・s、約70mPa・s、約80mPa・s、約90mPa・s、約100mPa・s、またはその間の任意の粘度などであってもよい。いくつかの実施形態において、ゲルの硬さはより硬く、例えば、約5Nm、約10Nm、約20Nm、約30Nm、約40Nm、約50Nm、約75Nm、約100Nm、またはそれらの間の任意のゲルの硬さなどであってもよい。

【0010】

いくつかの実施形態では、ポリマーはバイオポリマーである。いくつかの実施形態では、ポリマーは多糖類である。いくつかの実施形態では、一つ以上の構造単位は、式Ⅰのサッカライド単位によって表される。

【化 3】



式Ⅰ

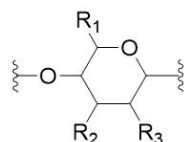
【0011】

いくつかの実施形態では、サッカライド単位は、カルボキシメチルセルロース構造単位の代表である。いくつかの実施形態では、式Ⅰの構造は、ヒアルロン酸ポリマーのサッカライド単位を表す。いくつかの実施形態では、式Ⅰの構造は、ヒドロキシエチルセルロースポリマーのサッカライド単位を表す。いくつかの実施形態では、式Ⅰの構造は、メチルセルロースポリマーのサッカライド単位を表す。いくつかの実施形態では、式Ⅰの構造は、アルギネートポリマーのサッカライド単位を表す。いくつかの実施形態では、式Ⅰの構造は、シクロデキストリン環構造のサッカライド単位を表す。

【0012】

いくつかの実施形態では、本明細書では、式Ⅰの単位構造を含む、NO放出カルボキシメチルセルロース由来ポリマー化合物を提供する。

【化 4】



式Ⅰ

【0013】

いくつかの実施形態では、 R_1 、 R_2 、および R_3 は独立して、 $-OH$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-OCH_2C(O)OH$ 、 $-CH_2OCH_2C(O)OH$ 、 $-C(O)-O-((CH_2)_aO)_b-H$ 、 $-C(O)-O-((CH_2)_aO)_b-(CH_2)_cH$ 、 $-C(O)-O-(C_{1-5}アルキル)$ 、 $-C(O)-NH-((CH_2)_dNH)_e-H$ 、 $-C(O)-NH-((CH_2)_dNH)_e-(CH_2)_fH$ 、 $-C(O)-X^1-((CH_2)_gX^2)_h-(CH_2)_iH$ 、 $-C(O)-X^1-((CH_2)_gX^2)_h((CH_2)_jX^3)_k-(CH_2)_lH$ 、 $-O-((CH_2)_aO)_b-H$ 、 $-O-((CH_2)_aO)_b-(CH_2)_cH$ 、 $-O-(C_{1-5}アルキル)$ 、 $-NH-((CH_2)_dNH)_e-H$ 、 $-NH-((CH_2)_dNH)_e-(CH_2)_fH$ 、 $-X^1-((CH_2)_gX^2)_h-(CH_2)_iH$ 、 $-X^1-((CH_2)_gX^2)_h((CH_2)_jX^3)_k-(CH_2)_lH$ から選択される。いくつかの実施形態では、 a 、 b 、 c 、 d 、 e 、 f 、 g 、 h 、 i 、 j 、 k 、および l の各例は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の整数から選択される。いくつかの実施形態では、 X^1 、 X^2 、および X^3 の各例は独立して、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $C(O)NH-$ から選択される。いくつかの実施形態では、 X^1 、 X^2 、および X^3 の少なくとも一つは、次のうちの一つによって表される。

10

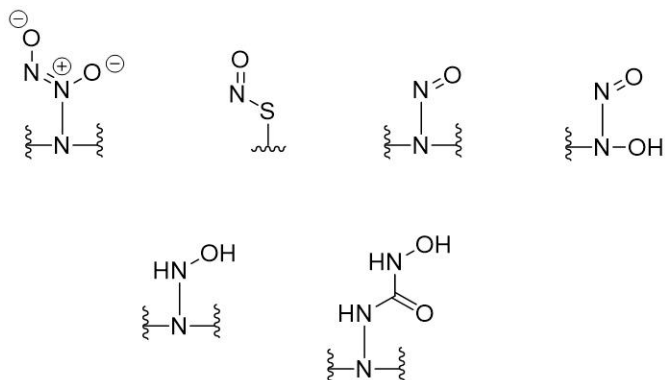
20

30

40

50

【化 5】



10

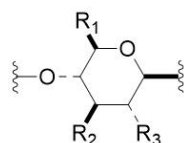
【0014】

いくつかの実施形態では、カルボキシメチルセルロース由来ポリマー化合物は、水中 5 % w / w の濃度で 20 °C で、約 10 mPa · s 以上の粘度を有する。

【0015】

いくつかの実施形態では、式 I は、式 I' に示される立体化学的配置を有する。

【化 6】



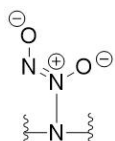
20

式 I'

【0016】

いくつかの実施形態では、 X^1 、 X^2 、および X^3 の少なくとも一つは、下記によって表される。

【化 7】



30

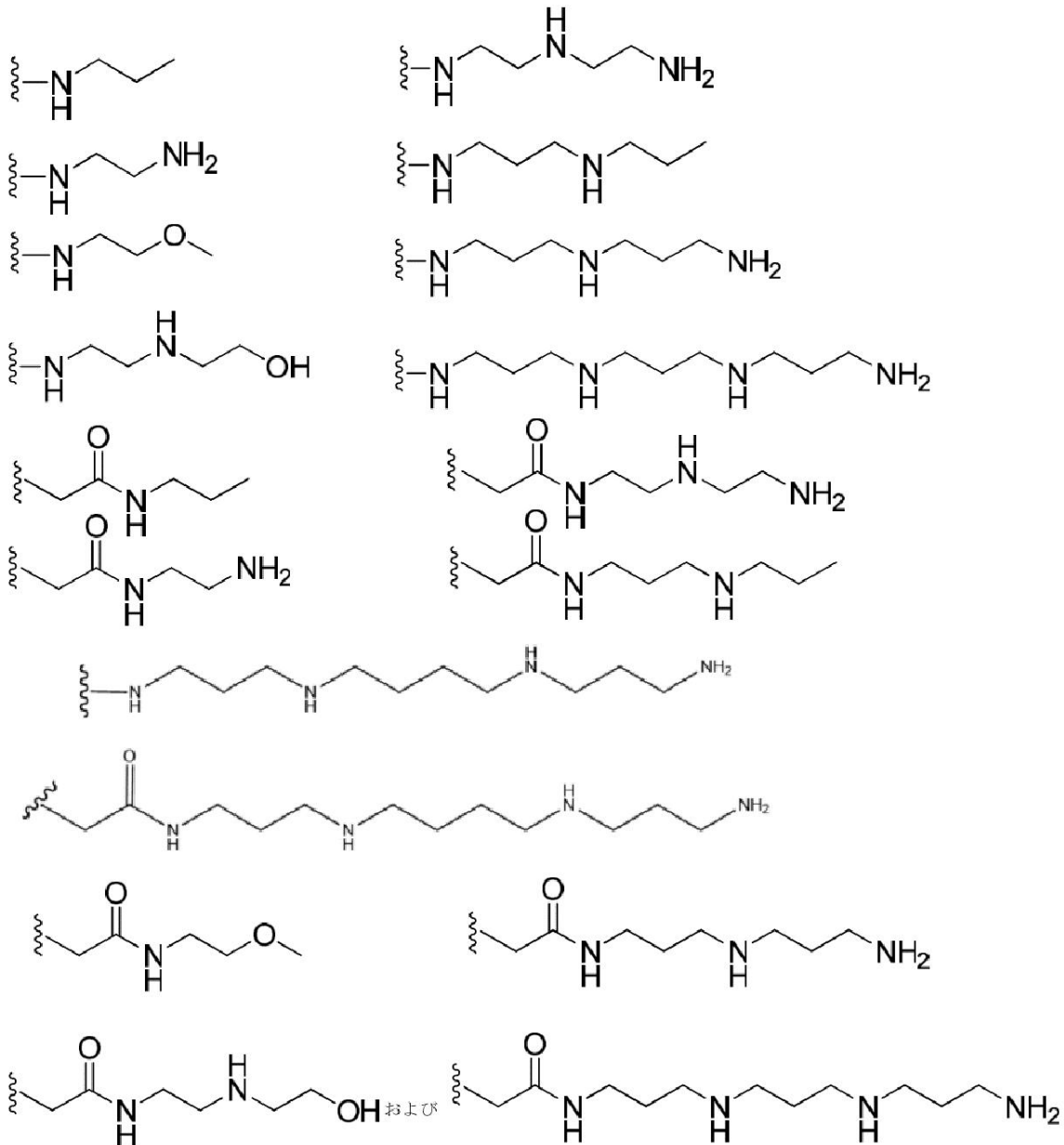
【0017】

いくつかの実施形態では、 R^1 は、 $-CH_2C(O)-X^1-(CH_2)_gX^2)_h((CH_2)_jX^3)_k-(CH_2)_lH$ である。いくつかの実施形態では、 R_2 、および R_3 は $-OH$ である。いくつかの実施形態では、 R_1 、 R_2 、および R_3 の各例は独立して、以下からなる群から選択される。

40

50

【化 8】



10

20

30

【0018】

いくつかの実施形態では、化合物は、水中20%w/wの濃度で20℃で、約20mPa・s以上の粘度を有する。いくつかの実施形態では、化合物は、50mg/mlの濃度で水に可溶性である。いくつかの実施形態では、化合物は、化合物1mg当たり0.1～1.0μmolのNOの範囲で、合計放出可能NO貯蔵量を有する。いくつかの実施形態において、化合物は、0.1～24時間の範囲内のNO半減期を有する。いくつかの実施形態において、化合物は、1～60時間の範囲内のNO放出の総持続時間を有する。いくつかの実施形態では、4時間後の合計NO放出は、化合物1mg当たり0.1～1.0μmolのNOの範囲内である。いくつかの実施形態において、化合物中の繰り返し単位のうちの15%超は、式Iのモノマーである。いくつかの実施形態において、化合物は、約90kDa～約700kDaの範囲の分子量を有する。いくつかの実施形態では、化合物は、式Iの二つ以上の異なる共有結合的に修飾されたモノマーを含む。

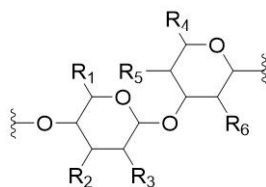
40

【0019】

いくつかの実施形態では、本明細書では、下記の式IIの単位構造を含む、NO放出ヒアルロン酸由来ポリマー化合物を提供する。

50

【化 9】

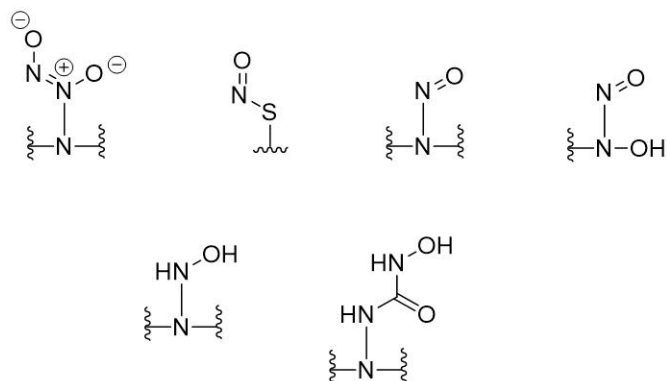


式 I I

【0020】

いくつかの実施形態において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、および R_6 の各例は独立して、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-NHC(O)CH_3$ 、 $-O-(CH_2)_aO)_b-H$ 、 $-O-(CH_2)_aO)_b-(CH_2)_cH$ 、 $-O-(C_{1-5}アルキル)$ 、 $-NH-(CH_2)_dNH)_e-H$ 、 $-NH-(CH_2)_dNH)_e-(CH_2)_fH$ 、 $-X^1-(CH_2)_gX^2)_h-H$ 、 $-X^1-(CH_2)_gX^2)_h-(CH_2)_iH$ 、または $-X^1-(CH_2)_gX^2)_h(CH_2)_jX^3)_k-(CH_2)_lH$ である。いくつかの実施形態では、 a 、 b 、 c 、 d 、 e 、 f 、 g 、 h 、 i 、 j 、 k 、および l の各例は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 の整数から選択される。いくつかの実施形態では、 X^1 、 X^2 、および X^3 の各例は独立して、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $C(O)NH-$ から選択される。いくつかの実施形態では、 X^1 、 X^2 、および X^3 の少なくとも一つは、次のうちの一つによって表される。

【化 10】



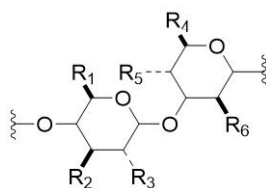
【0021】

いくつかの実施形態では、化合物は、水中 5% w/w の濃度で 20℃ で、約 10 mPa・s 以上の粘度を有する。

【0022】

いくつかの実施形態では、式 I I は、式 I I' に示される立体化学的配置を有する。

【化 11】



式 I I'

【0023】

いくつかの実施形態では、 X^1 、 X^2 、および X^3 の少なくとも一つは、下記によって表される。

10

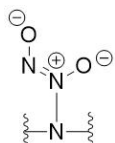
20

30

40

50

【化 1 2】

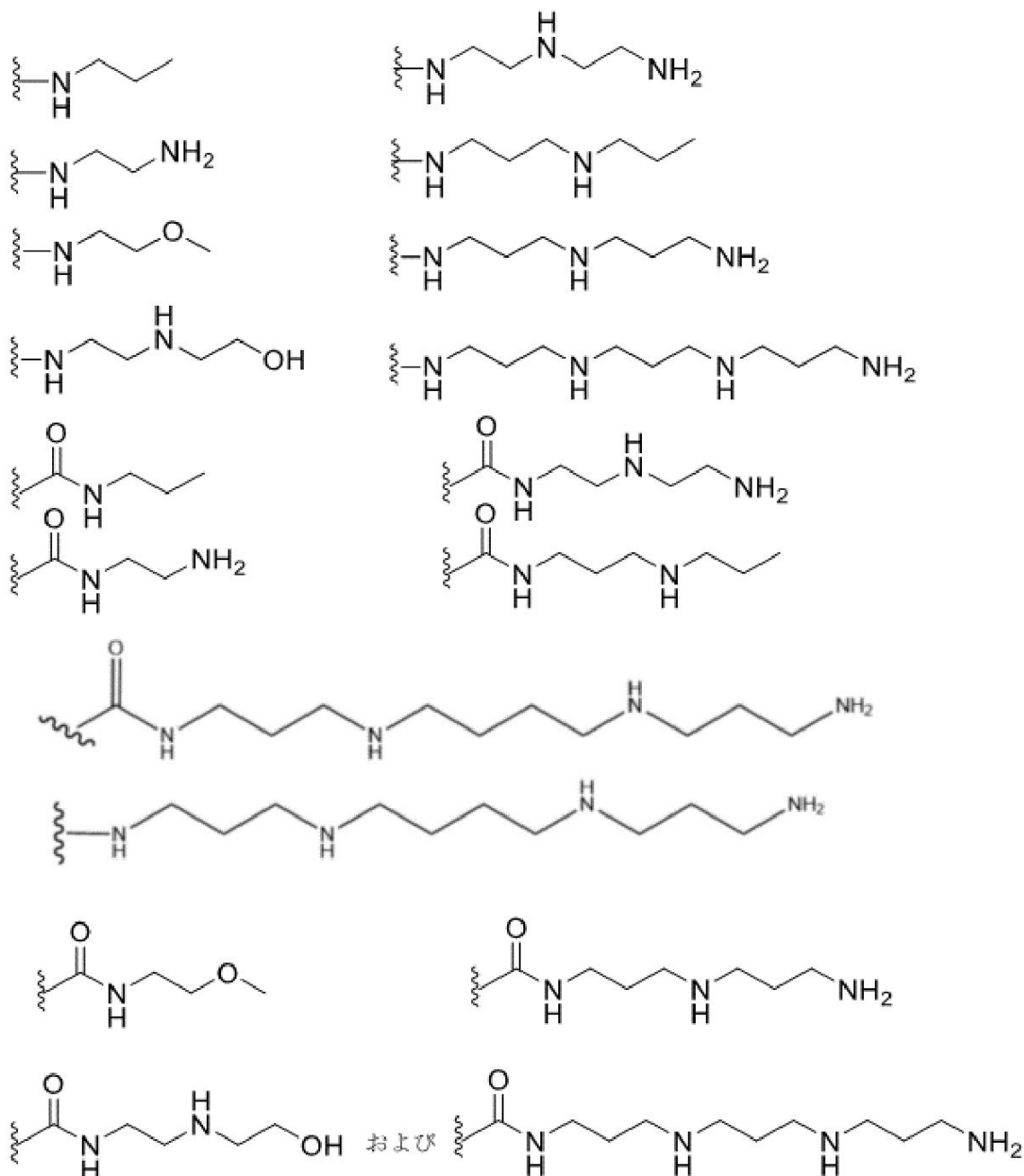


【0024】

いくつかの実施形態では、 R^1 は、 $-CH_2C(O)-X^1-(CH_2)_gX^2)_h(CH_2)_jX^3)_k-(CH_2)_lH$ である。いくつかの実施形態では、 R_2 、および R_3 は $-OH$ である。いくつかの実施形態では、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、および R_6 の一つ以上は独立して、以下からなる群から選択される。

10

【化 1 3】



20

30

40

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、化合物は、水中 20 % w / w の濃度で 20 °C で、約 20 m P

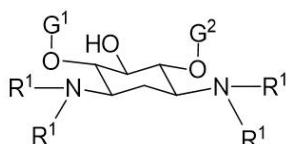
50

a・s以上の粘度を有する。いくつかの実施形態では、化合物は、50 mg/mLの濃度で水に可溶性である。いくつかの実施形態では、化合物は、化合物1 mg当たり0.1～1.0 μmolのNOの範囲で、合計放出可能NO貯蔵量を有する。いくつかの実施形態において、化合物は、0.1～24時間の範囲内のNO半減期を有する。いくつかの実施形態において、化合物は、1～60時間の範囲内のNO放出の総持続時間を有する。いくつかの実施形態では、4時間後の合計NO放出は、化合物1 mg当たり0.1～1.0 μmolのNOの範囲内である。いくつかの実施形態では、化合物は、約6 kDa～約90 kDaの範囲の分子量を有する。

【0026】

いくつかの実施形態では、ポリマーはポリアミノグリコシドを含む。いくつかの実施形態では、ポリアミノグリコシドは、式IIIの第一のアミノグリコシドを含む、超分岐ポリアミノグリコシドであって：

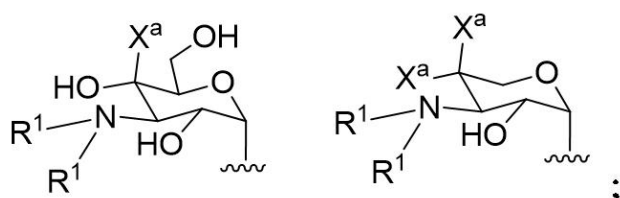
【化14】



式III；

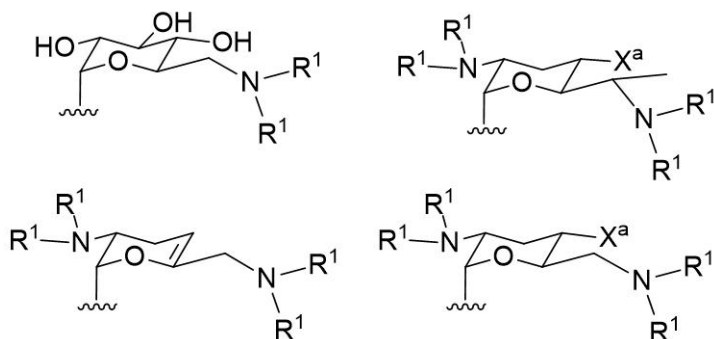
式中、G¹は、以下からなる群から選択され：

【化15】



式中、G²は、以下からなる群から選択される。

【化16】



【0027】

いくつかの実施形態では、R¹の各例は、-H、任意で置換されたC₁-C₆アルキル、介在するC₁-C₆アルキル基を有する1～6個の繰り返し単位を有する任意で置換されたポリアミノ、介在するC₁-C₆アルキル基を有する1～6個の繰り返し単位を有する任意で置換されたポリエーテルからなる群から独立して選択されるか、または連結単位への共有結合を示す。いくつかの実施形態では、X^aの各例は、独立して、-H、-OH、およびC₁-C₆アルキルから選択される。いくつかの実施形態では、R¹の少なくとも一つの例は、以下から選択される一つ以上の連結単位への共有結合を示す：

10

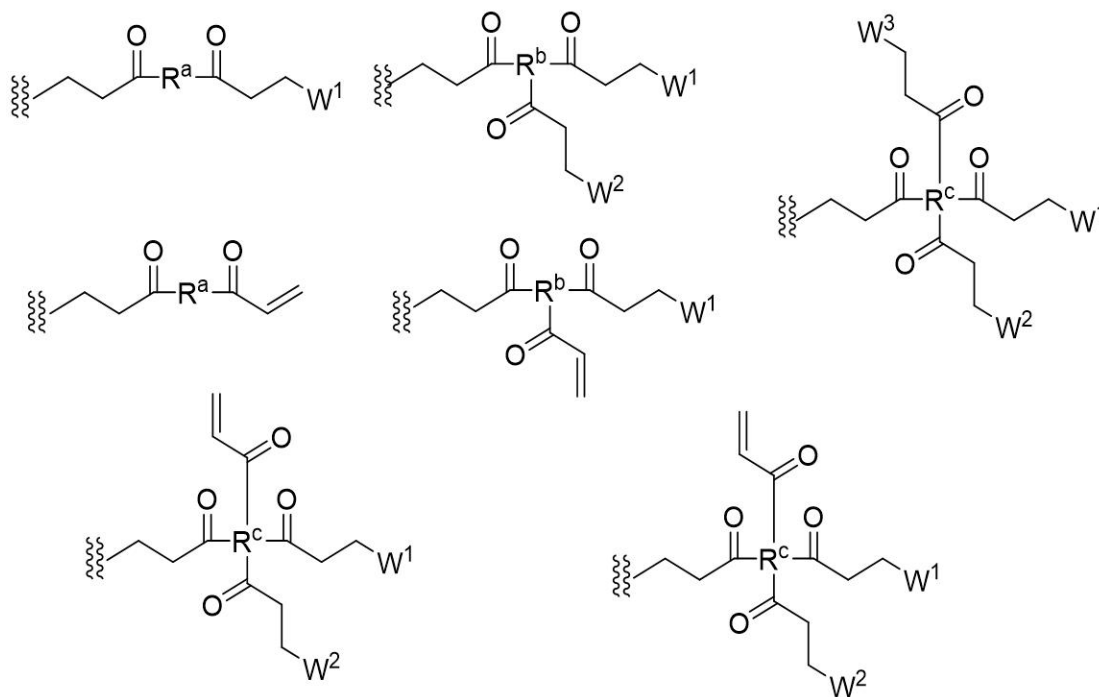
20

30

40

50

【化 17】



10

20

式中、

【化 18】



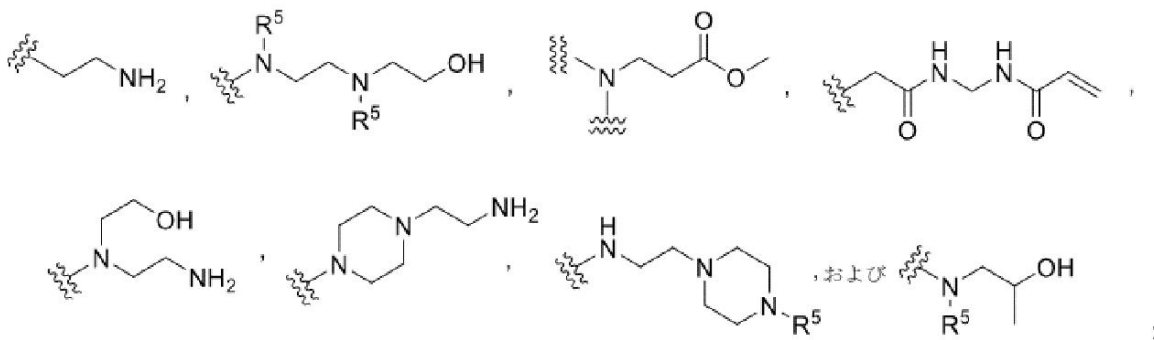
は、第一のアミノグリコシドへの付着を示す。いくつかの実施形態において、 W^1 の各例は、存在する場合、一つ以上の追加のアミノグリコシド、または一つ以上のエンドキャッピング置換基から独立して選択され、少なくとも一つの連結単位は、第一のアミノグリコシドから第二のアミノグリコシドへの共有結合架橋 (covalent bridge) を提供する。いくつかの実施形態では、 R^a の各例は独立して、任意で置換された C_1-C_6 アルキル、(C_1-C_6 アルキルを有する) 1~6個の繰り返し単位を有する任意で置換されたポリアミノ、または(C_1-C_6 アルキルを有する) 1~6個の繰り返し単位を有する任意で置換されたポリエーテルからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、一つ以上のエンドキャッピング置換基は、存在する場合、独立して、 $-X^1-(CH_2)_hX^2)_i-(CH_2)_jH$ の式を有する。

30

【0028】

いくつかの実施形態では、ポリマーは、以下からなる群から選択される末端基をさらに含む：

【化 19】



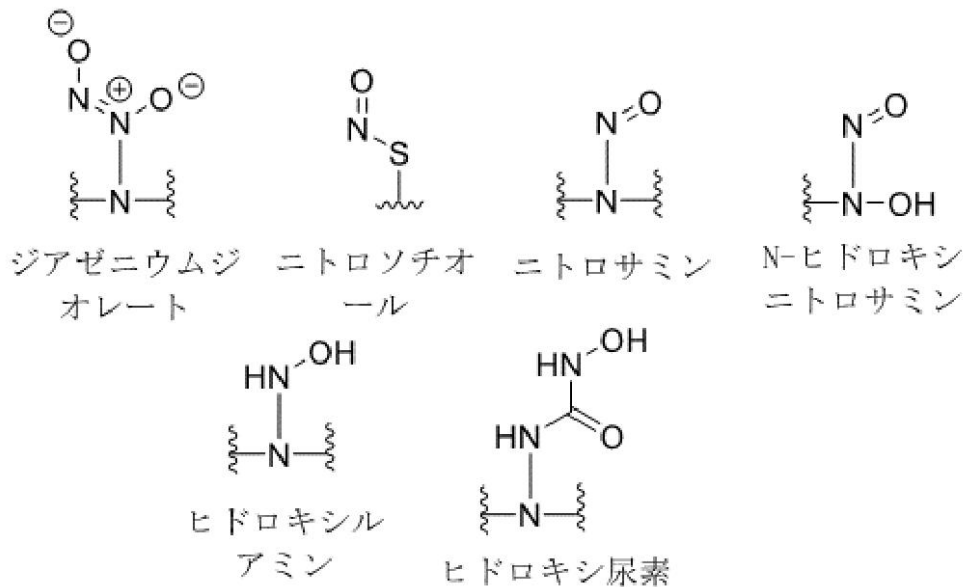
40

【0029】

50

いくつかの実施形態では、 R^5 の各例は、 H または $-N^+ (=N-O^-) O^-$ であり、および／または以下によって表される。

【化 20】



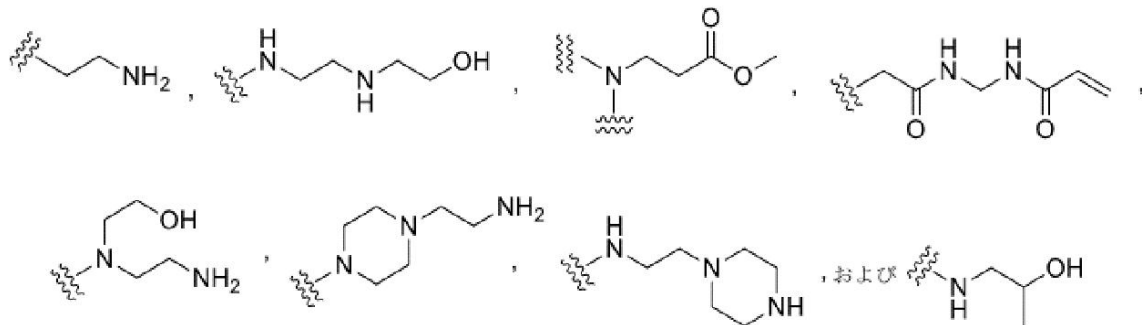
10

20

【0030】

いくつかの実施形態では、ポリマーは、以下からなる群から選択される末端基を含む。

【化 21】



30

【0031】

いくつかの実施形態は、治療を必要とする対象に一酸化窒素を送達する方法に関する。いくつかの実施形態では、有効量の化合物または粘性誘導剤が、対象に投与される。いくつかの実施形態では、化合物または粘性誘導剤の有効量は、ハイドロゲルとして投与されるか、またはハイドロゲルが投与部位（例えば、インピボ）で形成される。いくつかの実施形態では、対象は、創傷を負った患者であり、化合物または粘性誘導剤が、創傷治療を助けるために投与される。いくつかの実施形態において、対象は組織置換を必要とし、化合物または粘性誘導剤は、組織足場または充填剤および／または組織再成長促進剤として投与される。

40

【0032】

いくつかの実施形態は、疾患状態を治療する方法に関する。いくつかの実施形態において、有効量の化合物または粘性誘導剤が、それを必要とする対象に投与され、前述の疾患状態は、癌、心血管疾患、微生物感染、医療機器への血液の曝露によって引き起こされる血小板凝集および血小板粘着、異常細胞増殖に起因する病的状態、移植拒絶反応、自己免疫疾患、炎症、血管疾患、瘢痕組織、創傷収縮、再狭窄、痛み、発熱、胃腸障害、呼吸器障害、性機能不全、および性感染症からなる群から選択される。

【0033】

50

一部の実施形態は、化合物（例えば、ポリマー）または粘性誘導剤および薬学的に許容可能な賦形剤を含む、医薬製剤に関する。

【0034】

一部の実施形態は、表面上の微生物負荷を低減または予防する方法に関する。いくつかの実施形態では、化合物または粘性誘導剤は、複数の微生物で汚染された表面に適用される。いくつかの実施形態では、化合物または粘性は、一酸化窒素を生成し、微生物DNAおよび膜構造に酸化および／またはニトロソ化損傷を誘導し、それによって微生物負荷を予防または低減する。いくつかの実施形態では、複数の微生物は、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、真菌、酵母、およびウイルスのうちの一つ、二つ、または三つ以上を含む。いくつかの実施形態では、表面は有機表面である。いくつかの実施形態では、表面はヒト皮膚である。いくつかの実施形態では、表面は上皮組織である。いくつかの実施形態では、表面は創傷表面である。いくつかの実施形態では、表面は動物皮膚である。いくつかの実施形態において、適用は、皮膚刺激を誘発しない。

10

【0035】

いくつかの実施形態では、表面は無機表面である。いくつかの実施形態では、無機表面は、医療機器の外部表面または内部表面である。いくつかの実施形態では、化合物の適用は、医療機器の外部表面または内部表面上に抗微生物コーティングを生成する。いくつかの実施形態では、医療機器は、内視鏡を含む。

【0036】

いくつかの実施形態では、微生物負荷は、薬剤耐性菌を含む。いくつかの実施形態において、微生物負荷は、ヒト免疫不全ウイルス、単純ヘルペスウイルス、乳頭腫ウイルス、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザ、肝炎、コクサッキーウイルス、帯状疱疹、はしか、おたふくかぜ、風疹、狂犬病、肺炎、出血性ウイルス熱、H1N1、プリオン、寄生虫、真菌、カビ、カンジダ・アルビカンズ、クロコウジカビ、大腸菌、緑膿菌、および黄色ブドウ球菌、A群連鎖球菌、肺炎球菌、結核菌、カンピロバクター・ジェジュニ、サルモネラ菌、赤痢菌、カルバペネム耐性腸内細菌メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、およびバークホルデリア・セパシアのうちの一つ以上の存在に関連する微生物を含む。いくつかの実施形態では、微生物負荷はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌を含む。いくつかの実施形態では、微生物負荷は、カルバペネム耐性腸内細菌を含む。いくつかの実施形態では、微生物負荷は黄色ブドウ球菌を含む。いくつかの実施形態では、微生物負荷は、緑膿菌を含む。いくつかの実施形態では、微生物負荷は、バークホルデリア・セパシアを含む。いくつかの実施形態では、NO供与体は、一酸化窒素を生成し、微生物の膜および／またはDNAに損傷を引き起こし、それによって生存可能な微生物の数を減少させる。いくつかの実施形態では、複数の微生物は、ウイルス、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、薬剤耐性菌、カビ、酵母、真菌、およびそれらの組み合わせのうちの一つ以上を含む。

20

30

【0037】

一部の実施形態は、微生物汚染を予防および／または低減する方法に関する。一部の実施形態では、方法は、複数の微生物で汚染された表面（または微生物に曝露され得る表面）を、NO放出足場と接触させることを含む。一部の実施形態では、足場のNO供与体は、NOを生成し、微生物の膜および／またはDNAに損傷を引き起こし、それによって生存可能な微生物の数を減少させ、および／または微生物を有する領域のコロニー形成または感染を妨げる。いくつかの実施形態では、表面は有機表面を含む。本方法の一部の実施形態では、表面はヒト皮膚または動物皮膚である。本方法の一部の実施形態では、表面は、口内または周囲の組織（例えば、唇、鼻孔、歯、歯茎など）にある。いくつかの実施形態では、表面は口腔粘膜を含む。一部の実施形態では、表面は肺の中にある。一部の実施形態では、表面は、無機表面（機器など）である。いくつかの実施形態では、表面は無機表面である。いくつかの実施形態では、無機表面は、医療機器の外部表面または内部表面である。いくつかの実施形態では、機器は歯科用機器である。有利なことに、本方法の一部の実施形態では、適用工程は、皮膚または組織の刺激を誘発しない。一部の実施形態では、複数の微生物は、ウイルス、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、薬剤耐性菌、カビ、

40

50

酵母、真菌、およびそれらの組み合わせのうちの一つ以上を含む。

【0038】

いくつかの実施形態は、本明細書に開示される化合物または粘性誘導剤のいずれか一つを製造する方法に関し、ポリマーを選択し、ポリマーをNO結合部分で官能化することを含む。いくつかの実施形態では、ポリマーはバイオポリマーである。いくつかの実施形態において、方法は、化合物または粘性誘導剤をNOに曝露して、NO供与化合物または粘性誘導剤を提供することを含む。

【0039】

以下でさらに詳細に記載される組成物および関連方法は、開業医がとった特定の措置を説明するが、別の当事者によるそれらの措置の指示も含み得ることが理解されるべきである。したがって、「NO供与足場の投与」などの措置には、「NO供与足場の投与の指示」が含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】図1は、アミン修飾CMCのFTIR分析を示す。

【0041】

【図2】図2は、アミン官能化ヒアルロン酸誘導体の純度分析を示す。(A)は未反応出発材料の分析を示し、(B)はアミン修飾6kDaHA誘導体の分析を示し、(C)はHPLC-ELSDを介したアミン修飾90kDaHA誘導体の分析を示す。アミン修飾HA誘導体は、検出可能な量のEDCおよびNHS反応物を含有しない。

【0042】

【図3-1】図3は、非修飾ヒアルロン酸の代表的な ^1H NMRスペクトルおよび ^{13}C NMRスペクトルを示す。 D_2O におけるHA6の、(A)は代表的な ^1H NMRスペクトルを示し、(B)は代表的な ^{13}C NMRスペクトルを示す。

【図3-2】同上。

【0043】

【図4-1】図4は、二級アミン官能化ヒアルロン酸の代表的な ^1H NMRスペクトルを示す。 D_2O における、(A)はHA6-PAPAの代表的な ^1H NMRを示し、(B)はHA90-PAPAの代表的な ^1H NMRを示し、(C)はHA6-HEDAの代表的な ^1H NMRを示し、(D)はHA90-HEDAの代表的な ^1H NMRを示し、(E)はHA6-DPTAの代表的な ^1H NMRを示し、(F)はHA90-DPTAの代表的な ^1H NMRを示し、(G)はHA6-DETAの代表的な ^1H NMRを示し、および(H)はHA90-DETAの代表的な ^1H NMRを示す。

【図4-2】同上。

【図4-3】同上。

【0044】

【図5-1】図5は、二級アミン官能化ヒアルロン酸に対する代表的な ^{13}C NMRスペクトル、および非修飾およびアミン修飾ヒアルロン酸に対する代表的な ^{13}C NMRの比較を示す。 D_2O における、(A)はHA6-PAPAの代表的な ^{13}C NMRを示し、(B)はHA90-PAPAの代表的な ^{13}C NMRを示し、(C)はHA6-HEDAの代表的な ^{13}C NMRを示し、(D)はHA90-HEDAの代表的な ^{13}C NMRを示し、(E)はHA6-DPTAの代表的な ^{13}C NMRを示し、(F)はHA90-DPTAの代表的な ^{13}C NMRを示し、(G)はHA6-DETAの代表的な ^{13}C NMRを示し、および(H)はHA90-DETAの代表的な ^{13}C NMRを示す。(I)は、非修飾およびアミン修飾ヒアルロン酸の代表的な ^{13}C NMRを示す。

【図5-2】同上。

【図5-3】同上。

【図5-4】同上。

【0045】

【図6-1】図6は、以下の二級アミン官能化ヒアルロン酸およびNO放出ヒアルロン酸

10

20

30

40

50

の代表的なUV-Visスペクトルを示す：(A) HA6-PAPA、(B) HA90-PAPA、(C) HA6-HEDA、(D) HA90-HEDA、(E) HA6-DPTA、(F) HA90-DPTA、(G) HA6-DETA、および(H) HA90-DETA。修飾は、対照(—)ヒアルロン酸、およびNO放出(—)ヒアルロン酸の代表的なUV-Visスペクトルを含む。

【図6-2】同上。

【図6-3】同上。

【0046】

【図7-1】図7は、6および90kDaのNO放出ヒアルロン酸のリアルタイムNO放出プロファイルおよび累積NO放出を示す。PBS(10mM、pH7.4、37℃)中の(A、C)6kDaおよび(B、D)90kDaのNO放出ヒアルロン酸について、(A~B)は放出の最初の30分間のリアルタイムNO放出プロファイルを、および(C~D)は累積NO放出合計を示し、修飾はPAPA(—)、HEDA(—)、DPTA(・・・)、およびDETA(—・—)を含む。(E)もまた、NO放出のリアルタイム測定を示す。

【図7-2】同上。

【0047】

【図8】図8は、非修飾およびアミン修飾CMC足場のFTIRスペクトルを示す。

【0048】

【図9】図9は、(A)緑膿菌および(B)黄色ブドウ球菌に対する6kDaのNO放出HA誘導体の時間ベースの殺菌アッセイを示す。処理としては、HA6-PAPA/NO(青色の円)、HA6-HEDA/NO(緑色の正方形)、HA6-DPTA/NO(赤色の三角形)、HA6-DETA/NO(紫色のひし形)、および未処理(黒色の十字)が挙げられる。すべてのHA誘導体を同じ用量で、緑膿菌除菌用には2mg mL⁻¹、および黄色ブドウ球菌除菌用には16mg mL⁻¹で、調製した。

【0049】

【図10-1】図10は、HA6-DPTA/NO(青色の円)、HA90-DPTA/NO(緑色の正方形)、またはネオマイシン硫酸塩(赤色の三角形)を用いた処理後の、(A)大腸菌、(B)緑膿菌、(C)黄色ブドウ球菌、(D)フェカリス菌、(E)MDR-緑膿菌、および(F)MRSAに対する活性成分(ネオマイシンまたはNO)の抗菌有効性を示す。NO用量は、HA6-DPTA/NOおよびHA90-DPTA/NOについて、PBS(10mM、pH7.4、37℃)における4時間の曝露時間にわたって放出された合計NOから計算された。

【図10-2】同上。

【0050】

【図11】図11は、同等の活性成分用量のネオマイシン硫酸塩(中実)またはHA6-DPTA/NO(ストライプ)を用いて、溶液中の(A)緑膿菌および(B)MDR-緑膿菌の既存のバイオフィルムを24時間処理した後のバイオフィルムの生存可能性を示す。

【0051】

【図12-1】図12は、インビトロ細胞毒性の結果を示す。(A1)は、L929マウス線維芽細胞の酵素活性を50%減少させるために必要なアミン修飾ヒアルロン酸誘導体(中実)およびNO放出ヒアルロン酸誘導体(ストライプ)の濃度を示す(IC₅₀)。(A2)は同様に、L929マウス線維芽細胞の酵素活性を50%減少させるのに必要なアミン修飾ヒアルロン酸誘導体およびNO放出ヒアルロン酸誘導体の濃度(IC₅₀)、ならびにNO放出ヒアルロン酸の阻害活性成分用量を示す。図12A2では、HA6は各対の棒のうちの左側の棒である。(B)酵素活性を50%減少させるために必要なヒアルロン酸誘導体から放出されたNOの用量を示す。

【図12-2】同上。

【0052】

【図13-1】図13は、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、およびフェカリス菌に対す

る6および90 kDaのNO放出ヒアルロン酸誘導体の抗菌有効性を示す。(A、E)大腸菌、(B、F)緑膿菌、(C、G)黄色ブドウ球菌、および(D、H)フェカリス菌に対する、(A~D)6 kDa、および(E~H)90 kDaのNO放出ヒアルロン酸の抗菌有効性が示されている。修飾は、PAPA(青色の円)、HEDA(緑色の正方形)、DPTA(赤色の三角形)、およびDETA(紫色のひし形)を含む。

【図13-2】同上。

【図13-3】同上。

【0053】

【図14-1】図14は、6および90 kDaのアミン官能化(対照)ヒアルロン酸を用いた、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、およびフェカリス菌の処理後に残存するコロニーを示す。6 kDaおよび90 kDaのアミン修飾ヒアルロン酸(NOなし)で4時間処理した後に残る(A)大腸菌、(B)緑膿菌、(C)黄色ブドウ球菌、および(D)フェカリス菌のコロニー。修飾は、PAPA(青色)、HEDA(緑色)、DPTA(赤色)、およびDETA(紫色)を含む。すべての修飾を、8 mg mL⁻¹で、(A)大腸菌および(B)緑膿菌について評価した。NO放出誘導体による根絶に対してより高用量が必要でない限り、修飾は、(C)黄色ブドウ球菌および(D)フェカリス菌について、16 mg mL⁻¹で評価された。黄色ブドウ球菌およびフェカリス菌の両方について、HA6-DETA、HA90-HEDA、およびHA90-DETAを32 mg mL⁻¹で評価した。フェカリス菌については、HA90-PAPAも32 mg mL⁻¹で評価された。注目すべきことに、アミン修飾HA誘導体のいずれも、評価した濃度では殺菌性(3 log以上の減少)ではなかった。

【図14-2】同上。

【0054】

【図15】図15は、MDR-緑膿菌およびMRSAに対する、6および90 kDaのDPTA官能化ヒアルロン酸およびNO放出ヒアルロン酸の細菌死滅曲線を示す。多剤耐性緑膿菌(赤色)およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(青色)を含む抗生物質耐性細菌株に対する、6 kDa(円)および90 kDa(正方形)のDPTA修飾(中空)ヒアルロン酸およびNO放出(中実)ヒアルロン酸の抗菌有効性が示されている。

【0055】

【図16-1】図16は、緑膿菌およびMDR-緑膿菌バイオフィルムに対する、6および90 kDaのNO放出DPTA修飾HAの抗バイオフィルム有効性を示す。HA6-DPTA/NO(青色の円)、HA90-DPTA/NO(緑色の正方形)、またはネオマイシン硫酸塩(赤色の三角形)を用いて、(A~B)緑膿菌バイオフィルム、および(C~D)MDR-緑膿菌バイオフィルムに24時間の処理をした後の、バイオフィルムの生存可能性が示される。緑膿菌バイオフィルムとMDR-緑膿菌バイオフィルムとに対する、6および90 kDaのNO放出DPTA修飾HA、およびネオマイシンのバイオフィルム生存可能性の別の形態を、(E)および(F)に示す。

【図16-2】同上。

【0056】

【図17】図17は、ブランク(左、灰色)、対照HA6-DPTA(中央、青色)、または対照HA90-DPTA(右、緑色)溶液への、緑膿菌バイオフィルムおよびMDR-緑膿菌バイオフィルムの24時間曝露後のバイオフィルム生存可能性を示す。HAの溶液を、それぞれのNO放出誘導体についてMBEC24時間で調製した。注目すべきことに、HA90-DPTAは、MDR-緑膿菌バイオフィルムの試験用に32 mg mL⁻¹で調製された。これは、NO放出誘導体に対するMBEC24時間の欠如のためである。

【0057】

【図18】図18は、非修飾の6 kDa(青色、左)および90 kDa(緑色、右)ヒアルロン酸を用いた24時間の処理後のL929マウス線維芽細胞の生存可能性を示す。

【0058】

【図19-1】図19は、アミン修飾(中空)およびNO放出(中実)HA誘導体を用い

10

20

30

40

50

たL929マウス線維芽細胞の24時間処理後の用量反応曲線を示す。6kDa（赤色の円）および90kDa（青色の正方形）のHAの修飾は、（A）PAPA、（B）HEDA、（C）DPTA、および（D）DETAを含む。

【図19-2】同上。

【0059】

【図20】図20は、（A）CMC-DETA（中実）、CMC-DPTA（斜めストライプ）、CMC-HEDA（水平ストライプ）、およびCMC-PAPA（ドット）、ならびに（B）CMC-DETA/NO（中実）、CMC-DPTA/NO（斜めストライプ）、CMC-HEDA/NO（水平ストライプ）、およびCMC-PAPA/NO（ドット）に対する24時間曝露後の、MTSアッセイを介して決定されたHGF-1細胞の代謝活性を示す。

10

【0060】

【図21-1】図21は、A）CMC-DETA（実線）およびCMC-DETA/NO（破線）、B）CMC-DPTA（実線）およびCMC-DPTA/NO（破線）、C）CMC-HEDA（実線）およびCMC-HEDA/NO（破線）、ならびにD）CMC-PAPA（実線）およびCMC-PAPA/NO（破線）の、50mM NaOHにおける、UV-vis吸収スペクトルを示す。

【図21-2】

【発明を実施するための形態】

【0061】

20

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、N-ジアゼニウムジオレートNO供与体修飾足場の合成および特徴付け、ならびに抗微生物用途におけるそれらの使用を提供する。いくつかの実施形態では、足場はポリマーを含む。いくつかの実施形態では、足場はバイオポリマーを含む。いくつかの実施形態では、足場は生体適合性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、足場は、一つ以上のサッカライド単位を含み、および／または多糖類である。いくつかの実施形態において、足場は、一つ以上のキトサン、ヒアルロン酸（HA）、カルボキシメチルセルロース（CMC）、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロース、セルロース、アルギネート（1, 4-結合α-ラーグルロン酸（G）およびβ-D-マンヌロン酸（M）単位を含む）、コラーゲン、ゼラチン、シクロデキストリン（例えば、5（α）、6（β）、7（γ）、またはそれ以上のα-D-グリコピラノシドを有する）、アミノグリコシド（例えば、カナマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、ゲンタマイシン、ネオマイシン、など）エラスチン、その繰返し単位、その構造単位、またはその組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、一つ以上のポリマーは足場を形成するために架橋される。いくつかの実施形態において、ポリマーは足場を形成するために架橋されない。いくつかの実施形態において、足場は、低毒性の天然組織および患者細胞（例えば、真核細胞、哺乳動物細胞、ヒト細胞、など）で、微生物（例えば、原核細胞、細菌、原虫、真菌、藻類、アメーバ、粘菌など、そして特に、少なくともある程度の薬剤耐性を発現しているそのような微生物）の生存可能性の効率的な低減、および／または根絶を可能にする。

30

【0062】

40

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本主題が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書の主題の記述で使用される用語は、特定の実施形態を説明する目的のみを目的としており、主題の限定を意図するものではない。

【0063】

「有効量」という用語は、本明細書で使用される場合、当該技術分野で周知であろうように、例えば、対象の状態（例えば、一つ以上の症状）の改善、状態の進行の遅延または低減、障害の発症の予防または遅延、および／あるいは臨床パラメータ、疾患もしくは病気における変化などを含む、障害、疾患、または病気に苦しむ対象への有益な効果であり得る調節効果を付与する列挙された化合物のその量である。例えば、有効量は、対象にお

50

ける状態を少なくとも5%、例えば、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも100%、改善させる組成物、化合物、または薬剤の量を指し得る。一部の実施形態では、状態の改善は感染の減少であり得る。一部の実施形態では、改善は、表面上または対象における細菌負荷（例えば、バイオバーデン）の減少であり得る。本開示の主題の活性組成物中の活性成分の実際の用量レベルは、特定の対象および／または用途について所望の応答を達成するために有効な量の活性化合物を投与するように、変化させることができる。選択された用量レベルは、組成物の活性、配合、投与経路、他の薬剤または治療との組み合わせ、治療される状態の重症度、ならびに治療される対象の身体状態および既往歴を含むが、これらに限定されない、様々な要因に依存するであろう。一部の実施形態において、最小用量が投与され、用量が、用量制限毒性の非存在下で最小有効量まで漸増される。有効用量の決定および調整、ならびにかかる調整をいつ、どのように行うかの評価が、本明細書で企図される。

10

【0064】

用語「バイオポリマー」は、ポリヌクレオチド（例えば、DNA、RNA）、多糖類（例えば、セルロース）、タンパク質（例えば、ポリペプチド）、グリコペプチド、ペプチドグリカン、および同類のものを含む、生物体内で発生する高分子物質を指す。

【0065】

「治療する」または「治療すること」または「治療」は、例えば、対象の状態（例えば、一つ以上の症状）の改善、状態の進行の遅延または低減、および／あるいは臨床パラメータ、疾患もしくは病気における変化、病気の治癒などを含む、障害、疾患、または病気に苦しむ対象への有益な効果であり得る調節効果を付与する、任意のタイプの行動を指す。

20

【0066】

用語「破壊すること」および「根絶すること」は、バイオフィームと戦うための本開示の構造の能力を指す。バイオフィームは部分的に根絶または破壊されてもよく、これは、細胞がもはや互いにまたは表面に付着しないことを意味する。バイオフィームは、完全に根絶されてもよく、これは、バイオフィームがもはや、実質的な程度まで細胞の相互接続された、凝集した、または連続的なネットワークではないことを意味する。

30

【0067】

用語「一酸化窒素供与体」または「NO供与体」は、一酸化窒素種の生物活性が意図された作用部位で発現されるように、一酸化窒素種を供与、放出、および／または直接的もしくは間接的に搬送する、および／またはインビボで一酸化窒素の内因性産生を刺激する、および／またはインビボで一酸化窒素の内因性レベルを上昇させる種および／または分子を指す。

【0068】

用語「一酸化窒素放出」または「一酸化窒素供与」は、一酸化窒素の三つの酸化還元形態のうちのいずれか一つ（または二つ以上）（NO⁺、NO⁻、NO（例えば、 $\cdot$ NO））を、供与、放出、および／または直接的もしくは間接的に搬送する種、ならびに／あるいは一酸化窒素の三つの酸化還元形態（NO⁺、NO⁻、NO）のうちのいずれか一つ（または二つ以上）を、供与、放出、および／または直接的もしくは間接的に搬送する方法を指す。一部の実施形態では、一酸化窒素放出は、一酸化窒素種の生物活性が意図された作用部位で発現されるように達成される。

40

【0069】

本明細書で使用される場合、「微生物感染」という用語は、細菌感染、真菌感染、ウイルス感染、酵母感染、ならびに他の微生物、およびそれらの組み合わせを指す。

【0070】

本明細書に開示されるように治療される「患者」または「対象」は、一部の実施形態では、ヒト患者であるが、本開示の主題の原理は、本開示の主題が、用語「対象」および「

50

患者」に含まれることが意図される哺乳動物を含む、全ての脊椎動物種に対して有効であることを示すことを理解されるべきである。適切な対象は、概して哺乳動物対象である。本明細書に記載される主題は、研究、ならびに獣医学および医学用途での使用が見出される。本明細書で使用される場合、用語「哺乳類」は、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ウサギ、齧歯類（例えば、ラットまたはマウス）、サルなどを含むが、これらに限定されない。ヒト対象には、新生児、幼児、若年者、成人、および高齢者対象が含まれる。本明細書に開示される方法「を必要とする」対象は、疾患状態を経験している、および／または疾患状態を経験することが予期される対象であってもよく、本発明の方法および組成物は、治療的および／または予防的処置に使用される。

【0071】

本明細書に提供される一般的な化学式について、置換基が示されていない場合、当業者であれば、置換基が水素であることを理解するであろう。原子に接続されていないが、示されている結合は、こうした置換基の位置が可変であることを示している。結合を通して、または結合の端部で引かれたギザギザの線、波線、二つの波線は、何らかの追加の構造がその位置に結合されていることを示す。本明細書に開示される多数の追加のモノマーについて、構造に明示的に示されていないが、ポリマーの当業者であれば、これらのモノマーは、元素分析がこのような区別が予期されうることを示さない場合であっても、結果として生じるポリマー材料の物理的特性を変えるために添加できることを理解する。かかる物理的特性には、溶解性、電荷、安定性、架橋、2次構造および3次構造などが含まれる。さらに、一つ以上のキラル中心を有する化合物に対して立体化学が示されていない場合、すべてのエナンチオマーおよびジアステロマー（*diastereomers*）が含まれる。同様に、脂肪族基またはアルキル基の記述については、その全ての構造異性体も含まれる。別段の記載がない限り、 $A_1 \sim A_n$ として示され、本明細書ではアルキル基と呼称される基は、本明細書に提供される一般式において、独立してアルキルまたは脂肪族基、特に20個以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルなどの10個以下の原子を有する低級アルキルから選択される。アルキルは、任意で置換されていてもよい（例えば、本明細書の他の箇所に開示するように、置換されていても置換されていなくてもよい）。アルキルは、例えば、ハロゲン化アルキル（例えば、 $-CX_3$ 、式中、Xは、ハロゲン化物、およびその組み合わせ、鎖でまたはそれに結合されているいずれか）、アルコール（すなわち、脂肪族またはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、またはアミノ、アミノ酸、アリアル、アルキリアル、アルキルエステル、エーテル、ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド修飾アルキル基などの他の類似の置換部分などの、置換アルキル基であってもよい。

【0072】

用語「アミノ」および「アミン」は、 NR_3 、 NH_3 、 NHR_2 、および NH_2R などの窒素含有基を指し、ここで、Rは、本明細書の他の箇所に記載されるようなものであることができる。したがって、本明細書で使用される場合、「アミノ」は、一級アミン、二級アミン、または三級アミンを指すことができる。一部の実施形態では、アミノ基のうちの一つのRは、ジアゼニウムジオレート（すなわち、NONO）であり得る。

【0073】

基が「任意に置換される」と記載されるときは常に、その基が、非置換であってもよく、または示される置換基のうちの一つ以上で置換されていてもよい。同様に、基が「置換されていない、または置換されている」（あるいは「置換されている、または置換されていない」）と記載される場合で置換されている場合、置換基は、示される置換基のうちの一つ以上から選択され得る。置換基が示されていない場合、示される「任意に置換される」、または「置換される」基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリアル、ヘテロアリアル、ヘテロシクリル、アリアル（アルキル）、シクロアルキル（アルキル）、ヘテロアリアル（アルキル）、ヘテロシクリル（アルキル）、ヒドロキシ、アルコキシ、アシル、シアノ、ハロゲン、チオカルボニル、O-カル

バミル、N-カルバミル、O-チオカルバミル、N-チオカルバミル、C-アミド、N-アミド、S-スルホンアミド、N-スルホンアミド、C-カルボキシ、O-カルボキシ、ニトロ、スルフェニル、スルフィニル、スルホニル、ハロアルキル、ハロアルコキシ、アミノ、モノ置換アミン基、二置換アミン基、モノ置換アミン（アルキル）、二置換アミン（アルキル）、ジアミノ基、ポリアミノ、ジエーテル基、およびポリエーテル基から、個別に、独立して選択される一つ以上の基で置換されてもよいことを意味する。

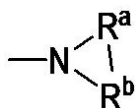
【0074】

本明細書で使用される場合、「a」および「b」が整数である「C_a~C_b」は、基の中の炭素原子の数を指す。示される基は、「a」と「b」を含んで、「a」~「b」の炭素原子を含有し得る。したがって、例えば、「C₁~C₄アルキル」、または「C₁-C₄アルキル」基は、1~4個の炭素を有する全てのアルキル基、すなわち、CH₃-、CH₃CH₂-、CH₃CH₂CH₂-、(CH₃)₂CH-、CH₃CH₂CH₂CH₂-、CH₃CH₂CH(CH₃)-、および(CH₃)₃C-を指す。「a」および「b」が指定されていない場合、これらの定義において記述される最も広い範囲を想定する。

【0075】

二つの「R」基が「一緒にされる」と記載される場合、R基およびそれらが結合される原子は、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、または複素環を形成することができる。例えば、限定されるものではないが、NR^aR^b基のR^aおよびR^bが「一緒にされる」と示される場合、それらは、環を形成するために互いに共有結合していることを意味する：

【化22】



【0076】

本明細書で使用される場合、用語「アルキル」は、完全に飽和した脂肪族炭化水素基を指す。アルキル部分は、分岐鎖または直鎖であってもよい。分岐アルキル基の例としては、以下に限定されないが、イソプロピル、sec-ブチル、tert-ブチルなどが挙げられる。直鎖アルキル基の例としては、以下に限定されないが、メチル、エチル、n-プロピル、n-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチルなどが挙げられる。アルキル基は、1~30個の炭素原子を有してもよい（本明細書に現れる場合は常に、例えば、「1~30」などの数値範囲は、所与の範囲の各整数を指す；例えば、「1~30個の炭素原子」は、アルキル基が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30個の炭素原子からなり得ることを意味するが、本定義は、数値範囲が指定されていない場合の用語「アルキル」の出現も包含する）。「アルキル」基はまた、1~12個の炭素原子を有する中級アルキルであってもよい。「アルキル」基はまた、1~6個の炭素原子を有する低級アルキルでもあり得る。アルキル基は、置換または非置換であってもよい。例としてのみ、「C₁-C₅アルキル」は、アルキル鎖に一~五個の炭素原子があること、すなわち、アルキル鎖がメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、ペンチル（分岐および直鎖）などから選択されることを示す。典型的なアルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、三級ブチル、ペンチル、およびヘキシルが挙げられるが、決してこれらに限定されない。

【0077】

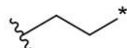
本明細書で使用される場合、用語「アルキレン」は、二価の完全飽和直鎖脂肪族炭化水素基を指す。直鎖アルキレン基の例としては、以下に限定されないが、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、およびオクチレンが挙げられる。アルキレン基は、

【化 2 3】



によって表され、その後に炭素原子の数が続き、そして「*」と続くことができる。例えば、エチレンを表すための

【化 2 4】



である。アルキレン基は、1～30個の炭素原子を有してもよい（本明細書中に示される場合常に、「1～30」などの数値範囲は、所与の範囲における各整数を指す；例えば、「1～30個の炭素原子」は、アルキル基が、1個の炭素原子、2個の炭素原子、3個の炭素原子など、30個の炭素原子を含んで、最大30個の炭素原子からなり得ることを意味するが、本定義は、数値範囲が指定されていない場合の用語「アルキレン」の出現も包含する）。アルキレン基はまた、1～12個の炭素原子を有する中級アルキルであってもよい。アルキレン基はまた、1～6個の炭素原子を有する低級アルキルでもあり得る。アルキレン基は、置換または非置換であってもよい。例えば、低級アルキレン基は、低級アルキレン基の一つ以上の水素を置換することによって、および／または同じ炭素上の両方の水素をC₃～6単環式シクロアルキル基（例えば、

【化 2 5】



）で置換することによって置換され得る。

【0078】

本明細書で使用される用語「アルケニル」は、限定されるものではないが、1-プロペニル、2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニルなどを含む炭素二重結合を含有する2～20個の炭素原子の一価直鎖または分岐鎖ラジカルを指す。アルケニル基は、非置換または置換であってもよい。

【0079】

本明細書で使用される用語「アルキニル」は、限定されるものではないが、1-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニルなどを含む炭素三重結合を含有する2～20個の炭素原子の一価直鎖または分岐鎖ラジカルを指す。アルキニル基は、非置換または置換であってもよい。

【0080】

本明細書で使用される場合、「シクロアルキル」は、完全に飽和した（二重結合でも三重結合でもない）単環式または多環式（二環式など）炭化水素環系を指す。二つ以上の環から構成される場合、環は融合、架橋、またはスピロ様式で一緒に結合され得る。本明細書で使用される場合、用語「融合」は、二つの原子と一つの結合とを共有する二つの環を指す。本明細書で使用される場合、用語「架橋シクロアルキル」は、シクロアルキルが、非隣接原子を接続する一つ以上の原子の結合を含有する化合物を指す。本明細書で使用される場合、用語「スピロ」は、一つの原子を共有する二つの環のことを指し、この二つの環は架橋によって連結されていない。シクロアルキル基は、環内に3～30個の原子、環内に3～20個の原子、環内に3～10個の原子、環内に3～8個の原子、または環内に3～6個の原子を含有することができる。シクロアルキル基は、非置換または置換であってもよい。モノ-シクロアルキル基の例としては、決して限定されるものではないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが挙げられる。縮合シクロアルキル基の例は、デカヒドロナフタレニル、ドデカヒドロ-1H-フェナレニル、およびテトラデカヒドロアントラセニルであり、架橋シクロアルキル基の例は、ビスクロ[1.1.1]ペンチル、アダマンタニル、および

ノルボルナニルであり、スピロシクロアルキル基の例は、スピロ〔3・3〕ヘプタンおよびスピロ〔4・5〕デカンを含む。

【0081】

本明細書で使用される場合、「シクロアルケニル」は、一つ以上の二重結合を少なくとも一つの環に含有する単環式または多環式（二環式など）炭化水素環系を指すが、複数ある場合、二重結合は、全ての環にわたって完全に非局在化されたパイ電子系を形成することはできない（そうでなければ、基は本明細書に定義されるように、「アリール」であろう）。シクロアルケニル基は、環内に3～10個の原子、環内に3～8個の原子、または環内に3～6個の原子を含有し得る。二つ以上の環から構成される場合、環は、融合、架橋、またはスピロ様式で一緒に接続されてもよい。シクロアルケニル基は、非置換または置換であってもよい。

【0082】

本明細書で使用される場合、「アリール」は、全環全体にわたって完全に非局在化されたパイ電子系を有する、炭素環式（全炭素）単環式または多環式（二環式など）芳香族環系（二つの炭素環式環が化学結合を共有する縮合環系を含む）を指す。アリール基中の炭素原子の数は、変化し得る。例えば、アリール基は、 C_6-C_{14} アリール基、 C_6-C_{10} アリール基、または C_6 アリール基であってもよい。アリール基の例としては、限定されるものではないが、ベンゼン、ナフタレン、およびアズレンが挙げられる。アリール基は、置換または非置換であってもよい。本明細書で使用される場合、「ヘテロアリール」は、一つ以上のヘテロ原子（例えば、1、2または3個のヘテロ原子）、すなわち、窒素、酸素および硫黄を含むがこれに限定されない炭素以外の元素を含有する、単環式または多環式（二環式など）芳香族環系（完全に非局在化されたパイ電子系を有する環系）を指す。ヘテロアリール基の環中の原子の数は、変化し得る。例えばヘテロアリール基は、環内に四～十四個の原子、環内に五～十個の原子、または環内に五～六個の原子、例えば、九個の炭素原子と一個のヘテロ原子；八個の炭素原子と二個のヘテロ原子；七個の炭素原子と三個のヘテロ原子；八個の炭素原子と一個のヘテロ原子；七個の炭素原子と二個のヘテロ原子；六個の炭素原子と三個のヘテロ原子；五個の炭素原子と四個のヘテロ原子；五個の炭素原子と一個のヘテロ原子；四個の炭素原子と二個のヘテロ原子；三個の炭素原子と三個のヘテロ原子；四個の炭素原子と一個のヘテロ原子；三個の炭素原子と二個のヘテロ原子；または二個の炭素原子と三個のヘテロ原子を含有することができる。さらに、用語「ヘテロアリール」は、例えば、少なくとも一つのアリール環と少なくとも一つのヘテロアリール環、または少なくとも二つのヘテロアリール環などの二つの環が、少なくとも一つの化学結合を共有する縮合環系を含む。ヘテロアリール環の例としては、限定されるものではないが、フラン、フラサン、チオフエン、ベンゾチオフエン、フタラジン、ピロール、オキサゾール、ベンゾオキサゾール、1, 2, 3-オキサジアゾール、1, 2, 4-オキサジアゾール、チアゾール、1, 2, 3-チアジアゾール、1, 2, 4-チアジアゾール、ベンゾチアゾール、イミダゾール、ベンジミダゾール、インドール、インダゾール、ピラゾール、ベンゾピラゾール、イソキサゾール、ベンゾイソキサゾール、イソチアゾール、トリアゾール、ベンゾトリアゾール、チアジアゾール、テトラゾール、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、プリン、プテリジン、キノリン、イソキノリン、キナゾリン、キノキサリン、シノリン、およびトリアジンを含む。ヘテロアリール基は、置換または非置換であってもよい。

【0083】

本明細書で使用される場合、「ヘテロシクリル」または「ヘテロアリシクリル」は、3員、4員、5員、6員、7員、8員、9員、10員、最大18員の単環式、二環式、および三環式環系を指し、ここで、炭素原子は1～5個のヘテロ原子とともに前述の環系を構成する。複素環は、任意選択的に、しかしながら、完全に非局在化されたパイ電子系は、全ての環にわたって発生しないような方法で位置付けられた一つ以上の不飽和結合を含有してもよい。ヘテロ原子は、限定されるものではないが、酸素、硫黄、および窒素を含む、炭素以外の元素である。複素環は、定義が、オキソ系、およびチオ系、例えばラクタム

10

20

30

40

50

、ラクトン、環状イミド、環状チオイミド、および環状カルバメートなど、を含むように、一つ以上のカルボニルまたはチオカルボニル官能基をさらに含有してもよい。二つ以上の環から構成される場合、環は融合、架橋、またはスピロ様式で一緒に結合され得る。本明細書で使用される場合、用語「融合」は、二つの原子と一つの結合とを共有する二つの環を指す。本明細書で使用される場合、用語「架橋ヘテロシクリル」または「架橋ヘテロアリシクリル」は、ヘテロシクリルまたはヘテロアリシクリルが、非隣接原子を接続する一つ以上の原子の結合を含有する化合物を指す。本明細書で使用される場合、用語「スピロ」は、一つの原子を共有する二つの環のことを指し、この二つ環は架橋によって連結されていない。ヘテロシクリルおよびヘテロアリシクリル基は、環内に3～30個の原子、環内に3～20個の原子、環内に3～10個の原子、環内に3～8個の原子、または環内に3～6個の原子を含有することができる。例えば、五つの炭素原子と一つのヘテロ原子、四つの炭素原子と二つのヘテロ原子、三つの炭素原子と三つのヘテロ原子、四つの炭素原子と一つのヘテロ原子、三つの炭素原子と二つのヘテロ原子、二つの炭素原子と三つのヘテロ原子、一つの炭素原子と四つのヘテロ原子、三つの炭素原子と一つのヘテロ原子、または二つの炭素原子と一つのヘテロ原子。さらに、ヘテロ脂環式中の任意の窒素を四級化することができる。ヘテロシクリルまたはヘテロ脂環式基は、非置換または置換であってもよい。こうした「ヘテロシクリル」または「ヘテロアリシクリル」基の例としては、限定されないが、1,3-ジオキシン、1,3-ジオキサン、1,4-ジオキサン、1,2-ジオキサラン、1,3-ジオキサラン、1,4-ジオキサラン、1,3-オキサチアン、1,4-オキサチン、1,3-オキサチオラン、1,3-ジチオール、1,3-ジチオラン、1,4-オキサチアン、テトラヒドロ-1,4-チアジン、2H-1,2-オキサジン、マレイミド、スクシンイミド、バルビツール酸、チオバルビツール酸、ジオキソピペラジン、ヒダントイン、ジヒドロウラシル、トリオキサン、ヘキサヒドロ-1,3,5-トリアジン、イミダゾリン、イミダゾリジン、イソキサゾリン、イソキサゾリジン、オキサゾリン、オキサゾリジン、オキサゾリジノン、チアゾリン、チアゾリジン、モルホリン、オキシラン、ピペリジンN-オキシド、ピペリジン、ピペラジン、ピロリジン、アゼパン、ピロリドン、ピロリジオン、4-ピペリドン、ピラゾリン、ピラゾリジン、2-オキソピロリジン、テトラヒドロピラン、4H-ピラン、テトラヒドロチオピラン、チアモルホリン、チアモルホリンスルホキシド、チアモルホリンスルホン、およびそのベンゾ縮合類似体（例えば、ベンジミダゾリジノン、テトラヒドロキノリンおよび／または3,4-メチレンジオキシフェニル）が挙げられる。スピロヘテロシクリル基の例としては、2-アザスピロ[3.3]ヘプタン、2-オキサスピロ[3.3]ヘプタン、2-オキサ-6-アザスピロ[3.3]ヘプタン、2,6-ジアザスピロ[3.3]ヘプタン、2-オキサスピロ[3.4]オクタン、および2-アザスピロ[3.4]オクタンが挙げられる。

【0084】

本明細書で使用される場合、「アラルキル」および「アリール（アルキル）」は、低級アルキレン基を介して置換基として接続されるアリール基を指す。アラルキルの低級アルキレンおよびアリール基は、置換または非置換であってもよい。例としては、ベンジル、2-フェニルアルキル、3-フェニルアルキル、およびナフチルアルキルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0085】

本明細書で使用される場合、「シクロアルキル（アルキル）」は、低級アルキレン基を介して置換基として接続されるシクロアルキル基を指す。シクロアルキル（アルキル）の低級アルキレンおよびシクロアルキル基は、置換または非置換であってもよい。

【0086】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアラルキル」および「ヘテロアリール（アルキル）」は、低級アルキレン基を介して置換基として接続されるヘテロアリール基を指す。ヘテロアラルキルの低級アルキレンおよびヘテロアリール基は、置換または非置換であってもよい。例としては、2-チエニルアルキル、3-チエニルアルキル、フリルアルキル、

チエニルアルキル、ピロリルアルキル、ピリジルアルキル、イソキサゾリルアルキル、およびイミダゾリルアルキル、ならびにそれらのベンゾ縮合類似体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0087】

「ヘテロアリシクリル（アルキル）」および「ヘテロシクリル（アルキル）」は、低級アルキレン基を介して置換基として接続される複素環式またはヘテロ脂環式基を指す。（ヘテロアリシクリル）アルキルの低級アルキレンおよびヘテロシクリルは、置換または非置換であってもよい。例としては、限定されるものではないが、テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル（メチル）、ピペリジン-4-イル（エチル）、ピペリジン-4-イル（プロピル）、テトラヒドロ-2H-チオピラン-4-イル（メチル）、および1,3-チアジナン-4-イル（メチル）が挙げられる。

10

【0088】

本明細書で使用される場合、用語「ヒドロキシ」は、-OH基を指す。

【0089】

本明細書で使用される場合、「アルコキシ」は、式-ORを指し、式中、Rはアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシクリル（アルキル）が本明細書に定義される。アルコキシの非限定的なリストは、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、1-メチルエトキシ（イソプロポキシ）、n-ブトキシ、イソ-ブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ、フェノキシ、およびベンゾキシである。アルコキシは、置換または非置換であってもよい。

20

【0090】

本明細書で使用される場合、「アシル」は、カルボニル基を介して、置換基として接続される水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、およびヘテロシクリル（アルキル）を指す。例としては、ホルミル、アセチル、プロパノイル、ベンゾイル、およびアクリルが挙げられる。アシルは、置換または非置換であってもよい。

【0091】

本明細書で使用される場合、「シアノ」基は、「-CN」基を指す。

30

【0092】

本明細書で使用される場合、「ハロゲン原子」または「ハロゲン」という用語は、フッ素、塩素、臭素、およびヨウ素などの元素の周期表の第7列の放射性安定原子のいずれか一つを意味する。

【0093】

「チオカルボニル」基は、「-C(=S)R」基を指し、ここでRは、O-カルボキシに関して定義されるのと同じであり得る。チオカルボニルは、置換または非置換であってもよい。「O-カルバミル」基は、R_AおよびR_Bが独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシクリル（アルキル）であり得る、「-OC(=O)N(R_AR_B)」基を指す。O-カルバミルは、置換または非置換であってもよい。

40

【0094】

「N-カルバミル」基は、RおよびR_Aが独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシクリル（アルキル）であり得る、「ROC(=O)N(R_A)-」基を指す。N-カルバミルは、置換または非置換であってもよい。

【0095】

「O-チオカルバミル」基は、R_AおよびR_Bが独立して、水素、アルキル、アルケニ

50

ル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシクリル（アルキル）であり得る、「 $-OC(=S)-N(R_A R_B)$ 」基を指す。O-チオカルバミルは、置換または非置換であってもよい。

【0096】

「N-チオカルバミル」基は、RおよびR_Aが独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシクリル（アルキル）であり得る、「 $ROC(=S)N(R_A)-$ 」基を指す。N-チオカルバミルは、置換または非置換であってもよい。

10

【0097】

「C-アミド」基は、R_AおよびR_Bが独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシクリル（アルキル）であり得る、「 $-C(=O)N(R_A R_B)$ 」基を指す。C-アミドは、置換または非置換であってもよい。

【0098】

「N-アミド」基は、RおよびR_Aが独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシクリル（アルキル）であり得る、「 $RC(=O)N(R_A)-$ 」基を指す。N-アミドは、置換または非置換であってもよい。

20

【0099】

「S-スルホンアミド」基は、R_AおよびR_Bが独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシクリル（アルキル）であり得る、「 $-SO_2N(R_A R_B)$ 」基を指す。S-スルホンアミドは、置換または非置換であってもよい。

【0100】

「N-スルホンアミド」基は、RおよびR_Aが独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシクリル（アルキル）であり得る、「 $RSO_2N(R_A)-$ 」基を指す。N-スルホンアミドは、置換または非置換であってもよい。

30

【0101】

「O-カルボキシ」基は、本明細書に定義されるように、Rが、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシクリル（アルキル）であり得る、「 $RC(=O)O-$ 」基を指す。O-カルボキシは、置換または非置換であってもよい。

40

【0102】

用語「エステル」および「C-カルボキシ」は、「 $-C(=O)OR$ 」基を指し、ここでRは、O-カルボキシに関して定義されるものと同じであり得る。エステルおよびC-カルボキシは、置換または非置換であってもよい。

【0103】

「ニトロ」基は、「 $-NO_2$ 」基を指す。

【0104】

「スルフェニル」基は、Rが、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシク

50

リル（アルキル）であり得る、「 $-SR$ 」基を指す。スルフェニルは、置換または非置換であってもよい。

【0105】

「スルフィニル」基は、「 $-S(=O)-R$ 」基を指し、ここで R は、スルフェニルに関して定義されるのと同じであり得る。スルフィニルは、置換または非置換であってもよい。

【0106】

「スルホニル」基は、「 SO_2R 」基を指し、ここで R は、スルフェニルに関して定義されるのと同じであり得る。スルホニルは、置換または非置換であってもよい。

【0107】

本明細書で使用される場合、「ハロアルキル」は、水素原子のうちの一つ以上がハロゲンによって置換されるアルキル基を指す（例えば、モノハロアルキル、ジハロアルキル、トリハロアルキル、およびポリハロアルキル）。かかる基には、クロロメチル、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、1-クロロ-2-フルオロメチル、2-フルオロイソブチル、およびペンタフルオロエチルが含まれるが、これらに限定されない。ハロアルキルは、置換または非置換であってもよい。

【0108】

本明細書で使用される場合、「ハロアルコキシ」は、水素原子のうちの一つ以上がハロゲンによって置換されるアルコキシ基を指す（例えば、モノハロアルコキシ、ジハロアルコキシ、およびトリハロアルコキシ）。かかる基には、クロロメトキシ、フルオロメトキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、1-クロロ-2-フルオロメトキシ、および2-フルオロイソブトキシが含まれるが、これらに限定されない。ハロアルコキシは、置換または非置換であってもよい。

【0109】

本明細書で使用される場合、「アミノ」および「非置換アミノ」という用語は、 $-NH_2$ 基を指す。

【0110】

「モノ置換アミン」基は、本明細書に定義されるように、 R_A が、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシクリル（アルキル）であり得る、「 $-NHR_A$ 」基を指す。 R_A は、置換または非置換であってもよい。モノ置換アミン基は、例えば、モノ-アルキルアミン基、モノ- C_1-C_6 アルキルアミン基、モノ-アリールアミン基、モノ- C_6-C_{10} アリールアミン基等を含み得る。モノ置換アミン基の例としては、限定されるものではないが、 $-NH$ （メチル）、 $-NH$ （フェニル）などが挙げられる。

【0111】

「ジ置換アミン」基は、本明細書に定義されるように、 R_A および R_B が独立して、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシクリル（アルキル）であり得る、「 $-NR_AR_B$ 」基を指す。 R_A および R_B は独立して、置換または非置換とすることができる。ジ置換アミン基は、例えば、ジ-アルキルアミン基、ジ- C_1-C_6 アルキルアミン基、ジ-アリールアミン基、ジ- C_6-C_{10} アリールアミン基等を含み得る。ジ置換アミン基の例としては、限定されるものではないが、 $-N$ （メチル）₂、 $-N$ （フェニル）（メチル）、 $-N$ （エチル）（メチル）などが挙げられる。

【0112】

本明細書で使用される場合、「モノ置換アミン（アルキル）」基は、低級アルキレン基を介して置換基として接続された、本明細書に提供されるモノ置換アミンを指す。モノ置換アミン（アルキル）は、置換または非置換であってもよい。モノ置換アミン（アルキル）基は、例えば、モノ-アルキルアミン（アルキル）基、モノ- C_1-C_6 アルキルアミ

10

20

30

40

50

ン (C_1-C_6 アルキル) 基、モノアリアルアミン (アルキル基)、モノ C_6-C_{10} アリアルアミン (C_1-C_6 アルキル) 基等を含み得る。モノ置換アミン (アルキル) 基の例としては、限定されるものではないが、 $-CH_2NH$ (メチル)、 $-CH_2NH$ (フェニル)、 $-CH_2CH_2NH$ (メチル)、 $-CH_2CH_2NH$ (フェニル) などが挙げられる。

【0113】

本明細書で使用される場合、「ジ置換アミン (アルキル)」基は、低級アルキレン基を介して置換基として接続された、本明細書に提供されるジ置換アミンを指す。ジ置換アミン (アルキル) は、置換または非置換であってもよい。ジ置換アミン (アルキル) 基は、例えば、ジアルキルアミン (アルキル) 基、ジ C_1-C_6 アルキルアミン (C_1-C_6 アルキル) 基、ジアリアルアミン (アルキル基)、ジ C_6-C_{10} アリアルアミン (C_1-C_6 アルキル) 基等を含み得る。ジ置換アミン (アルキル) 基の例としては、限定されるものではないが、 $-CH_2N$ (メチル)₂、 $-CH_2N$ (フェニル) (メチル)、 $-CH_2N$ (エチル) (メチル)、 $-CH_2CH_2N$ (メチル)₂、 $-CH_2CH_2N$ (フェニル) (メチル)、 $-NCH_2CH_2$ (エチル) (メチル)、および類似のものが挙げられる。

【0114】

本明細書で使用される場合、用語「ジアミノ」は、「 $-N(R_A)R_B-N(R_C)(R_D)$ 」基を示し、式中、 R_A 、 R_C 、および R_D が独立して、本明細書に定義されるように、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリアル、ヘテロアリアル、ヘテロシクリル、シクロアルキル (アルキル)、アリアル (アルキル)、ヘテロアリアル (アルキル)、またはヘテロシクリル (アルキル) であり得、ここで R_B は二つの「N」基を接続し、かつ (R_A 、 R_C 、および R_D から独立して) 置換、または非置換アルキレン基であり得る。 R_A 、 R_B 、 R_C 、および R_D は独立して、さらに置換または非置換であり得る。

【0115】

本明細書で使用される場合、用語「ポリアミノ」は、「 $-(N(R_A)R_B)_n-N(R_C)(R_D)$ 」を示す。例示のために、ポリアミノという用語は、 $-N(R_A)$ アルキル $-N(R_A)$ アルキル $-N(R_A)$ アルキル $-N(R_A)$ アルキル $-H$ を含み得る。一部の実施形態では、ポリアミノのアルキルは、本明細書の他の箇所で開示されるとおりである。本実施例は4つの繰り返し単位のみを有するが、用語「ポリアミノ」は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の繰り返し単位からなり得る。 R_A 、 R_C 、および R_D は独立して、本明細書に定義されるように、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリアル、ヘテロアリアル、ヘテロシクリル、シクロアルキル (アルキル)、アリアル (アルキル)、ヘテロアリアル (アルキル)、またはヘテロシクリル (アルキル) であってもよく、ここで R_B は二つの「N」基を接続し、かつ (R_A 、 R_C 、および R_D から独立して) 置換、または非置換アルキレン基であり得る。 R_A 、 R_C 、および R_D は独立して、さらに置換または非置換であり得る。本明細書に記述されるように、ポリアミノは、介在するアルキル基を有するアミン基を含む (アルキルは本明細書の他の箇所で定義されるとおりである場合)。

【0116】

本明細書で使用される場合、用語「ジエーテル」は、「 $-OR_BO-R_A$ 」基を示し、式中、 R_A は、本明細書に定義されるように、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリアル、ヘテロアリアル、ヘテロシクリル、シクロアルキル (アルキル)、アリアル (アルキル)、ヘテロアリアル (アルキル)、またはヘテロシクリル (アルキル) であり得、ここで R_B は二つの「O」基を接続し、かつ置換、または非置換アルキレン基であり得る。 R_A は独立して、さらに置換または非置換であり得る。

【0117】

本明細書で使用される場合、用語「ポリエーテル」は、繰り返し $-(OR_B)_nOR_A$ 基を示す。例示のために、ポリエーテルという用語は、 $-O$ アルキル $-O$ アルキル $-O$ ア

10

20

30

40

50

ルキル- O アルキル- O R_A を含み得る。一部の実施形態では、ポリエーテルのアルキルは、本明細書の他の箇所で開示される通りである。本実施例は4つの繰り返し単位のみを有するが、用語「ポリエーテル」は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の繰り返し単位からなり得る。 R_A は、本明細書で定義されるように、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル（アルキル）、アリール（アルキル）、ヘテロアリール（アルキル）、またはヘテロシクリル（アルキル）であり得る。 R_B は、置換または非置換アルキレン基であり得る。 R_A は独立して、さらに置換または非置換であり得る。本明細書に記述されるように、ポリエーテルは、介在するアルキル基を有するエーテル基を含む（アルキルは本明細書の他の箇所で定義されるとおりであり、任意に置換され得る場合）。

10

【0118】

置換基の数が指定されていない場合（例えば、ハロアルキル）、一つ以上の置換基が存在してもよい。例えば、「ハロアルキル」は、同一または異なるハロゲンのうちの一つ以上を含み得る。別の例として、「 C_1-C_3 アルコキシフェニル」は、一つ、二つ、または三つの原子を含有する同一または異なるアルコキシ基のうちの一つ以上を含み得る。

【0119】

本明細書で使用される場合、ラジカルは、単一の不対電子を有する種を示し、その結果、ラジカルを含有する種は、別の種に共有結合され得る。したがって、この文脈において、ラジカルは必ずしもフリーラジカルではない。むしろ、ラジカルは、より大きな分子の特定の部分を示す。用語「ラジカル」は、用語「基」と互換的に使用することができる。

20

【0120】

整数の範囲が与えられるとき、範囲は、範囲内に入る任意の数と、範囲の末端を画定する数とを含む。例えば、用語「1～20の整数」が使用される場合、範囲に含まれる整数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10など、20まで、かつ20を含める。

【0121】

また本明細書で使用される場合、「および／または」は、関連する列挙された項目のうちの一つ以上の、任意のおよび全ての可能な組み合わせ、ならびに代替物（「または」）で解釈される場合の組み合わせの欠如を指し、それらを包含する。

【0122】

さらに、本明細書で使用される場合、用語「約」は、本発明の化合物または薬剤の量、用量、時間、温度などの測定可能値を指す際に、指定された量の $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、またはさらには $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味する。用語「本質的にからなる」（および文法的変異形）は、その通常の意味を有するものとし、また、言及される組成物または方法は、追加の成分が組成物または方法を著しく変更しない限り、追加の成分を含有し得ることをも意味するものとする。用語「からなる」（および文法的変異形）は、その通常の意味を有するものとし、また言及される組成物または方法は、追加の構成要素に対して閉じられていることをも意味するものとする。用語「含む」（および文法的変異形）は、その通常の意味を有するものとし、また言及される組成物または方法は、追加の構成要素を含有するように開かれていることをも意味するものとする。

30

40

【0123】

本開示の主題は、以下でより完全に説明される。しかしながら、前述の説明で提示された教示の利益を有する、本開示の主題が属する技術分野の当業者は、本明細書に記述される本開示の主題の多くの修正および他の実施形態を思いつくであろう。したがって、本開示の主題は、開示された特定の実施形態に限定されるべきではなく、修正および他の実施形態は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されることが理解されるべきである。言い換えれば、本明細書に記載される主題は、全ての代替物、修正、および等価物を網羅する。組み込まれた文献、特許、および類似の資料のうちの一つ以上が、本出願（定義された用語、用語の使用、説明された技術、または類似のものを含むがこれらに限定さ

50

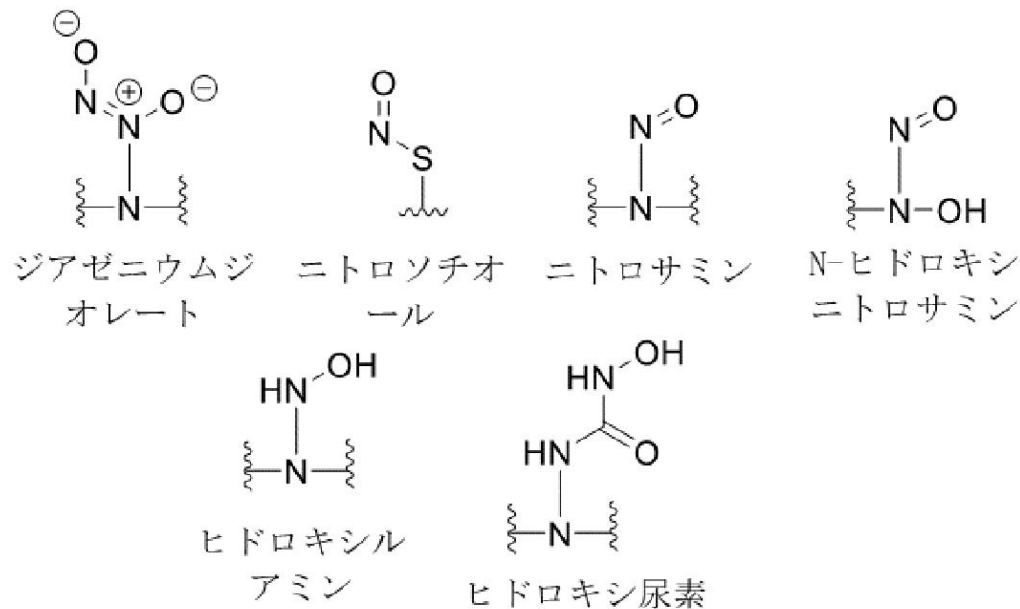
れない)と異なるか、または矛盾する場合、本出願を優先する。別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、この分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるすべての刊行物、特許出願、特許、およびその他の参考文献は、参照によりその全体が組み込まれる。

【0124】

一酸化窒素足場

内因的に産生される二原子フリーラジカルである一酸化窒素は、血小板凝集および粘着、血管拡張、創傷修復、免疫反応、血管新生の媒介、および発癌を含む多数の生物学的プロセスと関連している。NOの欠乏は、NOに関連する生理系のある程度の機能不全につながる可能性がある。外因性NO送達は、心血管疾患から抗菌療法および抗癌療法に及ぶ生物医学療法の解決のための有効な戦略でありうる。NO送達はまた、抗微生物活性を達成するためにも使用され得る。しかしながら、いくつかの実施形態において、治療としてのNO送達の困難さは、NO送達を制御するために、様々な合成NO供与体（例えば、N-ジアゼニウムジオレート、S-ニトロソチオール、金属ニトロシル、有機硝酸塩）の使用を必要なこととする。N-ジアゼニウムジオレート（NONOエート）は、生理学的条件下でのその良好な安定性とプロトン誘発性NO送達能力が理由で、NO供与体として有用であり得る。生物学的半減期が比較的短く（秒）、本質的に反応性である。本明細書に開示されるいくつかの実施形態では、NO供与体は、以下の一酸化窒素放出部分のうちのいずれか一つを含む。

【化26】



式中、

【化27】

~~~~~

は、構造内の他の原子への付着を示す（例えば、 $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}-$ などの任意の例）。一部の実施形態では、NO供与体は、N-ジアゼニウムジオレートNO供与体である。一部の実施形態では、NO供与体は、本明細書の他の箇所で開示されるように二級アミンで線状単位に沿って結合される。

#### 【0125】

制御されたNO貯蔵および放出が可能な足場の合成は、生理学におけるNOの役割をうまく利用するため、およびNOに基づいた治療を開発するために重要である。上述のNOの効果に加えて、NOはまた、ニトロソ化および／または酸化ストレスを介して細菌に作用する強力な抗菌剤でもある。NOは、広域スペクトル抗菌剤であり、一部の実施形態で

は、NOを送達する足場は、細菌およびバイオフィルムの両方を、主に、微生物DNAおよび／または膜構造に酸化およびニトロソ化損傷を引き起こす反応性NO副生成物（例えば、ペルオキシ亜硝酸および三酸化二窒素）の形成を通して、根絶することができる。有利なことに、NOがその抗菌効果を発揮する機構は広範囲であり、細菌が耐性を発生するリスクを減少させる。したがって、NO放出物質は、細菌感染と戦うための良好な標的であり得る。NO放出物質の抗菌有効性は、NOペイロードおよび関連する放出動態の両方に依存し得る。一部の例では、高いNO合計は、良好な足場の貯蔵能力を効果的に評価するための重要なパラメータである。さらに、本明細書に開示されるいくつかの実施形態において、高密度の二級アミン基は、特定の供与体に高いNO貯蔵能力を与える。しかしながら、NO放出が速すぎてNO貯蔵量が高すぎると、哺乳動物細胞に望ましくない毒性をもたらす場合がある。したがって、高いNO貯蔵量および低い細胞毒性を有する生体適合性NO放出物質を調製するための課題が存在し、そのような課題は、とりわけ、本明細書に開示されるいくつかの実施形態に従って対処される。

10

#### 【0126】

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、以下の利点のうちの一つ以上を有する：効率的で特有の合成経路、および結果として生じるポリマー構築物の化学組成。制御可能な量の二級アミンおよび多様な外部末端基（例えば、ヒドロキシル、メチル、ヒドロキシメチル、および一級アミン）が提供され得る。生成された一酸化窒素放出足場のNO貯蔵およびNO放出動態は、特定の用途に対して調整され得る。この調整は、いくつかの実施形態において、本明細書に開示される式の官能化モノマーの種類および／または数を変更することによって達成される。いくつかの実施形態では、例えば、異なる組成物を有する化合物によるなど、生成された一酸化窒素放出足場中のアミンの追加の官能化は、NO放出動態に対する制御をさらに可能にする。一部の実施形態では、二級アミン基は、N-ジアゼニウムジオレート（または他のNO担体基）の安定性に直接影響を与え、NO貯蔵および放出動態の両方に対する制御を可能にさせる。

20

#### 【0127】

本明細書の他の箇所に開示するように、一酸化窒素は、いくつかの重要な生物学的プロセスにおいて基本的な役割を果たすだけでなく、抗菌剤または抗癌剤としての機能も示す。本明細書の他の箇所に開示されるように、様々なNO供与体（例えば、N-ジアゼニウムジオレート、S-ニトロソチオール、金属ニトロシル、有機硝酸塩）を、制御された外因性NO送達に使用することができる。N結合ジアゼニウムジオレートは、その良好な安定性および容易な貯蔵のために魅力的であり、生理学的条件下でプロトン誘発解離を自発的に起こし、NOラジカルを再生成する。いくつかの実施形態において、バイオポリマーおよび糖由来ポリマー（例えば、キトサン、ヒアルロン酸、CMCなど）に由来する足場を含む、生体適合性N-ジアゼニウムジオレート修飾足場の調製および試験において、進歩が為されている。

30

#### 【0128】

現在の治療とは異なり、NO、内因的に産生されたフリーラジカルは、脂質過酸化、膜タンパク質のニトロソ化、および反応性酸素／窒素種（例えば、ペルオキシ亜硝酸、三酸化二窒素）を介したDNA損傷を含むがこれに限定されない様々な機構を使用して細菌を根絶する。複数の殺菌性機構により、NOは細菌耐性を育むリスクを大幅に減少させることができる。さらに、NOは、バイオフィルムマトリックスおよび粘液構造の両方を積極的に分解する改善された能力を有し、したがって、より効率的な殺菌作用および粘液線毛クリアランスを可能にする。

40

#### 【0129】

本明細書の他の箇所に開示されるように、本明細書に開示する一部の実施形態は、殺菌性作用を達成するためにNOを送達するためのポリマー足場の使用に関する。一部の実施形態では、ポリマー足場は、バイオポリマーに由来する。一部の実施形態では、足場および／またはバイオポリマーは、水溶性である。一部の実施形態では、足場および／またはバイオポリマーは、生分解性である。いくつかの実施形態において、ポリマー足場は、米

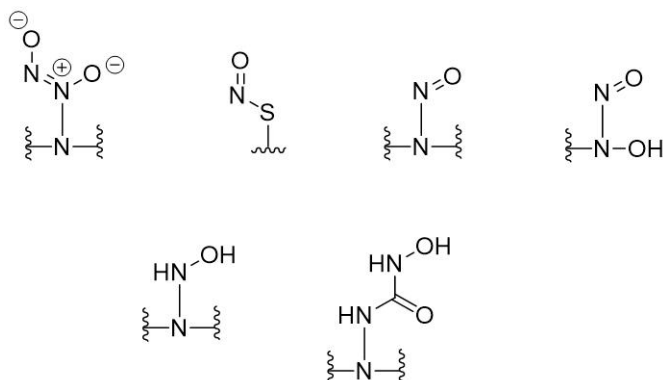
50

国特許出願第 62 / 737, 603 号（これは参照によりその全体がすべての目的のために組み込まれる）に開示されているような、超分岐構造である。いくつかの実施形態では、足場は粘度増強剤である。

#### 【0130】

いくつかの実施形態では、足場、ポリマー、ポリマーの混合物などは、ポリマーの鎖に沿って構造単位（例えば、繰り返し単位など）を有する。いくつかの実施形態において、一つ以上の構造単位は、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、および  $R_6$  のそれぞれの一つ以上の例で官能化される。いくつかの実施形態において、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、および  $R_6$  の各例は独立して、 $-OH$ 、 $NH_2$ 、 $OCH_3$ 、 $C(O)OH$ 、 $CH_2OH$ 、 $CH_2OCH_3$ 、 $CH_2OCH_2CH_2OH$ 、 $OCH_2C(O)OH$ 、 $CH_2OCH_2C(O)OH$ 、 $CH_2C(O)OH$ 、 $NHC(O)CH_3$ 、 $C(O)O((CH_2)_aO)_bH$ 、 $C(O)O((CH_2)_aO)_b(CH_2)_cH$ 、 $-C(O)O(C_{1-5}\text{アルキル})$ 、 $C(O)NH((CH_2)_dNH)_eH$ 、 $C(O)NH((CH_2)_dNH)_e(CH_2)_fH$ 、 $C(O)X^1((CH_2)_gX^2)_h(CH_2)_iH$ 、 $C(O)X^1((CH_2)_gX^2)_h((CH_2)_jX^3)_k(CH_2)_lH$ 、 $O((CH_2)_aO)_bH$ 、 $O((CH_2)_aO)_b(CH_2)_cH$ 、 $O(C_{15}\text{alkyl})$ 、 $NH((CH_2)_dNH)_eH$ 、 $NH((CH_2)_dNH)_e(CH_2)_fH$ 、 $X^1((CH_2)_gX^2)_h(CH_2)_iH$ 、 $X^1((CH_2)_gX^2)_h((CH_2)_jX^3)_k(CH_2)_lH$  からなる群から選択され、式中、 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $d$ 、 $e$ 、 $f$ 、 $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、および  $l$  は独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 の整数から選択され、式中、 $X^1$ 、 $X^2$ 、および  $X^3$  の各例は独立して、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $C(O)NH-$  から選択され、および式中、 $X^1$ 、 $X^2$ 、および  $X^3$  の少なくとも一つの例は、以下の NO 供与基の一つによって表される。

#### 【化 28】



#### 【0131】

例えば、一つ以上のヒドロキシル、アミノ、またはカルボキシル官能基を有する非誘導体化ポリマー鎖は、それらの官能基を介して官能化および／または誘導体化され、例えば、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、および  $R_6$  のうちの一つ以上を添加することができる。したがって、本開示の方法は、ポリマー鎖からのこれらの官能基ペンダントのうちの一つ以上を有する任意の生体適合性ポリマーに適用可能である。いくつかの実施形態では、ポリマーはバイオポリマーである。いくつかの実施形態では、ポリマーは生分解性ポリマーである。いくつかの実施形態では、ポリマーは多糖類である。いくつかの実施形態では、多糖類は、キトサン、ヒアルロン酸、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロース、セルロース、アルギネート、シクロデキストリン、アミノグリコシド、または他の多糖類に由来するポリマーを含む。いくつかの実施形態では、多糖類は、以下の構造のうちの一つ以上を含む：

10

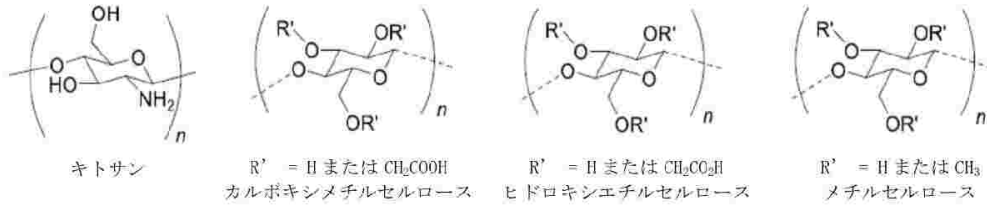
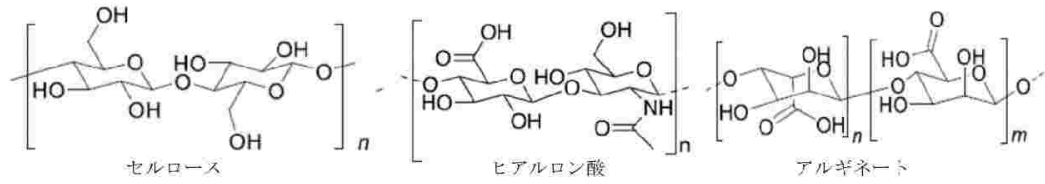
20

30

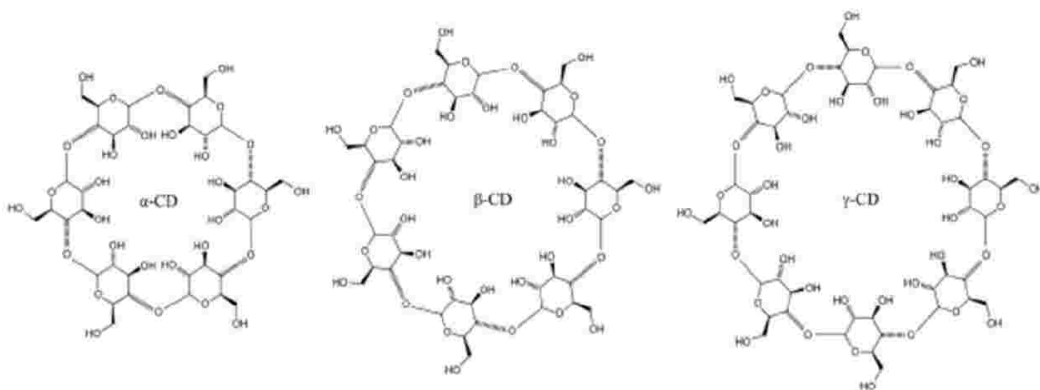
40

50

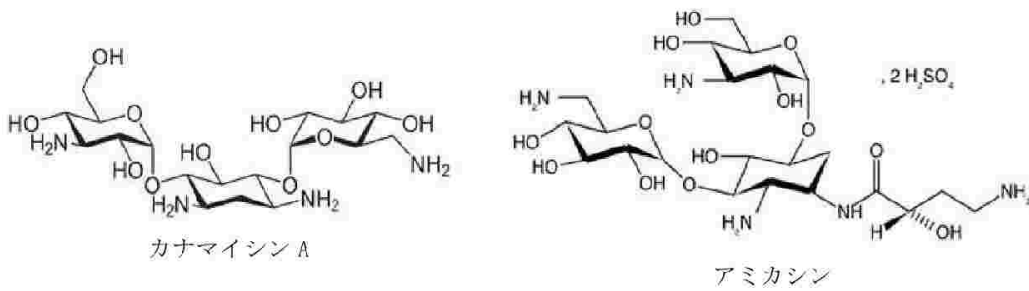
## 【化 2 9】



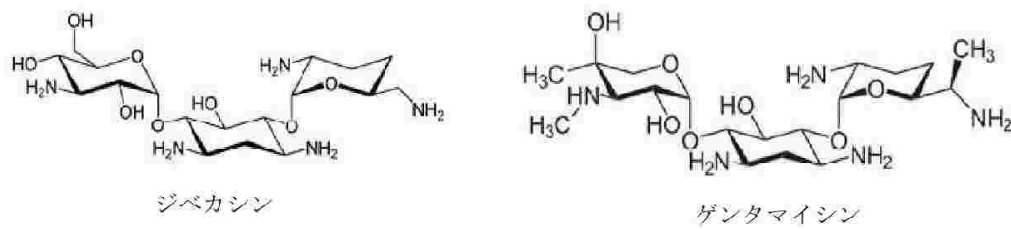
10



20



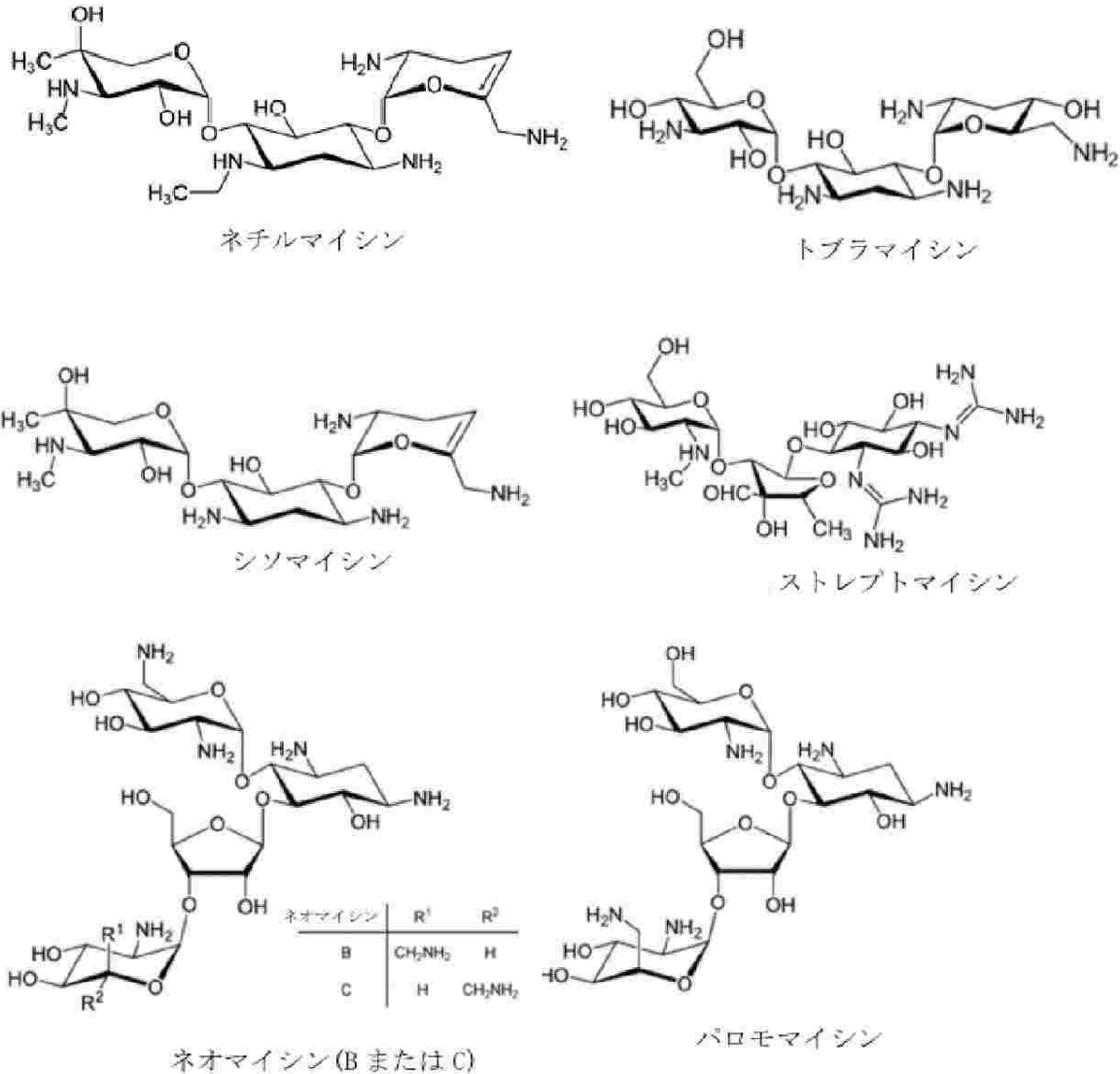
30



40

50

## 【化 3 0】

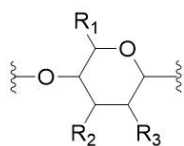


上に示されるヒドロキシル、アミノ、またはカルボキシル官能基の任意の一つ以上が、それらの官能基を介して官能化または誘導体化され、例えば、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、およびR<sub>6</sub>のうちの一つ以上を添加することができる。一部の実施形態では、アミノグリコシドのアミノ基のうちの一つを、連結単位(WO/2018/178902として公開されたPCT/IB2018/052144に開示され、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)で官能化して、巨大分子構造を調整することができる。

## 【0132】

いくつかの実施形態では、足場および／またはNO放出ポリマー系は、式Iによって表される一つ以上の構造単位を含む。

## 【化 3 1】



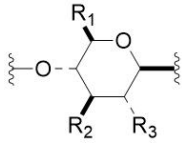
式 I

## 【0133】

いくつかの実施形態において、式Iによって表される構造単位は、セルロースポリマーのサッカライド単位、ヒアルロン酸ポリマーのサッカライド単位、アルギネートポリマー

のサッカライド単位、キトサンポリマーのサッカライド単位、カルボキシメチルセルロースポリマーのサッカライド単位、ヒドロキシエチルセルロースポリマーのサッカライド単位、メチルセルロースポリマーのサッカライド単位、および／またはシクロデキストリン環構造のサッカライド単位のうちの一つ以上を表す。いくつかの実施形態では、式Ⅰは、式Ⅰ' に示される立体化学的配置を有する。

【化 3 2】



10

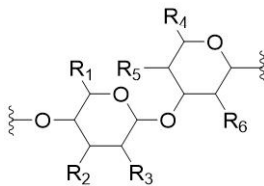
式Ⅰ'

および、足場のポリマーはカルボキシメチルセルロースを含む。

【0134】

いくつかの実施形態では、足場および／またはNO放出ポリマー系は、式ⅠⅠによって表される一つ以上の構造単位を含む。

【化 3 3】



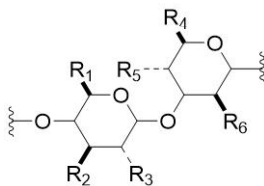
20

式ⅠⅠ

【0135】

いくつかの実施形態では、式Ⅰによって表される構造単位は、セルロースポリマーのサッカライド単位、ヒアルロン酸ポリマーのサッカライド単位、および／またはアルギネートポリマーのサッカライド単位のうちの一つ以上を表す。いくつかの実施形態では、式ⅠⅠは、式ⅠⅠ' に示される立体化学的配置を有する：

【化 3 4】



30

式ⅠⅠ'

および、足場のポリマーはヒアルロン酸を含む。

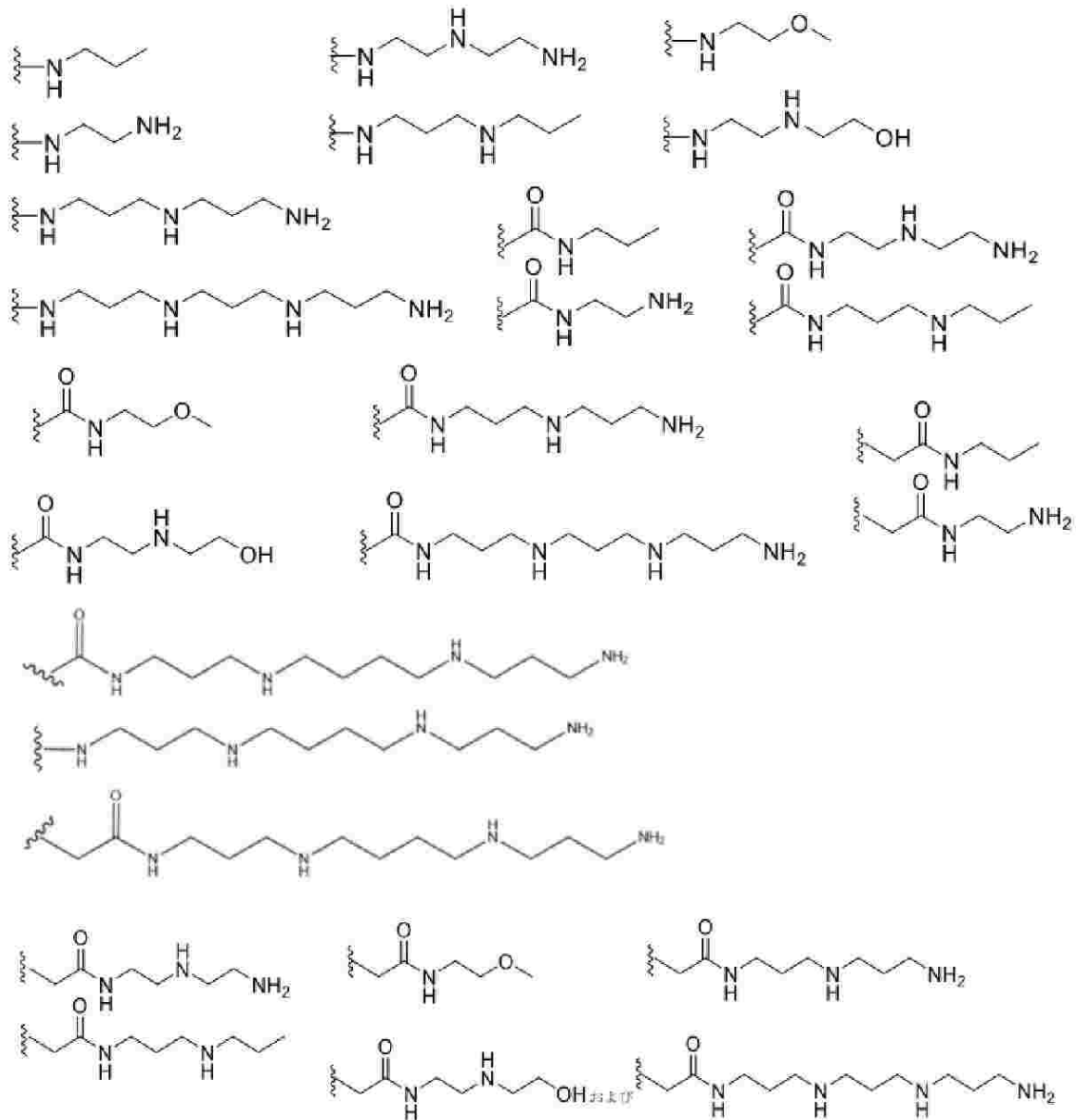
【0136】

いくつかの実施形態では、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、およびR<sub>6</sub>の各例は独立して、以下からなる群から選択される。

40

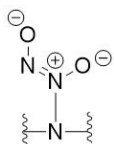
50

## 【化 3 5】



一部の実施形態では、二級アミンのいずれか一つは、例えば以下を含んで、NO 供与部分として官能化され得る。

## 【化 3 6】



## 【0 1 3 7】

## 特性

いくつかの実施形態において、様々な構造単位（例えば、繰り返し単位）、（様々な部分を有する）構造単位の官能化、架橋のレベル（架橋されている場合）、分子量、濃度、または開示された足場のその他の化学的特徴が、本明細書に開示される足場の特性の調整可能性に寄与する。いくつかの実施形態では、これらの特徴のうちの一つ以上を変更することによって、足場の特性の一つ以上を調整することができる。いくつかの実施形態では、NO 放出速度、抗微生物効果、水溶性、分解速度、粘度、ゲルの硬さ（足場がゲルを形成する場合）、粘弾性、係数などは、調整可能である。

## 【0138】

いくつかの実施形態では、ポリマーおよびまたはそこから調製される組成物の特性は、使用されるポリマーの分子量を調節することによって調整することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるポリマーのkDaにおける重量平均分子量( $M_w$ )は、約2.5、5.0、7.0、10、15、30、50、100、200、500、750、1,000、2,000、10,000、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるポリマーのkDaにおける数平均分子量( $M_n$ )は、約2.5、5.0、7.0、10、15、30、50、90、100、200、500、700、1,000、2,000、10,000、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるポリマーは、n個の繰り返し単位を有してもよい。いくつかの実施形態では、nは、約10、25、50、100、250、500、1000、2500、5000、10000、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値に及ぶ範囲以上である。いくつかの実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を使用して、本明細書に開示される足場構造の分子量を測定することができる。いくつかの実施形態では、多角度光散乱(SEC-MALS)検出器を使用することができる。いくつかの実施形態において、足場構造は、その多分散指数を使用して特徴付けることができる。多分散指数(PDI)は、所与のポリマー試料中の分子量の分布の尺度である。PDIは、重量平均分子量および数平均分子量を分けることによって計算することができる。いくつかの実施形態において、足場構造は、約1.05、1.1、1.2、1.3、1.5、1.7、1.8、1.9、2.0、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上のPDIを有する。

10

20

## 【0139】

いくつかの実施形態では、ポリマー（またはポリマーの混合物）は、水溶性および／または相互に混和性であってもよい。いくつかの実施形態において、足場は、約1mg/ml、10mg/ml、20mg/ml、50mg/ml、100mg/ml、200mg/ml、300mg/ml、400mg/ml、500mg/ml、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上の濃度で、水（約20℃）に可溶性である。

## 【0140】

いくつかの実施形態によれば、異なるNO担持ポリマーを組み合わせ、約100μg/ml以上の濃度を含む水溶液を調製することができ、またさらに高濃度、例えば、約1mg/ml、約5mg/ml、約10mg/ml、約20mg/ml、または約40mg/ml以上などとしてすることができる。水性組成物中の第二のポリマーの量は、第一のポリマーの重量に基づいて、少なくとも約10重量%とすることができ、より高くてもよい（例えば、同じ基準で、少なくとも約20重量%、少なくとも約30重量%、または少なくとも約50重量%）。水性組成物中のポリマーは、ポリマーが相互に混和性であるように選択される。上述のように、抗微生物活性を有する第一のポリマーおよび抗微生物活性を有する第二のポリマーは、目に見える検査で、各ポリマーの1mg/mlの濃度で、水に、室温で混合および維持してから24時間後に、ポリマー成分の少なくとも約90%が相互に可溶性のままである場合、相互に混和性があるとみなされる。驚くべきことに、本明細書に記載の1mg/mlの濃度および分子量で、水溶液中のポリマーの典型的な相互不適合性に起因する相分離の予想にもかかわらず、水ポリマーのこのような相互混和性を達成することができる。本明細書に記載の水性組成物は、個々のポリマー成分を、例えば、室温で攪拌しながら、水と混合することによって調製することができる。

30

40

## 【0141】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるポリマー（またはポリマーの混合物など）は、粘性流体および／またはゲルに特徴的な特性を有する。いくつかの実施形態において、ポリマー（またはポリマーの混合物など）は、室温で（水またはPBS中で）、約0.5%、1%、2.5%、5%、10%、あるいは前述の値を含むおよび／または前述

50

の値全体に及ぶ範囲以下の濃度（ $w/w\%$ で）のゲル化点を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー（またはポリマーの混合物など）は、水中のゲル化点を有し得る。いくつかの実施形態において、ポリマーは、約 $0.5\text{ mg/ml}$ 、 $1\text{ mg/ml}$ 、 $10\text{ mg/ml}$ 、 $20\text{ mg/ml}$ 、 $50\text{ mg/ml}$ 、 $100\text{ mg/ml}$ 、 $250\text{ mg/ml}$ 、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上の濃度で、水中で（約 $20^\circ\text{C}$ ）ゲル化する。いくつかの実施形態において、 $5\%w/w$ の濃度の溶液で、ポリマーは、約 $10$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $1,000$ 、 $2,000$ 、 $5,000$ 、 $10,000$ 、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上の粘度（ $\text{cPa}\cdot\text{s}$ で、 $20^\circ\text{C}$ で）を有する。いくつかの実施形態において、ポリマーは、約 $0.5\text{ m}^3/\text{kg}$ 、 $1.0\text{ m}^3/\text{kg}$ 、 $2.0\text{ m}^3/\text{kg}$ 、 $4.0\text{ m}^3/\text{kg}$ 、 $8.0\text{ m}^3/\text{kg}$ 、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上の固有粘度を有する。

10

#### 【0142】

いくつかの実施形態において、 $5\%w/w$ の濃度の溶液で、ポリマーは、約 $1.0\text{ mN}$ 、 $2.5\text{ mN}$ 、 $5\text{ mN}$ 、 $10\text{ mN}$ 、 $15\text{ mN}$ 、 $20\text{ mN}$ 、 $30\text{ mN}$ 、 $50\text{ mN}$ 、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上の硬さを有する。いくつかの実施形態において、 $5\%w/w$ の濃度の溶液で、ポリマーは、約 $1.0$ 、 $2.5$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $15$ 、 $20$ 、 $30$ 、 $50$ 、 $100$ 、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上の付着仕事量（ $\text{mN}\cdot\text{mm}$ ）を有する。いくつかの実施形態において、 $5\%w/w$ の濃度の溶液で、ポリマーは、約 $250$ 、 $500$ 、 $1,000$ 、 $2,000$ 、 $4,000$ 、 $5,000$ 、 $10,000$ 、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上の、パスカル（ $\text{Pa}$ ）での貯蔵弾性率（ $G'$ ）を有する。いくつかの実施形態において、 $5\%w/w$ の濃度の溶液で、ポリマーは、約 $25$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $200$ 、 $400$ 、 $500$ 、 $1,000$ 、 $2,000$ 、 $5,000$ 、 $10,000$ 、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上の、パスカル（ $\text{Pa}$ ）での弾性係数（ $G''$ ）を有する。いくつかの実施形態では、水性組成物は、 $40\text{ mg/ml}$ 以下の総足場濃度で $2\text{ log}$ 超のアニオン性染料の拡散速度の減少によって測定されるように、バリア活性によって特徴付けられる。

20

#### 【0143】

いくつかの実施形態において、ゲルは、様々な温度 $20^\circ\text{C}$ （例えば、 $40^\circ\text{C}$ 、 $45^\circ\text{C}$ 、 $55^\circ\text{C}$ 、 $60^\circ\text{C}$ 、 $80^\circ\text{C}$ 、など）で安定であり、長期にわたる貯蔵期間（例えば、 $10$ 時間、 $20$ 時間、 $22$ 時間、 $25$ 時間、 $30$ 時間など、日、例えば $1$ 日、 $3$ 日、 $5$ 日、 $6$ 日、 $7$ 日、 $15$ 日、 $30$ 日、 $45$ 日など、週、例えば $1$ 週間、 $2$ 週間、 $3$ 週間、 $4$ 週間、 $6$ 週間、 $8$ 週間など、月、例えば $1$ か月、 $2$ か月、 $3$ か月、 $4$ か月、 $5$ か月、 $6$ か月などまたはさらには年（ $1$ 年以上））に対しても安定である。

30

#### 【0144】

いくつかの実施形態では、組成物の粘度は、上述のように、温度上昇と共に増加する。いくつかの実施形態では、組成物の粘度は、温度の低下と共に減少する。例えば、組成物がゲル化温度を上回る場合、組成物は、ゲルの形態においてのように、比較的高い粘度を有する。いくつかの実施形態において、組成物がゲル化温度を下回るまで冷却される場合、組成物は、液体の形態においてのように、粘度が減少する。いくつかの実施形態において、そのように、本明細書に開示されるポリマーは、可逆ポリマー（例えば、熱可逆性ポリマー）であってもよく、液体からゲルへの遷移は、適切な条件に曝露したときに逆転し得る。例えば、上述のように、本開示の組成物は、熱可逆性ポリマーを含み、組成物の粘度は、組成物の温度に応じて変化し得る。いくつかの実施形態において、粘度の調整可能性は、送達にあたり調整された組成物プロファイル（例えば送達温度ではより流動的、例えば、体温ではより粘性）を可能にする。

40

#### 【0145】

いくつかの実施形態において、ポリマーは、水に曝露された場合のある程度の膨張によって特徴付けられる。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリマーの膨張率％は、約 $100$ 、 $250$ 、 $500$ 、 $1,000$ 、 $2,000$ 、 $5,000$ 、あるいは前述の値

50

を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上である。言い換えれば、ポリマーは、2倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、またはそれ以上に膨張、あるいは拡張し得る。

#### 【0146】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるポリマーは、例えばヒトの体温、37℃と同様の、対象の正常な体温と同様のゲル化温度を有する。ゲル化温度とは、弾性係数のプロットと粘性係数のプロットとの間の交点を意味する。一部の事例では、組成物がゲル化温度を下回る場合、組成物は、液体の形態など、比較的低い粘度を有する。一部の例では、組成物がゲル化温度を上回る場合、組成物は粘度が増大し（例えば、重合し）、その結果、組成物はゲルの形態となる。液体からゲルに遷移する組成物は、例えば、ゲル化温度を下回る温度で低粘度（例えば、液体）組成物の注射を促進することによって、組成物の対象への投与を容易にし得る。組成物の標的治療部位への注射後、組成物の温度は、周囲の体組織からの熱の吸収によって上昇し得、その結果、組成物が粘度を増加し（例えば、液体からゲルへ遷移する、または重合する）、それによって、標的治療部位で体組織に構造的および／または幾何学的支持を提供する。一部の例では、標的治療部位での組成物のゲル化はまた、治療部位から離れて組成物が拡散および／または移動するのを低減することによって、治療部位での組成物の保持を促進しうる。特定の実施形態では、組成物は、35℃～40℃を含む、例えば32℃～40℃などの、30℃～40℃のゲル化温度を有する。特定の例では、組成物は、37℃のゲル化温度を有する。

#### 【0147】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、約0.25、0.4、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上のNO貯蔵能力（ $\mu\text{mol NO/mg}$ ポリマー）を有する、NO放出ポリマーを提供する。一部の実施形態では、実施例に記載されるPBS緩衝液に添加されてから2時間以内に、NO放出ポリマーは、それらの結合されたNOの総重量%の、約25%、50%、75%、85%、90%、95%、100%、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上を放出する。いくつかの実施形態において、バイオフィルムを低減または除去するための使用におけるNO放出は、例えば、結合されたNOの総重量%の、約20～25%、約30～50%、約60～75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲、など、類似の量で発生する。

#### 【0148】

一部の実施形態では、NO放出は、約0.01時間、0.1時間、0.25時間、0.5時間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、10時間、15時間、20時間、24時間、36時間、48時間、60時間、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲にわたって発生し得る。いくつかの実施形態では、NO放出半減期は、約0.01時間、0.1時間、0.25時間、0.5時間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、10時間、15時間、20時間、24時間、36時間、48時間、60時間、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以上である。一部の実施形態では、NO放出は、約0.01時間、0.1時間、0.25時間、0.5時間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、10時間、15時間、20時間、24時間、36時間、48時間、60時間、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以下にわたって発生し得る。一部の実施形態では、ニトロサミンは、NO放出中に存在しない。本明細書で使用される場合、「ニトロサミンは存在しない」という語句は、UV-visスペクトルによって（または当技術分野で認められた他の方法によって）判定されるようには検出できないニトロサミンのレベルを指す。

#### 【0149】

一部の実施形態では、本開示の組成物の本開示の足場および／またはポリマーは、約0.2%、0.5%、1.0%、1.5%、2.5%、5.0%、10%、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体及ぶ範囲以下の、アミラーゼ酵素曝露アッセイにお

ける1時間当たりの分解速度を有する。

#### 【0150】

一部の実施形態では、本開示の官能化NO放出ポリマーは、抗微生物活性を有する。一部の実施形態では、本開示の官能化NO放出ポリマーは、緑膿菌、スタフィロコッカス・アウレウス、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*S. aureus* *P. gingivalis*)、アグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンス、アクチノミセス・ビスコーサス、および／またはストレプトコッカス・ミュータンスのうちの一つ以上に対して、約8mg/ml、6mg/ml、4mg/ml、2mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以下のポリマー濃度で、2時間にわたる静的条件下で実施される細菌生存可能性アッセイにおいて90%以上の細菌減少を提供する。一部の実施形態では、本開示の官能化NO放出ポリマーは、約8mg/ml、6mg/ml、4mg/ml、2mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以下のポリマー濃度で、グラム陽性細菌に対して、2時間にわたって静的条件下で実施される細菌生存可能性アッセイにおいて、99%以上の細菌減少および／または2～3logの減少をもたらす。一部の実施形態では、本開示の官能化NO放出ポリマーは、約8mg/ml、6mg/ml、4mg/ml、2mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以下のポリマー濃度で、グラム陰性細菌に対して、2時間にわたって静的条件下で実施される細菌生存可能性アッセイにおいて、99%以上の細菌減少および／または2～3logの減少をもたらす。いくつかの実施形態では、細菌の減少は、95%超、98%超、または99%超である。

#### 【0151】

##### 架橋

架橋は、一つのポリマー鎖を別のポリマー鎖に連結する結合である（例えば、共有結合またはイオン結合によって）。一部の実施形態では、架橋することができるポリマーは、概して、主鎖からの分岐を示す。カルシウムカチオンなどの架橋剤の存在下で、同じまたは異なる鎖からの負に荷電された分岐は、正のカチオンに引き付けられる。鎖と一緒に結合する分岐は、「架橋」と呼ばれる。ポリマー鎖が架橋によって互いに連結されると、それらは、個々のポリマー鎖として動く能力の一部を失う可能性がある。例えば、液体ポリマー（鎖が自由に流れている）は、鎖と一緒に架橋することによって、「固体」または「ゲル」に変換することができる。この説明は、アルギン酸ナトリウムなどのアニオン性ポリマーが塩化カルシウムと架橋されている場合に適用される。アルギン酸ナトリウムは溶液中で維持され得るが、塩化カルシウムの添加は、アルギネート鎖をカルシウムカチオンと凝集または架橋させ、それによって固定化された生成物を形成する。実施形態に応じて、他の架橋剤も使用され得る。概して固定化された生成物はまた、活性剤など、存在する可能性のある他の物質を概して固定してもよい。

#### 【0152】

一部の実施形態では、架橋は、熱、圧力、pHの変化、または放射線によって開始される化学反応によって形成され得る。例えば、非重合または部分的に重合された樹脂を、架橋試薬と呼ばれる特定の化学物質と混合すると、架橋を形成する化学反応が生じ得る。また、架橋は、電子ビーム曝露、ガンマ線照射、またはUV光などの放射線源への曝露を通して、通常熱可塑性である物質に誘導され得る。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリマーは、構造を共有結合的に架橋するために、複数の電荷を有する塩または多機能化合物を使用して架橋することができる（例えば、ジアミン、トリアミン、ジカルボン酸、ジエポキシドなど）。

#### 【0153】

本明細書に開示される実施形態の一部で使用される試薬である塩化カルシウムは、単純なイオン結合の例を提供する。カルシウム (Ca) と塩素 (Cl) が組み合わせられると、カルシウム原子はそれぞれ二つの電子を失い、カチオンを形成し ( $\text{Ca}^{2+}$ )、塩素原子はそれぞれ一つの電子を得てアニオンを形成する ( $\text{Cl}^-$ )。次いで、これらのイオンは

、1：2の比率で互いに引き寄せられて、塩化カルシウム（ $\text{CaCl}_2$ ）を形成する。使用される材料に応じて、その他のカチオン対アニオン比も可能である。一部の実施形態では、他の多価カチオンなど他の適切な金属はもちろん、塩化カルシウム以外のカルシウム塩も使用してもよい。同様に、アルギン酸ナトリウム以外のアルギネートも、アルギン酸カリウムおよびアルギン酸アンモニウムなど、使用され得る。さらに、架橋は、アルギネート以外の物質（例えば、多糖類）と共に使用され得る。一部の実施形態では、止血用途に適した結合材を形成するために、静電的に架橋する物質が使用され得る。一部の実施形態では、アルギネートの少なくとも一部が水溶性となるように、変換されたアルギネート、すなわち、部分的にナトリウム含有量を有する主にアルギン酸カルシウムである物質を利用することが望まれ得る。

10

#### 【0154】

ハイドロゲルは、多糖類鎖に沿って存在する化学的部分に従って選択される適切な架橋剤を使用して、各ポリマーを架橋することによって合成することができる。一部の実施形態では、アミン含有ポリマーは、単純なカップリング反応（例えば、EDCによる、など）によって、カルボン酸含有ポリマーと架橋され得る。例えば、ヒアルロン酸ハイドロゲルおよびカルボキシメチルセルロースハイドロゲルは、例えば、EDC化学を利用して、同じ化学経路に従って合成することができる。基本的に、多糖類のカルボン酸基と1，3-ジアミノプロパン（DAP）-架橋剤-の一級アミンとの間のアミド結合は、EDCの存在により形成することができる。架橋剤であるDAPを、ポリマーのカルボン酸のモルに対して、ならびにEDCおよびNHSモルに対して0.5のモル比で混合物に添加することができる。

20

#### 【0155】

##### 組成物

いくつかの実施形態では、ポリマーは、水性ゲルとして、例えば、局所的に投与される。いくつかの実施形態では、ゲルは、一つ以上の塩を含み、等張性である。いくつかの実施形態において、組成物は、例えば、結合剤（例えば、アルファ化メイズデンブ、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、充填剤（例えば、ラクトース、微結晶性セルロースまたはリン酸水素カルシウム）、潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ）、崩壊剤（例えば、ジャガイモデンブまたはデンプングリコール酸ナトリウム）、または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）など、薬学的に許容可能な賦形剤を用いた、従来の技術によって調製された錠剤またはカプセルの形態をとることができる。錠剤は、当該技術分野で公知の方法によってコーティングされ得る。例えば、治療剤は、ヒドロクロロチアジドと組み合わせて、また、標的器官に到達するまで治療剤を保護する腸溶性または遅延放出コーティングを有するpH安定化コアとして、製剤化されてもよい。

30

#### 【0156】

いくつかの実施形態では、組成物は、特定の比（w/w）を有する二つ以上のポリマーを含む。一部の事例では、比（w/w）は、1：10、または1：9、または1：8、または1：7、または1：6、または1：5、または1：4、または1：3、または1：2、または1：1、または2：1、または3：1、または4：1、または5：1、または6：1、または7：1、または8：1、または9：1、または10：1である。例えば、比（w/w）は、1：1～10：1の範囲、例えば、3：1～10：1、または4：1～10：1、または4：1～9：1、または4：1～8：1、または4：1～7：1、または4：1～6：1を含む、2：1～10：1などであってもよい。特定の実施形態では、比（w/w）は5：1である。次いで、これらのポリマーを、水溶液中に相互に溶解して、ゲルまたは溶液を提供することができる。いくつかの実施形態において、混合物の各ポリマーは、約1mg/ml、10mg/ml、20mg/ml、50mg/ml、100mg/ml、250mg/ml、あるいは前述の値を含むおよび／または前述の値全体に及ぶ範囲以下の濃度で提供される。

40

#### 【0157】

50

## 使用方法

創傷治癒、一般手術、および整形外科手術の分野における満たされていないニーズは、ゲルを形成することができ、必要な速度でNOを放出することができ、所望の時間枠中に分解することができる抗微生物材料に対するものである。この調整された分解速度は、各特定の状態の治癒サイクルに適合するようにされてもよく、および／または創傷の感染のリスクが高い時期に適合するようにされてもよい。これらの状態の例としては、ほんの数例挙げるとすれば、ヘルニアの治療、糖尿病性足潰瘍の治癒、腱の整形外科的修復などの処置がある。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される化合物および材料は、調整可能な分解時間を有する組成物を目標とする。

### 【0158】

一部の実施形態は、本明細書に記載のポリマーのいずれかを組織欠損に、組織欠損の上に、または組織欠損の中へと位置付けることを含む、組織欠損を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、組織欠損は創傷である。いくつかの実施形態は、創傷を治療する方法、組織修復を実施する方法、および／または組織および器官の補填を提供する方法を提供する。いくつかの実施形態において、組織欠損の治療、創傷の治療、および／または組織の補填および置換の第一の工程は、組織欠損の救済および治癒、創傷の治癒、または組織補填を必要としている状態を助けるための抗微生物性足場を必要とする患者を特定することを伴う。

### 【0159】

抗微生物性足場を必要とする患者の非限定的なリストは、組織欠損を患う患者を含む。いくつかの実施形態において、抗微生物性足場を必要とする患者は、熱傷、皮膚潰瘍、裂傷、弾丸穴、動物咬傷、および感染症を起こしやすい他の創傷からの創傷を含む創傷を患う。抗微生物ポリマーはまた、糖尿病性足潰瘍、静脈性下肢潰瘍、褥瘡、切断部位、他の皮膚外傷、または他の創傷または病気の治療に使用することができる。抗微生物性足場を必要とする患者には、腱、靱帯、筋膜、および硬膜の修復および補填を必要とする患者も含まれる。分解性抗微生物ポリマーは、以下に限定されないが、回旋腱板の修復、アキレス腱の修復、脚または腕の腱または靱帯の修復（例えば、断裂したACL）、膈脱出の修復、尿失禁のための膀胱スリング、手術後の乳房再建、ヘルニアの治療、ステープルまたは縫合線の補強、肥満手術の修復、骨盤底の再建、硬膜修復、歯肉修復、骨移植および再建を含む処置で、補填組織において使用され得る。さらに、抗微生物性足場を必要とする患者は、組織または器官の置換を必要とする患者も含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗微生物ポリマーは、充填剤として、および／または人工細胞外マトリックスとして作用することによって組織を補填および／または置換するために使用することができる。こうした用途では、抗微生物性足場を使用して、細胞および組織の成長を支持することができる。簡潔に述べると、細胞は、患者または生存可能な宿主から採取され、インビボまたはエキスピボのいずれかで抗微生物性足場上に播種され得る。その後、患者の天然組織が材料に侵入すると、それは分解するように調整され、細菌感染していない天然起源の組織および細胞のみが残る。

### 【0160】

いくつかの実施形態において、用途にはまた、局所部位への治療用分子の送達、接着剤または密閉剤として、および関節保護薬としての使用、ならびにとりわけ、創傷治癒においての使用が含まれる。安定化された組成物はまた、組織充填剤、皮膚充填剤、骨充填剤、バルク剤、例えば尿道または食道のバルク剤、ならびに塞栓剤として、ならびに軟骨の欠損／損傷を修復するための薬剤、および骨の修復および／または成長を強化するための薬剤として使用され得る。いくつかの実施形態において、抗微生物性足場は、例えば空隙内になど、患者の中または上に配置され空隙を充填し得る。

### 【0161】

いくつかの実施形態において、損傷した組織を修復するためのポリマーが提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、対象における標的治療部位への投与のために処方される。例えば、組成物は、対象の損傷した、または感染した組織への投与を容易にするた

10

20

30

40

50

めに処方されてもよい。

#### 【0162】

いくつかの実施形態では、組成物（例えば、抗微生物性足場）の投与後、組成物は、対象における周囲の体組織から熱を吸収することによって温度を上昇させ得る。いくつかの実施形態では、対象の体温は、組成物の粘度（例えば、液体からゲルへの遷移）を増加させるのに十分な温度である。いくつかの実施形態において、粘度の増加（例えば、ゲル化）は、心臓組織（例えば、梗塞領域の心臓組織）などの体組織に構造的および／または幾何学的支持を提供するのに十分な3次元ネットワークを生じさせ得る。いくつかの実施形態では、注射器またはカテーテルを使用して組成物をインビボで注入してもよい。いくつかの実施形態では、組成物は、治療部位に直接注入されてもよく、または注入前に組成物の粘度を増加させるために、注射器内で部分的に予熱も可能であり得る。いくつかの実施形態において、予熱された製剤は、より少ない粘性組成物が注射後に対象組織領域から拡散および／または移動し得る可能性を低減し得る。

10

#### 【0163】

虫歯（例えば、齲蝕）は、大部分の先進国において、60%～70%の学齢期の子供および成人の大多数に影響を及ぼす別の重要な疾患状態である。世界中で、全人口の11%が重度の歯周炎に罹患しており、これは歯の喪失および、冠状動脈性、心血管性、脳卒中、有害な妊娠転帰などの系統的疾患（systematic diseases）を引き起こす。口腔の700超の微生物のうち、齲蝕原性細菌（例えば、ストレプトコッカス・ミュータンス、アクチノマイセス・ビスコース）および歯周病原性細菌（例えば、ポルフィロモナス・ジンジバリス、アグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンス）は、口腔疾患の開始および進行において主要な役割を果たす。口腔疾患は、ヒトが直面する最もよく見られる健康問題のひとつである。グラム陽性の齲蝕原性細菌（例えば、ストレプトコッカス・ミュータンス、アクチノマイセス・ビスコース）およびグラム陰性の歯周病原性細菌（例えば、ポルフィロモナス・ジンジバリス、アグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンス）は、それぞれ、虫歯および歯周疾患の発生および進行に関連する主な悪化因子を代表する。残念なことに、これらの病原体と闘う現在の治療法には望ましくない副作用がある。例えば、抗生物質の全身的使用は、胃腸障害をもたらし、細菌耐性を助長し得る。一般的な口中消毒薬であるクロルヘキシジンは、味覚を変化させ、歯と舌を染色し、頬粘膜を刺激し得る。高分子NO送達ビヒクル（例えば、シリカナノ粒子、金など）は、グラム陰性歯周病原性細菌を死滅させる。しかしながら、これらの物質は、グラム陽性齲蝕原性細菌を安全な濃度（例えば、殺菌性であるが、哺乳動物細胞に対しては非毒性である濃度）で死滅させることは実証されていない。これらのナノ物質と同様に、生分解性の欠如、およびシリカナノ粒子の潜在的な細胞毒性も、生物医学的用途のためのそれらの将来を妨げる。また、現在の研究は、細菌耐性の助長を許す従来の抗生物質の代替として、銀、金、亜鉛、銅などのナノ物質の利用にも焦点を当てている。しかしながら、これらのナノ物質は体内に蓄積し、蓄積性毒性を引き起こし、特定の用途に対するそれらの将来を制限する場合がある。それらの疾患を引き起こす細菌を死滅させることができる口腔治療薬を開発することは、健康な口腔を維持する上で重要である。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される構造（例えば、NO足場および／またはポリマー）は、これらの問題または他の問題のうちの一つ以上を解決する。

20

30

40

#### 【0164】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される組成物は、点眼製剤（例えば、人工涙液）として使用され得る。いくつかの実施形態では、組成物は、約0.1%～約1.0%（または本明細書の他の箇所で開示される濃度）の足場を含む。いくつかの実施形態では、混合物は、2種類以上のポリマー足場（例えば、HA由来足場およびCMC由来足場）を含みつつ、第二のポリマー足場は0.05%～約0.15%の量で（または本明細書の他の箇所で開示される濃度で）存在する。

#### 【0165】

嚢胞性線維症（CF）は、貧弱な粘膜毛様体クリアランスおよび慢性細菌感染を特徴と

50

する遺伝的障害である。本明細書で示されるように、いくつかの実施形態において、一酸化窒素（NO）は、CF関連細菌に対して広範スペクトル抗菌活性を有し、よって従来の抗生物質の魅力的な代替物となっている。NOを用いた処理は、その複数の殺菌性機構（例えば、ニトロソ化および酸化ストレスの誘発）により細菌耐性を制限する。驚くべきことに、開示された設計の一つを使用して足場上にNOを貯蔵することによって、殺菌有効性が改善され、全身細胞毒性が低下することが見出されている。治療は、プラנקトン性およびバイオフィームベースの病原体に対して有効であり、哺乳動物肺細胞に対する細胞毒性アッセイは、治療された対象の細胞に対してほとんど害を及ぼさないことを示す。

#### 【0166】

CFは、肺の慢性細菌感染によって特徴付けられる衰弱性疾患であり、20年という短い余命をもたらす。CF膜コンダクタンス制御因子（CFTR）の遺伝的欠陥は、イオン（例えば、Cl<sup>-</sup>）の気道表面液体への正常な輸送を妨げ、水輸送を阻害する。このように、気道上皮は脱水状態となり、粘膜毛様体クリアランス機構を介して効率的に除去され得なくなった濃厚な粘液を生成する。杯細胞がムチンを脱水状態となった気道に継続的に排出するため、粘液の蓄積は、繊毛が損傷を受ける、または機能しない状態まで加速され、気道から粘液を除去することができない。プラנקトン性細菌は、この静的環境で繁殖し、バイオフィームとして知られる病原性細菌の複雑な群集の形成を促進する。これらのバイオフィームによって産生される菌体外多糖マトリックスは、酸素拡散を阻害し、嫌気性環境のポケットを形成し、細菌代謝を変化させる。濃縮された粘液層と頑強なバイオフィームとの組み合わせは、一般的なCF療法の抗菌有効性を著しく低下させる。

#### 【0167】

いくつかの実施形態では、低減すべきおよび／または排除すべき微生物負荷は、薬剤耐性菌を含む。いくつかの実施形態では、薬剤耐性菌は、カルバペネム耐性腸内細菌を含む。いくつかの実施形態では、薬剤耐性菌は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を含む。いくつかの実施形態において、微生物がヒト免疫不全ウイルス、単純ヘルペスウイルス、乳頭腫ウイルス、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザ、肝炎、コクサッキーウイルス、帯状疱疹、はしか、おたふくかぜ、風疹、狂犬病、肺炎、（出血性ウイルス熱、H1N1など）プリオン、寄生虫、真菌、カビ、酵母および、とりわけ、カンジダ・アルビカンス、クロコウジカビ、大腸菌（*E. coli*）、緑膿菌（*P. aeruginosa*）、および黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）、A群連鎖球菌、肺炎球菌、結核菌、カンピロバクター・ジェジュニ、サルモネラ菌、赤痢菌、P. ジンジバリス、アグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンス、A. ビスコーズス、および／またはS. ミュータンスを含む細菌（グラム陽性およびグラム陰性の両方）、ならびに様々な薬剤耐性菌を含む。微生物（microorganism）および微生物（microbe）という用語は、互換的に使用されるものとする。微生物は、野生型、遺伝子操作された、または改変された生物体を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製剤および方法は、局所使用、または口腔粘膜などの表面の治療のためのものである。

#### 【0168】

一部の実施形態では、足場および／またはその組成物は、例えば損傷した組織に、直接注入または塗布することによって投与されてもよい。適切な経路は、損傷した組織に隣接した部位への注入または塗布も含む。投与は、非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、または腹腔内注射）、皮下投与、血管裂孔内への投与、および／または関節内への投与（例えば、関節内注射）を含みうる。追加的な投与経路としては、鼻腔内、局所的、膣、直腸、くも膜下腔内、動脈内、および眼内経路が挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される足場および組成物は、治療部位にゲルとして適用することができる。いくつかの実施形態では、足場および組成物は、液体として適用することができる。

#### 【0169】

いくつかの実施形態において、経口または局所投与のための液体調合物は、例えば、溶液、シロップ、または懸濁液の形態を取ることができ、または使用前の水または別の適切なビヒクルとの組成のための乾燥生成物として提示することができる。こうした液体調合

10

20

30

40

50

物は、従来の技術によって、例えば懸濁化剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または水素化食用脂）、乳化剤（例えば、レシチンまたはアカシア）、非水性ビヒクル（例えば、アーモンドオイル、油性エステル、エチルアルコール、または分別植物油）、および防腐剤（例えば、メチルまたはプロピル *p*-ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸）などの医薬的に許容可能な添加剤を用いて調製することができる。調合物はまた、必要に応じて、緩衝塩、香味剤、着色剤、および甘味剤を含有してもよい。経口投与のための調合物は、活性化合物の制御された放出を可能にするように適切に製剤化され得る。口腔投与については、組成物は、従来の様式で製剤化された錠剤またはトロチの形態を取ることができる。

【0170】

いくつかの実施形態において、開示された化合物はまた、移植または注射のための調合物として製剤化されてもよい。したがって、例えば、化合物は、適切なポリマー材料もしくは疎水性材料（例えば、許容可能な油中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂とともに、あるいは難溶性誘導体として（例えば、難溶性塩として）製剤化され得る。化合物はまた、直腸用組成物（例えば、カカオ脂もしくは他のグリセリドなどの従来の座剤基剤を含有する座剤または停留浣腸）、クリームもしくはローション、または経皮パッチにも製剤化され得る。

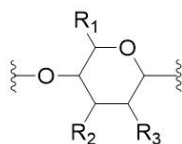
【0171】

吸入によるエアロゾルとしての投与に適した医薬製剤も提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリマー構造は、溶液および／またはエアロゾル形態で製剤化される。いくつかの実施形態では、これらの製剤は、本明細書に記載のポリマーの溶液または懸濁液を含む。いくつかの実施形態において、所望の製剤は、小さなチャンバ内に配置され、噴霧され得る。噴霧は、NO放出超分岐ポリアミドミン（polyamidomines）を含む複数の液体液滴または固体粒子を形成するための圧縮空気によって、または超音波エネルギーによって達成され得る。例えば、本開示のNO放出超分岐ポリアミドミンは、嚢胞性線維症に関連する細菌感染症を治療するために吸入を介して投与することができる。嚢胞性線維症関連細菌感染症としては、以下に限定されないが、ステノトロフォモニス、ミバクテリウム・アビウム・イントラセルレア、および *m*. アブセサス、バークホデリア・セパシア、および緑膿菌（*P. aeruginosa*）感染症が挙げられる。

本明細書に記載される主題は、以下の実施形態を対象とする：

1. 式 I の単位構造を含む、NO放出カルボキシメチルセルロース由来ポリマー化合物であって：

【化37】



式 I

式中、

$R_1$ 、 $R_2$ 、および  $R_3$  は独立して、 $-OH$ 、 $CH_2OH$ 、 $OCH_2C(O)OH$ 、 $CH_2OCH_2C(O)OH$ 、 $C(O)O((CH_2)_aO)_bH$ 、 $C(O)O((CH_2)_aO)_b(CH_2)_cH$ 、 $-C(O)-O-(C_{1-5}\text{アルキル})$ 、 $C(O)NH((CH_2)_dNH)_eH$ 、 $C(O)NH((CH_2)_dNH)_e(CH_2)_fH$ 、 $CH_2C(O)NH((CH_2)_dNH)_eH$ 、 $CH_2C(O)NH((CH_2)_dNH)_e(CH_2)_fH$ 、 $C(O)X^1((CH_2)_gX^2)_h(CH_2)_iH$ 、 $CH_2C(O)X^1((CH_2)_gX^2)_h(CH_2)_iH$ 、 $C(O)X^1((CH_2)_gX^2)_h((CH_2)_jX^3)_k(CH_2)_lH$ 、 $O((CH_2)_aO)_bH$ 、 $O((CH_2)_aO)_b(CH_2)_cH$ 、 $-O-(C_{1-5}\text{アルキル})$ 、 $NH((CH_2)_dNH)_eH$ 、 $NH((CH_2)_dNH)_e(CH_2)_fH$ 、

10

20

30

40

50

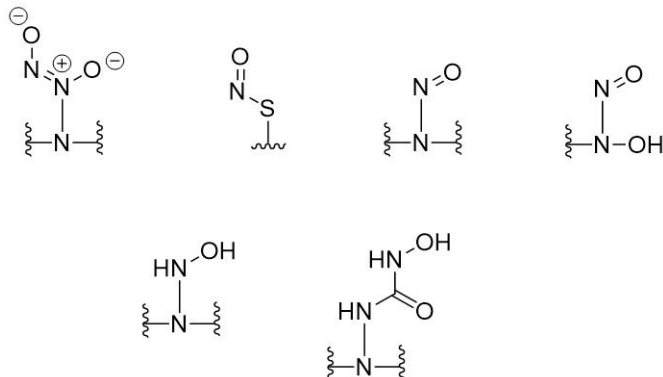
$f H$ 、 $X^1 ((CH_2)_g X^2)_h (CH_2)_i H$ 、 $X^1 ((CH_2)_g X^2)_h ((CH_2)_j X^3)_k (CH_2)_l H$ 、 $CH_2 C(O) X^1 ((CH_2)_g X^2)_h ((CH_2)_j X^3)_k - (CH_2)_l H$ からなる群から選択され、

$a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $d$ 、 $e$ 、 $f$ 、 $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、および $l$ の各例は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の整数から選択され；

$X^1$ 、 $X^2$ 、および $X^3$ の各例は独立して、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $C(O)NH-$ から選択され；

$X^1$ 、 $X^2$ 、および $X^3$ の少なくとも一つは、次のうちの一つによって表され：

【化38】



10

20

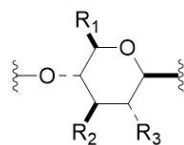
；および

ここで、化合物は、水中5%w/wの濃度で20℃で、約10mPa・s以上の粘度を有する。

【0172】

2. 実施形態1に記載の化合物であって、式Iは、式I'に示される立体化学的配置を有する：

【化39】



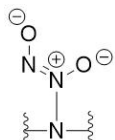
30

式I'。

【0173】

3. 実施形態1または2に記載の化合物であって、 $X^1$ 、 $X^2$ 、および $X^3$ の少なくとも一つは、下記によって表される。

【化40】



40

【0174】

4. 実施形態1～3のいずれか一つに記載の化合物であって、 $R^1$ は、 $-CH_2 C(O) - X^1 - ((CH_2)_g X^2)_h ((CH_2)_j X^3)_k - (CH_2)_l H$ である。

【0175】

5. 実施形態1～4のいずれか一つに記載の化合物であって、 $R_2$ および $R_3$ は、 $-OH$ である。

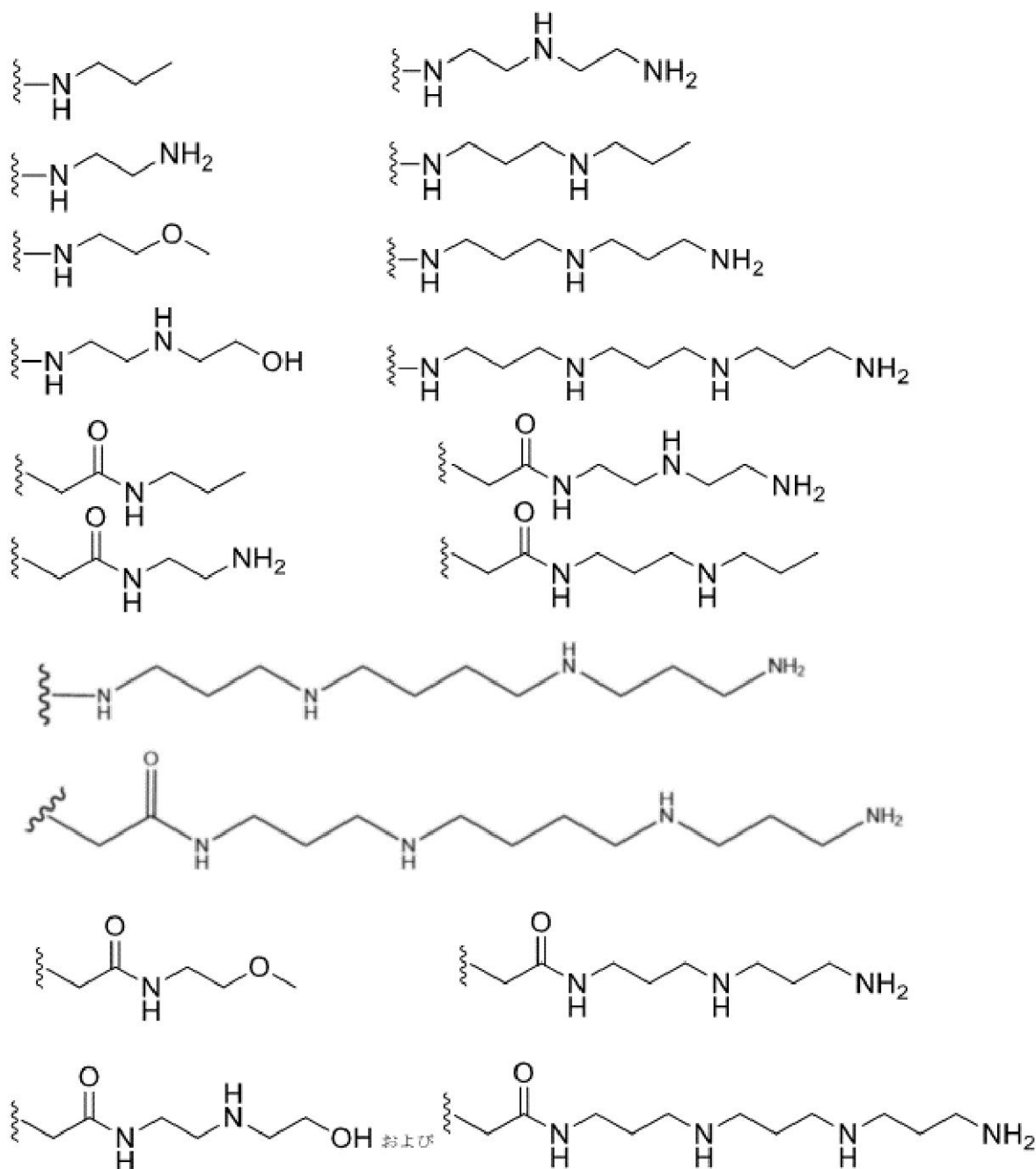
【0176】

6. 実施形態1～5のいずれか一つに記載の化合物であって、 $R_1$ 、 $R_2$ 、および $R_3$ のう

50

ちの一つ以上が、独立して、以下からなる群から選択される。

【化 4 1】



【0177】

7. 実施形態 1～6 のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物は、水中 20% w/w の濃度で 20℃で、約 20 mPa・s 以上の粘度を有する。

【0178】

8. 実施形態 1～7 のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物は 50 mg/ml の濃度で水に可溶性である。

【0179】

9. 実施形態 1～8 のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物は、化合物 1 mg 当たり 0.1～1.0 μmol の NO の範囲で、合計放出可能 NO 貯蔵量を有する。

【0180】

10. 実施形態 1～9 のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物は、0.1～24

時間の範囲内のNO半減期を有する。

【0181】

11. 実施形態1～8のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物は、1～60時間の範囲内のNO放出の総持続時間を有する。

【0182】

12. 実施形態1～8のいずれか一つに記載の化合物であって、4時間後の合計NO放出は、化合物1mg当たり0.1～1.0μmolのNOの範囲内である。

【0183】

13. 実施形態1～12のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物中の繰り返し単位のうちの15%超が、式Iのモノマーである。

【0184】

14. 実施形態1～13のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物は、約90kDa～約700kDaの範囲の分子量を有する。

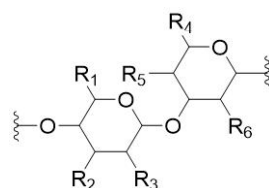
【0185】

15. 実施形態1～14のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物は、式Iの二つ以上の異なる共有結合的に修飾されたモノマーを含む。

【0186】

16. 式IIの単位構造を含む、NO放出ヒアルロン酸由来ポリマー化合物であって：

【化42】



式II

式中、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、および $R_6$ は独立して、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-NHC(O)-CH_3$ 、 $-O-(CH_2)_aO)_b-H$ 、 $-O-(CH_2)_aO)_b-(CH_2)_cH$ 、 $-O-(C_{1-5}アルキル)$ 、 $-NH-(CH_2)_dNH)_e-H$ 、 $-NH-(CH_2)_dNH)_e-(CH_2)_fH$ 、 $-X^1-(CH_2)_gX^2)_h-H$ 、 $-X^1-(CH_2)_gX^2)_h-(CH_2)_iH$ 、 $-CH_2C(O)-X^1-(CH_2)_gX^2)_h-(CH_2)_jX^3)_k-(CH_2)_lH$ 、および $-X^1-(CH_2)_gX^2)_h-(CH_2)_jX^3)_k-(CH_2)_lH$ からなる群から選択され；  
 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $d$ 、 $e$ 、 $f$ 、 $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、および $l$ の各例は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の整数から選択され；  
 $X^1$ 、 $X^2$ 、および $X^3$ の各例は独立して、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $C(O)NH-$ から選択され；

$X^1$ 、 $X^2$ 、および $X^3$ の少なくとも一つは、次のうちの一つによって表され：

10

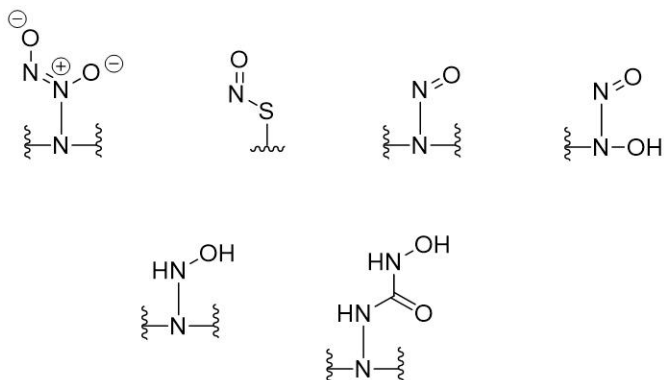
20

30

40

50

## 【化 4 3】



10

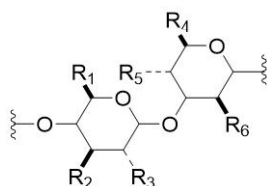
；および

ここで、化合物は、水中 5 % w / w の濃度で 20 °C で、約 10 m P a ・ s 以上の粘度を有する。

## 【 0 1 8 7 】

17. 実施形態 16 に記載の化合物であって、式 II が、式 II ' に示される立体化学的配置を有する。

## 【化 4 4】



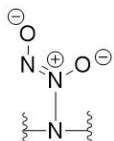
20

式 II ' ,

## 【 0 1 8 8 】

18. 実施形態 16 または 17 に記載の化合物であって、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、および X<sup>3</sup> の少なくとも一つは、下記のうちの一つによって表される。

## 【化 4 5】



30

## 【 0 1 8 9 】

19. 実施形態 16 ~ 18 のいずれか一つに記載の化合物であって、R<sup>1</sup> は、-CH<sub>2</sub>C(O)-X<sup>1</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>X<sup>2</sup>)<sub>h</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>X<sup>3</sup>)<sub>k</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>H である。

## 【 0 1 9 0 】

20. 実施形態 16 ~ 19 のいずれか一つに記載の化合物であって、R<sub>2</sub> および R<sub>3</sub> は、-OH である。

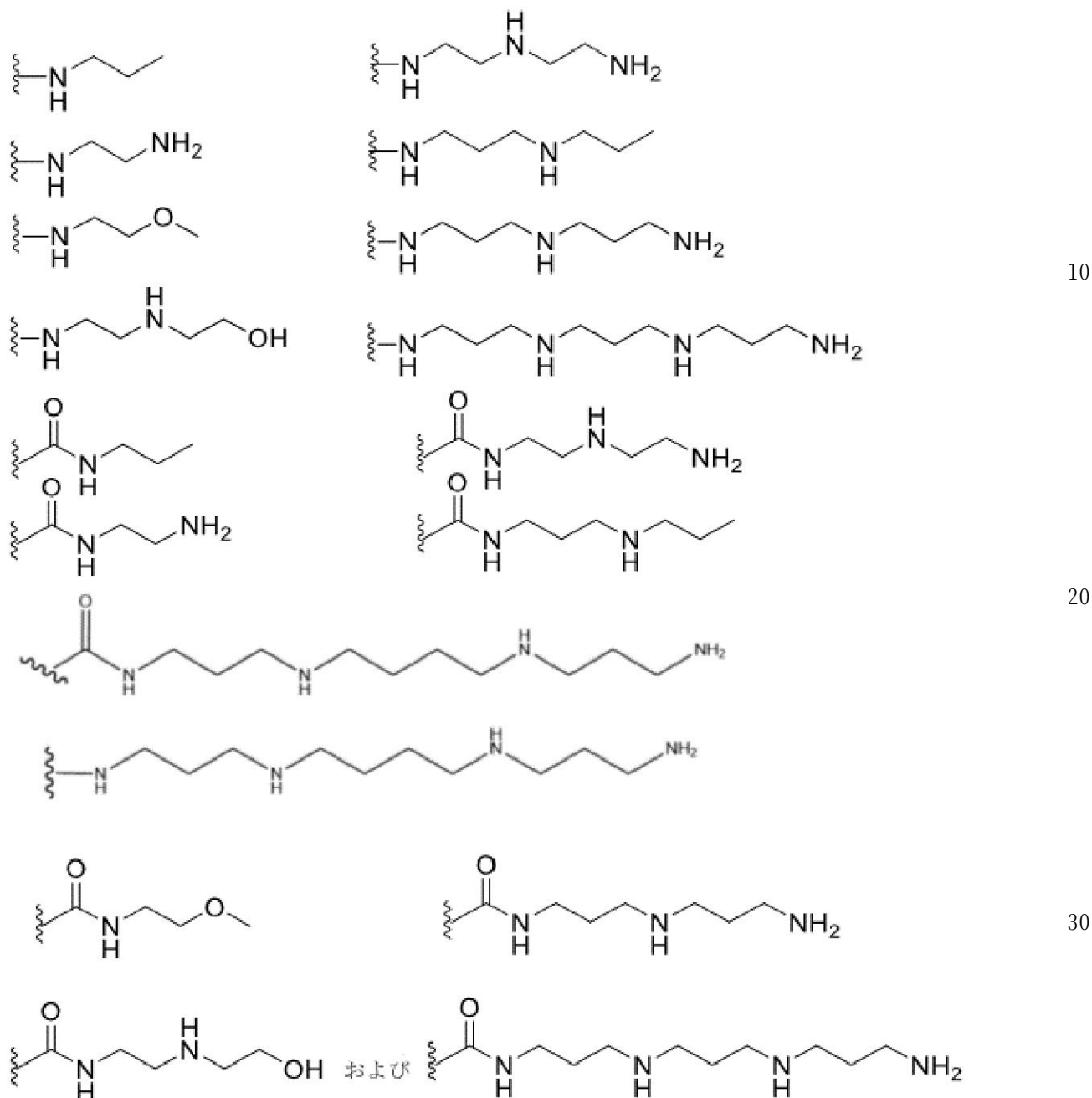
40

## 【 0 1 9 1 】

21. 実施形態 16 ~ 20 のいずれか一つに記載の化合物であって、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub> のうちの一つ以上が、独立して、以下からなる群から選択される。

50

## 【化 4 6】



## 【0192】

22. 実施形態16～21のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物は、水中20%w/wの濃度で20℃で、約20mPa・s以上の粘度を有する。

## 【0193】

23. 実施形態16～22のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物は50mg/mlの濃度で水に可溶性である。

## 【0194】

24. 実施形態16～23のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物は、化合物1mg当たり0.1～1.0μmolのNOの範囲で、合計放出可能NO貯蔵量を有する。

## 【0195】

25. 実施形態16～24のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物は、0.1～24時間の範囲内のNO半減期を有する。

## 【0196】

26. 実施形態16～24のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物は、1～60

時間の範囲内のNO放出の総持続時間を有する。

【0197】

27. 実施形態16～24のいずれか一つに記載の化合物であって、4時間後の合計NO放出は、化合物1mg当たり0.1～1.0μmolのNOの範囲内である。

【0198】

28. 実施形態1～13のいずれか一つに記載の化合物であって、化合物は、約6kDa～約90kDaの範囲の分子量を有する。

【0199】

29. 粘度増強剤であって、

ポリマーの鎖に沿って構造単位を有するポリマーを含む足場であって、一つ以上の構造単位がR<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、およびR<sub>3</sub>のそれぞれの一つ以上の例で官能化されている、足場を含み、式中、

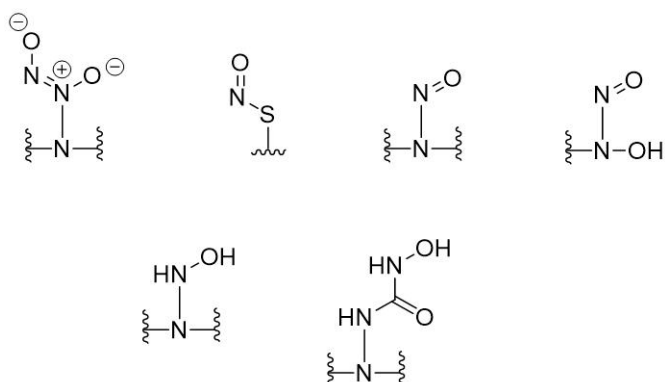
R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、およびR<sub>3</sub>は独立して、-OH、NH<sub>2</sub>、OCH<sub>3</sub>、C(O)OH、CH<sub>2</sub>OH、CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、OCH<sub>2</sub>C(O)OH、CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>C(O)OH、CH<sub>2</sub>C(O)OH、NHC(O)CH<sub>3</sub>、C(O)O((CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>O)<sub>b</sub>H、C(O)O((CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>O)<sub>b</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>H、-C(O)O(C<sub>1-5</sub>アルキル)、C(O)NH((CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>NH)<sub>e</sub>H、C(O)NH((CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>NH)<sub>e</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>H、CH<sub>2</sub>C(O)NH((CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>NH)<sub>e</sub>H、CH<sub>2</sub>C(O)NH((CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>NH)<sub>e</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>H、C(O)X<sup>1</sup>((CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>X<sup>2</sup>)<sub>h</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>H、C(O)X<sup>1</sup>((CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>X<sup>2</sup>)<sub>h</sub>((CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>X<sup>3</sup>)<sub>k</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>H、O((CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>O)<sub>b</sub>H、O((CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>O)<sub>b</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>H、-O-(C<sub>1-5</sub>アルキル)、NH((CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>NH)<sub>e</sub>H、NH((CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>NH)<sub>e</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>H、X<sup>1</sup>((CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>X<sup>2</sup>)<sub>h</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>H、CH<sub>2</sub>C(O)X<sup>1</sup>((CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>X<sup>2</sup>)<sub>h</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>H、X<sup>1</sup>((CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>X<sup>2</sup>)<sub>h</sub>((CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>X<sup>3</sup>)<sub>k</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>H、CH<sub>2</sub>C(O)X<sup>1</sup>((CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>X<sup>2</sup>)<sub>h</sub>((CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>X<sup>3</sup>)<sub>k</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>Hからなる群から選択され；

a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、およびlの各例は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の整数から選択され；

X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、およびX<sup>3</sup>の各例は独立して、-O-、-S-、-NH-、C(O)NH-から選択され；および

X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、およびX<sup>3</sup>の少なくとも一つの例は、次のうちの一つによって表され：

【化47】



；および

足場は、5%w/wの濃度で20℃で、約10mPa・s以上の粘度を有する。

【0200】

30. 足場が、5%w/wの濃度で、約1.0mN以上のゲル硬さを有する、実施形態29に記載の粘性誘導剤。

【0201】

31. ポリマーがバイオポリマーである、実施形態29に記載の粘性誘導剤。

【0202】

10

20

30

40

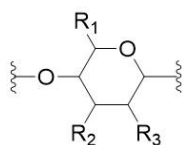
50

32. ポリマーが多糖類である、実施形態29に記載の粘性誘導剤。

【0203】

33. 実施形態32に記載の粘性誘導剤であって、一つ以上の構造単位が、式Iによって表される。

【化48】



式I

【0204】

34. 式Iの構造が、カルボキシメチルセルロースポリマーのサッカライド単位を表す、実施形態33に記載の粘性誘導剤。

【0205】

35. 式Iの構造が、ヒアルロン酸ポリマーのサッカライド単位を表す、実施形態33に記載の粘性誘導剤。

【0206】

36. 式Iの構造が、ヒドロキシエチルセルロースポリマーのサッカライド単位を表す、実施形態33に記載の粘性誘導剤。

【0207】

37. 式Iの構造が、メチルセルロースポリマーのサッカライド単位を表す、実施形態33に記載の粘性誘導剤。

【0208】

38. 式Iの構造が、アルギネートポリマーのサッカライド単位を表す、実施形態33に記載の粘性誘導剤。

【0209】

39. 式Iの構造が、シクロデキストリン環構造のサッカライド単位を表す、実施形態33に記載の粘性誘導剤。

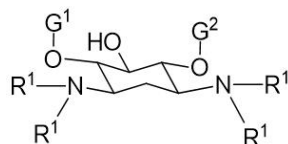
【0210】

40. ポリマーがポリアミノグリコシドを含む、実施形態29に記載の粘性誘導剤。

【0211】

41. 実施形態40に記載の粘性誘導剤であって、ポリアミノグリコシドは、式IIIの第一のアミノグリコシドを含む、超分岐ポリアミノグリコシドであって：

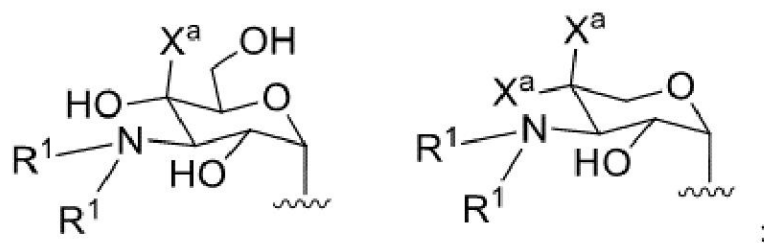
【化49】



式III；

式中、G<sup>1</sup>は、以下からなる群から選択され：

【化50】



10

20

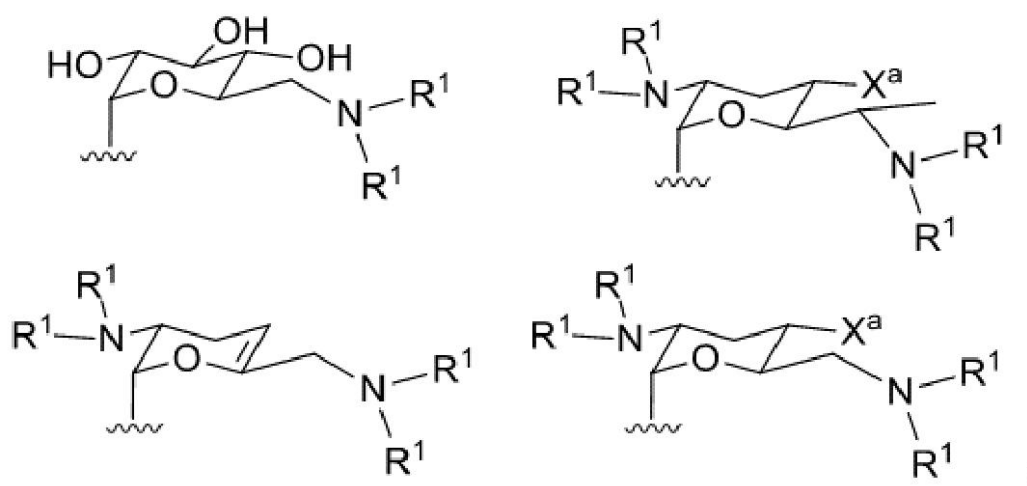
30

40

50

式中、 $G^2$  は、以下からなる群から選択され：

【化 5 1】

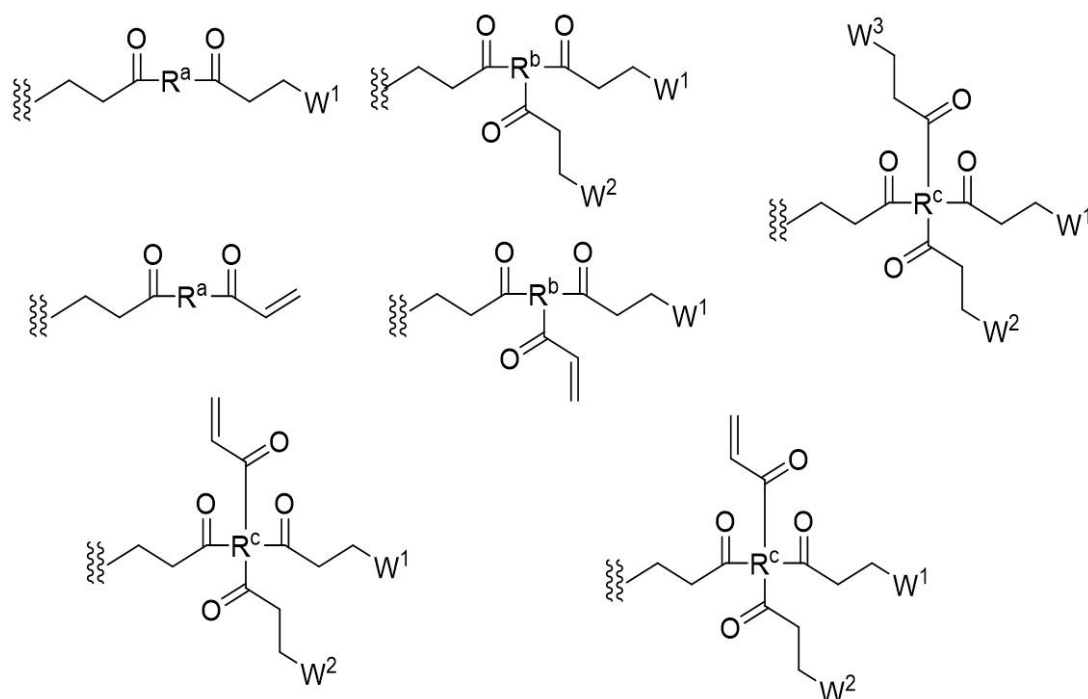


10

式中、 $R^1$  の各例は、 $-H$ 、任意で置換された  $C_1-C_6$  アルキル、介在する  $C_1-C_6$  アルキル基を有する 1～6 個の繰り返し単位を有する任意で置換されたポリアミノ、介在する  $C_1-C_6$  アルキル基を有する 1～6 個の繰り返し単位を有する任意で置換されたポリエーテルからなる群から独立して選択されるか、または連結単位への共有結合を示し；  
 式中、 $X^a$  の各例は、独立して、 $-H$ 、 $-OH$ 、および  $C_1-C_6$  アルキルから選択され；  
 式中、 $R^1$  の少なくとも一つの例は、以下から選択される一つ以上の連結単位への共有結合を示し；

20

【化 5 2】



30

40

式中、

【化 5 3】



は、第一のアミノグリコシドへの付着を示し；

式中、 $W^1$  の各例は、存在する場合、一つ以上の追加のアミノグリコシド、または一つ以

50

上のエンドキャッピング置換基から独立して選択され、少なくとも一つの連結単位は、第一のアミノグリコシドから第二のアミノグリコシドへの共有結合架橋を提供し；

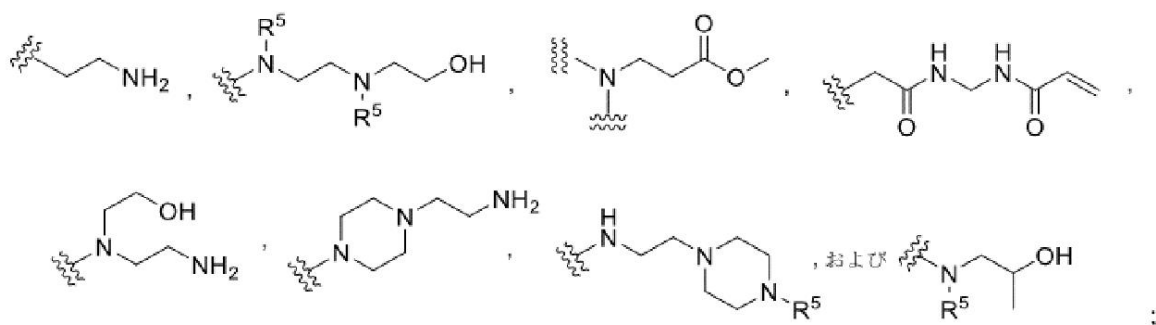
式中、 $R^a$ の各例は独立して、任意で置換された $C_1-C_6$ アルキル、( $C_1-C_6$ アルキルを有する) 1~6個の繰り返し単位を有する任意で置換されたポリアミノ、または( $C_1-C_6$ アルキルを有する) 1~6個の繰り返し単位を有する任意で置換されたポリエーテルからなる群から選択され；および

式中、一つ以上のエンドキャッピング置換基は、存在する場合、独立して、 $-X^1-(CH_2)_hX^2)_i-(CH_2)_jH$ の式を有する。

【0212】

42. 実施形態41に記載の粘性誘導剤であって、以下からなる群から選択される末端基をさらに含み：

【化54】

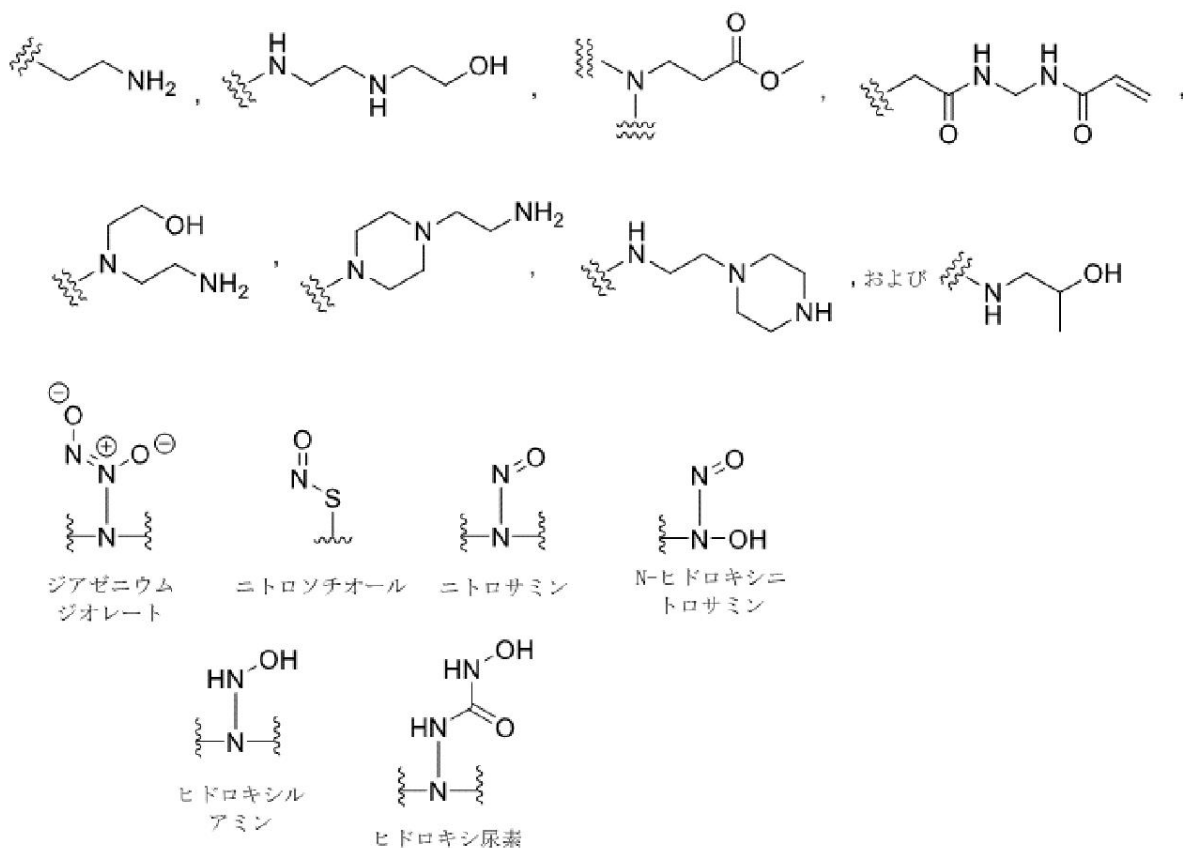


式中、 $R^5$ の各例は、Hまたは $-N^+ (=N-O^-)O^-$ である。

【0213】

43. 実施形態41または42に記載の粘性誘導剤であって、以下からなる群から選択される末端基をさらに含む。

【化55】



10

20

30

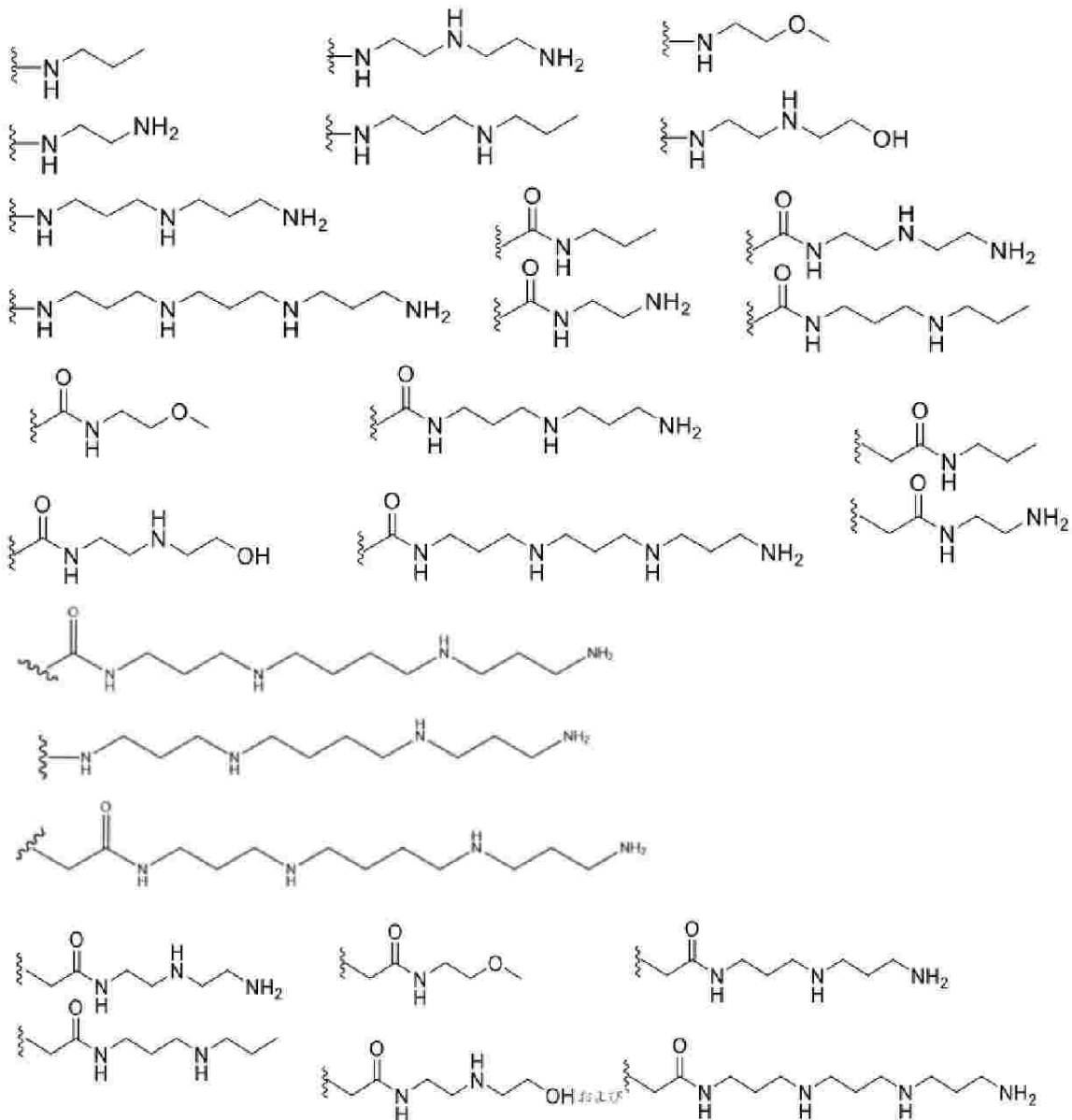
40

50

## 【0214】

44. 実施形態29～41のいずれか一つに記載の粘性誘導剤であって、 $R_1$ 、 $R_2$ 、および $R_3$ のうちの一つ以上が、独立して、下記からなる群から選択される。

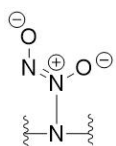
## 【化56】



## 【0215】

45. 実施形態29～41のいずれか一つに記載の粘性誘導剤であって、 $X^1$ 、 $X^2$ 、および $X^3$ の少なくとも一つの例が、以下の構造によって表される。

## 【化57】



## 【0216】

46. 治療を必要とする対象に一酸化窒素を送達する方法であって、実施形態1～45のいずれか一つに記載の化合物または粘性誘導剤の有効量を、対象に投与することを含む。

## 【0217】

47. 有効量の化合物または粘性誘導剤がハイドロゲルである、実施形態46に記載の方法。

## 【0218】

48. 対象が創傷を負っており、化合物または粘性誘導剤が創傷治癒を助けるために投与される、実施形態46または47に記載の方法。

## 【0219】

49. 対象が組織置換を必要とし、化合物または粘性誘導剤が組織足場として投与される、実施形態46または47に記載の方法。

## 【0220】

50. 疾患状態を治療する方法であって、  
実施形態1～45のいずれか一つに記載の化合物または粘性誘導剤の有効量を、それを必要とする対象に投与することを含み、ここで前述の疾患状態は、癌、心血管疾患、微生物感染、医療機器への血液の曝露によって引き起こされる血小板凝集および血小板粘着、異常細胞増殖に起因する病的状態、移植拒絶反応、自己免疫疾患、炎症、血管疾患、瘢痕組織、創傷収縮、再狭窄、痛み、発熱、胃腸障害、呼吸器障害、性機能不全、および性感染症からなる群から選択される。

## 【0221】

51. 医薬製剤であって、  
実施形態1～45のいずれか一つに記載の化合物または粘性誘導剤、および薬学的に許容可能な賦形剤を含む、医薬製剤。

## 【0222】

52. 表面上の微生物負荷を低減または防止する方法であって、  
実施形態1～45のいずれか一つに記載の化合物または粘性誘導剤を、複数の微生物で汚染された表面に適用することを含み、  
実施形態1～45のいずれか一つに記載の化合物または粘性誘導剤は、一酸化窒素を生成し、かつ微生物DNAおよび膜構造に酸化および／またはニトロソ化損傷を誘導し、それによって微生物負荷を予防または低減し、前述の複数の微生物は、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、真菌、酵母、およびウイルスのうちの二つ以上を含む。

## 【0223】

53. 表面が有機表面である、実施形態52に記載の方法。

## 【0224】

54. 表面がヒト皮膚である、実施形態52または53に記載の方法。

## 【0225】

55. 表面が創傷表面である、実施形態52または53に記載の方法。

## 【0226】

56. 前述の適用が、皮膚刺激を誘発しない、実施形態54または55に記載の方法。

## 【0227】

57. 表面が動物皮膚である、実施形態52または53に記載の方法。

## 【0228】

58. 前述の適用が、皮膚刺激を誘発しない、実施形態57に記載の方法。

## 【0229】

59. 表面が無機表面である、実施形態52に記載の方法。

## 【0230】

60. 無機表面が、医療機器の外部表面または内部表面である、実施形態59に記載の方法。

## 【0231】

61. 化合物の適用が、医療機器の外部表面または内部表面上に抗微生物コーティングを生成する、実施形態60に記載の方法。

## 【0232】

10

20

30

40

50

62. 医療機器が内視鏡を含む、実施形態60または61に記載の方法。

【0233】

63. 微生物負荷が、薬剤耐性菌を含む、実施形態52～62のいずれか一つに記載の方法。

【0234】

64. 実施形態52～63のいずれか一つに記載の方法であって、微生物負荷が、ヒト免疫不全ウイルス、単純ヘルペスウイルス、乳頭腫ウイルス、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザ、肝炎、コクサッキーウイルス、带状疱疹、はしか、おたふくかぜ、風疹、狂犬病、肺炎、出血性ウイルス熱、H1N1、プリオン、寄生虫、真菌、カビ、カンジダ・アルビカンズ、クロコウジカビ、大腸菌、緑膿菌、および黄色ブドウ球菌、A群連鎖球菌、肺炎球菌、結核菌、カンピロバクター・ジェジュニ、サルモネラ菌、赤痢菌、カルバペネム耐性腸内細菌メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、およびバークホルデリア・セパシアのうちの一つ以上の存在に関連する微生物を含む。

10

【0235】

65. 微生物負荷が、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を含む、実施形態52～63のいずれか一つに記載の方法。

【0236】

66. 微生物負荷が、カルバペネム耐性腸内細菌を含む、実施形態52～63のいずれか一つに記載の方法。

【0237】

20

67. 微生物負荷が、黄色ブドウ球菌を含む、実施形態52～63のいずれか一つに記載の方法。

【0238】

68. 微生物負荷が、緑膿菌を含む、実施形態52～63のいずれか一つに記載の方法。

【0239】

69. 微生物負荷が、バークホルデリア・セパシアを含む、実施形態52～63のいずれか一つに記載の方法。

【0240】

70. 実施形態1～45のいずれか一つに記載の化合物または粘性誘導剤のうちのいずれか一つを製造する方法が、  
ポリマーを選択することと、  
ポリマーをNO結合部分で官能化することと、を含む。

30

【0241】

71. ポリマーがバイオポリマーである、実施形態70に記載の方法。

【0242】

72. 化合物または粘性誘導剤をNOに曝露して、NO供与化合物または粘性誘導剤を提供することをさらに含む、実施形態70または71に記載の方法。

【0243】

73. 疾患、組織損傷の治療、または微生物負荷の低減を必要とする対象への一酸化窒素の送達のための、実施形態1～45のいずれか一つに記載の化合物または粘性誘導剤の使用。

40

【0244】

74. 疾患、組織損傷の治療、または微生物負荷の低減を必要とする対象へ一酸化窒素の送達するように構成される薬品の製造のための、実施形態1～45のいずれか一つに記載の化合物または粘性誘導剤の使用。

【0245】

いくつかの実施形態において、米国特許出願第62/441,742号、米国特許出願第62/483,505号、国際特許出願第PCT/IB2018/050051号、米国特許出願第62/447,564号、国際特許出願第PCT/IB2018/052144号、米国特許出願第14/421525号、米国特許出願第62/639,119号

50

、および米国特許出願第 62 / 737, 603 の各々に開示されるポリマーが使用される。これらの出願および出版物の各々は、参照によりその全体がすべての目的のために組み込まれる。

#### 【0246】

量、濃度、または他の値もしくはパラメータが、範囲、好ましい範囲、または好ましい上限値と好ましい下限値とのリストのいずれかとして与えられる場合、これは、範囲が別個に開示されているかどうかに関わらず、任意の上限範囲もしくは好ましい値、および任意の下限範囲もしくは好ましい値の任意の対から形成されるすべての範囲を具体的に開示することとして理解されるべきである。数値の範囲が本明細書に列挙される場合、別段の記載がない限り、範囲は、その終点、および範囲内のすべての整数および分数を含むことが意図される。本発明の範囲は、範囲を定義する際に列挙された特定の値に限定されることは意図されていない。

10

#### 【0247】

本発明は、以下の実施例でさらに定義される。これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示す一方で、例示としてのみ提供されることが理解されるべきである。

#### 【実施例】

#### 【0248】

例示的な合成方法：

#### 実施例 1：ヒアルロン酸足場

以下の実施例は、調整可能な NO 貯蔵および放出動態を有する、N-ジアゼニウムジオレート官能化一酸化窒素 (NO) 放出ヒアルロン酸の合成に関する。この実施形態は、以下の特徴、利点、および／または使用を有する。これらの足場の水溶性および生体適合性は、NO 放出足場の高分子量 (約 90 kDa) および低分子量 (約 6 kDa) で高い。

20

#### 【0249】

いくつかの実施形態において、これらの足場は、抗菌療法および細胞増殖に使用される NO 放出ヒアルロン酸誘導体を用いた慢性的な創傷の治療に有用であり得る。いくつかの実施形態において、これらの足場はまた、抗菌剤として作用する NO 放出物質を有する囊胞性線維症の治療剤としても使用することができる。

≡

#### 【0250】

#### 合成の詳細

材料。低分子量 (80 ~ 110 kDa) および超低分子量 (< 6 kDa) ヒアルロン酸 (HA) を、ローションクラフター (ワシントン州イーストサウンド) から取得した。ビス (3-アミノプロピル) アミン (DPTA)、ジエチレントリアミン (DETA)、N-プロピル-1,3-プロパンジアミン (PAPA)、N-(2-ヒドロキシエチル) エチレンジアミン (HEDA)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC)、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)、ネオマイシン硫酸塩、フェナジンメトサルフェート (PMS)、およびヒアルロニダーゼ (ウシ精巣由来、I-S 型) をミリポアシグマ (ミズーリ州セントルイス) から購入した。3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム分子内塩 (MTS) をバイオビジョン (BioVision) (カリフォルニア州ミルピタス) から購入した。一般的な実験用塩および溶媒を、フィッシャーサイエンティフィック (ニュージャージー州フェアローン) から購入した。別段の指定がない限り、すべての試薬を、さらなる精製を行うことなく、入手したままの状態で使用した。トリプトソイ培養液 (TSB) およびトリプトソイ寒天培地 (TSA) を、ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー (ニュージャージー州フランクリンレイクス) から取得した。トリプシン、ペニシリンストレプトマイシン (PS)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、および L929 マウス線維芽細胞 (ATCC CCL1) を、UNC 組織培養施設 (ノースカロライナ州チャペルヒル) から購入した。緑膿菌 (P. aeruginosa; ATCC #47085)、大腸菌 (E.

40

50

coli; ATCC # 43888)、黄色ブドウ球菌 (S. aureus; ATCC # 29213)、エンテロコッカス・フェカリス (E. faecalis; ATCC # 29212)、多剤耐性緑膿菌 (ATCC # BAA-2110)、およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA; ATCC # 33591) を、アメリカンタイプ組織培養コレクション (American Type Tissue Culture Collection) (バージニア州マナサス) から取得した。アルゴン (Ar)、二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>)、窒素 (N<sub>2</sub>)、酸素 (O<sub>2</sub>)、一酸化窒素 (NO) キャリブレーション (25.87 ppm バランス N<sub>2</sub>)、および純粋な NO (99.5%) ガスシリンダを、Airgas National Welders (ノースカロライナ州ローリー) から購入した。蒸留水を、ミリポア Milli-Q UV Gradient A10 システム (マサチューセッツ州ベドフォード) を使用して、18.2 MΩ・cm の抵抗率および 6 ppb 以下の総有機含有量に精製した。

#### 【0251】

アルキルアミン修飾ヒアルロン酸 (HAMW-アルキルアミン) の合成。ヒアルロン酸 (90 kDa または 6 kDa) 材料を、N-プロピル-1, 3-プロパンジアミン (PAPA)、N-(2-ヒドロキシエチル) エチレンジアミン (HEDA)、ビス(3-アミノプロピル) アミン (DPTA)、またはジエチレントリアミン (DETA) のいずれかで修飾した。(スキーム 1a) 簡潔に述べると、HA (1 g) を 40 mL (6 kDa の HA) または 100 mL (90 kDa の HA) の蒸留水に溶解した。HA 足場上のカルボン酸部分に対して、4:1 のモル比の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) および N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を添加し、0.5 M HCl を使用して溶液を pH 3.0 に滴定した。室温で 20 分間の活性化期間の後、8:1 のモル比の PAPA、DPTA、もしくは DETA、または 4:1 のモル比の HEDA を反応溶液に滴加した。溶液を、室温で 48 時間攪拌した。アミン修飾 HA をエタノール中で沈殿させ、遠心分離により収集し、エタノールで 2 回洗浄し、真空中で乾燥して、各修飾について白色固体を得た。

#### 【0252】

アルキルアミン修飾ヒアルロン酸の特徴付け。元素 (炭素、水素、および窒素; CHN) 分析を、パーキンエルマー元素分析器シリーズ 2400 機器 (マサチューセッツ州ウォルサム) を使用して実施した (表 1)。ゲル透過クロマトグラフィー (GPC) 測定を、Wyatt miniDawn TREOS 多角度光散乱検出器 (カリフォルニア州サンタバーバラ) に結合されたウォーターズ 2414 屈折率検出器 (マサチューセッツ州ミルフォード) を備えた水性 GPC システムを使用して、0.1 M 硝酸ナトリウムおよび 0.02 重量% アジ化ナトリウムを含有する 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で実施した。ダイオードアレイ検出器 (DAD) および蒸発光散乱検出器 (ELSD) を備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC; アジレント・テクノロジー (Agilent Technologies) 1260 Infinity II LC システム; カリフォルニア州サンタクララ) を使用して、未反応出発材料の存在を評価した。0.1 mg mL<sup>-1</sup> HA、EDC、または NHS 試料のアリコート (20 μL) を、シネルジ (Synergi) 4 μm ハイドロ-RP カラム (250 × 4.6 mm、フェノメネックス、カリフォルニア州トーランス)、および 1 mL 分<sup>-1</sup> の流量で 80:20 のアセトニトリル:水から構成される移動相を使用して分析した。溶出を ELSD、<sup>1</sup>H を介して監視し、<sup>13</sup>C 核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを Bruker (600 MHz) 分光計 (マサチューセッツ州ピレリカ) に記録した。

#### 【0253】

HA およびアルキルアミン修飾 HA 誘導体の代表的な <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR には、以下のピークが含まれた:

#### 【0254】

HA 90 および HA 6: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O, δ) 2.00 (NHC(O)CH<sub>3</sub>), 3.50 (CHCH<sub>2</sub>OH), 3.60-4.50 (OCHCH(OH)

10

20

30

40

50

CH(OH)), (OCHCH(OH)CH(OH)), 4.50–4.60 (NHCOCH), 5.30 (OCH(CHOH)O), 6.30 (NHCHCH(OH)).  $^{13}\text{C}$  NMR (600MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 24.0 (NHC(O)CH<sub>3</sub>), 65.0 (CHCH<sub>2</sub>OH), 70.0–81.0 (OCHCH(OH)CH(OH)CH(OH)CH(O)), 95.0 (NHCHCH(OH)), 110.0 (OCHCH(OH)), 175.0 (CHC(O)OH).

【0255】

HA90-DETAおよびHA6-DETA:  $^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 2.60–3.30 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.00 (NHC(O)CH<sub>3</sub>), 3.50 (CHCH<sub>2</sub>OH), 3.60–4.50 (OCHCH(OH)CH(OH)), (OCHCH(OH)CH(OH)), 4.50–4.60 (NHCOCH), 5.30 (OCH(CHOH)O), 6.10 (NHCHCH(OH)).  $^{13}\text{C}$  NMR (600MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 24.0 (NHC(O)CH<sub>3</sub>), 40.0–49.0 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 65.0 (CHCH<sub>2</sub>OH), 70.0–81.0 (OCHCH(OH)CH(OH)CH(OH)CH(O)), 95.0 (NHCHCH(OH)), 110.0 (OCHCH(OH)), 170.0 (CHC(O)NH), 175.0 (CHC(O)OH).

10

【0256】

HA90-DPTAおよびHA6-DPTA:  $^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 1.70–1.80 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.00 (NHC(O)CH<sub>3</sub>), 2.50–2.40 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.70–3.20 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.50 (CHCH<sub>2</sub>OH), 3.60–4.50 (OCHCH(OH)CH(OH)), (OCHCH(OH)CH(OH)), 4.50–4.60 (NHCOCH), 5.30 (OCH(CHOH)O), 6.10 (NHCHCH(OH)).  $^{13}\text{C}$  NMR (600MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 24.0 (NHC(O)CH<sub>3</sub>), 32.0 NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 38.0 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 39.0 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 46.0 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 65.0 (CHCH<sub>2</sub>OH), 70.0–81.0 (OCHCH(OH)CH(OH)CH(OH)CH(O)), 95.0 (NHCHCH(OH)), 110.0 (OCHCH(OH)), 170.0 (CHC(O)NH), 175.0 (CHC(O)OH).

20

30

【0257】

HA90-PAPAおよびHA6-PAPA:  $^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 0.80–0.90 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.40–1.50 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.70–1.80 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.00 (NHC(O)CH<sub>3</sub>), 2.50–3.20 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.50 (CHCH<sub>2</sub>OH), 3.60–4.50 (OCHCH(OH)CH(OH)), (OCHCH(OH)CH(OH)), 4.50–4.60 (NHCOCH), 5.30 (OCH(CHOH)O), 6.10 (NHCHCH(OH)).  $^{13}\text{C}$  NMR (600MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 11.0 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23.0 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24.0 (NHC(O)CH<sub>3</sub>), 24.0–30.0 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 46.0–52.0 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 65.0 (CHCH<sub>2</sub>OH), 70.0–81.0 (OCHCH(OH)CH(OH)CH(OH)CH(O)), 95.0 (NHCHCH(OH)), 110.0 (OCHCH(OH)), 170.0 (CHC(O)NH), 175.0 (CHC(O)OH).

40

【0258】

HA90-HEDAおよびHA6-HEDA:  $^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 1.75 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2.50–3.20 (C(O)N

50

$\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2.70–3.50 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), 2.00 ( $\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$ ), 3.50 ( $\text{CHCH}_2\text{OH}$ ), 3.60–4.50 ( $\text{OCHCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})$ ), ( $\text{OCHCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})$ ), 4.50–4.60 ( $\text{NHCOCH}$ ), 5.30 ( $\text{OCH}(\text{CHOH})\text{O}$ ), 6.10 ( $\text{NHCHCH}(\text{OH})$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (600MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 24.0 ( $\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$ ), 29.0 ( $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 38.0 ( $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 46.0 ( $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 52.0 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), 61.0 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), 65.0 ( $\text{CHCH}_2\text{OH}$ ), 70.0–81.0 ( $\text{OCHCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{O})$ ), 95.0 ( $\text{NHCCHCH}(\text{OH})$ ), 110.0 ( $\text{OCHCH}(\text{OH})$ ), 170.0 ( $\text{CHC}(\text{O})\text{NH}$ ), 175.0 ( $\text{CHC}(\text{O})\text{OH}$ ).

10

## 【0259】

アミン官能化ヒアルロン酸誘導体の純度分析を図2に記載する。非修飾ヒアルロン酸の代表的な $^1\text{H}$  NMRスペクトルおよび $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルを図3に記載する。二級アミン官能化ヒアルロン酸の代表的な $^1\text{H}$  NMRスペクトルを図4に記載する。二級アミン官能化ヒアルロン酸の代表的 $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルは、図5に記載され、ならびに非修飾およびアミン修飾ヒアルロン酸の代表的 $^{13}\text{C}$  NMRの比較も記載されている。アミドピークの存在および増加した窒素含量は、アルキルアミン修飾を裏付ける。

## 【0260】

NO放出ヒアルロン酸の合成。アルキルアミン修飾HA (45mg) を、1ドラムのガラスバイアル中で、ナトリウムメトキシド (75  $\mu\text{L}$ 、5.4mMメタノール中) を用いて7:3のメタノール:水 (3mL) に溶解した。開いたバイアルをステンレス鋼反応容器に入れ、磁気攪拌を介して連続的に攪拌した。容器をアルゴン (10秒、7気圧) で3回パージし、その後、さらに3回ロングパージ (10分、7気圧) して過剰酸素を除去した。次いで、容器をNOガスで20気圧まで加圧した (スキーム1b)。3日後、同じアルゴンパージプロトコルに従って未反応NOを除去した。次いで、得られたNO放出HAをエタノール中で沈殿させ、遠心分離により収集し、真空中で乾燥し、真空密封袋に白色/黄色の粉末として $-20^\circ\text{C}$ で保存した。二級アミン官能化およびNO放出ヒアルロン酸の代表的なUV-Visスペクトルを図6に記載する。

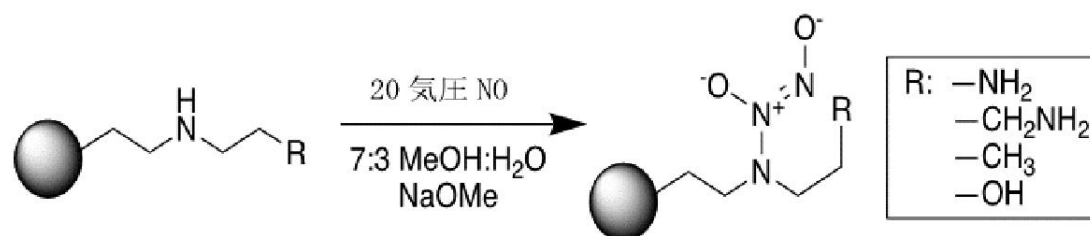
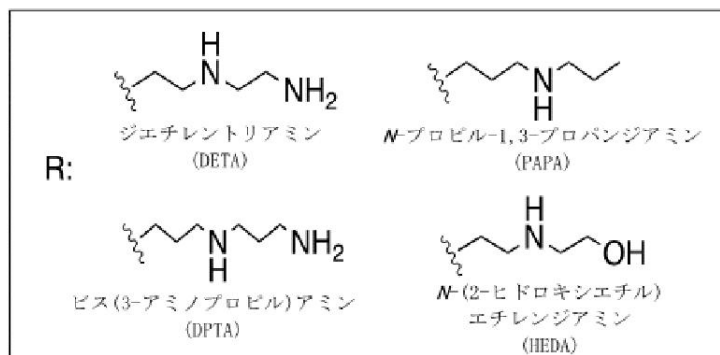
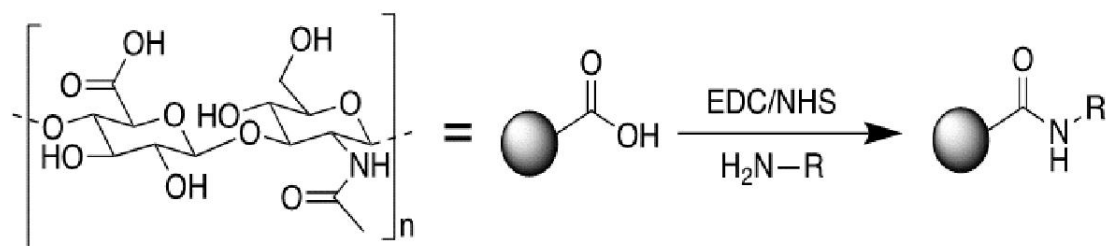
20

30

40

50

【化 5 8】



スキーム 1. (A) アミン官能化ヒアルロン酸を合成するための二級アミンを用いたヒアルロン酸の修飾 (B) 二級アミン修飾ヒアルロン酸上の N-ジアゼニウムジオレートの形成。

【表 1】

表 1. ベアおよびアミン修飾ヒアルロン酸の元素分析、およびヒアルロン酸上のカルボン酸部分の二級アミン含有アミド基 (amine-bearing amide groups) への反応変換。<sup>a</sup>

| 修飾        | % C        | % H       | % N       | 変換効率 |
|-----------|------------|-----------|-----------|------|
| HA6       | 39.2 ± 0.8 | 6.2 ± 0.3 | 3.0 ± 0.1 | —    |
| HA6-PAPA  | 41.6 ± 0.7 | 7.7 ± 0.2 | 6.9 ± 0.2 | 67%  |
| HA6-HEDA  | 40.6 ± 0.5 | 7.6 ± 0.2 | 8.2 ± 0.5 | 86%  |
| HA6-DPTA  | 40.9 ± 0.9 | 7.6 ± 0.1 | 8.2 ± 0.8 | 62%  |
| HA6-DETA  | 39.7 ± 0.2 | 6.9 ± 0.4 | 9.6 ± 0.4 | 73%  |
| HA90      | 37.0 ± 0.2 | 6.1 ± 0.2 | 3.0 ± 0.0 | —    |
| HA90-PAPA | 41.2 ± 1.2 | 7.6 ± 0.3 | 6.6 ± 0.4 | 62%  |
| HA90-HEDA | 40.2 ± 0.7 | 7.1 ± 0.3 | 7.4 ± 0.1 | 73%  |
| HA90-DPTA | 40.6 ± 1.5 | 7.4 ± 0.3 | 7.8 ± 0.5 | 57%  |
| HA90-DETA | 39.9 ± 1.0 | 7.3 ± 0.6 | 9.0 ± 0.1 | 66%  |

<sup>a</sup> 誤差は、nが3以上の別個の合成の標準偏差を表す。

【0 2 6 1】

NO貯蔵および放出の特徴付け。N-ジアゼニウムジオレート官能基の存在を確認するために、分子デバイスSpectraMax M2（カリフォルニア州サンノゼ）を用いて、50mM水酸化ナトリウム（NaOH）中で吸光度測定を行った。リアルタイム一酸化窒素放出を、Sievers 280i一酸化窒素分析器（NOA；コロラド州ボルダー）を使用して評価した。使用前に、試料を分析して、保存されている材料の安定性を確認した。NOAを、分析前にNOゼロフィルター（0ppmのNO）および25.87ppmのNOキャリブレーションガス（バランスN<sub>2</sub>）を通過した空気で校正した。典型的な実験では、脱酸素化PBS（10mM、pH7.4、37℃）の30mL中にNO放出HA（約1mg）を溶解した。溶液を、200mL分<sup>-1</sup>の流量で窒素ガスでパージし、遊離されるNOを機器に移した。分析は、NOレベルが機器の検出限界を下回った時に終了した（10ppb NO mg<sup>-1</sup> HA）。NO放出ヒアルロン酸の一酸化窒素放出特性の分析を表2および図7に記載する。非修飾ヒアルロン酸および一級アミン修飾ヒアルロン酸の対照NO放出特性の分析を表3に記載する。

【表2】

表2. PBS（10mM、pH7.4、37℃）中のNO放出ヒアルロン酸の一酸化窒素放出特性。<sup>a</sup>

| 修飾           | [NO] <sub>t</sub><br>(μmol mg <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup> | [NO] <sub>最大</sub><br>(ppb mg <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup> | t <sub>1/2</sub> (分) <sup>d</sup> | t <sub>i</sub> (時間) <sup>e</sup> | [NO] <sub>t, 4時間</sub><br>(μmol mg <sup>-1</sup> ) <sup>f</sup> |
|--------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| HA6-PAPA/NO  | 0.46 ± 0.02                                                | 9440 ± 1<br>450                                            | 5 ± 1                             | 8.4 ± 0.7                        | 0.43 ± 0.0<br>2                                                 |
| HA6-HEDA/NO  | 0.53 ± 0.08                                                | 7060 ± 1<br>350                                            | 10 ± 3                            | 7.4 ± 1.8                        | 0.50 ± 0.0<br>6                                                 |
| HA6-DPTA/NO  | 0.53 ± 0.11                                                | 4470 ± 1<br>680                                            | 21 ± 8                            | 11.2 ± 2.<br>2                   | 0.48 ± 0.0<br>9                                                 |
| HA6-DETA/NO  | 0.46 ± 0.11                                                | 4610 ± 1<br>390                                            | 61 ± 15                           | 16.3 ± 3.<br>3                   | 0.35 ± 0.0<br>8                                                 |
| HA90-PAPA/NO | 0.29 ± 0.05                                                | 5150 ± 1<br>860                                            | 7 ± 2                             | 3.4 ± 0.7                        | 0.29 ± 0.0<br>5                                                 |
| HA90-HEDA/NO | 0.40 ± 0.08                                                | 3450 ± 8<br>40                                             | 13 ± 4                            | 6.4 ± 1.5                        | 0.39 ± 0.0<br>8                                                 |
| HA90-DPTA/NO | 0.39 ± 0.06                                                | 1700 ± 3<br>90                                             | 28 ± 8                            | 8.1 ± 0.5                        | 0.36 ± 0.0<br>5                                                 |
| HA90-DETA/NO | 0.32 ± 0.07                                                | 1970 ± 5<br>80                                             | 64 ± 20                           | 14.1 ± 3.<br>7                   | 0.23 ± 0.0<br>3                                                 |

<sup>a</sup>誤差は、nが3以上の別個の合成の標準偏差を表す。<sup>b</sup>全期間にわたり放出された合計NO。<sup>c</sup>最大瞬間NO濃度。<sup>d</sup>NO放出の半減期。<sup>e</sup>NO放出の持続時間。<sup>f</sup>4時間にわたり放出された合計NO。

## 【表 3】

表 3. 塩基性条件下での 20 パールの NO ガスへの曝露後の、ベアおよびエチレンジアミン修飾された 6 kDa および 90 kDa のヒアルロン酸の元素分析および一酸化窒素放出特性。<sup>a</sup>

| 修飾       | % N           | [NO] <sub>t</sub> ( $\mu\text{mol mg}^{-1}$ )<br><sup>b</sup> |
|----------|---------------|---------------------------------------------------------------|
| HA6      | 3.0 $\pm$ 0.1 | 0.13 $\pm$ 0.00                                               |
| HA6-EDA  | 9.4 $\pm$ 0.3 | 0.23 $\pm$ 0.04                                               |
| HA90     | 3.0 $\pm$ 0.0 | 0.00 $\pm$ 0.00                                               |
| HA90-EDA | 8.6 $\pm$ 0.1 | 0.13 $\pm$ 0.02                                               |

<sup>a</sup>誤差は、n が 3 以上の別個の合成の標準偏差を表す。<sup>b</sup>リン酸緩衝生理食塩水 (10 mM、pH 7.4、37°C) 中の化学発光を介して測定される。

## 【0262】

アルキルアミン修飾 HA および NO 放出 HA の酵素分解。ヒアルロン酸の酵素分解は、ターナーら (Turner et al.) から適合された手順を使用して実施された。簡潔に述べると、50 mg の HA90、アミン修飾 HA90、または NO 放出 HA90 を、0.15 M の NaCl、0.1 M の CH<sub>3</sub>COONa、および 1 mM の Na<sub>2</sub>EDTA を含有する 5 mL の pH 5.0 緩衝液に、37°C で 30 分間磁気攪拌を用いて、溶解した。ヒアルロニダーゼ (2.5 mg) を 1 mL の同じ緩衝液中に溶解し、HA 溶液に直接添加した。混合物を、37°C で、30 分間激しい攪拌でインキュベートした。消化後、反応を、バイアルを 10 分間沸騰水浴中に置くことによって終了させ、次いで溶液を室温に冷却した。不溶性の酵素フラグメントを、遠心分離を介して除去した (7500 rpm、15 分)。上清を濾過し、GPC-MALS を介して分析し、0.1 M の硝酸ナトリウムおよび 0.02 重量% のアジ化ナトリウムを含有する 0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で測定を行った。

## 【0263】

例示的な合成方法：

実施例 2：カルボキシメチルセルロース足場

これらの実施例は、調整可能な NO 貯蔵および放出動態を有する、N-ジアゼニウムジオレート官能化一酸化窒素 (NO) 放出カルボキシメチルセルロースの合成に関する。この実施形態は、以下の特徴、利点、および／または使用を有する。この足場の水溶性および生体適合性は、NO 放出足場の高分子量で高い。

## 【0264】

いくつかの実施形態において、この足場は、細菌感染の治療に有用であり得る。

## 【0265】

歯周疾患は、人口の大部分に影響を及ぼす歯茎および周囲の組織の炎症性感染症の部類を包含する。疾患進行は、健康な歯垢バイオフィルムの微生物組成物における変化によって引き起こされ、結果としてグラム陰性細菌の過剰につながる。ポルフィロモナス・ジンジバリスなどのグラム陰性細菌は、歯組織 (例えば、歯茎、歯周靱帯、および歯槽骨組織) に炎症を誘発し、これらの細菌が成長し続けることができる歯周ポケットの発生をもたらす。未治療のまま放置すると、慢性歯周炎は最終的に、歯および骨吸収を含む口腔組織の分解をもたらす。さらに、研究は、病原性グラム陰性口腔細菌の血流および身体の他の領域への拡散に起因する、歯周炎と他の全身性炎症状態 (心血管疾患、冠動脈心疾患、および有害な妊娠転帰を含む) との間の関連性を示している。

## 【0266】

歯周疾患の主な治療は、歯の表面から歯垢を物理的に削り取るプロセスである、スクレーピングおよびルートプレーニング (SRP) である。これはプラークの大部分の除去に効果的であるが、病原性細菌を直接死滅させたり、歯表面の再コロニー形成を予防するもの

ではない。この理由から、重度の慢性歯周炎患者は、多くの場合、補助的な抗菌療法と共にSRPを受ける。最も一般的に処方される口腔用抗菌剤の一つであるクロルヘキシジンなどの薬剤を組み込んだ抗菌インプラントは、このような目的に使用されているが、その有効性に影響を与える多くの問題に直面している。歯および歯茎の変色、味覚の変化、および健康な細胞に対する毒性を含むクロルヘキシジンの望ましくない副作用は、その有用性を阻害し、患者のコンプライアンスを妨げかねない。さらに、歯周ポケットから口腔内に液体が絶えず流れ込む歯肉溝滲出液（GCF）の流れにより、歯周ポケットへの局所的薬剤送達は困難であり得る。結果として、副作用が限定的である強力な抗菌剤と、歯周病原体を効果的に根絶するために、抗菌剤を歯周ポケットに送達することができる物質の両方に対するニーズがある。

10

#### 【0267】

一酸化窒素（NO）は、哺乳動物の免疫反応において重要な役割を果たす内因性抗菌剤である。これは、細菌にニトロソ化および酸化ストレスの両方を及ぼすことができる反応性副生成物の形成を含む、その多数の死滅機構により、広範なスペクトルの抗菌活性を示す。結果として、NOは、多くの従来の抗菌剤よりも細菌耐性を促進する可能性が低い。ガス状NOの効果的な局所送達における課題は、一酸化窒素を貯蔵および放出することができるNO供与体の開発を必要としてきた。開発されてきた多数のNO供与体の中でもN-ジアゼニウムジオレートは、その水性環境でのNOのプロトン介在性放出が理由で、歯科治療法にとって魅力的な選択肢である。外部条件（すなわち、pHおよび温度）に依存する放出動態、およびNO供与体自体の化学構造により、様々な動態プロファイルを実現することができる。さらに、二級アミン含有構造を修飾してNO放出を付与する能力は、結果として得られる物質が送達足場および治療剤の両方として作用することができるので、有利である。したがって、歯周ポケットへのNOの送達を局在化するための所望の特性を有する構造を設計することができる。

20

#### 【0268】

セルロースの水溶性合成誘導体であるカルボキシメチルセルロース（CMC）は、その生体適合性、粘着性、および高い溶液粘度により、歯周ポケットで使用するための魅力的な足場である。これは、多くの業界で増粘用および安定化添加剤として広く使用され、また歯科用途でも有用性が認められている。したがって、CMCは、歯周ポケットでの保持力を高めることができ、一方で、その水溶性は時間の経過に伴う自然なクリアランスを可能にする。さらに、CMCは、幅広い分子量および置換度で作製することができ、その意図される最終用途に向けて追加の調整可能性を可能にする。カルボン酸部分の存在は、穏やかな反応条件下で水溶液中のポリマーの効果的な修飾を可能にし、これは足場に抗菌特性を付与するのに重要である。

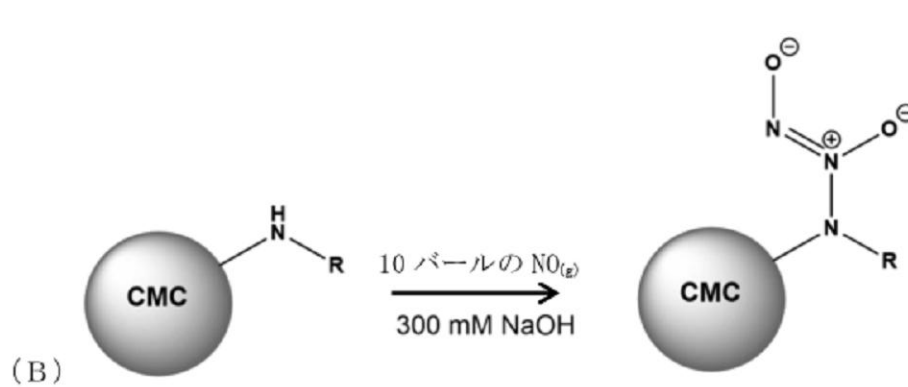
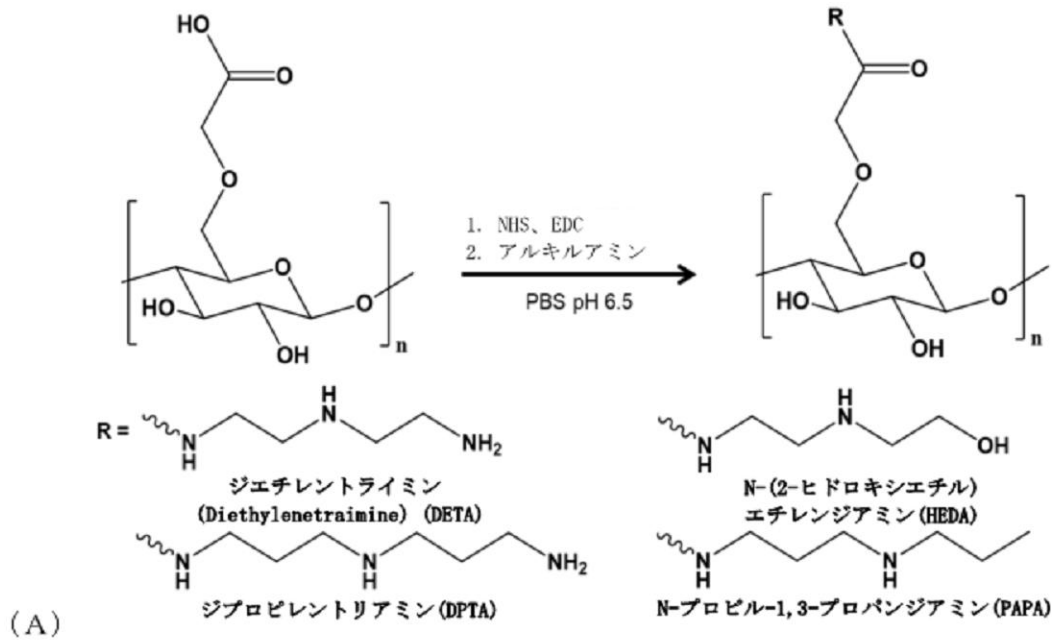
30

#### 【0269】

CMCポリマー骨格上にN-ジアゼニウムジオレートNO供与体を形成するためには、それは、二級アミン部分で化学的に修飾されなければならない。EDCおよびNHSを使用したカルボジイミド架橋反応は、前述のようにカルボン酸含有多糖類の水溶性修飾に有効であり、四つのアルキルアミンを用いたCMCの修飾を可能にする（スキーム2A）。二級アミン修飾後、ポリマーを、塩基性条件下で高圧のガス状NOに曝露することによって、N-ジアゼニウムジオレートを形成することができる（スキーム2B）。スキーム2.（A）アルキルアミンを用いたCMCの修飾、および（B）CMCアミン上のN-ジアゼニウムジオレート形成。

40

## 【化 5 9】



## 【 0 2 7 0】

## 合成の詳細：

材料および方法—カルボキシメチルセルロース (CMC、Mw 90 kDa、DS = 0.7)、ジエチレントリアミン (DETA)、ビス (3-アミノプロピル) アミン (DPTA)、N-(2-ヒドロキシエチル) エチレンジアミン (HEDA)、N-プロピル-1, 3-プロパンジアミン (PAPA)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC)、およびN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) をミリポアシグマ (ミズーリ州セントルイス) から購入した。アグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンス (ATCC # 43717) は、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関 (バージニア州マナサス) から購入した。ポルフィロモナス・ジンジバリス株 A7436 は、米国ノースカロライナ大学歯学部、ノースカロライナ州チャペルヒル、によって提供された。脳心臓浸出物 (BHI) 培養液および寒天培地、CDC 嫌気性 5 体積 % ヒツジ血液寒天培地、および Gas Pak EZ キャンピーサシェ (Gas Pak EZ campy sachets) を、ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー (ニュージャージー州フランクリンレイクス) から購入した。Wilkins-Chalgren (W-C) 培養液を、サーモフィッシャーサイエンティフィック (マサチューセッツ州ウォルサム) から購入した。ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF-1) および FibroLife S2 培地は、ライフライン・セル・テクノロジー LLC (メリーランド州フレデリック) から購入した。純粋な一酸化窒素 (99.5%)、アルゴン、窒素、一酸化窒素キャ

リブレーションガス（25.87 ppm窒素中）、および嫌気性ガス混合物（10%水素、5%二酸化炭素、バランス窒素）を、Airgas（ノースカロライナ州ダーラム）から購入した。バイオビジョン（BioVision）（カリフォルニア州ミルピタス）からMTS試薬を購入し、ミリポアシグマからフェナジンメトサルフェート（PMS）を購入した。一般的な実験室用塩および溶媒を、サーモフィッシャーサイエンティフィック（マサチューセッツ州ウォルサム）から購入した。

#### 【0271】

アミン修飾カルボキシメチルセルロースの合成。まず、CMCの溶液を、100mgの90kDaのCMCを、10mLのpH6.5リン酸緩衝生理食塩水（10mMのPBS 6.5）中に溶解することによって調製した。固体を磁気攪拌で完全に溶解した後、CMC上のカルボキシレートの数に対して5:1モル過剰のNHSを添加し、その後、同等のモル過剰のEDCを添加した。混合物を20分間攪拌した後、それぞれのアルキルアミンを、EDCに対する1:1のモル比でボラスとして添加した。溶液を一晩攪拌（16時間）し、次いで透析チューブ（MWCO 10kDa）に移し、頻りに水を換えながら、脱イオン水に対して3日間透析した。最終溶液をプラスチックチューブに移し、-80℃で凍結し、ラブコンコフリーズ-50℃凍結乾燥機（ラブコンコ、ミズーリ州カンザスシティ）上で凍結乾燥して、繊維状白色固体を得た。

#### 【0272】

アミン結合の形成を、パーキンエルマー100 FTIR（パーキンエルマー、マサチューセッツ州ウォルサム）を使用して定性的に確認し、パーキンエルマーシリーズII CHNS/Oアナライザー（パーキンエルマー、マサチューセッツ州ウォルサム）を用いて修飾効率を定量化した。2414屈折率検出器（ウォーターズ、マサチューセッツ州ミルフォード）およびminiDawn TREOS多角度光散乱検出器（ワイアット（Wyatt）テクノロジー、カリフォルニア州サンタバーバラ）に連結されたBreeze 2サイズ排除クロマトグラフィー機器（ウォーターズ、マサチューセッツ州ミルフォード）を使用して分子量を決定した。簡潔に述べると、0.1重量%のCMC溶液を、0.1Mの酢酸塩（pH4.6）からなる移動相緩衝液中で、0.1MのNaNO<sub>3</sub>と0.02重量%のNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>と共に調製した。各試料の50μLのアリコート注入し、0.6mL分-1の流量で、連続して二つのカラム（2x Shodex OHpak LB804、昭和電工アメリカ、ニューヨーク州ニューヨーク）を通して流した。

#### 【0273】

N-ジアゼニウムジオレート修飾カルボキシメチルセルロースの合成。アミン修飾CMCの溶液を、300mMのNaOH中、2重量%で調製した。溶液をParr水素化反応器に入れ、アルゴンで6回パージし（短いパージを3回、その後10分間パージを3回）、その後10バールのNOガスで3日間加圧した。次いで、反応チャンバを再びアルゴンで6回パージし、N-ジアゼニウムジオレート修飾CMCを冷たいエタノール中で沈殿させ、減圧下で乾燥させた。NO放出試料はすべて、使用前に-20℃で保存した。

#### 【0274】

CMC足場からの一酸化窒素放出は、Zysense 280i一酸化窒素分析器（NOA、Zysense、コロラド州フレデリック）を使用して特徴解析した。典型的な実験では、1mgのNO放出試料を、25mLの脱酸素化PBS（10mM、pH7.4、37℃）に浸した。窒素ガスを200mL分-1で溶液中に流し、足場から放出されたNOをNOAに移した。放出は、NOレベルが、足場1mg当たりのNOが10ppb未満になるまで測定された。

#### 【0275】

合成されたCMC足場の分析：

四つの異なるアミン修飾CMCを、90kDaのCMCと小分子アミンとの間の水性カルボジイミド架橋反応により調製した。ジエチレントリアミン（DETA）、ビス（3-アミノプロピル）アミン（DPTA）、N-（2-ヒドロキシエチル）エチレンジアミン（HEDA）、およびN-プロピル-1,3-プロパンジアミン（PAPA）とのCMC

の反応は、それぞれCMC-DETA、CMC-DPTA、CMC-HEDA、およびCMC-PAPAを生成した。

#### 【0276】

成功したアミン結合を定性的に決定するために、CMC-アミンをFTIR分光法を使用して分析した(図8)。非修飾CMCは、 $1590\text{ cm}^{-1}$ で単一のピークを示し、カルボニルC=Oストレッチを示す。各アミン試料で修飾すると、単数形のカルボニルストレッチングシグナルは、それぞれN-HベンディングおよびC=Oストレッチングの特徴である、 $1560\text{ cm}^{-1}$ および $1630\text{ cm}^{-1}$ で現れた二つの新しいピークによって追い越される。このFTIR分析は、アミド結合が形成され、それゆえアミンがCMCにうまく結合(コンジュゲート)されたことを支持するが、一方で、修飾の程度を定量化するために元素分析が必要であった。CHNS/O元素分析器を使用して各試料内の窒素パーセントを決定することにより、表4に示すように、一級アミン含量に加えてCMC骨格のカルボキシレート修飾の推定を可能にした(HEDAおよびPAPAは修飾後に追加の一級アミンを欠くため、DETAおよびDPTAのみ)。特に、アミン同一性の差異にもかかわらず、修飾効率は比較的一貫したままであった。

#### 【表4】

表4. CHN元素分析からのCMC修飾の程度

| 試料       | %N              | %COOH修飾    | 一級アミン含量( $\mu\text{mol mg}^{-1}$ ) |
|----------|-----------------|------------|------------------------------------|
| CMC-DETA | 7.11 $\pm$ 0.22 | 63 $\pm$ 2 | 1.69 $\pm$ 0.05                    |
| CMC-DPTA | 7.11 $\pm$ 0.92 | 68 $\pm$ 9 | 1.69 $\pm$ 0.22                    |
| CMC-HEDA | 6.99 $\pm$ 0.28 | 67 $\pm$ 3 | 0                                  |
| CMC-PAPA | 7.04 $\pm$ 0.25 | 59 $\pm$ 2 | 0                                  |

#### 【0277】

次に、各足場の分子量( $M_w$ )をSEC-MALSを用いて決定し、元素分析に基づいて計算された理論的 $M_w$ と比較した(表5)。

#### 【表5】

表5. 理論的 $M_w$ と比較した足場の分子量( $M_w$ )

| 試料       | 理論的 $M_w(\text{kDa})^a$ | 測定された $M_w(\text{kDa})^b$ | $D^b$ |
|----------|-------------------------|---------------------------|-------|
| CMC      | 90,000                  | 86,450                    | 2.39  |
| CMC-DETA | 110,400                 | 155,600                   | 2.20  |
| CMC-DPTA | 117,900                 | 116,100                   | 1.86  |
| CMC-HEDA | 111,700                 | 139,700                   | 1.30  |
| CMC-PAPA | 111,800                 | 105,100                   | 1.59  |

#### 【0278】

$M_w$ の明らかな増加が、非修飾バイオポリマーと比較してすべてのCMC-アミンについて観察された。CMC-DETAについては、実験的に決定された $M_w$ は、理論値よりもはるかに高く、二つの反応性アミン末端基の存在により、何らかの架橋を示す可能性が高い。しかしながら、DPTAについては同様の増加は観察されず、また、二つのアミン末端基も有しており、おそらくその大きなモル質量から生じたより高い立体障害性の結果である。CMC-HEDAについての $M_w$ の増加は、ヒドロキシル末端基に由来する、よ

り強い水素結合に起因した。驚くべきことに、可能性として、ポリマー骨格へのカチオン性電荷の導入から生じる試料相互作用の結果、修飾後に試料の分散性は減少した。N-ジアゼニウムジオレートの形成を介して、一酸化窒素放出能力がCMC-アミンに付与された。これらの修飾は、3日間の塩基性水溶液中の加圧された（10バール）NOガスと足場を反応させることによって達成された。250 nmにおける特徴的な吸光度ピークの存在を実証するために、UV-vis分光法を使用して、成功したN-ジアゼニウムジオレートの形成を確認した（図21）。さらに、化学発光に基づく一酸化窒素分析器を使用して、NO放出特性をリアルタイムで決定した。表6に示すように、生理学的条件下（37℃、pH7.4）での、NO放出の全範囲の特徴付けが、CMC-アミンについて達成可能な動態の範囲を、アミン修飾の化学構造の関数として示す。CMC-DETA/NOは、分子内環形成に由来するジアゼニウムジオレートの一級アミン安定化の結果として、最長の半減期（約3時間）を有する。CMC-DPTA/NOは、ジアゼニウムジオレートと類似の一級アミンの相互作用を有するが、その鎖長が長いため、分子内安定化があまり良好でなく、したがって、NO放出半減期がより短い。興味深いことに、CMC-HEDA/NOは、一級アミンが欠乏しているにもかかわらず、CMC-DPTA/NOと半減期が類似している。これは、一級アミンと比較して、一級ヒドロキシル基とジアゼニウムジオレートとの間のより強い水素結合、およびDETAにより類似したアルキル鎖長を有するHEDAの両方に起因する。最後に、CMC-PAPA/NOは、そのアルキル末端基がNO放出部分との間に非常に少ない相互作用を有するため、四つの系の中で最も急速なNO放出を示した。

#### 【表6】

表6. N-ジアゼニウムジオレート修飾CMCからの一酸化窒素放出の特徴付け

| 試料          | $t[\text{NO}]^a(\mu\text{mol mg}^{-1})$ | $t_{1/2}^b(\text{分})$ | $t_d^c(\text{時間})$ |
|-------------|-----------------------------------------|-----------------------|--------------------|
| CMC-DETA/NO | $0.29 \pm 0.07$                         | $179.0 \pm 6.2$       | $11.6 \pm 2.1$     |
| CMC-DPTA/NO | $0.27 \pm 0.05$                         | $24.0 \pm 2.6$        | $6.7 \pm 1.9$      |
| CMC-HEDA/NO | $0.45 \pm 0.03$                         | $25.0 \pm 5.4$        | $4.6 \pm 0.2$      |
| CMC-PAPA/NO | $0.38 \pm 0.11$                         | $11.3 \pm 2.4$        | $2.2 \pm 0.8$      |

<sup>a</sup>足場から放出されたNOの総量。<sup>b</sup>NO放出の半減期。<sup>c</sup>10ppb  $\text{mg}^{-1}$ に到達する前のNO放出の持続期間。

#### 【0279】

例示的な使用方法：

#### 実施例3A-ヒアルロン酸足場

以下の実施例は、例えば、創傷治癒における、抗菌剤としてのN-ジアゼニウムジオレート官能化一酸化窒素（NO）放出ヒアルロン酸の使用に関する。実施例1で生成された足場は、様々な細菌培養物に対して、以下の実験で使用される：

#### 【0280】

プランクトン性細菌殺菌アッセイ。緑膿菌、大腸菌、フェカリス菌、黄色ブドウ球菌、多剤耐性（MDR）緑膿菌、およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の細菌培養物を、TSB（3mL）中で37℃で一晩、凍結（-80℃）ストックから成長させた。一晩おいた溶液のアリコート（1mL）を、新鮮なTSB（50mL）中で $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ の濃度に再培養し、その後、PBS（10mM、pH7.4）中で $10^6$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ に希釈した。対照（NO放出しない）HA、NO放出HA、またはネオマイシン硫酸塩の計量された試料をPBS中に溶解し、1MのHClで滴定してpHを7.4に調整した。試料を96ウェルのポリスチレンプレートに添加し、PBS中で連続希釈して、各ウェルが100  $\mu\text{L}$ の対照HA、NO放出HA、またはネオマイシンを含有するようにした。 $10^6$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ （100  $\mu\text{L}$ 、1体積%のTSB補充PBS）を含有する細菌溶液を各ウェルに添加し、0.25～32  $\text{mg mL}^{-1}$ の範囲の最終HA濃度、または0.5～1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$ のネオマイシン濃度を得た。次いで、96ウェルプレート

を、穏やかに振とうしながら、37℃で4時間インキュベートした。未処理の細菌溶液を各実験に含めて、連続4時間にわたる細菌の生存可能性を保証した。4時間の曝露後、細菌溶液を連続希釈（10倍、100倍、および1000倍希釈）し、エディジェットスパイラルプレーター（IUL、ニューヨーク州ファーミングデール）を使用して、TSAプレート上にらせん状に培養し、37℃で一晩インキュベートした。HAまたはネオマイシンを用いた処理後の細菌の生存可能性を、フラッシュアンドゴーコロニーカウンター（IUL、ニューヨーク州ファーミングデール）を使用して決定した。4時間の曝露期間（MBC<sub>4時間</sub>）後の最小殺菌濃度は、未処理の細菌と比較して、細菌生存可能性における3 logの減少（99.9%以上の減少）を達成するために必要な最小濃度として定義された（すなわち、細菌数を $10^6$ から $10^3$  CFU mL<sup>-1</sup>に減少させた）。この計数方法の検出限界は、 $2.5 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup>である。殺菌作用に必要なNO用量は、NO放出HA試料（mg mL<sup>-1</sup>）のMBC<sub>4時間</sub>に、4時間でPBS（pH 7.4；μmol NO mg<sup>-1</sup> HA）中に放出された合計NOを乗じることによって計算した。様々な細菌に対するNO放出ヒアルロン酸の最低殺菌濃度（MBC<sub>4時間</sub>）は、表7および9に記載されている。DPTA修飾HAは、 $\leq 2$  mg mL<sup>-1</sup>の用量ですべての細菌株を根絶する。4時間処理後の細菌生存可能性において、3 logの減少を引き出すために必要なNOまたはネオマイシンの用量を表8および10に記載する。様々な細菌に対する、活性成分NO放出ヒアルロン酸の抗菌有効性を図10および13～15に記載する。NOは、低濃度で、抗生物質耐性細菌に対して殺菌性である。提示されたデータはすべて、nが3以上の別個の実験からのものである。

#### 【表7】

表7. グラム陰性細菌（大腸菌と緑膿菌）、およびグラム陽性細菌（黄色ブドウ球菌とフェカリス菌）に対する、NO放出ヒアルロン酸の最低殺菌濃度（MBC<sub>4時間</sub>）。<sup>a</sup>

| 修飾           | MBC <sub>4時間</sub> (mg mL <sup>-1</sup> ) |     |         |        |
|--------------|-------------------------------------------|-----|---------|--------|
|              | 大腸菌                                       | 緑膿菌 | 黄色ブドウ球菌 | フェカリス菌 |
| HA6-PAPA/NO  | 0.5                                       | 1   | 4       | 8      |
| HA6-HEDA/NO  | 2                                         | 2   | 8       | 16     |
| HA6-DPTA/NO  | 1                                         | 1   | 2       | 2      |
| HA6-DETA/NO  | 2                                         | 2   | 16      | 32     |
| HA90-PAPA/NO | 1                                         | 2   | 8       | >32    |
| HA90-HEDA/NO | 4                                         | 4   | >32     | >32    |
| HA90-DPTA/NO | 1                                         | 2   | 2       | 2      |
| HA90-DETA/NO | 8                                         | 4   | 32      | >32    |

<sup>a</sup> nが3以上の実験から決定したMBC<sub>4時間</sub>。

【表 8】

表 8. NO 放出ヒアルロン酸への 4 時間の処理後、細菌生存可能性における 310 g の減少を引き出すために必要な NO の用量。

| 修飾               | NO の用量 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) <sup>a</sup> |         |                     |                     |
|------------------|-----------------------------------------------|---------|---------------------|---------------------|
|                  | 大腸菌                                           | 緑膿菌     | 黄色ブドウ球菌             | フェカリス菌              |
| HA6-PAPA/N<br>O  | 7 ± 1                                         | 13 ± 1  | 52 ± 2              | 103 ± 5             |
| HA6-HEDA/N<br>O  | 30 ± 4                                        | 30 ± 4  | 120 ± 14            | 240 ± 29            |
| HA6-DPTA/N<br>O  | 14 ± 3                                        | 14 ± 3  | 29 ± 5              | 29 ± 5              |
| HA6-DETA/N<br>O  | 21 ± 5                                        | 21 ± 5  | 168 ± 38            | 336 ± 77            |
| HA90-PAPA/N<br>O | 9 ± 2                                         | 17 ± 3  | 70 ± 12             | 検出限界以下 <sup>b</sup> |
| HA90-HEDA/N<br>O | 47 ± 10                                       | 47 ± 10 | 検出限界以下 <sup>b</sup> | 検出限界以下 <sup>b</sup> |
| HA90-DPTA/N<br>O | 11 ± 2                                        | 22 ± 3  | 22 ± 3              | 22 ± 3              |
| HA90-DETA/N<br>O | 55 ± 7                                        | 28 ± 4  | 221 ± 29            | 検出限界以下 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup> MBC<sub>4時間</sub> および、PBS (10 mM、pH 7.4、37 °C) 中の 4 時間の曝露時間にわたって放出された合計 NO から導き出された NO 用量。<sup>b</sup> MBC<sub>4h</sub> が、評価された最も高い HA 濃度を超えたため、NO 用量は決定できなかった。

【表 9】

表 9. 抗生物質耐性細菌に対する、NO 放出 DPTA 修飾ヒアルロン酸の最低殺菌濃度 (MBC<sub>4時間</sub>)。<sup>a</sup>

| 修飾           | MBC <sub>4時間</sub> (mg mL <sup>-1</sup> ) |      |
|--------------|-------------------------------------------|------|
|              | MDR-緑膿菌                                   | MRSA |
| HA6-DPTA/NO  | 1                                         | 2    |
| HA90-DPTA/NO | 1                                         | 2    |

<sup>a</sup> n が 3 以上の実験から決定した MBC<sub>4時間</sub>。

## 【表 10】

表 10. 4 時間曝露後のプランクトン性細菌の生存可能性における  $3 \log$  の減少を引き出すために必要なネオマイシンの用量。

| 細菌      | [ネオマイシン] <sup>a</sup><br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) |
|---------|----------------------------------------------------|
| 大腸菌     | 1                                                  |
| 緑膿菌     | 32                                                 |
| 黄色ブドウ球菌 | 2                                                  |
| フェカリス菌  | 64                                                 |
| MDR-緑膿菌 | 128                                                |
| MRSA    | >1024                                              |

10

<sup>a</sup> nが3以上の実験から決定された殺菌ネオマイシン用量。

## 【0281】

時間ベースのプランクトン性細菌殺菌アッセイ。4 時間プランクトン性細菌殺菌アッセイに対して、 $10^6 \text{ CFU mL}^{-1}$  の緑膿菌と黄色ブドウ球菌とを含有する細菌溶液を、記載通りに調製した。 $6 \text{ kDa}$  の NO 放出 HA の計量された試料を、 $4 \text{ mg mL}^{-1}$  または  $32 \text{ mg mL}^{-1}$  (それぞれ緑膿菌および黄色ブドウ球菌処理用) で PBS 中に溶解し、 $1 \text{ M}$  の HCl で滴定して pH を 7.4 に調整した。 $10^6 \text{ CFU mL}^{-1}$  細菌溶液の等価体積を各バイアルに加え、最終濃度の NO 放出 HA を  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  または  $16 \text{ mg mL}^{-1}$  にした。未処理の細菌溶液が、4 時間の曝露期間にわたる生存可能性を保証するために、含まれた。細菌溶液を、穏やかに振とうしながら  $37^\circ\text{C}$  でインキュベートした。所定の時点 (すなわち、0 時間、0.5 時間、1 時間、1.5 時間、2 時間、3 時間、および 4 時間) で、 $100 \mu\text{L}$  の細菌溶液のアリコート除去し、連続希釈 (10 倍および 100 倍希釈) し、エディジェットスパイラルプレーターを使用して TSA プレート上に培養し、 $37^\circ\text{C}$  で一晩インキュベートした。各時点での細菌生存可能性を、フラッシュアンドゴーコロニーカウンターを使用して決定した。細菌に対する NO 放出 HA 誘導体の時間ベースの殺菌アッセイの結果を、図 9 に記載する。HA-DPTA/NO は、細菌を迅速かつ低濃度で根絶する。

20

30

## 【0282】

バイオフィーム根絶アッセイ。緑膿菌および MDR-緑膿菌の細菌培養物を、TSB (3 mL) 中で  $37^\circ\text{C}$  で一晩、凍結 ( $-80^\circ\text{C}$ ) ストックから成長させ、新鮮な TSB 中で  $10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$  の濃度まで再培養した。 $10^8$  溶液 ( $18 \mu\text{L}$ ) のアリコートを、24 ウェルのポリスチレンプレート中の  $1800 \mu\text{L}$  の新鮮な TSB に加え、穏やかに振とうしながら  $37^\circ\text{C}$  で 72 時間インキュベートした。一酸化窒素放出 DPTA 修飾 HA、またはネオマイシンを、1 ドラムバイアル中の PBS ( $750 \mu\text{L}$ 、pH 7.4、 $10 \text{ mM}$ ) に溶解し、 $1 \text{ M}$  の HCl を用いて pH 7.4 に調整した。バイオフィーム ( $250 \mu\text{L}$ ) を PBS (pH 7.4、 $10 \text{ mM}$ ) で洗浄し、1 ドラムバイアルに添加した。 $4 \sim 32 \text{ mg mL}^{-1}$  の NO 放出 DPTA 修飾 HA または  $30 \sim 240 \mu\text{g mL}^{-1}$  ネオマイシン硫酸塩を用いた処理は、穏やかに振とうしながら、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間にわたって行われた。未処理のバイオフィームを各実験に含めて、連続 24 時間にわたるバイオフィームの生存可能性を保証した。処理後、バイオフィーム ( $100 \mu\text{L}$ ) を 10 倍希釈し、ピペットおよびボルテックスにより分散させた。バイオフィーム溶液をさらに希釈 (1, 000 倍および 100, 000 倍) し、エディジェットスパイラルプレーターを使用して TSA プレート上に培養し、 $37^\circ\text{C}$  で一晩インキュベートした。HA またはネオマイシンを用いた処理後のバイオフィーム生存可能性を、フラッシュアンドゴーコロニーカウンターを使用して決定した。24 時間の曝露期間 (MBEC<sub>24</sub> 時間) 後の最小バイオフィーム根絶濃度は、未処理の細菌と比較して、細菌生存可能性における  $5 \log$  の減少 (99

40

50

・ 999%以上の減少)を達成するために必要な最小濃度として定義された(すなわち、細菌数を $10^8$ から $10^3$  CFU mL<sup>-1</sup>に減少させた)。バイオフィーム根絶に必要なNO用量は、NO放出HA試料(mg mL<sup>-1</sup>)のMBEC<sub>24</sub>時間に、pH7.4のPBS( $\mu$ mol NO mg<sup>-1</sup> HA)中に放出された合計NOを乗じることによって計算した。細菌が既存であるバイオフィームをネオマイシン硫酸塩または一酸化窒素放出DPTA修飾HAを用いて24時間処理した後の、バイオフィーム生存可能性の結果は、図11、16、および17に記載される。提示されたデータはすべて、nが3以上の別個の実験からのものである。低分子量HA>高分子量HA NO>ネオマイシン。

#### 【0283】

インビトロ細胞毒性アッセイ。L929マウス線維芽細胞を、10体積%のFBSおよび1重量%のペニシリンストレプトマイシンで補充したDMEM中で増殖させた。細胞を、37℃の加湿条件下で5体積%のCO<sub>2</sub>中でインキュベートした。80%の培養密度に達した後、細胞を、 $1 \times 10^4$ 細胞ウェル<sup>-1</sup>の密度で、96ウェルポリスチレンプレート上に播種した。37℃で24時間インキュベートした後、上清を吸引し、0.25~32 mg mL<sup>-1</sup>の範囲のHA濃度の新鮮な成長培地中の対照またはNO放出HAのいずれかの100  $\mu$ Lで、置換した。次いで培養物を、24時間、37℃でインキュベートした。曝露後、上清を吸引し、ウェルをPBSで2回洗浄した。DMEM/MTS/PMS(105/20/1、v/v/v)の100  $\mu$ Lの混合物を各ウェルに加え、37℃で90分間インキュベートした。各ウェル中の溶液の吸光度を、モレキュラーデバイススペクトラマックスM2(カリフォルニア州サンノゼ)を使用して490 nmで測定した。DMEM/MTS/PMSのブランク混合物、および未処理細胞を、それぞれブランクおよび対照として使用した。各試料に対する細胞生存可能性を以下のように計算した：

#### 【数1】

$$\% \text{細胞生存可能性} = \frac{(Abs_{490} - Abs_{ブランク})}{(Abs_{対照} - Abs_{ブランク})} \times 100 \quad (\text{式2})$$

#### 【0284】

グラフパッド プリズム 8ソフトウェア(カリフォルニア州、サンディエゴ)を使用して、用量反応曲線をプロットした。IC<sub>50</sub>値を決定するために、非線形回帰(勾配変化のある法面を有する正規化応答(normalized response with variable slope))分析を実施した。非修飾、アミン修飾、およびNO放出HAを用いた処理後のIC<sub>50</sub>結果およびL929マウス線維芽細胞の生存可能性の結果を、図12、18、および19に記載する。細胞毒性は、NOペイロードにより強く影響を受け、NO放出HEDA修飾HAは、細胞に対して最も毒性が低い。提示されたデータはすべて、nが3以上の別個の実験からのものである。

#### 【0285】

実施例3B-カルボキシメチルセルロース足場

以下の実施例は、NO放出カルボキシメチルセルロース(CMC)の使用に関する。実施例2で生成された足場は、様々な細菌培養物に対して、以下の実験で使用される：

#### 【0286】

2時間最低殺菌濃度(MBC<sub>2時間</sub>)の決定。ポルフィロモナス・ジンジバリスを、嫌気性チャンバ(コイ・ラボラトリー・プロダクツ、ミシガン州グレースレイク)中のW-C嫌気性培養液の凍結ストックから一晚再接種(reinoculated)した。細菌の300  $\mu$ Lアリコートを生きた培養液に移し、 $10^8$  cfu/mLに成長させた。アグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンスは、GasPak EZキャンピー容器システムを使用して、微好気性条件下で脳心臓浸出物(BHI)培養液を使用して同様に調製した。600 nmでの光学密度(OD<sub>600</sub>)を測定することによって、細菌濃度を確認した。1%の培養液添加PBS 7.4中で細菌を $10^6$  cfu/mLに希釈し、37℃で2時間、好気条件下で対照(すなわち、非NO放出)およびNO放出物質に曝露した。物質に曝露しないとき、両方の細菌について、静菌状態を確認した。曝露後、試料をP

B S 7 . 4 中 で 1 0 ～ 1 0 0 0 倍 希 釈 し、I U L イ ン ス ト ウ ル メ ン ツ エ デ ィ ジ ャ ッ ト 2 ス パ イ ラ ル プ レ ー タ ー ( N e u t e c G r o u p、 ニ ュ ー ヨ ー ク 州 フ ァ ー ミ ン グ デ ー ル ) を 使 用 し て、対 応 す る 寒 天 培 地 上 に 培 養 し た。C D C 嫌 気 性 5 体 積 % ヒ ツ ジ 血 液 寒 天 培 地 上 の ポ ル フ ィ ロ モ ナ ス ・ ジ ン ジ バ リ ス を、嫌 気 性 チ ャ ン バ 内 で 3 日 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し、脳 心 臓 浸 出 物 寒 天 培 地 ( B H A ) 上 の ア グ リ ゲ イ テ ィ バ ク タ ー ・ ア ク チ ノ ミ セ テ ム コ ミ タ ン ス を、微 好 気 条 件 下 で 3 日 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。イ ン キ ュ ベ ー ト し た 後、I U L イ ン ス ト ウ ル メ ン ツ フ ラ ッ シ ュ ア ン ド ゴ ー ( N e u t e c G r o u p、 ニ ュ ー ヨ ー ク 州 フ ァ ー ミ ン グ デ ー ル ) を 用 い て 平 板 計 数 法 を 用 い て 細 菌 濃 度 を 決 定 し た。

【 0 2 8 7 】

N O 放 出 C M C ア ミ ン の 抗 菌 有 効 性 を、二 つ の 顕 著 な 歯 周 病 病 原 体 ( p e r i o d o n t o p a t h o g e n s )、ポ ル フ ィ ロ モ ナ ス ・ ジ ン ジ バ リ ス お よ び ア グ リ ゲ イ テ ィ バ ク タ ー ・ ア ク チ ノ ミ セ テ ム コ ミ タ ン ス の プ ラ ン ク ト ン 形 態 に 対 し て 評 価 し た。こ れ ら の グ ラ ム 陰 性 細 菌 は 両 方 と も、慢 性 歯 周 炎 の 発 症 に お け る キ ー ス ト ー ン 病 原 体 と し て 作 用 す る ポ ル フ ィ ロ モ ナ ス ・ ジ ン ジ バ リ ス、お よ び よ り 局 所 的 で 攻 撃 的 な 形 態 の 歯 周 炎 を 引 き 起 こ す ア グ リ ゲ イ テ ィ バ ク タ ー ・ ア ク チ ノ ミ セ テ ム コ ミ タ ン ス と と も に、歯 周 疾 患 の 増 殖 に お い て 重 要 な 役 割 を 果 た す。表 1 1 に 提 示 さ れ る 抗 菌 有 効 性 は、静 的 条 件 下 ( M B C <sub>2</sub> 時 間 ) で の 2 時 間 曝 露 に お け る 各 ポ リ マ ー の 最 低 殺 菌 濃 度 ( す な わ ち、細 菌 生 存 可 能 性 の 3 l o g の 減 少 ) を 決 定 す る こ と に よ っ て 評 価 さ れ た。

【 0 2 8 8 】

C M C - D E T A / N O を 除 い て、N O 放 出 足 場 は、両 方 の 病 原 体 に 対 し て 同 様 の 死 滅 有 効 性 を 有 し て い た。特 に、対 照 ( す な わ ち、非 N O 放 出 ) 足 場 は 最 小 限 の 殺 菌 作 用 し か 示 さ ず、N O が 実 際 に 殺 菌 剤 と し て 作 用 し て い る こ と を 支 持 し た。C M C - D E T A / N O の N O 放 出 半 減 期 が よ り 遅 い と、曝 露 の 長 さ で あ る 2 時 間 で の 総 N O が よ り 低 減 し、し た が っ て、殺 菌 活 性 を 引 き 出 す た め に よ り 高 い 足 場 濃 度 が 必 要 と な っ た。対 象 と な る 歯 周 病 病 原 体 の 両 方 が グ ラ ム 陰 性 で あ る 一 方 で、N O 浸 透 性 を 低 下 さ せ る 可 能 性 の あ る カ プ セ ル を 有 す る ポ ル フ ィ ロ モ ナ ス ・ ジ ン ジ バ リ ス の A 7 4 3 6 株 は、ア グ リ ゲ イ テ ィ バ ク タ ー ・ ア ク チ ノ ミ セ テ ム コ ミ タ ン ス と 比 較 し て、試 験 さ れ た ポ リ マ ー の 三 つ に 対 し て わ ず か に 高 い M B C <sub>2</sub> 時 間 を も た ら す。

【 表 1 1 】

表 1 1 . 顕 著 な 歯 周 病 病 原 体 に 対 す る N O 放 出 C M C の 抗 菌 有 効 性

| 試料          | ポ ル フ ィ ロ モ ナ ス ・ ジ ン ジ バ リ ス                |                                     | ア グ リ ゲ イ テ ィ バ ク タ ー ・ ア ク チ ノ ミ セ テ ム コ ミ タ ン ス |                                     |
|-------------|----------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------|
|             | MBC <sub>2時間</sub><br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | 2時間NO用量<br>(μmol mL <sup>-1</sup> ) | MBC <sub>2時間</sub><br>(mg mL <sup>-1</sup> )      | 2時間NO用量<br>(μmol mL <sup>-1</sup> ) |
| CMC-DETA    | >16                                          | —                                   | >16                                               | —                                   |
| CMC-DETA/NO | 16                                           | 1.96                                | 4                                                 | 0.49                                |
| CMC-DPTA    | >16                                          | —                                   | >16                                               | —                                   |
| CMC-DPTA/NO | 4                                            | 1.00                                | 2                                                 | 0.50                                |
| CMC-HEDA    | >16                                          | —                                   | >16                                               | —                                   |
| CMC-HEDA/NO | 4                                            | 1.68                                | 2                                                 | 0.84                                |
| CMC-PAPA    | >16                                          | —                                   | >16                                               | —                                   |
| CMC-PAPA/NO | 2                                            | 0.75                                | 2                                                 | 0.75                                |

【 0 2 8 9 】

ヒ ト 歯 肉 線 維 芽 細 胞 に 対 す る 修 飾 C M C の 細 胞 毒 性。H G F - 1 細 胞 を、1 % の ペ ニ シ リ ン お よ び ス ト レ プ ト マ イ シ ン を 補 充 し た F i b r o L i f e S 2 培 地 中 で 培 養 し、加 湿 し た 5 体 積 % の C O <sub>2</sub> 中 で 3 7 ° C で イ ン キ ュ ベ ー ト し た。約 8 0 % の 培 養 密 度 に 達 し た ら、細 胞 を ト リ プ シ ン 処 理 し、組 織 培 養 処 理 9 6 ウ ェ ル ポ リ ス チ レ ン プ レ ー ト に 1 0 <sup>4</sup> 細 胞 / ウ ェ ル の 密 度 で 配 置 し た。9 6 ウ ェ ル プ レ ー ト 中 で 2 4 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 後、

培地を吸引し、対照およびNO放出CMCを含有する100μLの培地で置換した。37℃で24時間曝露した後、各ウェルからの培地を吸引し、細胞をPBSで洗浄し、100μLのMTS溶液(105/20/1 v/v/vで培地/MTS/PMSから構成される)を添加した。プレートを2時間インキュベートした後、スペクトラマックス M2 UV-vis分光光度計(モレキュラーデバイス、カリフォルニア州サンノゼ)を用いて、490nmで各ウェルの培地の吸光度を測定した。対照(未処理細胞)およびブランク(MTS溶液)を用いて、以下の式を用いて相対細胞生存可能性を決定した：

【数2】

$$\%細胞生存可能性 = \frac{Abs_{490} - Abs_{ブランク}}{Abs_{対照} - Abs_{ブランク}} * 100\%$$

【0290】

哺乳動物細胞に対するCMC足場の毒性は、ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)を24時間、NO放出および非NO放出物質の両方に曝露することによって、図20で評価された。代謝活性をMTSアッセイを使用してエンドポイントで決定し、未処理の細胞は100%生存可能性を示し、細胞生存可能性と関連付けられた。アミン修飾CMCについては、CMC-DPTAのみが、8mg/mLで約80%、16mg/mLで約30%に減少という、HGF生存可能性において有意な減少をもたらした。NO放出CMCポリマーについて、より顕著な差異が観察された。最大4mg/mLまで、CMC-DETA/NOは、NOの増殖効果または細胞代謝の増加のいずれかの結果として、ベースラインよりも一貫してより高い明白な細胞生存可能性をもたらした。4mg/mLを超えると、おそらく、線維芽細胞に酸化およびニトロソ化ストレスをもたらすNO用量の増加に応答して、細胞生存可能性はすべての物質で低下した。特に、高い細胞生存可能性は、CMC-DETA/NOを除くすべての足場のMBC2時間で、24時間維持される。

【0291】

これは、二つの顕著な歯周病病原体であるポルフィロモナス・ジンジバリスおよびアグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンスに対する抗菌剤としての、NO放出カルボキシメチルセルロースの有効性を示す。インビトロ結果では、より速いNO放出動態が、より低いMBC2時間でもたらされ、CMC-DETA/NO以外の全ての足場が、HGF-1細胞に対して有意に細胞毒性でない濃度で細菌の3logの減少を達成することが可能であることを示した。

【0292】

#### 実施例4

##### 予想実施例

実施例2に開示されるCMC-DETAの溶液を、PBS中、10mg/mLの濃度で調製する。溶液を、成人男性患者のナイフ創傷の開裂に注射器を介して注射する。創傷の内面に到達すると、粘性溶液は、硬いゲルを形成する。ゲルは包帯で覆われる。対照として、同様の創傷を有する別の患者は、創傷を洗浄し、バシトラシンの塗布を適用し、それを包帯で被覆することによって治療される。毎日、実験用および対照の抗菌製剤を再塗布し、新しい包帯に取り換える。

【0293】

3日後、実験用患者は感染の兆候を示さない。対照患者は、創傷の周りに発赤を有し、細菌の侵入を示す。

【0294】

1週間後、実験用患者の創傷は治癒し、残されたものは瘢痕のみである。対照患者の創傷は、17日間を経て治癒する。

【0295】

#### 実施例4

##### 予想実施例

実施例 1 に開示される H A 6 - D P T A / N O の溶液を、P B S 中、5 m g / m l の濃度で調製する。実施例 2 に開示される C M C - D E T A の溶液を、P B S 中、1 0 m g / m l の濃度で調製する。二つの溶液は混合され、固いゲルを形成する。このゲルは、M R S A に感染し、以前に抗生物質で治療された糖尿病足病変の痛みに適用される。ゲルは包帯で覆われる。ゲルは、毎日新鮮な包帯と共に再塗布される。

【 0 2 9 6 】

6 日後、患者は感染の兆候を示さない。3 週間後、患者の創傷は治癒する。

【 0 2 9 7 】

上述の実施形態の特定の特徴および態様の、様々な組み合わせまたは部分的組み合わせがなされてもよく、なおも発明のうちの一つ以上の範囲内であることが企図される。さらに、実施形態に関連して、任意の特定の特徴、態様、方法、特性、特質、品質、属性、要素、または類似のものについての本明細書の開示は、本明細書に記載する他のすべての実施形態で使用され得る。したがって、本開示の実施形態の様々な特徴および態様は、本開示の発明の様々な様式を形成するために、互いに組み合わせることができるか、または置換することができることが理解されるべきである。したがって、本明細書に開示する本発明の範囲は、上述の特定の開示された実施形態によって限定されるべきではないことが意図される。さらに、本発明は、様々な改変、および代替形態の影響を受けやすいが、その具体的な例が図面に示されており、本明細書に詳細に記載されている。しかしながら、本発明は、開示される特定の形態または方法に限定されるべきではなく、逆に、記載される様々な実施形態および添付の特許請求の範囲の精神および範囲内にある全ての改変、同等物、および代替物を網羅することが理解されるべきである。本明細書に開示される任意の方法は、列挙された順序で実施される必要はない。本明細書に開示される方法は、実践者によってなされる特定の行為を含むが、明示的または黙示的に、それらの行為についての任意の第三者の指示もまた含むことができる。例えば、「N O 供与体組成物の投与すること」などの行為には、「N O 供与体組成物の投与を指示すること」が含まれる。さらに、本開示の特徴または態様が、マーカッシュ群の点で記述される場合、当業者は、それによって、本開示が、マーカッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループの点においても記述されていることを認識するであろう。

【 0 2 9 8 】

本明細書に開示される範囲はまた、任意のおよびすべての重複、サブ範囲、およびそれらの組み合わせを包含する。「までの」、「少なくとも」、「より大きい」、「より小さい」、「の間」などの文言は、列挙された数を含む。「約」または「およそ」などの用語が先行する数字は、列挙された数字を含む。例えば、「約 1 0 1 ミリパスカル秒 ( a b o u t 1 0 o n e m i l l i p a s c a l - s e c o n d ) 」は「1 0 1 ミリパスカル秒」を含む。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

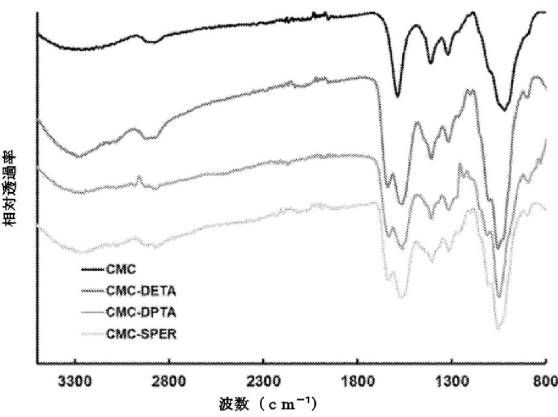


図 1

【図 2】

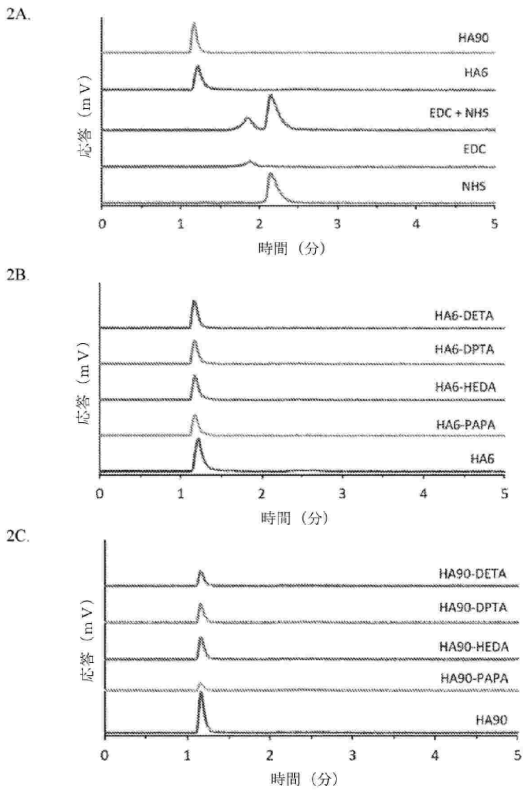


図 2

10

20

30

40

50

【図 3 - 1】

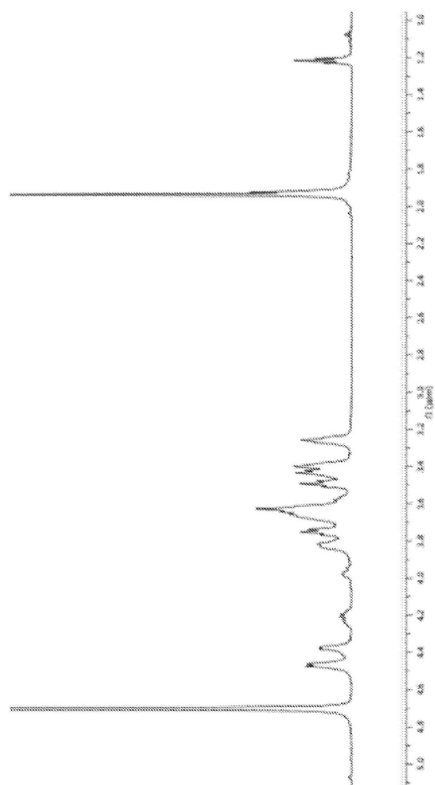


図 3 A

【図 3 - 2】

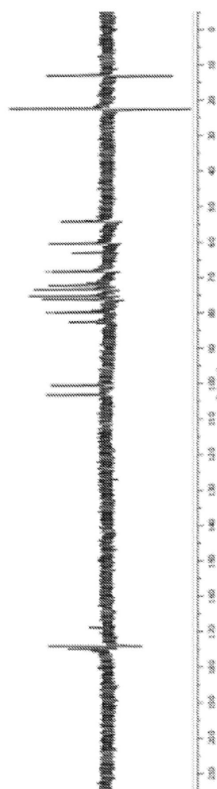


図 3 B

【図 4 - 1】

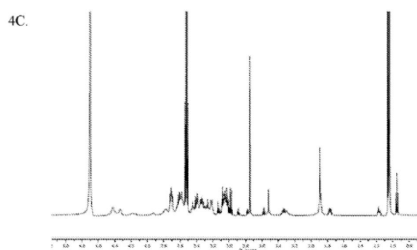
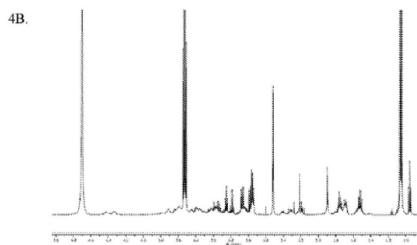
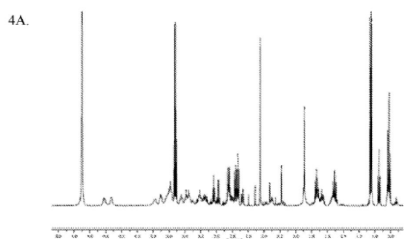


図 4 A ~ C

【図 4 - 2】

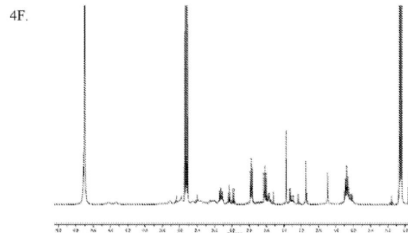
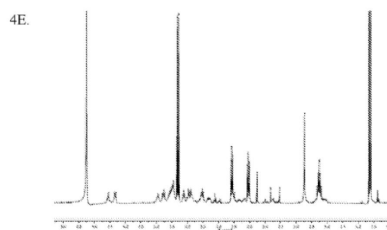
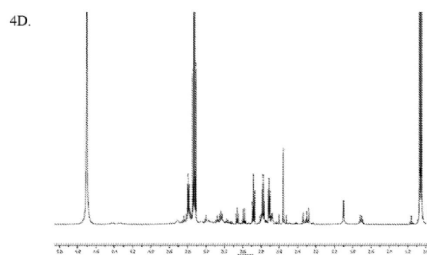


図 4 D ~ F

10

20

30

40

50

【図 4 - 3】

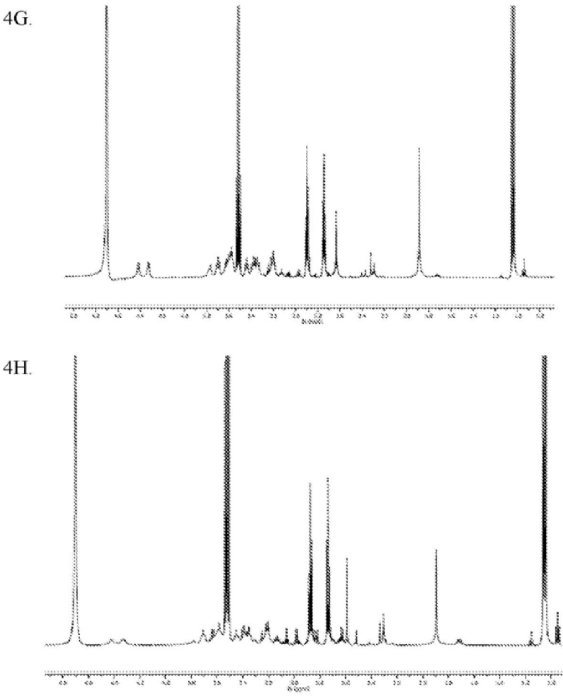


図 4 G~H

【図 5 - 1】

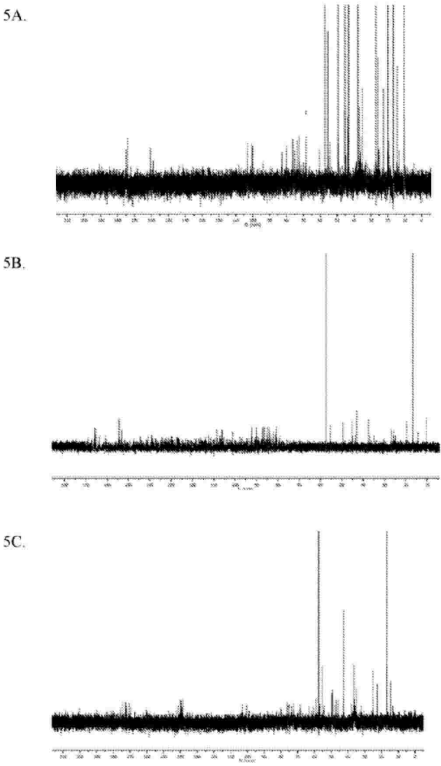


図 5 A~C

【図 5 - 2】

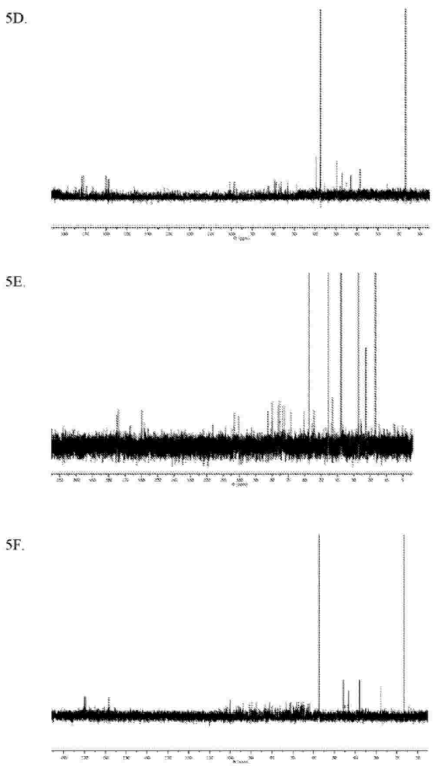


図 5 D~F

【図 5 - 3】

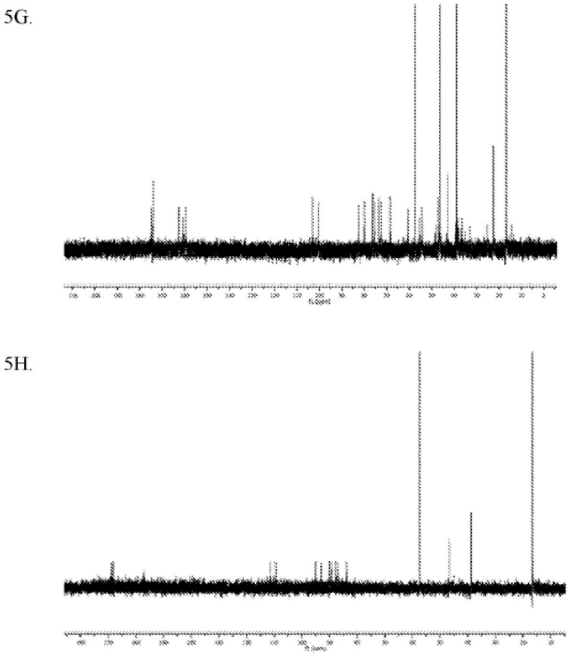


図 5 G~H

10

20

30

40

50

【図 5 - 4】

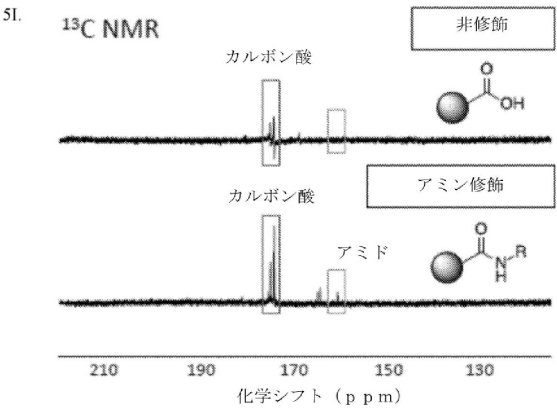


図 5 I

【図 6 - 1】

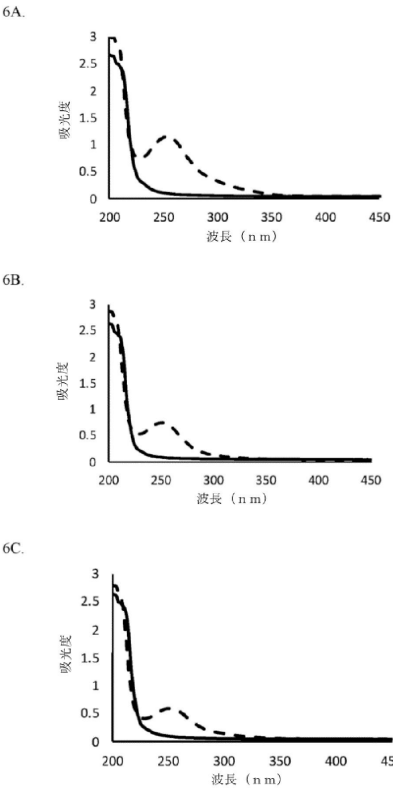


図 6 A ~ C

【図 6 - 2】

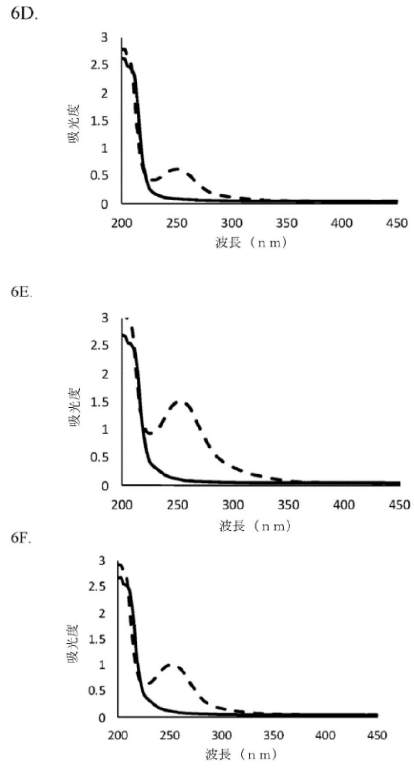


図 6 D ~ F

【図 6 - 3】

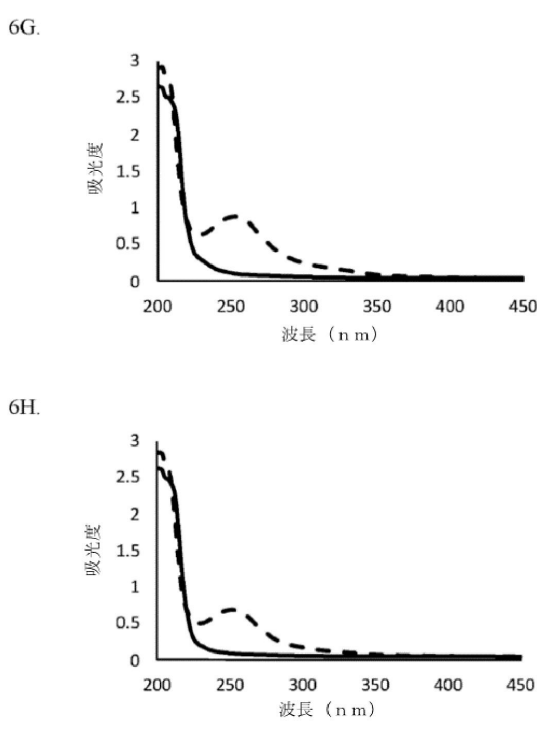


図 6 G ~ H

10

20

30

40

50

【図 7-1】

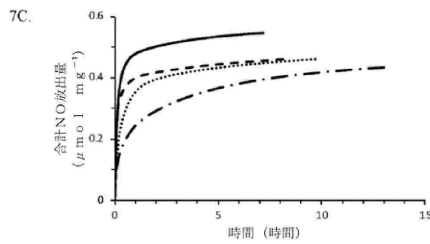
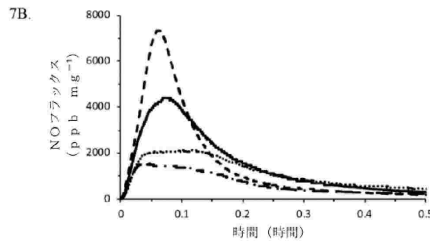
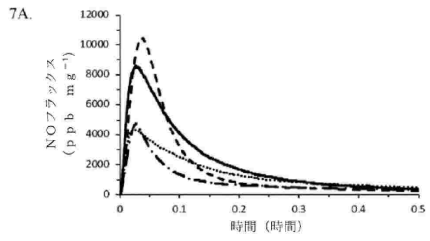


図 7 A~C

【図 7-2】

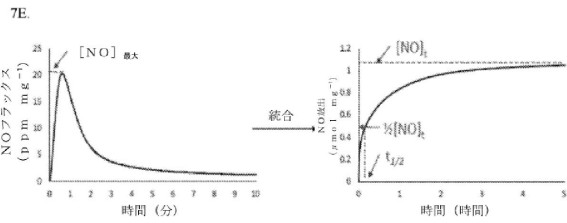
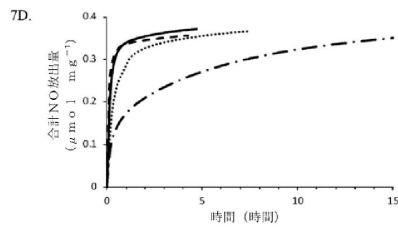


図 7 D~E

【図 8】

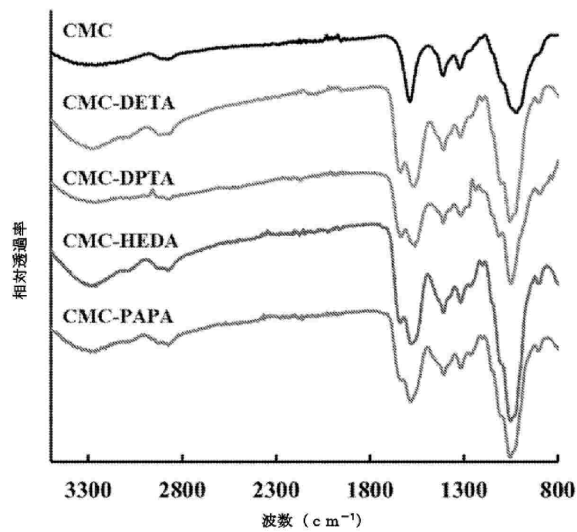


図 8

【図 9】

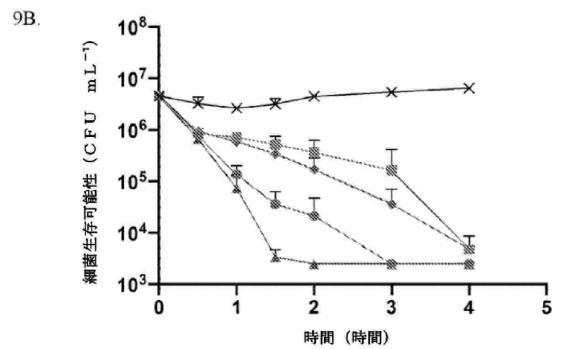
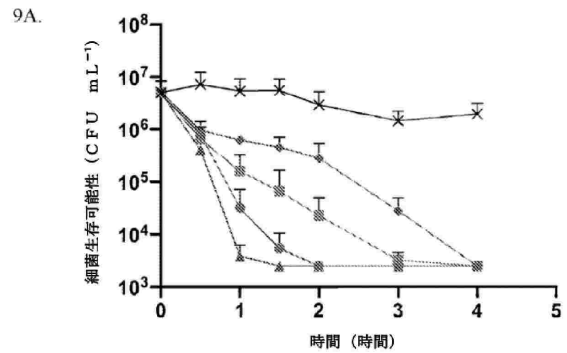


図 9

## 【図 10-1】

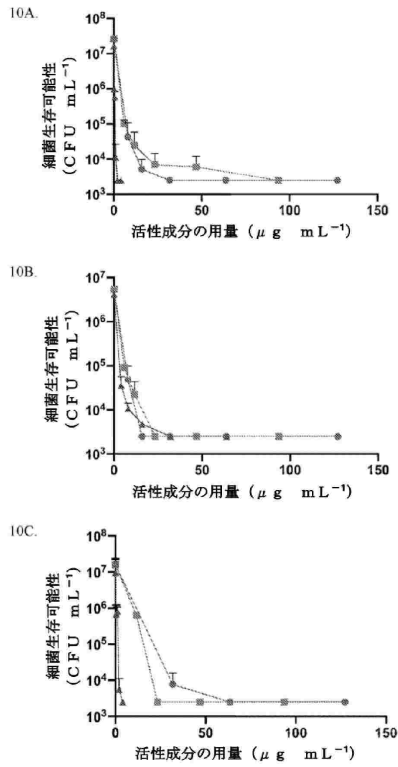


図 10A~C

## 【図 10-2】

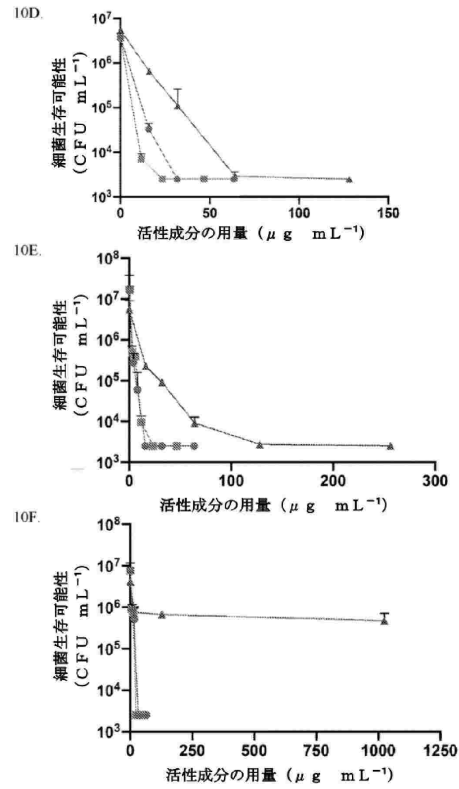


図 10D~F

## 【図 11】

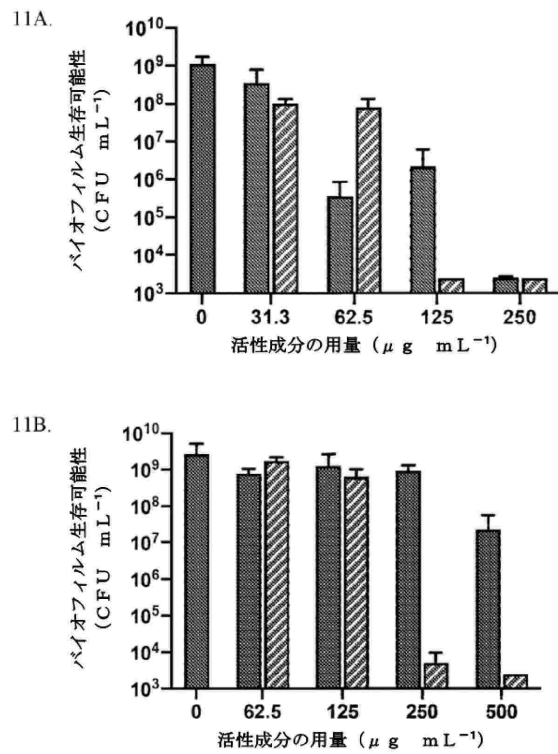
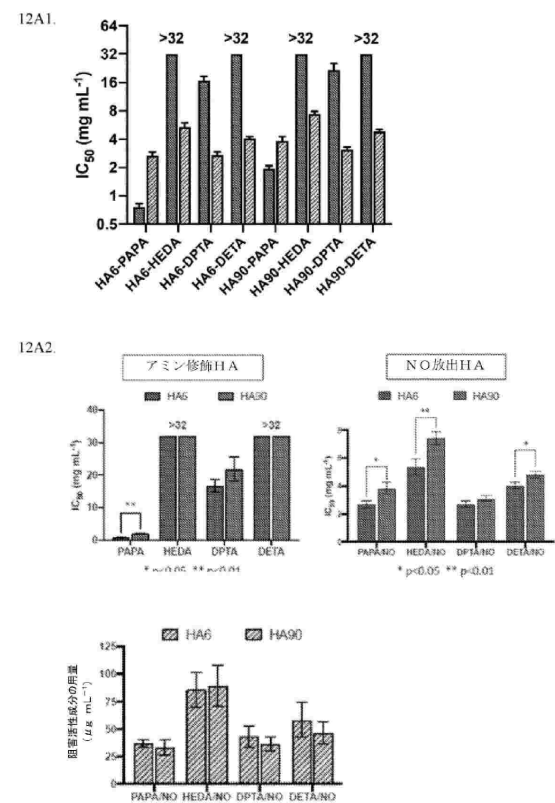


図 11

## 【図 12-1】



10

20

30

40

50

【図 1 2 - 2】

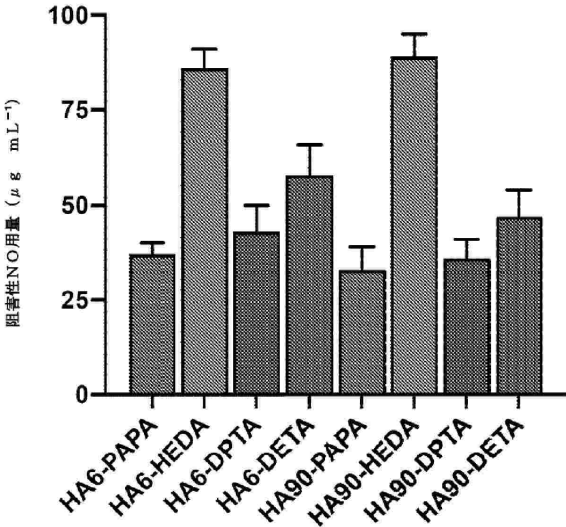


図 1 2 B

【図 1 3 - 1】

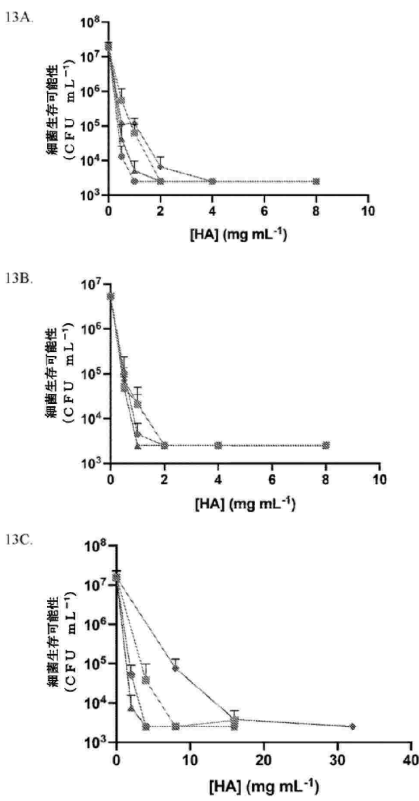


図 1 3 A ~ C

【図 1 3 - 2】

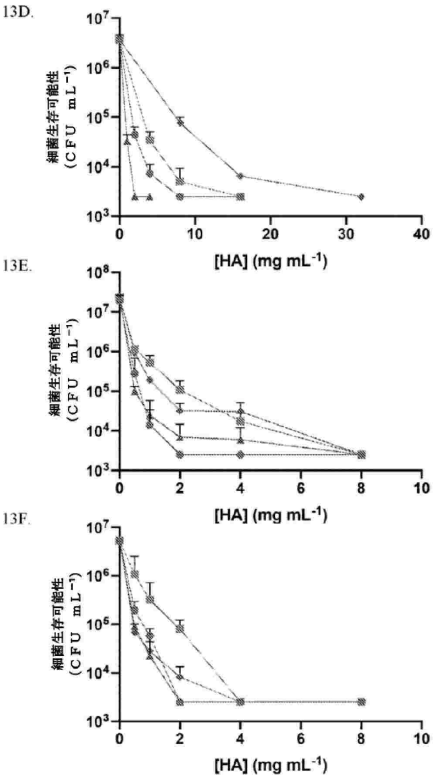


図 1 3 D ~ F

【図 1 3 - 3】

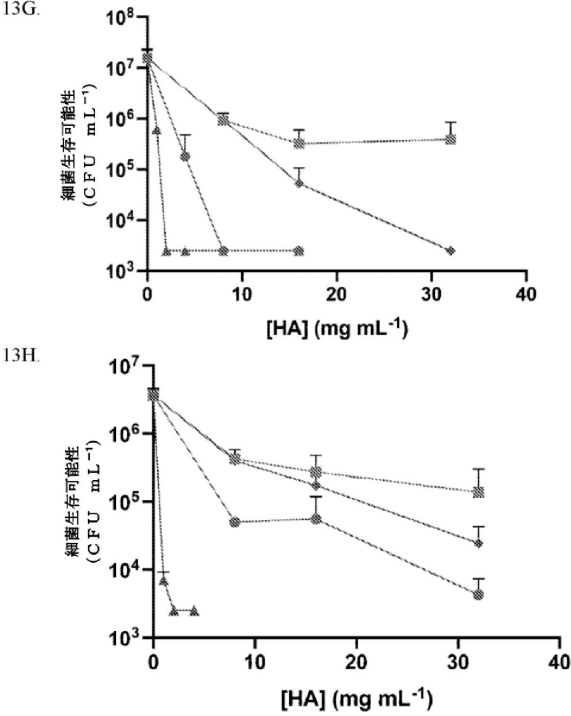


図 1 3 G ~ H

10

20

30

40

50

【図 1 4 - 1】

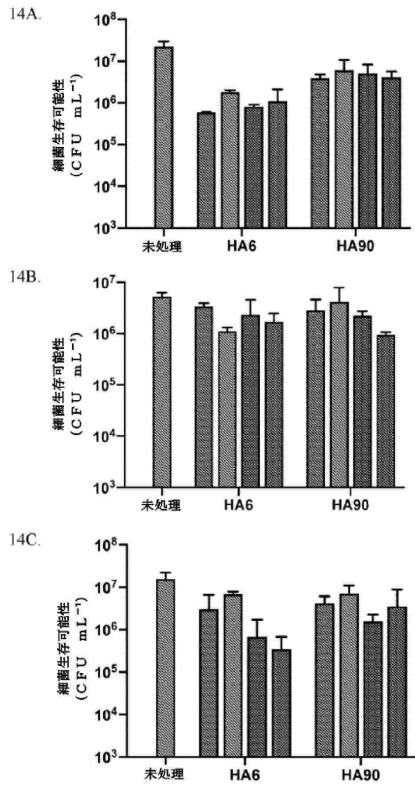


図 1 4 A ~ C

【図 1 4 - 2】

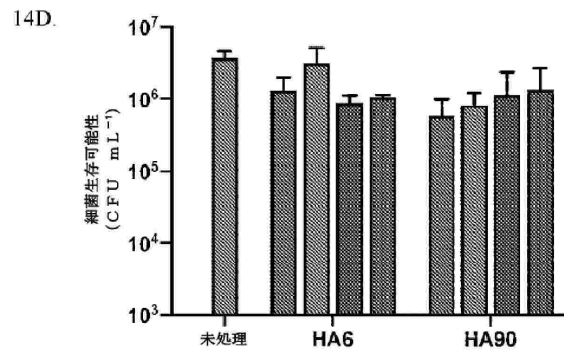
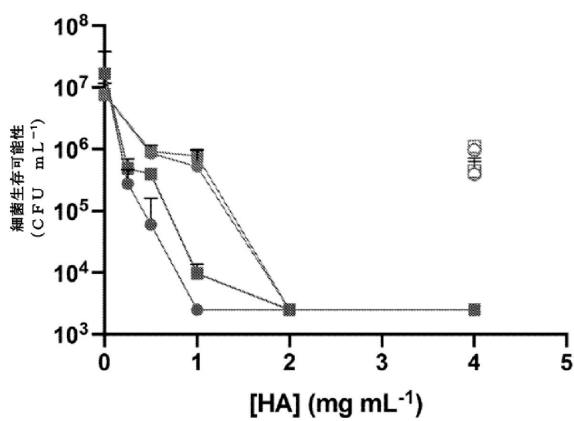


図 1 4 D

【図 1 5】



【図 1 6 - 1】

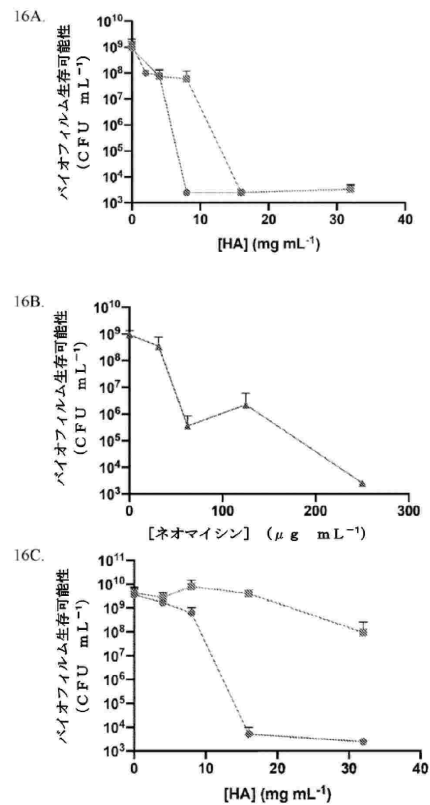


図 1 6 A ~ C

【図 16-2】

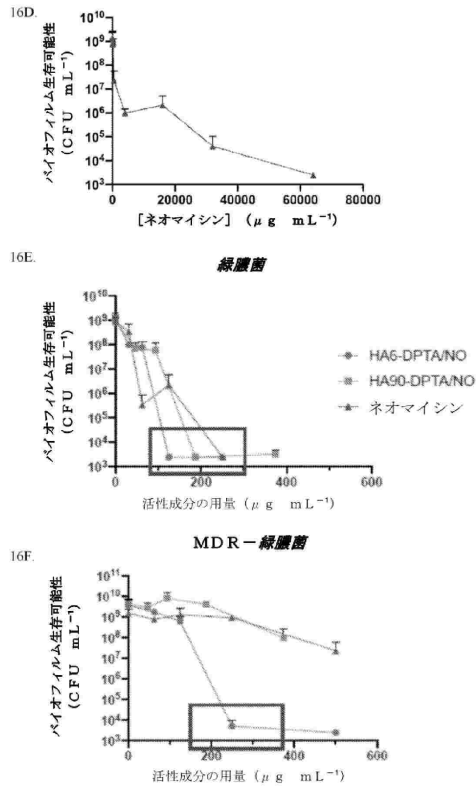


図 16 D ~ F

【図 17】

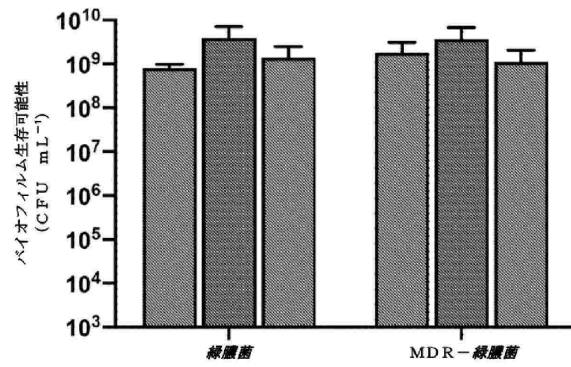


図 17

【図 18】

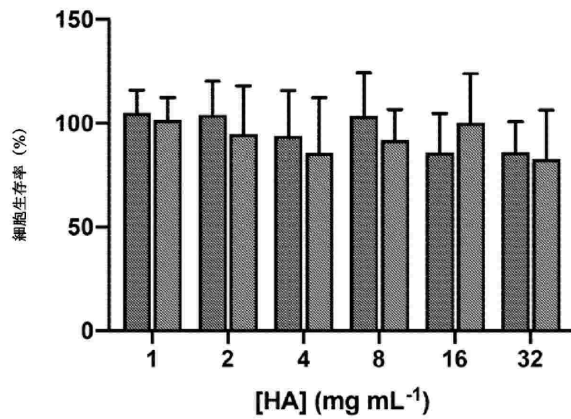


図 18

【図 19-1】

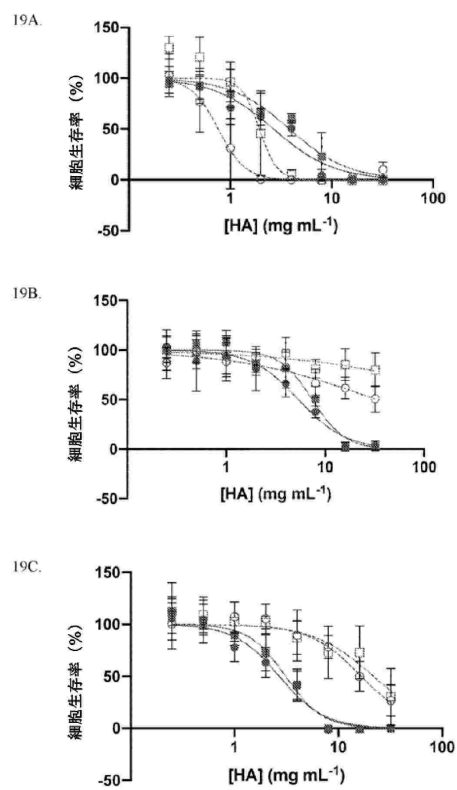


図 19 A ~ C

10

20

30

40

50

【図 19 - 2】

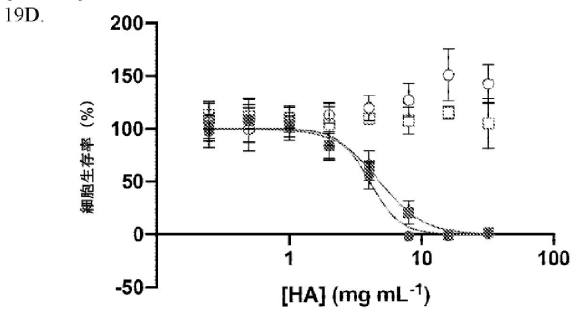


図 19 D

【図 20】

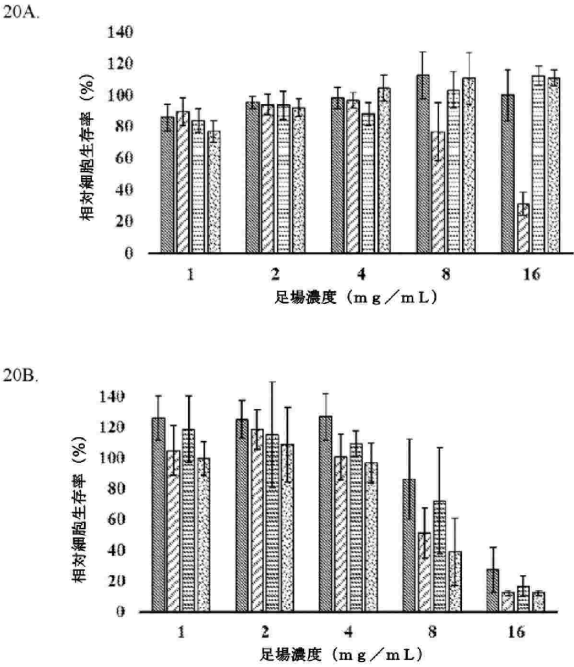


図 20 A ~ B

【図 21 - 1】

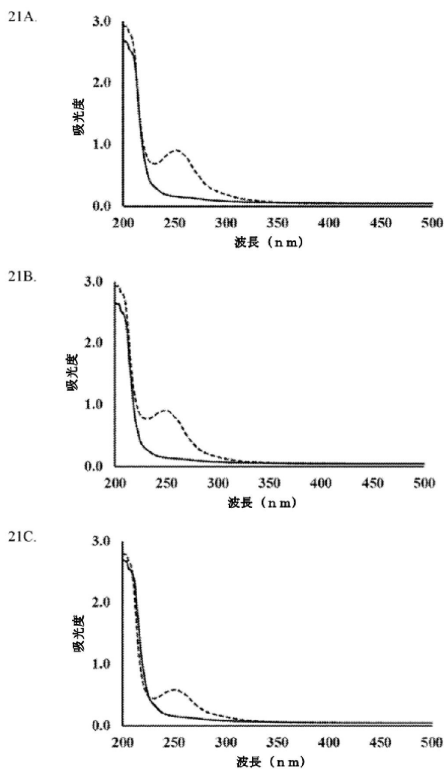


図 21 A ~ C

【図 21 - 2】

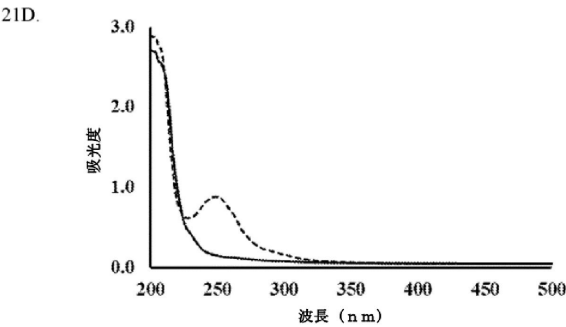


図 21 D

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

- (72)発明者 シャーンフィッシュ, マーク エイチ  
アメリカ合衆国 2 7 5 1 6 ノースカロライナ州チャペル・ヒル、オータム・ドライブ 2 1 4
- (72)発明者 アホネン, モナ ジャスミン アール  
アメリカ合衆国 2 7 5 1 4 ノースカロライナ州チャペル・ヒル、ベイティ・ヒル・ドライブ 1 6 0  
0、アパートメント 1 2 4
- (72)発明者 ヤン, レイ  
アメリカ合衆国 2 7 5 1 0 ノースカロライナ州キャルボロ、ロック・ヘイブン・ロード 1 0 0、ア  
パートメント・ビー 1 0 4
- (72)発明者 ジン, ハイバオ  
アメリカ合衆国 2 7 5 1 0 ノースカロライナ州キャルボロ、ロック・ヘイブン・ロード 1 0 0、ア  
パートメント・ジー 2 0 5
- (72)発明者 フューラ, エバン スコット  
アメリカ合衆国 2 7 5 1 0 ノースカロライナ州キャルボロ、ディラード・ストリート 1 1 1
- (72)発明者 マロニー, サラ エリザベス  
アメリカ合衆国 2 7 5 1 4 ノースカロライナ州チャペル・ヒル、バトラー・コート 2 0 3
- 審査官 中村 政彦
- (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 3 0 6 0 1 2 (U S , A 1)  
国際公開第 2 0 1 8 / 1 2 7 8 1 9 (W O , A 1)  
特表 2 0 1 5 - 5 2 4 8 7 7 (J P , A)  
LU, Y. et al., S-Nitrosothiol-modified nitric oxide-releasing chitosan oligosaccharides as anti  
bacterial agents, Acta Biomaterialia, 2015年, Vol. 12, pp. 62-69, DOI: 10.1016/j.actbi  
o.2014.10.028
- (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)  
C 0 8 B 3 7 / 0 0  
A 6 1 K 3 1 / 0 0  
A 6 1 P 3 1 / 0 0  
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)