

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-523898

(P2013-523898A)

(43) 公表日 平成25年6月17日(2013.6.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/722 (2006.01)	A 6 1 K 31/722	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 6
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 103 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-505181 (P2013-505181)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月15日 (2011.4.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月12日 (2012.12.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/032709
 (87) 国際公開番号 W02011/130646
 (87) 国際公開日 平成23年10月20日 (2011.10.20)
 (31) 優先権主張番号 61/324, 657
 (32) 優先日 平成22年4月15日 (2010.4.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501250337
 マリン ポリマー テクノロジーズ, イン
 コーポレーテッド
 アメリカ合衆国 01923 マサチュー
 セッツ州, ダンバース, ウォーター スト
 リート 107
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人原謙三国際特許事務所
 (72) 発明者 ヴォルナキス, ジョーン, エヌ.
 アメリカ合衆国, 29403 サウスカロ
 ライナ州, チャールストン, ローンデス
 ポイント ドライブ 23

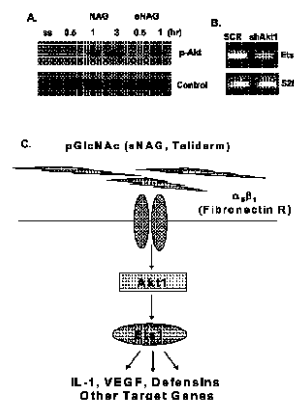
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリ-N-アセチルグルコサミンナノファイバーの抗菌性の適用

(57) 【要約】

本明細書では、ポリ-N-アセチルグルコサミンおよび/またはポリ-N-アセチルグルコサミンの誘導体の短くなった繊維(sNAGナノファイバー)を含んでいる組成物、並びに当該組成物の抗菌性に関する利用が記載されている。上記sNAGナノファイバーは、細菌の感染、および当該感染に関連した疾患の予防および/または治療のために、組成物へと製剤化され得る。上記組成物を用いた投薬計画もまた記載されている。

Fig. 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験体における細菌の感染を治療する方法であって、以下の工程を含んでいることを特徴とする方法：

上記細菌の感染と診断された被験体、または上記細菌の感染の 1 つ以上の症状を示している被験体に対して、s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物を局所的に投与する工程であって、

上記 s N A G ナノファイバーのうちの 5 0 % を上回る s N A G ナノファイバーが約 1 ~ 1 5 μ m の間の長さであり、

上記 s N A G ナノファイバーは、in vitro における *Staphylococcus aureus* の細菌培養物の細菌の増殖または生存に影響を与えないものであり、かつ、

上記 s N A G ナノファイバーは、筋肉内への埋め込み試験において試験された場合に非反応性である工程。

【請求項 2】

上記感染は、皮膚感染、胃腸感染、呼吸器感染、尿路感染、または生殖器官感染であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

被験体における細菌の感染に関連した疾患、または、細菌の不均衡に関連した疾患を治療する方法であって、以下の工程を含んでいることを特徴とする方法：

上記細菌の感染に関連した疾患、もしくは、細菌の不均衡に関連した疾患と診断された被験体、または、上記細菌の感染に関連した疾患、もしくは、細菌の不均衡に関連した疾患の 1 つ以上の症状を示している被験体に対して、s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物を局所的に投与する工程であって、

上記 s N A G ナノファイバーのうちの 5 0 % を上回る s N A G ナノファイバーが約 1 ~ 1 5 μ m の間の長さであり、

上記 s N A G ナノファイバーは、in vitro における *Staphylococcus aureus* の細菌培養物の細菌の増殖または生存に影響を与えないものであり、かつ、

上記 s N A G ナノファイバーは、筋肉内への埋め込み試験を行った場合に非反応性である工程。

【請求項 4】

上記疾患は、細菌の感染に関連していることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

上記疾患は、皮膚疾患または胃腸疾患であることを特徴とする請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

上記感染は、院内感染であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

細菌の感染に関連した疾患を予防する方法であって、以下の工程を含んでいることを特徴とする方法：

被験体に対して、s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物を局所的に投与する工程であって、

上記 s N A G ナノファイバーのうちの 5 0 % を上回る s N A G ナノファイバーが約 1 ~ 1 5 μ m の間の長さであり、

上記 s N A G ナノファイバーは、in vitro における *Staphylococcus aureus* の細菌培養物の細菌の増殖または生存に影響を与えないものであり、かつ、

上記 s N A G ナノファイバーは、筋肉内への埋め込み試験を行った場合に非反応性である工程。

【請求項 8】

上記被験体は、創傷を有している、または、外科手術を経験していることを特徴とする

10

20

30

40

50

請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

被験体における細菌に感染した創傷を治療する方法であって、以下の工程を含んでいることを特徴とする方法：

細菌の感染と診断された被験体、または、細菌の感染の 1 つ以上の症状を示している被験体における上記創傷の部位に対して、s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物を局所的に投与する工程であって、

上記 s N A G ナノファイバーのうちの 5 0 % を上回る s N A G ナノファイバーが約 1 ~ 1 5 μ m の間の長さであり、

上記 s N A G ナノファイバーは、in vitro における *Staphylococcus aureus* の細菌培養物の細菌の増殖または生存に影響を与えないものであり、かつ、

上記 s N A G ナノファイバーは、筋肉内への埋め込み試験を行った場合に非反応性である工程。

【請求項 1 0】

上記創傷は、開放創であることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

上記開放創は、銃創、刺創、裂創、切り傷、擦過傷、穿通創、または外科創傷であることを特徴とする請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

上記創傷は、刺創であり、

上記刺創は、血液透析処置またはカテーテル処置に起因するものであり、

ヒトである上記被験体は、血液透析に関連した感染、またはカテーテル法に関連した感染であると診断されていることを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

上記感染は、以下の種のうちの 1 つ以上の細菌によるものであることを特徴とする請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法： *Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumonia*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibria cholerae*, および *Yersinia pestis*。

【請求項 1 4】

上記細菌は、標準的な抗生物質治療に対して耐性を有していることを特徴とする請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

上記感染は、M R S A の感染、*Pseudomonas* の感染または *C. difficile* の感染であることを特徴とする請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

上記被験体はヒトであることを特徴とする請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

上記 s N A G ナノファイバーは、クリーム、ゲル、軟膏、膜、粉末、スプレー、または

10

20

30

40

50

坐薬として製剤化されることを特徴とする請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

上記組成物は、1 つ以上の追加の抗菌剤を含んでいることを特徴とする請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

上記組成物は、1 つ以上の抗菌剤と併用して投与されることを特徴とする請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

上記抗菌剤が抗生物質であることを特徴とする請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 21】

上記 s N A G ナノファイバーのうちの 50 % を上回る s N A G ナノファイバーが約 2 ~ 10 μ m の間の長さであることを特徴とする請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

上記 s N A G ナノファイバーのうちの 50 % を上回る s N A G ナノファイバーが約 4 ~ 7 μ m の間の長さであることを特徴とする請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

上記 s N A G ナノファイバーの 100 % が約 1 ~ 15 μ m の間の長さであることを特徴とする請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

上記 s N A G ナノファイバーは、ポリ - N - アセチルグルコサミンまたはポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体へのガンマ線照射によって生産され、

上記ポリ - N - アセチルグルコサミンもしくは上記ポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体は、乾燥された繊維の形態で 500 ~ 2000 k g y にて放射線を照射される、または、上記ポリ - N - アセチルグルコサミンもしくは上記ポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体は、湿っている繊維の形態で 100 ~ 500 k g y にて放射線を照射されることを特徴とする請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

上記 s N A G ナノファイバーは、微細藻類のポリ - N - アセチルグルコサミンから生産されることを特徴とする請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

上記 s N A G ナノファイバーは、N - アセチルグルコサミン単糖および / またはグルコサミン単糖を含んでおり、

上記 s N A G ナノファイバーの単糖のうちの 70 % を上回る単糖が N - アセチルグルコサミン単糖であることを特徴とする請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

s N A G ナノファイバーおよび抗生物質を含んでいる組成物であって、

上記 s N A G ナノファイバーのうちの 50 % を上回る s N A G ナノファイバーが約 1 ~ 15 μ m の間の長さであり、

上記 s N A G ナノファイバーは、in vitro における Staphylococcus aureus の細菌培養物の細菌の増殖または生存に影響を与えないものであり、

上記 s N A G ナノファイバーは、筋肉内への埋め込み試験を行った場合に非反応性であることを特徴とする組成物。

【請求項 28】

上記抗生物質は、以下の種類の抗生物質の 1 つに由来する抗生物質であることを特徴とする請求項 27 に記載の組成物：マイクロライド系（例えば、エリスロマイシン、アジスロマイシン）、アミノグリコシド系（例えば、アミカシン、ゲンタマイシン、ネオマイシン、ストレプトマイシン）、セファロsporin 系（例えば、セファドロキシル、セファクロール、セフォタキシム、セフェピム）、フルオロキノロン系（例えば、シプロフロキサシン、レボフロキサシン）、ペニシリン系（例えば、ペニシリン、アンピシリン、アモキ

10

20

30

40

50

シシリン)、テトラサイクリン系(例えば、テトラサイクリン、ドキシサイクリン)、およびカルバペネム系(例えば、メロペネム、イミペネム)。

【請求項29】

s N A G ナノファイバーおよび亜鉛を含んでいる組成物であって、

上記 s N A G ナノファイバーのうちの 50 % を上回る s N A G ナノファイバーが約 1 ~ 15 μ m の間の長さであり、

上記 s N A G ナノファイバーは、in vitro における Staphylococcus aureus の細菌培養物の細菌の増殖または生存に影響を与えないものであり、

上記 s N A G ナノファイバーは、筋肉内への埋め込み試験を行った場合に非反応性であることを特徴とする組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本願は、米国特許仮出願第 61 / 324, 657 号(出願日 2010 年 4 月 15 日)に基づいて優先権を主張し、該特許仮出願の内容は全て参照によって本明細書中に引用されるものとする。

【0002】

〔1. 技術分野〕

本明細書では、ポリ - N - アセチルグルコサミンおよび / またはポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体の短くなった繊維(s N A G ナノファイバー)を含んでいる組成物、並びに当該組成物の抗菌性の適用が記載されている。上記 s N A G ナノファイバーは、細菌の感染、および細菌の感染に関連した疾患の予防および / または治療のために、組成物へと製剤化され得る。上記組成物を用いた投薬計画もまた記載されている。

20

【0003】

〔2. 背景技術〕

現在、抗生物質は、細菌の感染に対する標準的な治療法である。しかしながら、特定の抗生物質に対してアレルギー反応を示す人もいれば、抗生物質に関連した副作用に苦しむ人もおり、また、抗生物質の継続的な利用は、しばしば当該抗生物質の効果の減少を引き起こす。さらに、抗生物質治療は、しばしば細菌の抗生物質耐性株の発生を引き起こす。従って、抵抗性を発生させずに、または長期間にわたって効果を減少させることなく感染に対抗する場合に効果的な、新しい抗菌剤が継続的に必要とされている。臨床的な状況(例えば、皮膚、消化器および呼吸器の感染症の治療、ならびに創傷の治療)において使用することができる、抗生物質ではない抗菌剤が必要とされている。

30

【0004】

創傷感染は、細菌の感染の一種である。特に糖尿病等の慢性疾患を有する患者、または免疫抑制中の患者において、創傷感染は主要な合併症である。上記患者は、好中球およびマクロファージの移動および動員(recruitment)を包含する、適切な炎症反応が崩壊しており、このことは患者の感染を増加させる素因となる(Singer, A.J. and R.A. Clark, 1999, N Engl J Med 341(10): 738-46)。さらに、細菌の感染は、創傷の治癒の欠陥および敗血症を引き起こし得る。現在の多数の抗生物質治療の効果の無さ、および、M R S A (メチシリン耐性 S. aureus) 等の抗生物質耐性菌の流行の増加を鑑みて、新しい臨床治療の需要が高まっている。

40

【0005】

〔3. 発明の概要〕

1 つの側面において、本明細書には、被験体における細菌の感染、および / または、細菌の感染に関連した疾患もしくは細菌の感染によって引き起こされる疾患を治療および / または予防する方法が記載されている。

【0006】

特定の実施形態において、本明細書には、被験体における細菌の感染を治療する方法であって、被験体に対して、s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物を局所的に投与す

50

る工程を含んでいることを特徴とする方法が記載されている。いくつかの実施形態において、上記被験体は、上記細菌の感染と診断されているか、または上記細菌の感染の1つ以上の症状を示している。細菌の感染および細菌の感染の症状を診断する方法は、当該分野にて公知であるか、または本明細書に記載されている。上記感染は、皮膚感染、胃腸感染、呼吸器感染、尿路感染、生殖器官感染、または本明細書に記載されているような被験体の体の他のいずれかの器官もしくは組織の感染であってもよい。1つの実施形態において、上記感染は、院内感染、MRSAの感染、Pseudomonasの感染またはC. difficileの感染である。

【0007】

特定の実施形態において、本明細書には、被験体における細菌の感染に関連した疾患、または、細菌の不均衡に関連した疾患を治療および/または予防する方法であって、被験体に対して、sNAGナノファイバーを含んでいる組成物を局所的に投与する工程を含んでいることを特徴とする方法が記載されている。上記実施形態の1つにおいて、上記方法は、細菌の感染に関連した疾患を治療および/または予防する工程を包含している。別の実施形態において、上記方法は、細菌の不均衡（例えば、本明細書に記載されているような細菌叢（bacterial microbiota）における不均衡）に関連した疾患を治療および/または予防する工程を包含している。特定の実施形態において、上記方法は、既存の細菌の感染を治療する工程を包含している。上記実施形態のいくつかにおいて、治療される被験体は、細菌の感染に関連した疾患と診断されているか、または、当該疾患の1つ以上の症状を示している。他の実施形態において、治療される被験体は、細菌の不均衡に関連した疾患と診断されているか、または、当該不均衡の1つ以上の症状を示している。上記疾患は、皮膚疾患、胃腸疾患、呼吸器疾患、尿路疾患、生殖器官疾患、または本明細書に記載されているような被験体の体の他のいずれの器官もしくは組織の疾患であってもよい。いくつかの実施形態において、上記疾患は、皮膚疾患または胃腸疾患である。1つの実施形態において、上記疾患は、院内感染、MRSAの感染、Pseudomonasの感染またはC. difficileの感染に関連している。

【0008】

いくつかの実施形態において、本明細書には、細菌の感染および/または細菌の感染に関連した疾患を予防する方法であって、被験体に対して、sNAGナノファイバーを含んでいる組成物を局所的に投与する工程を含んでいることを特徴とする方法が記載されている。いくつかの実施形態において、sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、細菌の感染に関連した疾患を予防するために、細菌の感染の危険性が高い被験体に投与される。特定の実施形態において、sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、創傷を有している被験体、または、外科手術を経験した被験体に投与される。1つの実施形態において、上記組成物は免疫障害を有する被験体に投与される。いくつかの実施形態において、sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は創傷に投与され、上記創傷は、細菌の感染の危険性が高い状態にある。特定の実施形態において、上記創傷は、開放創である。上記開放創は、銃創、刺創、裂創、擦過傷、切り傷（cut）、穿通創、外科創傷、または他のいずれの創傷であってもよい。特定の実施形態において、上記創傷は、刺創であってもよく、例えば、血液透析処置またはカテーテル処置に起因する刺創であってもよい。いくつかの実施形態において、治療される被験体は、血液透析に関連した感染、またはカテーテル法に関連した感染であると診断されていてもよい。1つの実施形態において、sNAG組成物によって予防される細菌の感染および/または細菌の感染に関連した疾患は、創傷（例えば、開放創）におけるものではないか、または、創傷に関連していない。上記実施形態の1つにおいて、細菌の感染および/または細菌の感染に関連した疾患は、創傷の部位におけるものではない（例えば、開放創の部位におけるものではない）。

【0009】

いくつかの実施形態において、本明細書には、被験体における細菌に感染した創傷を治療する方法であって、被験体における上記創傷の部位に対して、sNAGナノファイバーを含んでいる組成物を局所的に投与する工程を含んでいることを特徴とする方法が記載さ

10

20

30

40

50

れている。いくつかの実施形態において、治療される被験体は、細菌の感染と診断されているか、または、当該細菌の感染の1つ以上の症状を示している。特定の実施形態において、上記創傷は、開放創である。上記開放創は、銃創、刺創、裂創、擦過傷、切り傷、穿通創、外科創傷、または他のいずれの創傷であってもよい。特定の実施形態において、上記創傷は、刺創であってもよく、例えば、血液透析処置またはカテーテル処置に起因する刺創であってもよい。いくつかの実施形態において、治療される被験体は、血液透析に関連した感染、またはカテーテル法に関連した感染であると診断されていてもよい。

【0010】

本明細書に記載されている方法を用いて治療または予防される細菌の感染は、以下の属の1つ以上の細菌による感染を包含している：Bordetella, Borrelia, Brucella, Campylobacter, Chlamydia および Clamidophylia, Clostridium, Corynebacterium, Enterococcus, Escherichia, Francisella, Haemophilus, Helicobacter, Legionella, Leptospira, Listeria, Mycobacterium, Mycoplasma, Neisseria, Pseudomonas, Rickettsia, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus, Treponema, Vibria, ならびに Yersinia。いくつかの実施形態において、s N A G 組成物は、上記列挙された属の細菌の1つ以上に由来する細菌による感染に関連した疾患、または当該疾患の症状の1つ以上を治療および/または予防するために使用され得る。

10

【0011】

本明細書に記載されている方法を用いて治療または予防される細菌の感染はまた、以下の種の1つ以上の細菌による感染を包含している：Bacillus anthracis, Bordetella pertussis, Borrelia burgdorferi, Brucella abortus, Brucella canis, Brucella melitensis, Brucella suis, Campylobacter jejuni, Chlamydia pneumonia, Chlamydia trachomatis, Clamidophila psittaci, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Francisella tularensis, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, Legionella pneumophila, Leptospira pneumophila, Leptospira interrogans, Listeria monocytogenes, Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Rickettsia rickettsii, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus; Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumonia, Streptococcus pyogenes, Treponema pallidum, Vibria cholerae, および Yersinia pestis。いくつかの実施形態において、s N A G 組成物は、上記列挙された種の細菌の1つ以上に由来する細菌による感染に関連した疾患、または当該疾患の症状の1つ以上を治療および/または予防するために使用され得る。

20

30

【0012】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている方法を用いて治療または予防される細菌の感染は、M R S A の感染、Pseudomonas の感染または C. difficile の感染である。いくつかの実施形態において、s N A G 組成物は、M R S A の感染、Pseudomonas の感染または C. difficile の感染に関連した疾患、または当該疾患の症状の1つ以上を治療および/または予防するために使用され得る。

40

【0013】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている方法を用いて治療または予防される細菌の感染は、当業者に公知の細菌であって、標準的な抗菌治療に対して耐性を有する細菌（例えば、1つ以上の抗生物質に対して耐性を有する細菌）によって引き起こされる。1つの実施形態において、本明細書に記載されている方法を用いて治療または予防される細菌の感染は、M R S A（例えば院内の M R S A）である。いくつかの実施形態において、s N A G 組成物は、1つ以上の抗生物質に対して耐性を有する細菌による感染に関連した疾患を治療および/または予防するために使用され得る。1つの実施形態において、s N A G 組成物は、M R S A（例えば院内の M R S A）に関連した疾患（例えば院内の M

50

R S Aに関連した疾患)を治療および/または予防するために使用され得る。

【0014】

本明細書に記載されている方法を用いて治療される被験体は、哺乳類であってもよく、好ましくはヒトである。上記被験体はまた、家畜(例えば、ニワトリ、ウシ、ブタ、ヤギ)、もしくはペット(例えば、イヌまたはネコ)、または他のいずれの動物であってもよい。

【0015】

本明細書に記載されている方法において検討されているs N A G ナノファイバーは、下記のセクション5.1において記載されているように、様々な長さ、幅、および分子量であり得る。特定の実施形態において、s N A G ナノファイバーの大多数(特定の実施形態において、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%または99%以上)、またはs N A G ナノファイバーの100%は、約1~15 μ mの間の長さである。いくつかの実施形態において、s N A G ナノファイバーの大多数(特定の実施形態において、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%または99%以上)、またはs N A G ナノファイバーの100%は、約2~10 μ mの間の長さ、または約4~7 μ mの間の長さである。記載された長さのs N A G ナノファイバーは、例えば下記のセクション5.2において記載されているように得ることができる。

【0016】

いくつかの実施形態において、s N A G ナノファイバーは、ポリ-N-アセチルグルコサミンまたはポリ-N-アセチルグルコサミンの誘導体への放射線照射(例えば、ガンマ線照射)によって生産された。いくつかの実施形態において、s N A G ナノファイバーは、乾燥された繊維の形態でのポリ-N-アセチルグルコサミンへの放射線照射(例えば、500~2000 kgy)、または、湿っている繊維の形態でのポリ-N-アセチルグルコサミンへの放射線照射(例えば、100~500 kgy)によって生産される。

【0017】

特定の実施形態において、s N A G ナノファイバーは微細藻類に由来する。別の実施形態において、s N A G ナノファイバーは甲殻類には由来していない。さらに別の実施形態において、s N A G ナノファイバーは微細藻類、甲殻類(例えば、エビ)、菌類、または他のいずれの供給源に由来していてもよい。

【0018】

1つの実施形態において、s N A G ナノファイバーはN-アセチルグルコサミン単糖および/またはグルコサミン単糖を含んでおり、当該s N A G ナノファイバーの単糖のうちの60%、70%、80%、90%、95%または99%を上回る単糖がN-アセチルグルコサミン単糖である。別の実施形態において、s N A G ナノファイバーはN-アセチルグルコサミン単糖および/またはグルコサミン単糖を含んでおり、当該s N A G ナノファイバーの単糖の70%を上回る単糖がN-アセチルグルコサミン単糖である。

【0019】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている方法に用いられるs N A G ナノファイバーは、in vitroにおけるStaphylococcus aureusの細菌培養物の細菌の増殖または生存に影響を与えないものであるか、または、in vitroにおけるStaphylococcus aureusの細菌培養物の細菌の増殖または生存に実質的に影響を与えないものである。いくつかの実施形態において、s N A G ナノファイバーは、in vitroにおける細菌培養物の細菌の増殖または生存を、1 log、0.75 log、0.5 log、0.25 log、0.2 logまたは0.1 log未満減少させる(例えば、Staphylococcus aureusの細菌培養物がs N A G ナノファイバーを用いてin vitroにおいて処理/培養された場合)。細菌の増殖または生存に対するs N A G ナノファイバーの効果の試験、および、試験結果の評価は、例えば、下記のセクション5.1、実施例2(例えば、セクション6.2.2.5)、および図11Eに記載されている。

【0020】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている方法に用いられる s N A G ナノファイバーは、生体適合性試験（単数または複数）において非反応性である。例えば、本明細書に記載されている方法に用いられる s N A G ナノファイバーは、溶出試験、筋肉内への埋め込み試験、皮内試験、または全身性の試験（systemic test）において試験された場合に非反応性であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、溶出試験、筋肉内への埋め込み試験、皮内試験、または全身性の試験において試験された場合に非反応性である。他の実施形態において、本明細書に記載されている方法に用いられる s N A G ナノファイバーは、溶出試験、筋肉内への埋め込み試験、皮内試験、または全身性の試験において試験された場合にグレード（Grade）0 またはグレード 1 である。さらに別の実施形態において、明細書に記載されている方法に用いられる s N A G ナノファイバーは、溶出試験、筋肉内への埋め込み試験、皮内試験、または全身性の試験において試験された場合に、最大でも、軽度の反応性である。1 つの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または当該ナノファイバーを含んでいる組成物は、筋肉内への埋め込み試験によって決定される場合に、非反応性である。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、例えば適用する部位において、アレルギー反応または炎症を引き起こさない。他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、例えば適用する部位において、最大でも、軽度のアレルギー反応または軽度の炎症を引き起こす。

10

【0021】

本明細書に記載されている組成物の、検討されている投与方法は、局所的であり、例えば、皮膚上において局所的；創傷、手術、細菌の感染、または感染の症状（例えば、腫れ）の部位において局所的；並びに、体の表面に対して局所的（例えば、皮膚、粘膜（例えば、膣、肛門、喉、目、耳））、もしくは他の組織の表面に対して局所的である。特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または当該ナノファイバーを含んでいる組成物は、包帯（dressing）、包帯（bandage）、マット、スプレー、液体、懸濁物、膜、粉末、軟膏、クリーム、ペースト、坐薬、またはゲルとして製剤化される。いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または当該ナノファイバーを含んでいる組成物は、クリーム、ゲル、軟膏、膜、粉末、スプレー、または坐薬として製剤化される。

20

【0022】

別の側面において、本明細書には、本明細書に記載されている方法において使用するための組成物が記載されている。特定の実施形態において、上記組成物は、s N A G ナノファイバーを含んでいる。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、s N A G ナノファイバーと、細菌の感染、細菌の感染に関連した疾患、またはそれらの症状の予防および／または治療に有用な 1 つ以上の追加の活性成分とを含んでいる。いくつかの実施形態において、上記追加の活性成分は抗菌剤である。上記追加の抗菌剤は、抗生物質である。別の実施形態において、上記追加の抗菌剤は亜鉛である。さらに別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、抗生物質を含んでいない。さらに他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、いずれの追加の抗菌剤も含んでいない。1 つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、s N A G ナノファイバーを唯一の活性成分として含んでおり、いずれの追加の抗菌剤も含んでいない。

30

40

【0023】

特定の実施形態において、組成物は、上記 s N A G ナノファイバーと抗生物質とを含んでいる。本発明の組成物において使用され得る抗生物質の例には、マイクロライド系（例えば、エリスロマイシン、アジスロマイシン）、アミノグリコシド系（例えば、アミカシン、ゲンタマイシン、ネオマイシン、ストレプトマイシン）、セファロsporin 系（例えば、セファドロキシル、セファクロール、セフォタキシム、セフェピム）、フルオロキノロン系（例えば、シプロフロキサシン、レボフロキサシン）、ペニシリン系（例えば、ペニシリン、アンピシリン、アモキシシリン）、テトラサイクリン系（例えば、テトラサイクリン、ドキシサイクリン）、および／またはカルバペネム系（例えば、メロペネム、イ

50

ミペナム)が包含される。本明細書に記載されているs N A G ナノファイバーおよび薬剤は、上記組成物において使用され得る。いくつかの実施形態において、組成物は、上記s N A G ナノファイバーと、S. aureusの感染、M R S Aの感染、Pseudomonasの感染、もしくはC. difficileの感染を治療もしくは予防するために効果的な薬剤、または上記感染を治療もしくは予防するために一般的に使用される薬剤(例えば、上記感染に対して効果的な抗生物質、または上記感染に対して一般的に使用される抗生物質)とを含んでいる。

【0024】

他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、1つ以上の追加の抗菌剤、または他のいずれかの適切な治療法と併用して投与される。いくつかの実施形態において、上記追加の抗菌剤または治療法は、抗生物質(例えば、当該分野にて公知である、または本明細書に記載されているように、細菌の感染、または治療される細菌の感染に関連した疾患に対して標準的な抗生物質治療)である。いくつかの実施形態において、上記追加の抗菌剤は、S. aureusの感染、M R S Aの感染、Pseudomonasの感染、もしくはC. difficileの感染を治療もしくは予防するために効果的な薬剤、または上記感染を治療もしくは予防するために一般的に使用される薬剤(例えば、上記感染に対して効果的な抗生物質、または上記感染に対して一般的に使用される抗生物質)である。いくつかの実施形態において、上記追加の治療法は、s N A G ナノファイバー組成物を投与する前、当該組成物の投与と同時に、または当該組成物を投与した後に投与される。さらに別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、他のいずれの治療法とも併用して投与されず、例えば、抗生物質と併用して投与されない。

10

20

【0025】

〔3.1 用語〕

本明細書において使用される場合、用語「s N A G ナノファイバー」、「s N A G」、「タリダーム(Taliderm)」または「タリメド(Talymed)」(以前は「Taliderm」として知られていた)は、ポリ-N-アセチルグルコサミンおよび/またはポリ-N-アセチルグルコサミンの誘導体の短くなった繊維を意味するために、同義的に使用される。

【0026】

本明細書において使用される場合、用語「約」は、任意の値の周辺の範囲を意味し、その結果としての値が、明示されている値と同一または実質的に同一(例えば、10%、5%または1%以内)であることを意味する。1つの実施形態において、「約」は、任意の値または範囲の10%以内を意味する。別の実施形態において、用語「約」は、任意の値または範囲の5%以内を意味する。別の実施形態において、用語「約」は、任意の値または範囲の1%以内を意味する。

30

【0027】

本明細書において使用される場合、用語「疾患」、「障害」または「病気(condition)」は、被験体における病状を意味するために同義的に使用される。特定の実施形態において、上記疾患は、細菌の感染に関連した、または細菌の感染によって引き起こされる病的状態である。

【0028】

本明細書において使用される場合、用語「細菌の感染」は、細胞または被験体における細菌の増殖および/または存在による侵入を意味する。

40

【0029】

本明細書において使用される場合、数学用語「log」は \log_{10} を意味する。

【0030】

本明細書において使用される場合、用語「治療法(複数または単数)」は、細菌の感染、または細菌の感染に関連した症状もしくは病気の予防および/または治療において使用され得る、いずれのプロトコル、方法、組成物、剤形、および/または薬剤をも意味し得る。特定の実施形態において、用語「治療法」は、s N A G ナノファイバー、またはs N A G ナノファイバーを含んでいる薬学的組成物を意味する。他の実施形態において、用語「治療法」は、s N A G ナノファイバー、またはs N A G ナノファイバーを含んでいる薬

50

学的組成物以外の治療法を意味する。特定の実施形態において、「追加の治療法（単数または複数）」は、s N A G ナノファイバー、または s N A G ナノファイバーを含んでいる薬学的組成物以外の治療法を意味する。特定の実施形態において、上記治療法は、アジュバント療法として、s N A G ナノファイバー、または s N A G ナノファイバーを含んでいる薬学的組成物の使用を包含する；例えば、抗生物質、並びに / または、細菌の感染、もしくは細菌の感染に関連した症状もしくは病気の予防および / もしくは治療において有用な他の治療法等の薬物治療と併用して s N A G ナノファイバー組成物を使用する。

【 0 0 3 1 】

本明細書において使用される場合、s N A G ナノファイバー組成物を被験体に投与する工程に関連して、用語「効果的な量」は、結果として有益な効果または治療効果をもたらす s N A G ナノファイバーの量を意味する。特定の実施形態において、s N A G ナノファイバーの「効果的な量」は、以下の効果の少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ以上を達成するために十分な量を意味する：(i) 細菌の感染の解消 (clearance) ；(i i) 細菌の感染に関連した 1 つ以上の症状の除去、(i i i) 細菌の感染を解消するために必要な時間の減少；(i v) 細菌の感染、および / または細菌の感染に関連した 1 つ以上の症状の重症度の減少または改善；(v) 細菌の感染、および / または細菌の感染に関連した 1 つ以上の症状の期間の減少；(v i) 細菌の耐性株（単数または複数）の発生の防止もしくは遅延、または発生した細菌の耐性株の数の減少；(v i i) 細菌の感染、および / または細菌の感染に関連した 1 つ以上の症状の再発の防止；(v i i i) 細菌の細胞集団の減少または除去；(i x) 細菌の感染によって引き起こされる病気または細菌の感染に関連した病気の重症度および / または期間の減少；(x) 被験体の入院の減少；(x i) 入院期間の減少；(x i i) 被験体の生存の増加；(x i i i) 別の治療法の治療効果の促進または改善；(x i v) 死亡の減少；(x v) ある被験体から別の被験体へ、または、ある器官もしくは組織から別の器官もしくは組織への細菌の蔓延の減少または排除；(x v i) 細菌の数の増加の防止；(x v i i) 細菌の感染、および / または細菌の感染に関連した 1 つ以上の症状の発達または発病の予防；(x v i i i) 細菌の感染に関連した症状の数の減少；(x i x) 細菌の感染によって引き起こされる病気または細菌の感染に関連した病気の期間および / または重症度の減少；(x x) 細菌毒素、または細菌の感染に関連した毒素の生産の阻害または減少；(x x i) 細菌の感染に関連した炎症の安定化または減少；(x x i i) 1 つ以上のデフェンシンタンパク質および / またはデフェンシン様タンパク質の発現の誘導；(x x i i i) 1 つ以上の T o l l 様レセプターの発現の誘導；(x x i v) 細菌の感染、または細菌の感染に関連した 1 つ以上の症状の解消または減少に有益な 1 つ以上のタンパク質の発現の誘導；(x x v i) 細菌の感染に関連した臓器不全、または細菌の感染に関連した疾患に関連した臓器不全の減少；(x x v i i) 細菌の感染によって引き起こされる病気または細菌の感染に関連した病気の発病、発達または再発の防止；および / または (x x v i i i) 当該分野にてよく知られた方法（例えばアンケート）によって評価された生活の質の改善。特定の実施形態において、s N A G ナノファイバーの「効果的な量」は、本明細書において（例えば、下記のセクション 5 . 6 において）特定された s N A G ナノファイバー組成物の量を意味する。

【 0 0 3 2 】

本明細書において使用される場合、用語「高齢のヒト」は、65 歳以上のヒトを指す。

【 0 0 3 3 】

本明細書において使用される場合、用語「ヒトの成人」は、18 歳以上のヒトを指す。

【 0 0 3 4 】

本明細書において使用される場合、用語「ヒトの子供」は、1 歳 ~ 18 歳のヒトを指す。

【 0 0 3 5 】

本明細書において使用される場合、用語「ヒトの乳児 (infant) 」は、新生児から 1 歳のヒトを指す。

【 0 0 3 6 】

本明細書において使用される場合、用語「ヒトの早産児」は、新生児から1歳のヒトであって、在胎期間37週未満（例えば、妊娠の37週目より前、36週、35週、34週、33週、32週、31週、30週、29週、28週、または28週未満）で産まれたヒトを指す。

【0037】

本明細書において使用される場合、用語「ヒトの幼児（toddler）」は、1歳～3歳のヒトを指す。

【0038】

本明細書において使用される場合、用語「大多数」は、50%を上回る数を指し、例えば、50.5%、51%、52%等を包含する。

10

【0039】

本明細書において使用される場合、用語「被験体」および「患者」は、動物（例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、シチメンチョウ、ウズラ、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等）を指すために同義的に使用される。特定の実施形態において、上記被験体は、例えば非霊長類または霊長類（例えば、ヒト）である。特定の実施形態において、上記被験体はヒトである。本明細書において提供される方法に従って治療される患者に関する更なる情報については下記のセクション5.5を参照されたい。

【0040】

本明細書において使用される場合、用語「低発現」は、遺伝子の発現に関連して（例えば、当該遺伝子によって生産されるタンパク質またはペプチドのレベルに基づいて）、遺伝子の「通常」の発現未満である発現を指す。特定の実施形態において、「低発現」は、遺伝子の「通常」の発現の、90%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、50%未満、45%未満、40%未満、35%未満、30%未満、25%未満、または20%未満である遺伝子の発現を指す。別の特定の実施形態において、「低発現」は、遺伝子の「通常」の発現に比べ、約20倍少ない、約15倍少ない、約10倍少ない、約5倍少ない、約4倍少ない、約3倍少ない、約2倍少ない、または約1.5倍少ない遺伝子の発現を指す。

20

【0041】

〔4. 図面の簡単な説明〕

< 図1 > ナノファイバーは、Ets1の上流の調節因子であるAkt1の活性化を刺激する。（A）血清飢餓ECのNAGおよびsNAGによる刺激に対する反応におけるホスホ-Aktのウェスタンブロット分析。（B）スクランブルコントロール（SCR）またはAkt1 shRNAレンチウイルスのいずれかに感染したECのRT-PCR分析であって、ローディングコントロールとしてEts1およびS26の発現が評価されている。（C）sNAGナノファイバーからAkt1、Ets1またはデフェンシンへのシグナルを伝達するシグナル伝達経路の模式図。

30

【0042】

< 図2 > Akt1ヌル動物における創傷の治癒の遅延は、Taliderm処理によって部分的に救済される。（A）Taliderm処理あり、および、Taliderm処理なしの創傷を形成されたWTマウスおよびAKT1ヌルマウスの代表的な図。（B）代表的なマウスの3日目の創傷に由来する皮膚切片のH&E染色。

40

【0043】

< 図3 > sNAGナノファイバーは、初代内皮細胞におけるサイトカインおよびデフェンシンの発現を刺激する。（A）a-デフェンシンに対する抗体を用いた、sNAGあり、またはsNAGなしで処理したECの免疫組織学的試験。（B）ECのナノファイバー処理の結果、-デフェンシン1-3が分泌されたことを示すELISA（血清飢餓、5 μg/mlまたは10 μg/mlのsNAGを用いて処理）。

【0044】

< 図4 > sNAGナノファイバーは、Akt1に依存する様式で、初代内皮細胞におけるデフェンシンの発現を刺激する。（A）および（B）PD98059（MAPK阻害剤

50

、「PD」)、ウォルトマンニン(P13K阻害剤、「wtm」)ありもしくはなし、または、スクランブルコントロール(SCR)もしくはAkt1(AKT1) shRNAレンチウイルスに感染した、sNAGありまたはなし(snag)で処理された血清飢餓EC(ss)の定量的RT-PCRであって、上記遺伝子の発現が評価されている。

【0045】

<図5> sNAGナノファイバーは、マウスのケラチノサイトにおける - デフェンシン3の発現を刺激する。(A)3日目のWT動物およびAkt1ヌル動物に由来するマウス皮膚の創傷切片であって、パラフィンに包埋された切片の、 - デフェンシン3(右側のパネルにおいて明るい染色として見える;例えば、太い白矢印を参照されたい)およびインボルクリンを用いた免疫蛍光染色。(B)NIHImageJソフトウェアを用いた、 - デフェンシン3の免疫蛍光染色の定量(TX= Taliderm; Akt1= Akt1ヌル)。(C) - デフェンシン3(明るい染色として見える;例えば、太い白矢印を参照されたい)およびTOPRO-3(核染色;例えば、細い白矢印を参照されたい)を用いた、WTおよびAkt1ヌルの処理済みのケラチノサイトおよび未処理のケラチノサイトの免疫蛍光染色。WTおよびAkt1ヌルのTalidermで処理された創傷における - デフェンシン3の染色の増加に注目されたい。

10

【0046】

<図6> Akt1に依存した転写因子の結合部位。Akt1に依存した転写因子の結合部位の模式図。Genomatixソフトウェアを用いて、DEF1、4および5のmRNAの保存部位について、転写開始部位の500bp上流を分析した(ETS-黒い楕円;FKHD-縞模様の楕円;CREB-白い楕円;NFkB-チェックの楕円)。

20

【0047】

<図7> sNAG処理の結果、in vitroにおいてデフェンシンが発現および分泌される。(A)示された時間において、sNAG(50μg/ml)を用いて処理された血清飢餓(ss)初代内皮細胞のRT-PCR分析であって、 - デフェンシン3および - デフェンシン1の発現について評価されている。(B)血清飢餓(未処理)の内皮細胞、またはsNAGナノファイバー(10μg/mlで5時間)を用いて処理された内皮細胞のいずれかの免疫蛍光標識。抗体は、 - デフェンシン5(FITC、左上側のパネル)、 - デフェンシン3(テキサスレッド、右上側のパネル)に対するものである。核はTOPRO-3を用いて染色されている(青、左下側のパネル)。右下側のパネルは3重のオーバーレイを示している。(C)血清飢餓(未処理)のケラチノサイト、またはsNAGナノファイバー(10μg/mlで5時間)を用いて処理されたケラチノサイトのいずれかの免疫蛍光標識(HaCat)。抗体は、 - デフェンシン5(FITC、左上側のパネル)、 - デフェンシン3(テキサスレッド、右上側のパネル)に対するものである。核はTOPRO-3を用いて染色されている(青、左下側のパネル)。

30

【0048】

<図8> sNAGによって誘導されたデフェンシンの発現は、Akt1に依存している。(A)PD98059(PD)(50μM)、ウォルトマンニン(WTM)(100nm)あり、またはなしの、sNAGを用いた3時間の処理あり、またはなしの血清飢餓内皮細胞から分離された全RNAに由来する - デフェンシン1に対するプライマーを使用した定量的RT-PCR分析。定量はS26タンパク質サブユニットと比較されている。(B)PD98059(50μM)、ウォルトマンニン(100nm)を用いた処理あり、またはなしの、sNAGを用いた3時間の処理あり、またはなしの血清飢餓内皮細胞から分離された全RNAに由来する - デフェンシン3の発現の定量であって、当該定量はS26と比較されている。(C)示された時間においてsNAGを用いて刺激された血清飢餓内皮細胞(SS)中のホスホ-Aktのウェスタンブロット分析。ラインは、レーンが除去されている箇所を示している。(D)sNAGを用いた処理あり、またはなしの、スクランブルコントロール(SCR)またはAkt1 shRNAレンチウイルスに感染した血清飢餓内皮細胞の定量的RT-PCR分析であって、 - デフェンシン4について評価されている。定量はS26と比較して示されている。(E)sNAGを用いた処理あり

40

50

、またはなしの、スクランブルコントロール (S C R) または A k t 1 s h R N A レンチウイルスに感染した血清飢餓内皮細胞から分離された全 R N A に由来する - デフェンシン 3 の発現の定量。定量は S 2 6 と比較して示されている。全ての実験は、少なくとも 3 反復行われ、かつ、少なくとも独立して 3 回繰り返され、p 値が示されている。

【 0 0 4 9 】

< 図 9 > s N A G によって誘導された in vivo におけるデフェンシンの発現は、A k t 1 を必要とする。(A) W T マウス (n = 3) および A k t 1 マウスの両方から、創傷形成から 3 日後に採集した皮膚の創傷の切片であって、パラフィンに包埋された切片。創傷は未処理であるか、または s N A G 膜を用いて処理されているかのいずれかであった。

- デフェンシン 3 (緑、右上側のパネルにおいて明るい染色として見える ; 例えば、太い白矢印を参照)、インボルクリン (赤) および T o p r o (青、核染色 ; 例えば、細い白矢印を参照) に対する抗体を用いて、免疫蛍光を行った。(B) 3 日目に採集された、s N A G を用いて処理された W T 由来の切片であって、パラフィンに包埋された切片。- デフェンシン 3 (緑、右上側のパネルにおいて明るい染色として見える ; 例えば、太い白矢印を参照)、インボルクリン (赤) および T o p r o (青、核染色 ; 例えば、細い白矢印を参照) に対する抗体を用いて、免疫蛍光を行った。- デフェンシン 3 を発現している表皮層をうまく示すために、当該低倍率 (2 0 x) が含まれている。スケールバー = 5 0 μ m。(C) パラフィンに包埋された切片からの - デフェンシン 3 の発現の定量を、NIH ImageJ ソフトウェアを用いて行った。実験は、独立して 3 回繰り返され、p 値が示されている。

10

20

【 0 0 5 0 】

< 図 1 0 > s N A G 処理は野生型マウスでの創傷の閉鎖を増加させる。未処理であるか、または s N A G 膜を用いて処理されているかのいずれかである C 5 7 B 1 6 野生型動物に由来する創傷組織切片の H & E 染色。創傷形成後の日数は各パネルの左側に示されている。黒い実線は、創傷の閉鎖を示しているケラチノサイト細胞層を示している。黒い矢印は、創床 (wound bed) の縁を示している。

【 0 0 5 1 】

< 図 1 1 > s N A G 処理は、A k t 1 に依存する様式で、細菌の感染を減少させる。(A) W T マウスに由来する、S. aureus に感染した創傷の組織グラム染色。W T マウスには 4 m m 生検パンチを用いて創傷を形成した。創傷を形成した直後に、マウスに 1×10^9 c f u / m l 接種した。感染して 3 0 分後、Taliderm を用いて処理グループのマウスを処理した。皮膚サンプルは処理から 5 日後に採集され、分析のために切断された。組織グラム染色を行った。暗い紫色の染色は、グラム陽性細菌と細菌を取り込んだ好中球とを示している。2 0 倍および 4 0 倍での断面図が示されている。(B) W T マウスおよび A k t 1 ノックアウトマウス (n = 3) に由来する、S. aureus に感染した創傷であって、パラフィンに包埋された創傷の組織グラム染色。感染した創傷は、未処理であるか、または s N A G 膜を用いて処理されているかのいずれかであって、分析のために創床を 3 日目および 5 日目に採集した。暗い紫色の染色は、創床におけるグラム陽性細菌の存在を示している。黒い矢印はグラム陽性染色の例を示している。未処理の W T における陽性染色の蓄積に注目されたい (当該蓄積は、s N A G を用いて処理された W T 動物においては見られない)。スケールバー = 5 0 μ m。(C) 創傷形成後 5 日目に由来する C F U を、処理された、および未処理の W T マウス (n = 3) および A k t 1 ノックアウトマウス (n = 3) の両方を用いて、S. aureus に感染した創傷から定量した。A k t 1 ノックアウト動物に比べて、s N A G を用いて処理された野生型マウスでは、創床における細菌の量の顕著な減少を示した。全ての実験は、独立して 3 回繰り返され、p 値が示されている。(D) (C) に記載された方法と同様にして、創傷形成後 3 日目における感染した創傷から定量された C F U。感染した創傷の s N A G 処理によって、3 日目の W T 動物および A k t 1 ノックアウト動物の両方の C F U の顕著な減少が示されたが、A k t 1 動物では 2 倍の差であったのに比べて、W T 動物では、およそ 1 0 倍の差を示した。(E) 未処理であるか、または様々な量の s N A G ナノファイバーを用いて処理されたかのいずれかである S. aureus 培養物における C F U の定量

30

40

50

。各実験は、独立して3回繰り返され、p値が示されている。(F) - デフェンシン3ペプチド(1.0 μM)を用いて処理された、または当該ペプチドを用いずに処理されたWTマウス(n=3)から創傷形成後3日目に採集された、S. aureusに感染した創傷の組織グラム染色。(G) - デフェンシン3ペプチドを用いて処理された、または当該ペプチドを用いずに処理された、S. aureusに感染したWTマウス(n=3)からのCFUの定量。ペプチドを用いて処理された感染創傷では、CFUの顕著な減少が示された(p<.05)。スケールバー=50 μm。各実験は、独立して3回繰り返され、p値が示されている。

【0052】

<図12> S. aureusに感染した創傷のsNAG処理によるデフェンシンの発現の急激な誘導。(A) 3日目に採集された、S. aureusに感染した創傷に由来する組織切片であって、パラフィンに包埋された切片に対して、sNAGを用いて処理されたWTマウス(n=3)および未処理のWTマウス(n=3)の両方に由来する - デフェンシン3(緑、右上側のパネルおよび中央の下側のパネルにおいて明るい染色として見える；例えば、太い白矢印を参照)、ケラチノサイト層を標識するためのインボルクリン(赤)およびTopro(青、核染色；例えば、細い白矢印を参照)に対する抗体を用いて、免疫蛍光を行った。ケラチンの非特異的染色が、二次抗体のみを用いて染色された、一次抗体なしのコントロールによって示された。スケールバー=50 μm。(B) NIH ImageJソフトウェアを用いた、パラフィンに包埋された切片からの - デフェンシン3の発現の定量。sNAGを用いて処理された、S. aureusに感染した創傷では、 - デフェンシン3の染色の顕著な増加が示された(p<.05)。実験は、独立して3回繰り返され、p値が示されている。

【0053】

<図13> - デフェンシン3に対する抗体は、sNAG処理の抗菌効果を妨げる。(A) 3日目に採集された、WTマウス(n=3)に由来する、sNAGを用いて処理されたS. aureusに感染した創傷であって、パラフィンに包埋された創傷の組織グラム染色。sNAGを用いて処理された創傷は、sNAG処理の前に、 - デフェンシン3抗体またはアイソトープコントロールヤギIgG抗体のいずれかを用いて処理された。代表的な画像は、 - デフェンシン3に対する抗体を用いて処理されたマウスの創床におけるグラム陽性染色(黒い矢印)の蓄積の増加を示している。スケールバー=20 μm。(B) sNAG処理の前に、 - デフェンシン3抗体(n=3)またはコントロールIgG抗体(n=3)のいずれかを用いて処理された、S. aureusに感染したWTマウスに由来するCFUの定量。 - デフェンシン3の適用により、CFUが顕著に増加した(p<.05)。

【0054】

<図14> sNAG処理は、Pseudomonas aeruginosaによる細菌感染を減少させる。マウスに4mm生検パンチを用いて創傷を形成し、 1.5×10^9 cfu/mlのP. aeruginosaを接種した。感染した創傷は、未処理(n=6)であるか、または感染から30分後にsNAG膜(n=6)を用いて処理(n=6)を行うかのいずれかとした。分析のために3日目に創床を採集し、30分間培養して蒔き(plated)、未処理の感染した創傷および処理済みの感染した創傷のCFUを定量した。sNAGを用いて処理されたマウスでは、未処理の動物に比べて、創床における細菌の量の顕著な減少が示された(p<.05)。

【0055】

<図15> pGlcNAc繊維の化学的構造および物理的構造における放射線照射の影響。(A) 放射線照射におけるpGlcNAcの分子量と放射線レベル/剤形との間の相関関係。(B) 放射線を照射されていないpGlcNAcスラリー(上のライン)、100 kGyにて放射線を照射されたpGlcNAcスラリー(下のライン)、および200 kGyにて放射線を照射されたpGlcNAcスラリー(中央のライン)。(C) 走査型電子顕微鏡(SEM)によるpGlcNAcの分析。(D) 走査型電子顕微鏡(SEM)

による s N A G の分析。

【 0 0 5 6 】

< 図 1 6 > p G l c N A c は代謝率に影響を与えなかった。各期間（すなわち、24 時間および 48 時間）において、4 つのバーはそれぞれ、以下を示している（左から右へ）：血清飢餓（S S）、V E G F、ならびに、50 μ g / m l および 100 μ g / m l における p G l c N A c（N A G）。

【 0 0 5 7 】

< 図 1 7 > p G l c N A c は、血清飢餓によって誘導されるヒト臍静脈内皮細胞（E C）の細胞死を防止した。各期間（すなわち、24 時間、48 時間および 72 時間）において、5 つのバーはそれぞれ、以下を示している（左から右へ）：血清飢餓（S S）、V E G F、ならびに、50 μ g / m l、100 μ g / m l および 250 μ g / m l における p G l c N A c（N A G）。

【 0 0 5 8 】

< 図 1 8 > s N A G は、代謝率の顕著な増加を誘導した。5 つのバーはそれぞれ、以下を示している（左から右へ）：血清飢餓（S S）、V E G F、ならびに、50 μ g / m l、100 μ g / m l および 200 μ g / m l における s N A G。

【 0 0 5 9 】

< 図 1 9 > s N A G は、血清飢餓によって誘導される E C の細胞死を防止しなかった。各期間（すなわち、24 時間および 48 時間）において、5 つのバーはそれぞれ、以下を示している（左から右へ）：血清飢餓（S S）、V E G F、ならびに、50 μ g / m l、100 μ g / m l および 200 μ g / m l における s N A G。

【 0 0 6 0 】

〔 5 . 詳細な説明 〕

本発明者らは、s N A G ナノファイバーが、Staphylococcus aureus および Pseudomonas aeruginosa に感染した皮膚の創傷における細菌感染を減少させることを見出した。いずれの特定の作用機序によっても制限されることもなく、セクション 6 . 2 に提示されたデータは、s N A G の抗菌効果が s N A G と細菌との直接的な相互作用に起因するものではなく、例えば、A k t 1 の活性化によるデフェンシンの調節等の下流での影響に起因するものであることを示唆している。具体的には、データは、in vitro における s N A G ナノファイバーを用いた細菌培養物の処理が細菌の数に影響を与えていないことを示しており、s N A G ナノファイバーが細菌の増殖を直接的には阻害していないことを示している。セクション 6 . 2 . 2 . 5 に記載され、図 1 1 E に示されている特定の実施例においては、s N A G ナノファイバーは Staphylococcus aureus の増殖または生存に直接的な影響を与えない。下記のセクション 6 . 2 . 2 . 5 に記載されている試験は、細菌の増殖または生存に対する s N A G ナノファイバーの直接的な影響がないことを試験するために利用され得る。当該実施例においては、溶液中の S. aureus の培養物を様々な濃度の s N A G ナノファイバーを用いて 3 時間処理し、その後、培養物を 37 で一晩培養し、細菌の C F U / m l を決定した。図 1 1 E に示されているように、細菌の増殖または生存に対する影響は観察されなかった。

【 0 0 6 1 】

本発明の発明者らは、s N A G ナノファイバーはデフェンシンの発現を刺激することが可能であって、当該刺激によって先天性の抗菌反応が促進され得ることを見出した。デフェンシンが先天性免疫において重要な役割を担っており、抗菌作用において機能することは広く認められている。下記のセクション 6 . 1 および 6 . 2 において提示される実施例によって実証されているように、本発明の発明者らは、s N A G ナノファイバーが、内皮細胞における 型デフェンシンおよび 型デフェンシンの両方の発現、ならびに、in vitro でのケラチノサイトおよび in vivo での創傷治癒モデルにおける 型デフェンシンの発現を増加し得ることを見出した。

【 0 0 6 2 】

さらに、下記のセクション 6 . 1 および 6 . 2 において提示される実施例によって実証

10

20

30

40

50

されているように、いずれの特定の作用機序によっても制限されるものではないが、創傷治癒モデルにおいて、*in vitro*および*in vivo*でのs N A Gに依存したデフェンシンの発現にとってA k t 1は重要であると考えられる。一貫して、s N A Gナノファイバーは、野生型のコントロール動物におけるStaphylococcus aureusに感染した皮膚の創傷の細菌感染を減少させたが、同様に処理されたA k t 1ヌル動物においては細菌の感染を減少させなかった。

【0063】

本発明の発明者らはまた、T o l l様レセプターの数ヒト内皮細胞のs N A G処理によって上方制御され得ることを見出した。T o l l様レセプター（「T L R（単数または複数）」）は、よく保存されたレセプターであり、先天性免疫の活性化を引き起こす細菌の成分の特定の分子パターンを認識するレセプターである。近年の研究では、ヒトデフェンシンの発現とT L Rの活性化とが関連付けられている。特に、T L Rの活性化はデフェンシンの合成の増加を引き起こし得る。従って、いずれの特定の作用機序によっても制限されるものではないが、s N A Gナノファイバーは、A k t 1の活性化を介して、先天性免疫および細菌の除去の刺激因子として作用し得る。

10

【0064】

従って、本明細書には、細菌の感染および細菌の感染に関連した疾患を予防および/または治療するための新しい方法としてのs N A Gナノファイバーの利用が記載されている。特定の実施形態において、s N A Gナノファイバーを用いた細菌の感染の治療は、患者における細菌の量を減少させる。特定の実施形態において、s N A Gナノファイバーの利用は、創傷の閉鎖を促進し、同時に、創傷における細菌の感染を根絶する、低減させる、または予防する。

20

【0065】

〔5.1 s N A Gナノファイバー〕

本明細書には、s N A Gナノファイバー組成物が記載されている。当該s N A Gナノファイバー組成物は、ポリ-N-アセチルグルコサミンおよび/またはポリ-N-アセチルグルコサミンの誘導体の繊維を含んでおり、当該繊維の大多数は、当業者に知られた方法によって（例えば、走査型電子顕微鏡（S E M）によって）測定した場合に、30ミクロン未満の長さであり、少なくとも長さ1ミクロンである。当該s N A Gナノファイバーを、例えば、本明細書に記載されているように得てもよい。

30

【0066】

特定の実施形態において、上記s N A Gナノファイバーの大多数（特定の実施形態において、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、もしくは100%、または55%~65%、55%~75%、65%~75%、75%~85%、75%~90%、80%~95%、90%~95%、もしくは95%~99%の間）は、当業者に知られた方法によって（例えば、S E Mによって）測定した場合に、長さが約30、25、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4、または3ミクロン未満であり、少なくとも1ミクロンである。特定の実施形態において、上記s N A Gナノファイバーの大多数（特定の実施形態において、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、もしくは100%、または55%~65%、55%~75%、65%~75%、75%~85%、75%~90%、80%~95%、90%~95%、もしくは95%~99%の間）は、当業者に知られた方法によって（例えば、S E Mによって）測定した場合に、長さが約15ミクロン未満、もしくは約12ミクロン未満であり、少なくとも1ミクロンである。特定の実施形態において、上記s N A Gナノファイバーの全（100%）は、当業者に知られた方法によって（例えば、S E Mによって）測定した場合に、長さが約15ミクロン未満であり、少なくとも1ミクロンである。特定の実施形態において、上記s N A Gナノファイバーの大多数（特定の実施形態において、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、もしくは100%、または55%~65%、55%~75%、65%~75%

40

50

、75%～85%、75%～90%、80%～95%、90%～95%、もしくは95%～99%の間)は、当業者に知られた方法によって(例えば、SEMによって)測定した場合に、長さが14、13、12、11、10、9、8もしくは7ミクロン以下であり、少なくとも1ミクロンである。いくつかの実施形態において、上記sNAGナノファイバーの大多数(特定の実施形態において、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、もしくは100%、または55%～65%、55%～75%、65%～75%、75%～85%、75%～90%、80%～95%、90%～95%、もしくは95%～99%の間)は、当業者に知られた方法によって(例えば、SEMによって)測定した場合に、長さが1～15、2～15、2～14、1～12、2～12、1～10、2～10、3～12、3～10、1～9、2～9、3～9、1～8、2～8、3～8、4～8、1～7、2～7、3～7、4～7、1～6、1～5、1～4、または1～3ミクロンの間である。

10

【0067】

特定の実施形態において、上記sNAGナノファイバーの大多数(特定の実施形態において、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、もしくは100%、または55%～65%、55%～75%、65%～75%、75%～85%、75%～90%、80%～95%、90%～95%、もしくは95%～99%の間)は、当業者に知られた方法によって(例えば、SEMによって)測定した場合に、長さが約8、7、6、5、4、3または2ミクロンである。別の特定の実施形態において、上記sNAGナノファイバーの大多数(特定の実施形態において、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、もしくは100%、または55%～65%、55%～75%、65%～75%、75%～85%、75%～90%、80%～95%、90%～95%、もしくは95%～99%の間)は、当業者に知られた方法によって(例えば、SEMによって)測定した場合に、長さが約2～約10ミクロン、約3～8ミクロン、または約4～約7ミクロンの間である。別の特定の実施形態において、上記sNAGナノファイバーの全て(100%)は、当業者に知られた方法によって(例えば、SEMによって)測定した場合に、長さが約2～約10ミクロン、約3～8ミクロン、または約4～約7ミクロンの間である。

20

【0068】

特定の実施形態において、上記sNAGナノファイバーは、電子顕微鏡によって測定した太さおよび/または直径が0.005～5ミクロンの間の範囲である。特定の実施形態において、上記sNAGナノファイバーは、太さおよび/または直径が平均で約0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.2、2.4、2.6、2.8、3または4ミクロンであるか、または例えば0.02～2ミクロン、0.02～1ミクロン、0.02～0.75ミクロン、0.02～0.5ミクロン、0.02～0.5ミクロン、0.05～1ミクロン、0.05～0.75ミクロン、0.05～0.5ミクロン、0.1～1ミクロン、0.1～0.75ミクロン、0.1～0.5ミクロン等の間の範囲である。特定の実施形態において、上記sNAGナノファイバーの大多数(特定の実施形態において、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、もしくは100%、または55%～65%、55%～75%、65%～75%、75%～85%、75%～90%、80%～95%、90%～95%、もしくは95%～99%の間)は、約0.02～1ミクロンの太さまたは直径を有する。他の特定の実施形態において、上記sNAGナノファイバーの大多数(特定の実施形態において、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、もしくは100%、または55%～65%、55%～75%、65%～75%、75%～85%、75%～90%、80%

30

40

50

～ 95 %、90 %～ 95 %、もしくは 95 %～ 99 %の間)は、約 0.05～ 0.5 ミクロンの太さまたは直径を有する。特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの全て (100 %)は、約 0.02～ 1 ミクロンまたは約 0.05～ 0.5 ミクロンの太さまたは直径を有する。特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの大多数 (特定の実施形態において、少なくとも 60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、99.5 %、99.8 %、99.9 %、もしくは 100 %、または 55 %～ 65 %、55 %～ 75 %、65 %～ 75 %、75 %～ 85 %、75 %～ 90 %、80 %～ 95 %、90 %～ 95 %、もしくは 95 %～ 99 %の間)は、約 0.02～ 2 ミクロン、0.02～ 1 ミクロン、0.02～ 0.75 ミクロン、0.02～ 0.5 ミクロン、0.02～ 0.5 ミクロン、0.05～ 1 ミクロン、0.05～ 0.75 ミクロン、0.05

10

【 0 0 6 9 】

特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの大多数 (特定の実施形態において、少なくとも 60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、99.5 %、99.8 %、99.9 %、もしくは 100 %、または 55 %～ 65 %、55 %～ 75 %、65 %～ 75 %、75 %～ 85 %、75 %～ 90 %、80 %～ 95 %、90 %～ 95 %、もしくは 95 %～ 99 %の間)は、長さが 1 ミクロンと 1.5 ミクロンとの間であり、約 0.02～ 1 ミクロンの太さまたは直径を有する。

【 0 0 7 0 】

特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの分子量は、100 k D a、90 k D a、80 k D a、75 k D a、70 k D a、65 k D a、60 k D a、55 k D a、50 k D a、45 k D a、40 k D a、35 k D a、30 k D a、または 25 k D a 未満である。特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの大多数 (特定の実施形態において、少なくとも 60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、99.5 %、99.8 %、99.9 %、もしくは 100 %、または 55 %～ 65 %、55 %～ 75 %、65 %～ 75 %、75 %～ 85 %、75 %～ 90 %、80 %～ 95 %、90 %～ 95 %、もしくは 95 %～ 99 %の間)は、100 k D a、90 k D a、80 k D a、75 k D a、70 k D a、65 k D a、60 k D a、55 k D a、50 k D a、45 k D a、40 k D a、35 k D a、30 k D a、または 25 k D a 未満の分子量を有する。

20

30

特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの大多数 (特定の実施形態において、少なくとも 60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、99.5 %、99.8 %、99.9 %、もしくは 100 %、または 55 %～ 65 %、55 %～ 75 %、65 %～ 75 %、75 %～ 85 %、75 %～ 90 %、80 %～ 95 %、90 %～ 95 %、もしくは 95 %～ 99 %の間)は、約 5 k D a～ 100 k D a、約 10 k D a～ 100 k D a、約 20 k D a～ 100 k D a、約 10 k D a～ 80 k D a、約 20 k D a～ 80 k D a、20 k D a～ 75 k D a、約 25 k D a～ 約 75 k D a、約 30 k D a～ 約 80 k D a、約 30 k D a～ 約 75 k D a、約 40 k D a～ 約 80 k D a、約 40 k D a～ 約 75 k D a、約 40 k D a～ 約 70 k D a、約 50 k D a～ 約 70 k D a、または約 55 k D a～ 約 65 k D aの間の分子量を有する。1つの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの大多数 (特定の実施形態において、少なくとも 60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、99.5 %、99.8 %、99.9 %、もしくは 100 %、または 55 %～ 65 %、55 %～ 75 %、65 %～ 75 %、75 %～ 85 %、75 %～ 90 %、80 %～ 95 %、90 %～ 95 %、もしくは 95 %～ 99 %の間)は、約 60 k D aの分子量を有する。

40

【 0 0 7 1 】

特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの 1 %～ 5 %、5 %～ 10 %、5 %～ 15 %、20 %～ 30 %または 25 %～ 30 %は脱アセチル化されている。いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの 1 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、または 30 %は脱アセチル化されている。他の実施形態において、上記 s

50

N A G ナノファイバーの 30 %、25 %、20 %、15 %、10 %、5 %、4 %、3 %、2 % または 1 % 未満は脱アセチル化されている。いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの 1 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % もしくは 99 % 以上、または全て (100 %) は脱アセチル化されている。他の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの 1 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 %、または 100 % 未満は脱アセチル化されている。

【0072】

特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの 70 % ~ 80 %、75 % ~ 80 %、75 % ~ 85 %、85 % ~ 95 %、90 % ~ 95 %、90 % ~ 99 % または 95 % ~ 100 % はアセチル化されている。いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 % または 100 % はアセチル化されている。他の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 %、99.5 % または 99.9 % を上回る数はアセチル化されている。いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの 1 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % もしくは 99 % 以上、または全て (100 %) はアセチル化されている。他の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーの 1 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 %、または 100 % 未満はアセチル化されている。

【0073】

いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーは、少なくとも 1 つのグルコサミン単糖を含んでおり、さらに N - アセチルグルコサミン単糖の少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 % または 99 % を含んでいてもよい。他の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーは、少なくとも 1 つの N - アセチルグルコサミン単糖を含んでおり、さらにグルコサミン単糖の少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 % または 99 % を含んでいてもよい。

【0074】

1 つの側面において、上記 s N A G ナノファイバーは、MTT アッセイにおいて血清飢餓ヒト臍帯静脈内皮細胞 (EC) の代謝率を増加させる。MTT アッセイは、細胞の増殖 (cellular proliferation (cell growth)) を測定するための実験室試験および標準的な比色アッセイ (色の変化を測定するアッセイ) である。要約すれば、生きている細胞のミトコンドリアにおいて、黄色の MTT (3 - (4,5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2,5 - ジフェニルテトラゾリウムブロミド、テトラゾール) は紫色のホルマザンに還元される。当該還元は、ミトコンドリア還元酵素が活性である場合にのみ起こる。それゆえ、変換は生存 (生きている) 細胞の数と直接的に比較され得る。細胞の代謝率は当業者に一般的に知られている他の技術によって決定されてもよい。

【0075】

別の側面において、上記 s N A G ナノファイバーは、トリパンブルー排除試験において血清飢餓 EC のアポトーシスを救済しない。トリパンブルー排除試験は、細胞懸濁物中に存在する生存細胞の数を決定するために使用される色素排除試験である。当該試験は、生きている細胞はトリパンブルー、エオジン、またはプロピジウム等の特定の色素を排除する無傷の細胞膜 (intact cell membranes) を有しており、一方死んでいる細胞は無傷の細胞膜を有していないという原理に基づいている。細胞の生存は当業者に一般的に知られている他の技術によって決定されてもよい。

【 0 0 7 6 】

特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物が記載されており、上記 s N A G ナノファイバーは、M T T アッセイにおいて血清飢餓ヒト臍帯静脈内皮細胞の代謝率を増加させ、かつ／または、トリパンプルー排除試験において血清飢餓ヒト臍帯静脈内皮細胞のアポトーシスを救済しない。いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーは、M T T アッセイにおいて血清飢餓ヒト臍帯静脈内皮細胞の代謝率を増加させ、かつ、トリパンプルー排除試験において血清飢餓ヒト臍帯静脈内皮細胞のアポトーシスを救済しない。

【 0 0 7 7 】

特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーは生体適合性である。生体適合性は、種々の技術によって決定され得る。当該技術としては、特に限定されないが、例えば、溶出試験、筋肉内への埋め込み、または動物被験体への皮内注射もしくは全身投与 (systemic injection) 等の処置が包含される。上記試験は、米国特許第 6 , 6 8 6 , 3 4 2 号 (例えば、実施例 1 0 参照) に記載されており、その内容は全て参照によって本明細書中に引用されるものとする。

【 0 0 7 8 】

特定の実施形態において、本明細書中に記載されている方法に用いられる s N A G ナノファイバーは生体適合性試験 (単数または複数) において非反応性である。例えば、本明細書に記載されている方法に用いられる s N A G ナノファイバーは、溶出試験、筋肉内への埋め込み試験、皮内試験、または全身性の試験において試験された場合に非反応性であり得る。他の実施形態において、本明細書に記載されている方法に用いられる s N A G ナノファイバーは、溶出試験、筋肉内への埋め込み試験、皮内試験、または全身性の試験において試験された場合にグレード 0 またはグレード 1 である。さらに別の実施形態において、明細書に記載されている方法に用いられる s N A G ナノファイバーは、溶出試験、筋肉内への埋め込み試験、皮内試験、および／または全身性の試験において試験された場合に、最大でも、軽度の反応性である。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、例えば適用する部位において、アレルギー反応または炎症を引き起こさない。他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、例えば適用する部位において、最大でも、軽度のアレルギー反応または軽度の炎症を引き起こす。関連する試験、および、試験結果の評価は、例えば、米国特許第 6 , 6 8 6 , 3 4 2 号 (その内容は全て参照によって本明細書中に引用されるものとする)、および下記のセクション 6 . 8 に記載されている。

【 0 0 7 9 】

特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーは、筋肉内への埋め込み試験において試験された場合に、非反応性である。1つの側面において、筋肉内への埋め込み試験は、下記のセクション 6 . 8 . 3 に記載されているような、筋肉内への埋め込み試験 (I S O 4 週間の埋め込み) である。特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーは、溶出試験によって決定される生物反応性を示さない (溶出試験グレード = 0)。いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーは、皮内注射試験によって決定される試験スコアが「 0 」に等しく、かつ／または、最大でも無視できる程度の刺激性である。いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーは、Kligman試験において皮内での反応を引き起こさず (すなわち、グレード I の反応)、かつ／または、Kligman試験によって決定される弱いアレルギーポテンシャル (allergenic potential) を示す。

【 0 0 8 0 】

特定の側面において、上記 s N A G ナノファイバーは、免疫的に中性である (すなわち、当該 s N A G ナノファイバーは免疫反応を引き起こさない)。

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーは、生分解性である。上記 s N A G ナノファイバーは、患者に投与した後または埋め込んだ後、好ましくは、約 1 日

10

20

30

40

50

、2日、3日、5日、7日(1週間)、8日、10日、12日、14日(2週間)、17日、21日(3週間)、25日、28日(4週間)、30日、1か月、35日、40日、45日、50日、55日、60日、2か月、65日、70日、75日、80日、85日、90日、3か月、95日、100日または4か月以内に分解される。

【0082】

特定の実施形態において、上記s N A Gナノファイバーは、検出可能な異物反応を引き起こさない。異物反応は、創傷治癒の間に起こり得るものであり、外傷部位における滲出液の蓄積、創面切除する炎症細胞の浸潤、および肉芽組織の形成を包含する。異物が存在し続けることは、完全な治癒を阻害し得る。創傷治癒において起こる再吸収および再構築よりも、異物巨細胞の形成、異物の被包(encapsulation)、および慢性炎症によって、異物反応は特徴付けられる。被包は、異物の周りに堆積する、固く、一般的に血管のないコラーゲンの殻が、宿主組織から異物を効果的に隔離することを指す。1つの実施形態において、上記s N A Gナノファイバーを用いた部位(例えば、創傷、または創傷において細菌に感染した部位)の処理は、処理後、1日、3日、5日、7日、10日または14日間は異物反応を引き起こさない。上記実施形態の1つにおいて、上記s N A Gナノファイバーを用いた部位(例えば、創傷)の処理は、処理後、1日、3日、5日、7日、10日または14日間は異物の被包を引き起こさない。

10

【0083】

いくつかの実施形態において、上記s N A Gナノファイバーは、(i)繊維を含んでおり、当該繊維の大多数は長さが約1ミクロンと約15ミクロンとの間であり、かつ、(i i)(a)MTTアッセイにおいて血清飢餓ECの代謝率を増加させ、かつ/または、トリパンブルー排除試験において血清飢餓ECのアポトーシスを救済せず、かつ(b)筋肉内への埋め込み試験において試験された場合に、非反応性である。特定の実施形態において、上記s N A Gナノファイバーは、(i)繊維を含んでおり、当該繊維の大多数は長さが約1ミクロンと約12ミクロンとの間であり、かつ、(i i)(a)MTTアッセイにおいて血清飢餓ECの代謝率を増加させ、かつ/または、トリパンブルー排除試験において血清飢餓ECのアポトーシスを救済せず、かつ(b)筋肉内への埋め込み試験において試験された場合に、非反応性である。特定の実施形態において、上記s N A Gナノファイバーは、(i)繊維を含んでおり、当該繊維の大多数は長さが約4ミクロンと約7ミクロンとの間であり、かつ、(i i)(a)MTTアッセイにおいて血清飢餓ECの代謝率を増加させ、かつ/または、トリパンブルー排除試験において血清飢餓ECのアポトーシスを救済せず、かつ(b)筋肉内への埋め込み試験において試験された場合に、非反応性である。

20

30

【0084】

いくつかの実施形態において、上記s N A Gナノファイバーは、当業者によって決定されるS. aureus等の細菌の増殖または生存に対して直接的な影響を与えない。他の実施形態において、上記s N A Gナノファイバーは、下記のセクション6.2.2.5に記載されている方法によって決定されるように、S. aureus等の細菌の増殖または生存に対して直接的な影響を与えない。いくつかの実施形態において、上記s N A Gナノファイバーは、in vitroにおいて細菌の増殖または生存に対して直接的な影響を与えない。1つの実施形態において、上記s N A Gナノファイバーは、(例えば、in vitroにおいて)グラム陰性細菌の増殖または生存に対して直接的な影響を与えない。別の実施形態において、上記s N A Gナノファイバーは、(例えば、in vitroにおいて)グラム陽性細菌の増殖または生存に対して直接的な影響を与えない。さらに別の実施形態において、上記s N A Gナノファイバーは、(例えば、in vitroにおいて)グラム陽性細菌またはグラム陰性細菌のどちらの増殖または生存に対しても直接的な影響を与えない。いくつかの実施形態において、上記s N A Gナノファイバーまたはs N A Gナノファイバー組成物は、細菌(例えば、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、または両方のタイプの細菌)に結合しない。いくつかの実施形態において、上記s N A Gナノファイバー(例えば、50~500 μgのs N A Gナノファイバー)を用いたin vitroにおける細菌培養物の培養は、10分間、30分間

40

50

、1時間、2時間、3時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間または96時間の培養では、細菌の量を減少させない（上記細菌培養物はグラム陽性および／またはグラム陰性であり得る）。いくつかの実施形態において、上記sNAGナノファイバー（例えば、約80～300μgまたは約100～200μgのsNAGナノファイバー）を用いたin vitroにおける*S. aureus*の培養物の培養は、2時間、3時間、6時間、または24時間の培養では、細菌の量を減少させない（上記細菌培養物はグラム陽性および／またはグラム陰性であり得る）。さらに他の実施形態において、例えば、*Staphylococcus aureus*の細菌培養物をin vitroにおいて上記sNAGナノファイバーを用いて処理／培養した場合に、上記sNAGナノファイバーはin vitroにおける細菌の増殖または生存を、1 log、0.9 log、0.8 log、0.75 log、0.7 log、0.6 log、0.5 log、0.4 log、0.3 log、0.25 log、0.2 log、0.1 log、0.05 log、または0.025 log未満減少させる。いくつかの実施形態において、例えば、*Staphylococcus aureus*の細菌培養物をin vitroにおいて上記sNAGナノファイバーを用いて処理／培養した場合に、上記sNAGナノファイバーはin vitroにおける細菌の増殖または生存を、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、または 10×10^4 cfu/ml未満減少させる。細菌の増殖または生存に対するsNAGナノファイバーの影響の試験、および試験結果の評価は、例えば、後述する実施例2（例えばセクション6.2.2.5）および図11Eに記載されている。

10

【0085】

20

いくつかの実施形態において、上記sNAGナノファイバーは、(i)繊維を含んでおり、当該繊維の大多数は長さが約1ミクロンと約15ミクロンとの間、約1ミクロンと約12ミクロンとの間、もしくは約4ミクロンと約7ミクロンとの間であり、(ii)in vitroにおいて*Staphylococcus aureus*の細菌培養物の細菌の増殖または生存に影響を与えず、かつ(b)生体適合性試験（例えば、筋肉内への埋め込み試験）において試験された場合に、非反応性である。

【0086】

特定の実施形態において、上記sNAGナノファイバーは、sNAGナノファイバー組成物を用いて処理された、または、sNAGナノファイバー組成物に曝された細胞、組織または期間において、特定のパターンの遺伝子の発現（例えば、RT-PCR、マイクロアレイまたはELISAによって決定されるRNAまたはタンパク質の発現）を誘導する。具体的には、特定の実施形態において、上記sNAGナノファイバー、または上記sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、1つ以上のデフェンシンタンパク質、1つ以上のデフェンシン様タンパク質、および／または1つ以上のTo11様レセプターの発現を誘導する。さらに他の実施形態において、上記sNAGナノファイバー、または上記sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、抗菌効果を有すると知られている1つ以上のタンパク質の発現を誘導する。

30

【0087】

特定の実施形態において、上記sNAGナノファイバー、または上記sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、1つ以上の - デフェンシン（例えば、DEFA1（すなわち、 - デフェンシン1）、DEFA1B、DEFA3、DEFA4、DEFA5、DEFA6）、1つ以上の - デフェンシン（例えば、DEFB1（すなわち、 - デフェンシン1）、DEFB2、DEFB4、DEFB103A、DEFB104A、DEFB105B、DEFB107B、DEFB108B、DEFB110、DEFB112、DEFB114、DEFB118、DEFB119、DEFB123、DEFB124、DEFB125、DEFB126、DEFB127、DEFB128、DEFB129、DEFB131、DEFB136）、および／または1つ以上の - デフェンシン（例えば、DEFT1P）の発現を誘導する。いくつかの実施形態において、上記sNAGナノファイバー、または上記sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、DEFA1、DEFA3、DEFA4、DEFA5、DEFB1、DEFB3、DEFB103A、DEFB

40

50

B 1 0 4 A、D E F B 1 0 8 B、D E F B 1 1 2、D E F B 1 1 4、D E F B 1 1 8、D E F B 1 1 9、D E F B 1 2 3、D E F B 1 2 4、D E F B 1 2 5、D E F B 1 2 6、D E F B 1 2 8、D E F B 1 2 9、および D E F B 1 3 1 のうちの 1 つ以上の発現を誘導する。特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、1 つ以上の T o l l レセプター（例えば、T L R 1、T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、T L R 1 0、T L R 1 1、および / または T L R 1 2）の発現を誘導する。他の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、I L - 1、C E A C A M 3、S P A G 1 1、S I G I R R（I L 1 様レセプター）、I R A K 1、I R A K 2、I R A K 4、T B K 1、T R A F 6 および I K K i のうちの 1 つ以上の発現を誘導する。いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、I R A K 2、S I G I R R、T L R 1、T L R 2、T L R 4、T L R 7、T L R 8、T L R 1 0 および T R A F 6 のうちの 1 つ以上の発現を誘導する。1 つの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、上記遺伝子産物のうちの少なくとも 1 つの発現を誘導する。

10

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、上記 s N A G ナノファイバーを用いて処理する前の被験体の細胞、組織または器官における上記遺伝子のうちの 1 つ以上の発現のレベル（例えば、上記遺伝子のうちの 1 つ以上の発現において知られている平均的なレベル）に比べて、約 0 . 2 5 倍、0 . 5 倍、1 倍、1 . 5 倍、2 倍、2 . 5 倍、3 倍、3 . 5 倍、4 倍、4 . 5 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、1 0 倍、1 2 倍、1 5 倍または 2 0 倍以上の量にて上記遺伝子のうちの 1 つ以上の発現を誘導する。いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、上記 s N A G ナノファイバーを用いて処理する前の被験体の細胞、組織または器官における上記遺伝子のうちの 1 つ以上の発現のレベル（例えば、上記遺伝子のうちの 1 つ以上の発現において知られている平均的なレベル）の約 1 0 %、2 5 %、5 0 %、7 5 %、1 0 0 %、1 2 5 %、1 5 0 %、1 7 5 %、2 0 0 %、2 2 5 %、2 5 0 %、2 7 5 %、3 0 0 %、3 5 0 %、4 0 0 %、4 5 0 %、5 0 0 %、5 5 0 %、6 0 0 %、6 5 0 %、7 0 0 %、7 5 0 %、8 0 0 %、9 0 0 % または 1 0 0 0 % 以上の量にて上記遺伝子のうちの 1 つ以上の発現を誘導する。

20

30

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー（ただし、長いポリ - N - アセチルグルコサミン、キチンおよび / またはキトサンではない）は、当業者に知られている方法によって決定されるように、または本明細書に記載されているように、上記 1 つ以上の遺伝子の発現を誘導する。いくつかの実施形態において、長いポリ - N - アセチルグルコサミン、キチンおよび / またはキトサンは、当業者に知られている方法によって決定されるように、または本明細書に記載されているように、上記 1 つ以上の遺伝子の発現を誘導しないか、または上記 s N A G ナノファイバーによって誘導される上記 1 つ以上の遺伝子の発現のレベルに比べて、より低いレベル（例えば、1 . 2 5 倍、1 . 5 倍、2 倍、2 . 5 倍、3 倍、3 . 5 倍、4 倍、4 . 5 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、または 1 0 倍を上回る倍率で低い）の上記 1 つ以上の遺伝子の発現を誘導する。

40

【 0 0 9 0 】

特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、下記のセクション 6 . 2 ~ 6 . 5 の表 I、II、III、V、VII および IX において実証されている 1 つ以上の遺伝子発現プロファイルと一致、同様、ほぼ同一、または同等である遺伝子発現プロファイルを誘導する。いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、下記のセクション 6 . 2 ~ 6 . 5 の表 I、II、III、V、VI

50

II および IX において s N A G 処理によって上方制御されることが示されている遺伝子のうちの 1 つ以上の発現を誘導する。いくつかの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、下記のセクション 6 . 2 ~ 6 . 5 の表 I、II、III、V、VII および IX において s N A G 処理によって上方制御されることが示されている遺伝子の大多数または全ての発現を誘導する。上記実施形態のうちのいくつかにおいて、遺伝子発現のレベルは、当業者に知られている方法によって、または本明細書に記載されている方法によって、s N A G ナノファイバーを用いた細胞、組織または器官の処理から 1 時間、2 時間、4 時間、5 時間、6 時間、8 時間、10 時間、12 時間、14 時間、16 時間、18 時間、20 時間、24 時間、48 時間、3 日または 5 日後に測定される。

10

【0091】

特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、長いポリ - N - アセチルグルコサミンのポリマーまたは繊維によって誘導される遺伝子発現プロファイルとは異なる遺伝子発現プロファイルを誘導する。特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーによって誘導される遺伝子発現プロファイルは、下記のセクション 6 . 2 ~ 6 . 5 の表 I、II、III、V、VII および IX に示されている遺伝子発現プロファイルと一致、同様、ほぼ同一、または同等であり、一方、長いポリ - N - アセチルグルコサミンのポリマーまたは繊維によって誘導される遺伝子発現プロファイルは、下記のセクション 6 . 5 の表 VII および / または IX に示されている遺伝子発現プロファイルと一致、同様、ほぼ同一、または同等である。他の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバー、または上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、キチンまたはキトサンによって誘導される遺伝子発現プロファイルとは異なる遺伝子発現プロファイルを誘導する。

20

【0092】

特定の実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーは、ポリ - N - アセチルグルコサミンおよび / またはポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体に放射線を照射することによって得られる。ポリ - N - アセチルグルコサミンおよびポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体に関しては下記のセクション 5 . 1 . 1 を、放射線照射に用いられる s N A G ナノファイバーを生産する方法に関してはセクション 5 . 2 を参照されたい。放射線照射は、ポリ - N - アセチルグルコサミンの繊維および / またはポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体の繊維の長さを短縮し、短くなったポリ - 1 4 - N - アセチルグルコサミンの繊維および / または短くなったポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体の繊維（すなわち、s N A G ナノファイバー）を形成するために使用され得る。具体的には、放射線照射は、ポリ - N - アセチルグルコサミンおよび / またはポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体の微細構造を破壊せずにそれらの長さおよび分子量を減少させるために使用され得る。s N A G ナノファイバーの赤外線スペクトル（IR）は、放射線が照射されていないポリ - 1 4 - N - アセチルグルコサミンまたはその誘導体と同様、ほぼ同一、または同等である。

30

【0093】

1 つの実施形態において、上記 s N A G ナノファイバーは、キチンまたはキトサンに由来していない。一方、別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物がキチンまたはキトサンに由来していてもよく、または上記 s N A G ナノファイバーがキチンまたはキトサンに由来していてもよい。

40

【0094】

〔5 . 1 . 1 ポリ - N - アセチルグルコサミンおよびその誘導体〕

米国特許第 5 , 6 2 2 , 8 3 4 号 ; 第 5 , 6 2 3 , 0 6 4 号 ; 第 5 , 6 2 4 , 6 7 9 号 ; 第 5 , 6 8 6 , 1 1 5 号 ; 第 5 , 8 5 8 , 3 5 0 号 ; 第 6 , 5 9 9 , 7 2 0 号 ; 第 6 , 6 8 6 , 3 4 2 号 ; 第 7 , 1 1 5 , 5 8 8 号 および 米国特許公開第 2 0 0 9 / 0 1 1 7 1 7 5 号（上記のそれぞれの内容は、参照によって本明細書中に引用される）には、上記ポリ - N - アセチルグルコサミンおよびポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体、ならび

50

にそれらの生産方法が記載されている。いくつかの実施形態において、上記ポリ-N-アセチルグルコサミンは、-1-4配置を有している。他の実施形態において、上記ポリ-N-アセチルグルコサミンは、-1-4配置を有している。上記ポリ-N-アセチルグルコサミンおよびポリ-N-アセチルグルコサミンの誘導体は、ポリマーの形態または繊維の形態であってもよい。

【0095】

ポリ-N-アセチルグルコサミンは例えば、微細藻類（好ましくは珪藻）によって生産されてもよく、当該微細藻類から精製されてもよい。上記ポリ-N-アセチルグルコサミンの生産の出発源として使用され得る珪藻には、特に限定されないが、Coscinodiscus属、Cyclotella属、およびThalassiosira属の種が包含される。ポリ-N-アセチルグルコサミンを、当該分野にて公知の機械力法および化学的/生物学的方法を包含する様々な方法を介して、珪藻培養物から得てもよい（例えば、米国特許第5,622,834号；第5,623,064号；第5,624,679号；第5,686,115号；第5,858,350号；第6,599,720号；第6,686,342号；および第7,115,588号参照。上記のそれぞれの内容は、全て参照によって本明細書中に引用される）。特定の実施形態において、上記ポリ-N-アセチルグルコサミンは、以下のうちの1つ以上には由来していない：貝、甲殻類、昆虫、菌類または酵母。

10

【0096】

1つの実施形態において、ポリ-N-1-4-N-アセチルグルコサミンは、a) N-アセチルグルコサミンポリマー繊維を細胞体から分離することが可能な生物学的薬剤（例えば、例えばフッ化水素系）を用いて、細胞体およびポリ-N-1-4-N-アセチルグルコサミンポリマー繊維を含んでいる微細藻類を処理し、当該ポリ-N-1-4-N-アセチルグルコサミンポリマー繊維を細胞体から放出させる工程；b) 上記ポリ-N-1-4-N-アセチルグルコサミンポリマー繊維を細胞体から分離させる工程；ならびにc) 分離されたポリ-N-1-4-N-アセチルグルコサミンポリマー繊維から混入物質を除去し、ポリ-N-1-4-N-アセチルグルコサミンポリマーを単離および精製する工程を含んでいる処理に由来する。

20

【0097】

他の実施形態において、上記ポリ-N-1-4-N-アセチルグルコサミンは、以下のうちの1つ以上に由来していてもよい：貝、甲殻類、昆虫、菌類または酵母。特定の実施形態において、本願に記載されている組成物はキチンまたはキトサンを含んでいない。

30

【0098】

上記ポリ-N-アセチルグルコサミンの単糖ユニットの1つ以上は、脱アセチル化されていてもよい。特定の実施形態において、上記ポリ-N-アセチルグルコサミンの1%~5%、5%~10%、5%~15%、20%~30%または25%~30%は脱アセチル化されている。いくつかの実施形態において、上記ポリ-N-アセチルグルコサミンの1%、5%、10%、15%、20%、25%、または30%は脱アセチル化されている。他の実施形態において、上記ポリ-N-アセチルグルコサミンの30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%または1%未満は脱アセチル化されている。いくつかの実施形態において、上記ポリ-N-アセチルグルコサミンの1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%以上、または全て(100%)は脱アセチル化されている。他の実施形態において、上記ポリ-N-アセチルグルコサミンの1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%未満は脱アセチル化されている。

40

【0099】

特定の実施形態において、ポリ-N-アセチルグルコサミン組成物は、アセチル化されたグルコサミン（すなわち、N-アセチルグルコサミン）単糖の70%~80%、75%~80%、75%~85%、85%~95%、90%~95%、90%~99%または9

50

5 % ~ 100 %を含んでいる。いくつかの実施形態において、ポリ - N - アセチルグルコサミン組成物は、アセチル化されたグルコサミン（すなわち、N - アセチルグルコサミン）単糖の70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 %または100 %を含んでいる。他の実施形態において、ポリ - N - アセチルグルコサミン組成物は、アセチル化されたグルコサミンの70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 %、99.5 %または99.9 %を上回る割合のアセチル化されたグルコサミンを含んでいる。いくつかの実施形態において、ポリ - N - アセチルグルコサミン組成物は、アセチル化されたグルコサミンの1 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %もしくは99 %以上、または全て(100 %)を含んでいる。他の実施形態において、ポリ - N - アセチルグルコサミン組成物は、アセチル化されたグルコサミンの1 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 %、または100 %未満を含んでいる。

10

20

30

40

50

【0100】

いくつかの実施形態において、ポリ - N - アセチルグルコサミン組成物は、少なくとも1つのグルコサミン単糖を含んでおり、さらにN - アセチルグルコサミン単糖の少なくとも10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %または99 %を含んでいてもよい。他の実施形態において、ポリ - N - アセチルグルコサミン組成物は、少なくとも1つのN - アセチルグルコサミン単糖を含んでおり、さらにグルコサミン単糖の少なくとも10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %または99 %を含んでいてもよい。

【0101】

ポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体もまた、本明細書中に記載されている組成物中に使用され得る。ポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体、および当該誘導体の製造方法は、米国特許第5,623,064号に記載されており（例えば、セクション5.4参照）、その内容は全て参照によって本明細書中に引用される。ポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体としては、特に限定されないが、部分的に、または完全に脱アセチル化されたポリ - N - アセチルグルコサミン、またはその脱アセチル化された誘導体が包含される。さらに、ポリ - N - アセチルグルコサミンは、硫酸化、リン酸化および/または硝酸化されることによって誘導体化されてもよい。ポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体としては、例えば、硫酸化されたポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体、リン酸化されたポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体、または硝酸化されたポリ - N - アセチルグルコサミンの誘導体が包含される。さらに、ポリ - N - アセチルグルコサミンの単糖ユニットの1つ以上は、1つ以上のスルホニル基、1つ以上のO - アシル基を含んでいてもよい。さらに、上記脱アセチル化されたポリ - N - アセチルグルコサミンの単糖の1つ以上は、N - アシル基を含んでいてもよい。ポリ - N - アセチルグルコサミン、またはその脱アセチル化された誘導体の単糖の1つ以上は、O - アルキル基を含んでいてもよい。ポリ - N - アセチルグルコサミンの単糖の1つ以上は、アルカリ誘導体であってもよい。ポリ - N - アセチルグルコサミンの脱アセチル化された誘導体の単糖ユニットの1つ以上は、N - アルキル基を含んでいてもよい。ポリ - N - アセチルグルコサミンの脱アセチル化された誘導体の単糖ユニットの1つ以上は、少なくとも1つのデオキシハロゲン誘導体を含んでいてもよい。ポリ - N - アセチルグルコサミンの脱アセチル化された誘導体の単糖ユニットの1つ以上は、塩を形成してもよい。ポリ - N - アセチルグルコサミンの脱アセチル化された誘導体の単糖ユニットの1つ以上は、金属キレート形成してもよい。特定の実施形態において、上記金属は亜鉛である。ポリ - N - アセチルグルコサミンの脱アセチル化された誘導体の単糖ユニットの1つ以上は、N - アルキリデン基またはN - アリリデン基を含んでいてもよい。1つの実施形態において、上記誘導体は、酢酸塩誘導体である。別の実施形態において、上記誘導体は、酢酸塩誘導体ではない。1つの実施形態において、ポリ - N - アセチルグルコサミンまたは脱アセチル化されたポリ - N - アセチル

グルコサミンは、酪酸を用いて誘導体化される。別の実施形態において、上記誘導体は酪酸を用いて誘導体化されない。

【0102】

〔5.2 s N A G ナノファイバーの製造方法〕

上述したポリ-N-アセチルグルコサミンのポリマーもしくは繊維、ならびにポリ-N-アセチルグルコサミンのポリマーもしくは繊維の誘導体は、乾燥したポリマーもしくは繊維、またはポリマーもしくは繊維の膜として放射線を照射され得る。また、上述したポリ-N-アセチルグルコサミンのポリマーもしくは繊維、ならびにポリ-N-アセチルグルコサミンのポリマーもしくは繊維の誘導体は、湿っている状態で放射線を照射され得る。放射線照射による s N A G ナノファイバーの製造方法、および製造された s N A G ナノファイバーは、米国特許公開第 2 0 0 9 / 0 1 1 7 1 7 5 号に記載されており、その内容は、全て参照によって本明細書中に引用される。

10

【0103】

特定の実施形態において、上記ポリ-N-アセチルグルコサミンのポリマーまたは繊維は、放射線照射のために、懸濁物/スラリーまたはウェットケーキ (wet cake) として形成される。放射線照射は、上記ポリマーまたは繊維を最終的な剤形 (例えば、包帯) へと製剤化する前、製剤化と同時、または製剤化した後に行われ得る。一般的に、懸濁物/スラリーまたはウェットケーキ中のポリマーまたは繊維の含有量は様々である。例えば、スラリーの形成のために蒸留水 1 m l あたりに約 0 . 5 m g ~ 約 5 0 m g のポリマーまたは繊維が使用され、ウェットケーキの形成のために蒸留水 1 m l あたりに約 5 0 m g ~ 約 1 0 0 0 m g のポリマーまたは繊維が使用される。上記ポリマーまたは繊維は、懸濁物/スラリーまたはウェットケーキをより形成しやすくするために、まず凍結乾燥され、液体窒素中で凍結され、粉碎され得る。また、上記懸濁物/スラリーは、水分を除去してウェットケーキを形成するために濾過され得る。特定の側面において、上記ポリマーまたは繊維は、蒸留水 1 m l あたりに約 0 . 5 m g 、 1 m g 、 2 m g 、 3 m g 、 4 m g 、 5 m g 、 6 m g 、 7 m g 、 8 m g 、 9 m g 、 1 0 m g 、 1 2 m g 、 1 5 m g 、 1 8 m g 、 2 0 m g 、 2 5 m g もしくは 5 0 m g のポリマーもしくは繊維、または上述の実施形態の間のいずれかの範囲 (例えば、1 ~ 1 0 m g / m l 、 5 ~ 1 5 m g / m l 、 2 ~ 8 m g / m l 、 2 0 ~ 5 0 m g / m l 等) のポリマーまたは繊維を含んでいる懸濁物として放射線を照射され得る。他の側面において、上記ポリマーまたは繊維は、蒸留水 1 m l あたりに約 5 0 ~ 1 , 0 0 0 m g のポリマーまたは繊維を含んでいるウェットケーキとして放射線を照射され得る。特定の実施形態において、上記ウェットケーキは、蒸留水 1 m l あたりに約 5 0 、 1 0 0 、 2 0 0 、 3 0 0 、 4 0 0 、 5 0 0 、 6 0 0 、 7 0 0 、 8 0 0 、 9 0 0 もしくは 1 0 0 0 m g のポリマーもしくは繊維、またはその間のいずれかの範囲 (例えば、1 0 0 ~ 5 0 0 m g / m l 、 3 0 0 ~ 6 0 0 m g / m l 、 5 0 ~ 1 0 0 0 m g / m l 等) のポリマーまたは繊維を含んでいる。

20

30

【0104】

上記放射線の照射は、ガンマ線照射、e-ビーム照射、またはx線の形態であることが好ましい。照射源は2つであることが好ましい：放射性原子核および電気。特定の実施形態において、上記放射性原子核は、コバルト-60およびセシウム-137である。上記原子核は両方とも、質量を持たない光子であるガンマ線を放射する。上記ガンマ線は0 . 6 6 ~ 1 . 3 M e V のエネルギーを有している。電気を使えば、電子が発生し、エネルギーが1 0 M e V 以上まで高められる。ポリマーまたは繊維に放射線を照射してサイズを縮小する場合に考慮すべきことは、水と同様の密度を有する物質に対する1 0 M e V の電子による透過 (penetration) の深さは、片側からの曝露で約 3 . 7 c m 、または両側からの曝露で約 8 . 6 c m に制限されるということである。透過の深さは、より低い電子エネルギーで減少する。電子エネルギーは、金属 (通常はタングステンまたはタantal) の標的を電子ビームの経路中に配置することによってx線に変換され得る。x線への変換は、5 M e V までのエネルギーを有する電子に制限される。x線は質量を持たない光子であり、ガンマ線と同様にポリマーまたは繊維を透過し得る。電子エネルギーのx線への変換

40

50

はたった約 8 % の効率である。低い変換効率の原因となる x 線生産施設においては、高性能な電子ビーム装置が必要とされている。

【 0 1 0 5 】

特定の実施形態において、上記放射線の照射は、ガンマ線の照射である。

【 0 1 0 6 】

放射線の吸収線量は、生産物の単位重量あたりに吸収されたエネルギーであり、グレイ (g y) またはキログレイ (k g y) で測定される。乾燥されたポリマーまたは繊維において、好ましい吸収線量は、約 5 0 0 ~ 2 , 0 0 0 k g y の放射線であり、最も好ましくは約 7 5 0 ~ 1 , 2 5 0 k g y または約 9 0 0 ~ 1 , 1 0 0 k g y の放射線である。湿ったポリマーまたは繊維において、好ましい吸収線量は、約 1 0 0 ~ 5 0 0 k g y の放射線であり、最も好ましくは約 1 5 0 ~ 2 5 0 k g y または約 2 0 0 ~ 2 5 0 k g y の放射線である。

10

【 0 1 0 7 】

上記放射線照射量は、上記ポリマーまたは繊維の長さにおける当該照射量の効果の観点から記載され得る。特定の実施形態において、使用された放射線照射量によって、好ましくは、ポリマーまたは繊維の長さが当該ポリマーまたは繊維の当初の長さの約 1 0 % ~ 9 0 % のいずれかで減少する。特定の実施形態において、平均的な長さは、約 1 0 % 、約 2 0 % 、約 3 0 % 、約 4 0 % 、約 5 0 % 、約 6 0 % 、約 7 0 % 、約 8 0 % 、もしくは約 9 0 % 、またはその間のいずれかの範囲 (例えば 2 0 ~ 4 0 % 、 3 0 ~ 7 0 % 等) で減少する。または、使用された放射線照射量によって、好ましくは、上記ポリマーまたは繊維の長さが 1 ~ 1 0 0 ミクロンのいずれかまで減少する。特定の実施形態においては当初の繊維の長さに依存して、上記ポリマーまたは繊維の平均的な長さが約 1 5 ミクロン未満、約 1 4 ミクロン未満、約 1 3 ミクロン未満、約 1 2 ミクロン未満、約 1 1 ミクロン未満、約 1 0 ミクロン未満、約 8 ミクロン未満、約 7 ミクロン未満、約 5 ミクロン未満、約 4 ミクロン未満、約 3 ミクロン未満、2 ミクロン未満、または 1 ミクロン未満まで減少する。特定の実施形態において、上記ポリマーまたは繊維の大多数 (特定の実施形態において、少なくとも 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、 9 9 . 5 % 、 9 9 . 8 % 、 9 9 . 9 % 、もしくは 1 0 0 % 、または 5 5 % ~ 6 5 % 、 5 5 % ~ 7 5 % 、 6 5 % ~ 7 5 % 、 7 5 % ~ 8 5 % 、 7 5 % ~ 9 0 % 、 8 0 % ~ 9 5 % 、 9 0 % ~ 9 5 % 、もしくは 9 5 % ~ 9 9 % の間) の長さは、約 2 0 ミクロン以下、約 1 5 ミクロン以下、約 1 2 ミクロン以下、約 1 0 ミクロン以下、約 8 ミクロン以下、約 7 ミクロン以下、または約 5 ミクロン以下まで減少する。特定の実施形態において、上記ポリマーまたは繊維に対する放射線照射によって、上記繊維の大多数 (特定の実施形態において、少なくとも 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、 9 9 . 5 % 、 9 9 . 8 % 、 9 9 . 9 % 、もしくは 1 0 0 % 、または 5 5 % ~ 6 5 % 、 5 5 % ~ 7 5 % 、 6 5 % ~ 7 5 % 、 7 5 % ~ 8 5 % 、 7 5 % ~ 9 0 % 、 8 0 % ~ 9 5 % 、 9 0 % ~ 9 5 % 、もしくは 9 5 % ~ 9 9 % の間) の長さは、約 1 ~ 2 0 ミクロンの間、約 1 ~ 1 5 ミクロンの間、約 2 ~ 1 5 ミクロンの間、約 1 ~ 1 2 ミクロンの間、約 2 ~ 1 2 ミクロンの間、約 1 ~ 1 0 ミクロンの間、約 2 ~ 1 0 ミクロンの間、約 1 ~ 8 ミクロンの間、約 2 ~ 8 ミクロンの間、約 1 ~ 7 ミクロンの間、約 2 ~ 7 ミクロンの間、約 3 ~ 8 ミクロンの間、約 4 ~ 7 ミクロンの間、約 1 ~ 5 ミクロンの間、約 2 ~ 5 ミクロンの間、約 3 ~ 5 ミクロンの間、約 4 ~ 1 0 ミクロンの間のいずれか、または同様に包含される上記の長さの間のいずれかの範囲へと減少する。

20

30

40

【 0 1 0 8 】

上記放射線照射量はまた、上記ポリマーまたは繊維の分子量における当該照射量の効果の観点から記載され得る。特定の実施形態において、使用された放射線照射量によって、好ましくは、ポリマーまたは繊維の分子量が、当該ポリマーまたは繊維の当初の分子量の約 1 0 % ~ 9 0 % のいずれかで減少する。特定の実施形態において、平均的な分子量は、約 1 0 % 、約 2 0 % 、約 3 0 % 、約 4 0 % 、約 5 0 % 、約 6 0 % 、約 7 0 % 、約 8 0 % 、もしくは約 9 0 % 、またはその間のいずれかの範囲 (例えば 2 0 ~ 4 0 % 、 3 0 ~ 7 0 %

50

等)で減少する。または、使用された放射線照射量によって、好ましくは、上記ポリマーまたは繊維の分子量が1,000~1,000,000ダルトンのいずれかまで減少する。特定の実施形態においては当初の分子量に依存して、上記ポリマーまたは繊維の平均的な分子量が1,000,000ダルトン未満、750,000ダルトン未満、500,000ダルトン未満、300,000ダルトン未満、200,000ダルトン未満、100,000ダルトン未満、90,000ダルトン未満、80,000ダルトン未満、70,000ダルトン未満、60,000ダルトン未満、50,000ダルトン未満、25,000ダルトン未満、10,000ダルトン未満、または5,000ダルトン未満まで減少する。特定の実施形態において、上記平均的な分子量は、500ダルトン以上、1,000ダルトン以上、2,000ダルトン以上、3,500ダルトン以上、5,000ダルトン以上、7,500ダルトン以上、10,000ダルトン以上、25,000ダルトン以上、50,000ダルトン以上、60,000ダルトン以上、または100,000ダルトン以上まで減少する。上述の平均的な分子量の間のいずれかの範囲もまた包含される；例えば、特定の実施形態において、上記ポリマーまたは繊維に対する放射線照射は、上記平均的な分子量を10,000~100,000ダルトンの間、1,000~25,000ダルトンの間、50,000~500,000ダルトンの間、25,000~100,000ダルトンの間、30,000~90,000ダルトンの間、約40,000~80,000ダルトンの間、約25,000~75,000ダルトンの間、約50,000~70,000ダルトンの間、または約55,000~65,000ダルトンの間等のいずれかまで減少させる。特定の実施形態において、上記ポリマーまたは繊維に対する放射線照射は、上記ポリマーまたは繊維の大多数の分子量を減少させ、特定の実施形態においては、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、もしくは100%、または55%~65%、55%~75%、65%~75%、75%~85%、75%~90%、80%~95%、90%~95%、もしくは95%~99%の間の繊維を約20,000~100,000ダルトン、約25,000~75,000ダルトン、約30,000~90,000ダルトン、約40,000~80,000ダルトン、約50,000~70,000ダルトン、または約55,000~65,000ダルトンの間のいずれかまで減少させる。特定の実施形態において、上記ポリマーまたは繊維に対する放射線照射は、上記ポリマーまたは繊維の大多数の分子量を減少させ、特定の実施形態においては、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、もしくは100%、または55%~65%、55%~75%、65%~75%、75%~85%、75%~90%、80%~95%、90%~95%、もしくは95%~99%の間の繊維を約60,000ダルトンまで減少させる。

【0109】

放射線照射の後、スラリーを濾過して乾燥させ、またウェットケーキを乾燥させて、本発明の実施において有用な組成物（例えば、包帯、および本明細書に記載されている他の組成物）を形成することができる。

【0110】

〔5.3 sNAGナノファイバーを含んでいる組成物〕

上記sNAGナノファイバーは、本明細書に記載されているような局所的な投与のための種々の組成物として製剤化されていてもよい。

【0111】

上記sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、クリーム、膜、フィルム、溶液、懸濁物、粉末、ペースト、軟膏、坐薬、ゼラチン様組成物、エアロゾル、ゲル、またはスプレーとして製剤化されていてもよい。1つの実施形態において、上記sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、極薄膜として製剤化されていてもよい。いくつかの実施形態において、上記sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、包帯、マット、または包帯として製剤化されていてもよい。投与前の液体に含まれる溶液または懸濁物において好適な固体の製剤もまた、検討されている。当該組成物が、抗菌活性が有効となり得る、

整形外科用インプラント（尻、膝、肩用；ピン、ねじ等）、心臓血管用インプラント（ステント、カテーテル等）等の埋め込み型の装置に組み込まれたり、または当該装置上にコーティングされたりする可能性もある。

【0112】

上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、薬学的に許容可能な賦形剤の 1 つ以上を含んでもよい。好適な賦形剤は、水、生理食塩水、食塩水、D 型グルコース、グリセロール、エタノール等、またはそれらの組み合わせを含み得る。好適な賦形剤はまた、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チヨーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、油（ピーナッツ油、大豆油、鉱物油、ごま油等の、石油、動物、植物、または合成に由来する油を包含する）、タルク、塩化ナトリウム、乾燥したスキムミルク、プロピレン、グリコール等を含んでいる。さらに、上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、湿潤剤、乳化剤、p H 緩衝剤、および他の薬剤のうちの 1 つ以上を含んでもよい。上記 s N A G ナノファイバー組成物はまた、生理学的に許容可能な担体に組み込まれていてもよく、例えば、局所適用に好適な生理学的に許容可能な担体に組み込まれていてもよい。用語「薬学的に許容可能」とは、連邦政府もしくは州政府に認可されていること、または米国薬局方もしくは動物（特にヒト）における使用についての他の一般的に認められている薬局方に記載されていることを意味する。好適な薬学的に許容可能な担体の例は E.W. Marti n による Remington's Pharmaceutical Sciences に記載されている。

10

【0113】

組成物中の上記 s N A G ナノファイバーの最終的な量は様々であり得る。例えば、組成物（例えば、患者に投与するために調整された組成物）中の上記 s N A G ナノファイバーの量は、体積あたりの重量で約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 8 %、または約 9 9 % 以上であり得る。1 つの実施形態において、組成物中の上記 s N A G ナノファイバーの量は約 9 5 %、約 9 8 %、約 9 9 %、または約 1 0 0 % である。また、組成物（例えば、患者に投与するために調整された組成物）中の上記 s N A G ナノファイバーの量は、体積あたりの重量で約 5 0 % ~ 1 0 0 %、約 6 0 % ~ 1 0 0 %、約 7 0 % ~ 1 0 0 %、約 7 5 % ~ 1 0 0 %、約 8 0 % ~ 1 0 0 %、約 9 0 % ~ 1 0 0 %、約 9 5 % ~ 1 0 0 %、約 7 0 % ~ 9 5 %、約 7 5 % ~ 9 5 %、約 8 0 % ~ 9 5 %、約 9 0 % ~ 9 5 %、約 7 0 % ~ 9 0 %、約 7 5 % ~ 9 0 %、または約 8 0 % ~ 9 0 % であってもよい。組成物は、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % または 9 9 % を上回る濃度の上記 s N A G ナノファイバーの溶液を含んでもよい。

20

30

【0114】

s N A G ナノファイバー組成物は、創傷包帯として製剤化されていてもよい。特定の実施形態において、s N A G ナノファイバー組成物は、バリア（barrier）、膜、またはフィルム形態で創傷包帯として製剤化されていてもよい。または、s N A G ナノファイバー組成物は、バリア、膜、またはフィルム等の包帯の基材に添加されてもよい。バリア、膜、またはフィルムは種々の標準的なサイズで供給され、さらに切断し、治療する領域のサイズに合わせることができる。上記基材は、患者への投与の前に、ポリマーまたは繊維が添加またはコーティングされている包帯またはガーゼ等の従来の包帯材料であってもよい。または、上記 s N A G ナノファイバーが、ひも、マイクロビーズ、ミクロスフィア、または微小繊維から製造されたバリア、膜、またはフィルムとして製剤化されてもよく、または上記組成物がバリア形成マットとして製剤化されていてもよい。特定の実施形態において、包帯の少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % は上記 s N A G ナノファイバーから構成されている。特定の側面において、包帯は、ガーゼまたは包帯等の従来の包帯材料を含んでいない。当該実施形態においては、上記 s N A G ナノファイバー自体が、創傷包帯として製剤化されている。

40

【0115】

上記 s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、いずれかの好適な天然のポリマー

50

もしくは繊維または合成されたポリマーもしくは繊維をさらに含んでもよい。好適なポリマーまたは繊維の例としては、セルロースポリマー、キサン、ポリアラミド、ポリアミド、ポリイミド、ポリアミド/イミド、ポリアミドヒドラジド、ポリヒドラジド、ポリイミダゾール、ポリベンゾオキサゾール、ポリエステル/アミド、ポリエステル/イミド、ポリカーボネート/アミド、ポリカーボネート/イミド、ポリスルホン/アミド、ポリスルホン/イミド等、コポリマーおよびそれらの混合物が包含される。他の好適なポリマーまたは繊維の種類としては、ポリフッ化ビニリデンおよびポリアクリロニトリルが包含される。上記ポリマーまたは繊維の例としては、米国特許RE 30, 351号；第4, 705, 540号；第4, 717, 393号；第4, 717, 394号；第4, 912, 197号；第4, 838, 900号；第4, 935, 490号；第4, 851, 505号；第4, 880, 442号；第4, 863, 496号；第4, 961, 539号；および欧州特許出願0 219 878に記載されているポリマーまたは繊維が包含され、上記文献の内容は全て参照によって引用される。上記ポリマーまたは繊維は、セルロースポリマー、ポリアミド、ポリアラミド、ポリアミド/イミド、またはポリイミドのいずれかのうちの少なくとも1つが含んでいる。特定の実施形態において、上記ポリマーまたは繊維は、ポリアラミド、ポリエステル、ウレタンおよびポリテトラフルオロエチレンを含んでいる。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、2つ以上の種類のポリマーを含んでいる（例えば、上記s N A G ナノファイバーおよびセルロース）。

10

【0116】

特定の側面において、上記s N A G ナノファイバーは、組成物中の唯一の活性成分である。

20

【0117】

他の実施形態において、組成物は、例えば、抗菌効果および/または治癒（例えば創傷の治癒）を促進するために、1つ以上の追加の活性成分を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記追加の活性成分は、1つ以上の抗菌剤（例えば、抗生物質、デフェンシンペプチド、デフェンシン様ペプチド、またはT o l l レセプター様ペプチド）、または成長因子である。特定の実施形態において、上記追加の活性成分は、例えば、PDGF - A A、PDGF - A B、PDGF - B B、PDGF - C C、PDGF - D D、FGF - 1、FGF - 2、FGF - 5、FGF - 7、FGF - 10、EGF、TGF - 、（HB - EGF）、アンフィレグリン、エピレグリン、ベータセルリン、ニューレグリン、エピゲン（epigen）、VEGF - A、VEGF - B、VEGF - C、VEGF - D、VEGF - E、胎盤成長因子（PLGF）、アンジオポエチン - 1、アンジオポエチン - 2、IGF - I、IGF - II、肝細胞成長因子（HGF）、およびマクロファージ刺激タンパク質（MSP）のうちの1つ以上の成長因子である。他の実施形態において、上記追加の活性成分は、免疫システムを促進する薬剤、鎮痛剤または解熱剤（fever relief agent）である。

30

【0118】

特定の実施形態において、上記追加の活性成分は、以下の種類の抗生物質のうちの1つの抗生物質である：マイクロライド系（例えば、エリスロマイシン、アジスロマイシン）、アミノグリコシド系（例えば、アミカシン、ゲンタマイシン、ネオマイシン、ストレプトマイシン）、セファロsporin系（例えば、セファドロキシル、セファクロール、セフォタキシム、セフェピム）、フルオロキノロン系（例えば、シプロフロキサシン、レボフロキサシン）、ペニシリン系（例えば、ペニシリン、アンピシリン、アモキシシリン）、テトラサイクリン系（例えば、テトラサイクリン、ドキシサイクリン）、およびカルバペネム系（例えば、メロペネム、イミペネム）。いくつかの特定の実施形態において、上記追加の活性成分は、バンコマイシン、サルファ剤（例えば、コトリモキサゾール/トリメトプリム - スルファメトキサゾール）、テトラサイクリン（例えば、ドキシサイクリン、ミノサイクリン）、クリンダマイシン、オキサゾリジノン（例えばリネゾリド）、ダブトマイシン、テイコプラニン、キヌプリスチン/ダルフォプリスチン（シナシッド）、チゲサイクリン、アリシン、バシトラシン、ニトロフラントイン、過酸化水素、ノボピオシン

40

50

、ネチルミシン、メチルグリオキサール、ハチデフェンシン - 1、トブラマイシン、グルコン酸クロルヘキシジン (chlorhexidine digluconate)、グルコン酸クロルヘキシジン (chlorhexidine gluconate)、レボフロキサシン、亜鉛、および銀のうちの1つ以上である。いくつかの実施形態において、組成物は、上記 s N A G ナノファイバーと、S. aureus の感染、MRSA の感染、Pseudomonas の感染、もしくは C. difficile の感染を治療もしくは予防するために効果的な薬剤、または上記感染を治療もしくは予防するために一般的に使用される薬剤 (例えば、上記感染に対して効果的な抗生物質、または上記感染に対して一般的に使用される抗生物質) とを含んでいる。

【0119】

s N A G ナノファイバー組成物は、コラーゲンを含んでいてもよいが、特定の側面においては、s N A G ナノファイバー組成物は、コラーゲンを含んでいない。

10

【0120】

特定の実施形態において、s N A G ナノファイバー組成物は、いずれの追加の治療法も含んでいない。特定の実施形態において、s N A G ナノファイバー組成物は、いずれの追加の抗菌剤、デフェンシンペプチド、デフェンシン様ペプチド、T o l l レセプター様ペプチド、または成長因子を含んでいない。いくつかの実施形態において、s N A G ナノファイバー組成物は抗生物質を含んでいない。さらに他の実施形態において、s N A G ナノファイバー組成物は、追加の治療法 (例えば、抗生物質) を含んでいてもよい。上記実施形態の1つにおいて、上記追加の治療法 (例えば、抗生物質) は、上記 s N A G ナノファイバー中にて被包、固定または製剤化されない。

20

【0121】

他の側面において、s N A G ナノファイバー組成物は、顕著な量のタンパク質を含んでいない。特定の実施形態において、s N A G ナノファイバー組成物中のタンパク質の含有量は、0.1重量%、0.5重量%または1重量%以下である。他の実施形態において、上記組成物中のタンパク質の含有量は、クマシー染色によって検出することが不可能である。

【0122】

1つの実施形態においては、亜鉛も s N A G ナノファイバー組成物中に含まれている。抗菌特性に加えて、亜鉛は創傷治癒においても役割を果たす (Andrews et al., 1999, Adv Wound Care 12:137-8参照)。上記亜鉛は、酸化亜鉛、硫酸亜鉛、酢酸亜鉛、またはグルコン酸亜鉛等の塩の形態で加えられることが好ましい。

30

【0123】

〔5.4 s N A G 組成物の抗菌性の利用〕

様々な細菌の感染または細菌の感染に関連した疾患が、本明細書に記載されている s N A G ナノファイバー組成物の投与によって治療および/または予防され得る (例えば、下記のセクション 5.4.1 および 5.4.2 参照)。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は静菌性である。別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は殺菌性である。実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、グラム陽性細菌による感染および/または当該感染に関連したいずれかの疾患を治療および/または予防するために使用されてもよい。別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、グラム陰性細菌による感染および/または当該感染に関連したいずれかの疾患を治療および/または予防するために使用されてもよい。さらに別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌の両方による感染および/または当該感染に関連したいずれかの疾患を治療および/または予防するために使用されてもよい。

40

【0124】

本明細書に記載されている組成物を用いて治療および/または予防され得る細菌の感染には、Aquaspirillum科、Azospirillum科、Azotobacteraceae科、Bacteroidaceae科、Bartonella種、Bdellovibrio科、Campylobacter種、Chlamydia種 (例えば、Chlamydia pneumoniae)、クロストリジウム、Enterobacteriaceae科 (例えば、Citrobacter種、エドワー

50

ドシエラ属、Enterobacter aerogenes、Erwinia種、Escherichia coli、ハフニア属の種、Klebsiella種、モルガネラ属の種、Proteus vulgaris、プロビデンシア属、Salmonella種、Serratia marcescens、およびShigella flexneri)、Gardinerella科、Haemophilus influenzae、Halobacteriaceae科、Helicobacter科、Legionellaceae科、Listeria種、Methylococcaceae科、マイコバクテリア（例えばMycobacterium tuberculosis）、Neisseriaceae科、Oceanospirillum科、Pasteurellaceae科、Pneumococcus種、Pseudomonas種、Rhizobiaceae科、Spirillum科、Spirosomaceae科、Staphylococcus（例えば、メチシリン耐性Staphylococcus aureusおよびStaphylococcus pyrogenes）、Streptococcus（例えば、Streptococcus enteritidis、Streptococcus fasciae、およびStreptococcus pneumoniae）、Vampirovibr Helicobacter科、および／またはVampirovibrio科の細菌による感染が包含される。特定の実施形態において、上記細菌による感染によって引き起こされる疾患、または上記細菌による感染と関連した疾患はまた、本明細書に記載されている組成物を用いて予防および／または治療され得る。

10

【0125】

本明細書に記載されている組成物を用いて治療および／または予防され得る細菌の感染には、以下の属の細菌による感染も包含される：Bordetella, Borrelia, Brucella, Campylobacter, ChlamydiaおよびClamidophyllia, Clostridium, Corynebacterium, Enterococcus, Escherichia, Francisella, Haemophilus, Helicobacter, Legionella, Leptospira, Listeria, Mycobacterium, Mycoplasma, Neisseria, Pseudomonas, Rickettsia, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus, Treponema, Vibria, および／またはYersinia。特定の実施形態において、上記細菌による感染によって引き起こされる疾患、または上記細菌による感染と関連した疾患はまた、本明細書に記載されている組成物を用いて予防および／または治療され得る。

20

【0126】

本明細書に記載されている組成物を用いて治療および／または予防され得る細菌の感染には、以下の種の細菌による感染も包含される：Bacillus anthracis, Bordetella pertussis, Borrelia burgdorferi, Brucella abortus, Brucella canis, Brucella melitensis, Brucella suis, Campylobacter jejuni, Chlamydia pneumonia, Chlamydia trachomatis, Clamidophila psittaci, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Francisella tularensis, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, Legionella pneumophila, Leptospira pneumophila, Leptospira interrogans, Listeria monocytogenes, Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Rickettsia rickettsii, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumonia, Streptococcus pyogenes, Treponema pallidum, Vibria cholerae, および／またはYersinia pestis。特定の実施形態において、上記細菌による感染によって引き起こされる疾患、または上記細菌による感染と関連した疾患はまた、本明細書に記載されている組成物を用いて予防および／または治療され得る。

30

40

【0127】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、好気性細菌による感染および／または当該感染に関連した疾患を予防および／または治療するために使用され得る。他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、嫌気性細菌による感染および／または当該感染に関連した疾患を予防および／または治療するために使用され得る。

【0128】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、Pseudomonas aeruginosaの感染を予防および／または治療するために使用される。Pseudomonasは、土壌、水、

50

他の湿潤性の環境、植物および動物において見られるグラム陰性の好気性細菌であり、当該細菌の臨床分離株は青緑色の色素であるピオシアニンおよび特徴的な甘い匂いを産生する。*Pseudomonas aeruginosa*は、尿路感染、肺炎、呼吸器系感染、皮膚炎、軟組織感染、菌血、骨関節感染、胃腸感染、および種々の全身感染症を引き起こすことで知られている。*Pseudomonas aeruginosa*は、特にやけどを負った患者、嚢胞性線維症の患者、免疫不全の患者（例えば、AIDSおよび癌患者）、および1週間を超えて入院している患者における感染の重要な原因として知られている。*Pseudomonas aeruginosa*は、例えば、以下に限定されないが、肺炎、尿路感染、菌血の院内感染を頻繁に引き起こす。上記感染のいずれか、または全ては本明細書に記載されている組成物によって予防および/または治療され得る。

10

【0129】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、Staphの感染（特に*Staphylococcus aureus*の感染）を予防および/または治療するために使用される。本明細書に記載されている、本実施形態および他の実施形態におけるsNAGナノファイバー組成物の利用は、抗生物質に依存しない細菌の感染の解消を可能にするとともに、耐性を有する生物の発生を防ぎ得る。

【0130】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、1つ以上の抗菌剤に対して耐性を有する細菌に対抗するために使用され得る。例えば、本明細書に記載されている組成物は、1つ以上の抗生物質に対して耐性を有する細菌を処置するために使用され得る。上記細菌の例としては、例えば、MRSA（メチシリン耐性*Staphylococcus aureus*）、VISA（バンノマイシン耐性*S. aureus*）、VRE（バンノマイシン耐性*Enterococcus*）、ペニシリン耐性*Enterococcus*、PRSP（ペニシリン耐性*Streptococcus pneumoniae*）、イソニアジド/リファンピン耐性*Mycobacterium tuberculosis*および他の抗生物質耐性株の細菌（例えば、*E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, および*Streptococci*の耐性株）等の、従来の抗生物質に対して耐性を有する細菌が挙げられる。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、多剤耐性細菌を処置するために使用され得る。

20

【0131】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、メチシリン耐性*Staphylococcus aureus*（「MRSA」；多剤耐性*Staphylococcus aureus*またはオキサシリン耐性*Staphylococcus aureus*（ORSA））を処置および/または予防するために使用され得る。MRSAは、ベータラクタム系抗生物質に対する耐性を発達させている*Staphylococcus aureus*のあらゆる株である。上記ベータラクタム系抗生物質には、限定はされないが、ペニシリン（ペニシリン、メチシリン、ジクロキサシリン、ナフシリン、オキサシリン等）およびセファロスポリンが包含される。MRSAの公知の株のいくつかは、エリスロマイシンおよびシプロフロキサシンに対して耐性を有するEMRSA15およびEMRSA16（MRSA252としても知られている）；CC8（ST8：USA300としても知られている）；ST1：USA400；ST8：USA500；ST59：USA1000；ST93株；ST80株；ならびにST59株である。MRSAは、ヒトにおける多くの感染の原因となっている。MRSAは、健康上の重大な懸念となっており、医療に関連したブドウ球菌感染症（staph infections）のおよそ50%の原因となっている。米国では、毎年、94,000人を上回る人が深刻なMRSA感染症にかかっており、約19,000人が感染によって死んでいる。特に蔓延しているMRSAは、病院内のものである；病院におけるMRSA感染症の危険因子としては、事前の抗生物質（例えばキノロン系抗生物質）の曝露、集中治療室への入室、手術およびMRSAがコロニーを形成している患者への接触が包含される。開放創を有する患者、免疫不全の患者（例えば、HIV/AIDS、癌、移植処置、重い喘息による）、幼い子供（例えば、ヒトの乳児およびヒトの幼児）、および高齢者（例えば、高齢のヒト）は、MRSA感染症にかかるリスクが高い。注射薬の利用者、糖尿病の人、皮膚病変の患者、侵襲的な装置（例えば、血管

30

40

50

内カテーテル)を用いている患者、ならびに医療従事者および限定空間内で時間を過ごしている他の人(例えば、囚人、兵士、療養施設(nursing homes)等の長期的な医療施設の患者)においては、MRSA感染症に対する危険性がより高いことが観察されている。他の呼吸器、開いた創傷、静脈内カテーテル、および尿路もまた、感染の可能性がある部位ではあるが、*S. aureus*は、前鼻孔(鼻孔)に最も頻繁にコロニーを形成する。市中感染型MRSA感染の多くは、皮膚および軟組織に集中している。MRSAの初期の症状には、発熱および発疹を伴い得るにきび、クモに咬まれた跡またはおでき(boils)に似た赤い瘤;後に膿んだおできへと発達し得る瘤が包含される。市中感染型MRSA感染の一般的な兆候は、壊疽性筋膜炎もしくは化膿性筋炎等の皮膚感染、壊疽性肺炎、感染性心内膜炎、骨感染症または間接感染症である。MRSAには、当該株(例えば、PVL、PSM)によってもたらされる毒素に起因し得る、敗血症および毒素性ショック症候群を引き起こすものもある。MRSAは蜂巣炎を引き起こし得る。上記の株のMRSAもしくは公知の株のMRSA、MRSAと診断された患者、MRSAの症状、MRSAのリスクがある患者の集団、および/またはMRSAに関連した疾患は、本明細書に記載されている組成物を用いて処置され得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、MRSAの症状の1つ以上の発症もしくは発達を予防する、または、当該症状(例えば、本明細書に記載されている症状)の1つ以上の期間および/もしくは重症度を低減させる。

10

【0132】

本明細書に記載されている組成物は、好ましくない細菌を殺すため、または当該細菌にダメージを与えるための殺菌剤として使用され得る。例えば、本明細書に記載されている組成物は、予防的に細菌の感染を防止するために、もしくは定着した細菌の感染を治療するために使用され得る。または上記組成物は、感染しやすい被験体が有する領域、または細菌が増殖しやすい部位である体の領域(例えば、歯茎、開放創、床擦れ、ならびに膣または股間の領域)に対して局所的に投与され得る。

20

【0133】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の増殖および/または細菌の生存を、約0.1 log、0.2 log、0.25 log、0.3 log、0.4 log、0.5 log、0.6 log、0.7 log、0.75 log、0.8 log、0.9 log、1 log、1.25 log、1.5 log、1.75 log、2 log、2.25 log、2.5 log、2.75 log、3 log、3.25 log、3.5 log、3.75 log、4 log、4.5 log、5 log、5.5 log、6 log、6.5 log、7 log、7.5 log、8 log、8.5 log、9 log、9.5 log、10 log、10.5 log、11 log、11.5 log、12 log、12.5 log、13 log、13.5 log、14 log、14.5 log、または15 logコロニー形成単位(CFU)/mLを上回る値で減少させる。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の増殖および/または細菌の生存を、約0.2 log~15 log、0.2 log~10 log、0.2 log~5 log、0.5 log~15 log、0.5 log~10 log、0.5 log~5 log、0.5 log~3 log、1 log~15 log、1 log~12 log、1 log~10 log、1 log~7 log、1 log~5 log、1 log~3 log、1.5 log~5 log、2 log~15 log、2 log~10 log、2 log~5 log、3 log~15 log、3 log~10 log、3 log~5 log、4 log~10 log、2 log~8 log、3 log~8 log、4 log~8 log、2 log~7 log、3 log~7 log、2 log~6 logコロニー形成単位(CFU)/mL、および上記値の間のいずれかの値で減少させる。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の増殖および/または細菌の生存を、 1×10^{10} 、 0.5×10^{11} 、 1×10^{11} 、 1.5×10^{11} 、 2×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 7×10^{11} 、 1×10^{12}

30

40

50

、 1.5×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 5×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1.5×10^{13} 、もしくは 2×10^{13} (CFU) / mL、または上記値の間のいずれかの値以上の値で減少させる。いくつかの実施形態において、細菌の増殖および／または生存における上記減少は、s N A G ナノファイバー組成物の1回の適用／投薬または複数回の適用／投薬による細菌の感染の治療後、約30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、15時間、18時間、20時間、22時間、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間、1日、2日、3日、4日、5日、7日、10日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月または2か月未満で達成される。

【0134】

10

1つの実施形態において、s N A G ナノファイバー組成物を用いて治療される感染症は、ウイルス感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、またはイースト菌感染症ではない。

【0135】

細菌の感染に関連した種々の疾患または病状は、本明細書に記載されているs N A G ナノファイバー組成物を用いて治療および／または予防され得る（例えば、下記のセクション5.4.2参照）。1つの実施形態において、既存の細菌の感染、または細菌の感染に関連した疾患の治療方法が検討される。

【0136】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、創傷を治療するために使用され得る（下記のセクション5.4.1参照）。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌に感染した創傷を治療するために使用される。他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、創傷における細菌の感染を予防するために使用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、創傷感染に関連することが知られている細菌を処置するために使用され、特にStaphylococcus aureus / MRSA, Streptococcus pyogenes, Enterococci および／または Pseudomonas aeruginosaの感染、ならびに上記感染に関連した疾患を治療するために使用される。

20

【0137】

他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、創傷を治療するためには使用されない。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、慢性的な創傷を治療するためには使用されない。別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、熱傷創を治療するためには使用されない。さらに別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、外科創傷を治療するためには使用されない。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、慢性的な創傷、熱傷創および外科創傷を治療するためには使用されない。別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、創傷および／またはやけどを治療するためには使用されない。さらに別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、感染していない創傷を治療するためには使用されない。

30

【0138】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌に感染した創傷を治療するためには使用されない。別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、創傷に関連した細菌の感染、または創傷によって引き起こされる細菌の感染を治療するためには使用されない。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、Staphylococcus aureus / MRSA, Streptococcus pyogenes, Enterococci および／または Pseudomonas aeruginosa等の、創傷感染に関連することが知られている細菌を処置するためには使用されない。

40

【0139】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、創傷とは関連しない種々の細菌の感染、ならびに細菌の感染によって引き起こされる疾患、もしくは細菌の感染に関連した疾患を治療および／または予防するために使用され得る（下記のセクショ

50

ン 5 . 4 . 2 参照)。

【 0 1 4 0 】

特定の実施形態において、細菌の感染に関連した疾患の治療には、疾患を治療するため、または有益な効果もしくは治療効果を得るために、本明細書に記載されている組成物の 1 つを被験体または被験体の集団に投与することが含まれる。特定の実施形態において、上記治療は、被験体または被験体の集団において以下の効果のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ以上を達成する：(i) 細菌の感染に関連した疾患または症状の重症度の減少または改善；(i i) 細菌の感染に関連した疾患または症状の期間の減少；(i i i) 細菌の感染に関連した疾患または症状の進行の防止；(i v) 細菌の感染に関連した疾患または症状の後退；(v) 細菌の感染に関連した症状の発達または発生の防止；(v i) 細菌の感染に関連した症状の再発の防止；(v i i) 被験体または被験体の集団から別の被験体または被験体の集団への疾患の蔓延の予防または減少；(v i i i) 疾患に関連した臓器不全の減少；(i x) 入院の発生の減少；(x) 入院期間の減少；(x i) 生存の増加；(x i i) 疾患の除去；(x i i i) 別の治療法の予防効果または治療効果の促進または改善；(x i v) 当該分野にてよく知られた方法（例えばアンケート）によって評価された生活の質の改善；(x v) 疾患の症状の数の減少；および / または (x v i) 死亡の減少。いくつかの実施形態において、治療には、本明細書に記載されている組成物を用いたいずれかの治療法が含まれる。

10

【 0 1 4 1 】

いくつかの実施形態において、細菌の感染の治療には、細菌の感染または細菌の感染の症状を治療するために、本明細書に記載されている組成物の 1 つを被験体または被験体の集団に投与することが含まれる。特定の実施形態において、上記治療は、被験体または被験体の集団において以下の効果のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ以上を達成する：(i) 細菌の感染の解消；(i i) 細菌の感染に関連した 1 つ以上の症状の根絶；(i i i) 細菌の感染を解消するために必要な時間の減少；(i v) 細菌の感染、および / または細菌の感染に関連した 1 つ以上の症状の重症度の減少または改善；(v) 細菌の感染、および / または細菌の感染に関連した 1 つ以上の症状の期間の減少；(v i) 細菌の耐性株（単数または複数）の発生の防止もしくは遅延、または発生した細菌の耐性株の数の減少；(v i i) 細菌の感染に関連した 1 つ以上の症状の再発の防止；(v i i i) 細菌の細胞集団の減少または除去（当該分野にて公知の方法、または本明細書に記載されている方法の 1 つによる C F U / m L または対数減少によって測定される、例えば、患者の生物学的サンプルにおける細菌の数の減少等）；(i x) 被験体の入院の減少；(x) 入院期間の減少；(x i) 被験体の生存の増加；(x i i) 別の治療法の治療効果の促進または改善；(x i i i) 死亡の減少；(x i v) ある被験体から別の被験体へ、またはある器官もしくは組織から別の器官もしくは組織への細菌の蔓延の減少または排除；(x v) 細菌の数の増加の防止；(x v i) 細菌の感染に関連した 1 つ以上の症状の発達または発生の防止；(x v i i) 細菌の感染に関連した症状の数の減少；(x v i i i) 細菌毒素、または細菌の感染に関連した毒素の生産の阻害または減少；(x i x) 細菌の感染に関連した炎症の安定化または減少；(x x) 細菌の感染に関連した臓器不全、または細菌の感染に関連した疾患に関連した臓器不全の減少；および / または (x x i) 当該分野にてよく知られた方法（例えばアンケート）によって評価された生活の質の改善。

20

30

40

【 0 1 4 2 】

特定の実施形態において、被験体に対する本明細書に記載されている組成物の投与は、結果として以下のうちの 1 つ以上をもたらす：(i) 1 つ以上のデフェンシンタンパク質および / またはデフェンシン様タンパク質の発現の誘導；(i i) 1 つ以上の T o l l 様レセプターの発現の誘導；および / または (i i i) 細菌の感染、または細菌の感染に関連した 1 つ以上の症状の解消または減少に有益な 1 つ以上のタンパク質の発現の誘導。

【 0 1 4 3 】

特定の実施形態において、細菌の感染の予防には、以下の効果のうちの 1 つ以上を達成するために、被験体または被験体の集団に対して本明細書に記載されている組成物の 1 つ

50

を投与することが含まれる：(i) 細菌の感染、または細菌の感染に関連した症状の発達または発生の阻害；および / または (i i) 細菌の感染、または細菌の感染に関連した症状の再発の阻害。

【 0 1 4 4 】

他の実施形態において、細菌の感染の予防には、細菌の感染に関連した疾患を予防するために、被験体または被験体の集団に対して本明細書に記載されている組成物の 1 つを投与することが含まれる。特定の実施形態において、上記予防は、被験体または被験体の集団において以下の効果のうちの 1 つ以上を達成する：(i) 細菌の感染に関連した疾患、またはその症状の発達または発生の阻害；および / または (i i) 細菌の感染に関連した疾患、または細菌の感染に関連した症状の再発の阻害。

10

【 0 1 4 5 】

〔 5 . 4 . 1 創傷における細菌の感染の治療または予防 〕

特定の実施形態において、本明細書に記載されている s N A G ナノファイバー組成物は、体のいずれかの組織に影響を与える種々の細菌に感染した創傷を治療するため、または、細菌に感染する危険性がある創傷の感染を予防するために有用であり得る。

【 0 1 4 6 】

創傷には、開放および閉鎖の 2 種類がある。開放創は、創傷の原因となった対象に従って分類される。例えば、切開 (incisions) または切創 (外科創傷を包含する) は、ナイフ、剃刀またはガラスの破片等のきれいな、刃の鋭い物体に起因するものである。裂傷は、硬組織上に存在する軟組織に対する鈍い衝撃 (例えば、頭がい骨上の皮膚の裂傷) 、または出産等による皮膚および他の組織の引き裂きに起因する不規則な創傷である。擦過傷 (abrasions) またはかすり傷 (grazes) は、表在性の創傷であって、皮膚の最も上の層 (表皮) が削られるものである。刺創 (puncture wounds) は、釘または針等の皮膚を突き刺す物体に起因する。穿通創は、ナイフ等の物体が体に入ることに起因する。銃創は、銃弾または同様の発射体が体の中へ入り込むこと (例えば、射入創) 、および / または体の外へ出ていくこと (例えば、射出創) に起因する。医学的な文脈においては、刺創 (stab wounds) および銃創は全て、開放創であると考えられる。開放創はまた、熱傷、化学的損傷、または電氣的損傷によって引き起こされたやけども包含している。閉鎖創には、打撲傷 (より一般的には痣として知られており、皮膚の下にダメージを与える、鈍器で殴られた傷に起因する) 、血腫 (hematoma) (血腫 (blood tumor) と呼ばれ、血管へのダメージによって皮膚の下に血液が集められることに起因する) 、および挫傷 (crushing injuries) (多量または極端な量の力が長時間加えられることに起因する) が包含される。

20

30

【 0 1 4 7 】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌に感染した開放創を治療するため、または、開放創における細菌の感染を予防するために使用される。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、銃創、刺創および / または穿通創における細菌の感染を治療または予防するために使用され得る。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、手術後の細菌の感染、手術部位の細菌の感染、カテーテルに関連した細菌の感染、または血液透析に関連した細菌の感染を治療または予防するために使用され得る。さらに別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、開放創、銃創、刺創および / または穿通創における細菌の感染を治療または予防するためには使用されない。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、手術後の細菌の感染、手術部位の細菌の感染、カテーテルに関連した細菌の感染、または血液透析に関連した細菌の感染を治療または予防するためには使用されない。

40

【 0 1 4 8 】

いくつかの実施形態において、上記創傷は、慢性的な創傷である。慢性的な創傷は、適切に治癒しなかった創傷であり、当該創傷には、外科創傷 (例えば、皮膚移植のドナーとなった部位) 、皮膚潰瘍 (例えば、糖尿病性潰瘍、静脈うっ血性潰瘍、下腿潰瘍、動脈不全潰瘍、または褥瘡) 、または熱傷創が包含される。1 つの実施形態において、本明細書

50

に記載されている組成物は、慢性的な創傷における感染（例えば、糖尿病性潰瘍、静脈うっ血性潰瘍、下腿潰瘍、動脈不全潰瘍、褥瘡、外科創傷、またはやけどに関連した感染）を治療または予防するために使用される。さらに別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、慢性的な創傷における細菌の感染を治療または予防するためには使用されない（例えば、糖尿病性潰瘍、静脈うっ血性潰瘍、下腿潰瘍、動脈不全潰瘍、褥瘡、外科創傷、またはやけどに関連した細菌の感染を予防するためには使用されない）。

【0149】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、院内における細菌の感染を治療または予防するために使用される。院内における細菌の感染のなかでも、外科創傷における細菌の感染が主流である；統計では、最大で全ての外科患者の8%であることが示されている。上記の種類の感染の直接的なコストは、1年あたり、およそ4.5億ドルである。院内で感染する細菌の多くは、抗生物質に対する耐性を発達させているため、抗生物質に基づかない治療が望ましい。本明細書に記載されているsNAGナノファイバーの院内の環境での利用は、上記コストの多くを負担し、抗生物質耐性の種の産生を顕著に減少させ得る。さらに別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、院内における細菌の感染（例えば、外科的な細菌の感染）を治療または予防するためには使用されない。

10

【0150】

1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、出血している創傷（例えば、出血している外傷）における細菌の感染を治療または予防するために使用される。

20

1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、銃創、刺創、穿通創または外科創傷における細菌の感染を治療または予防することを目的として、当該創傷を治療するために使用され得る。さらに別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、出血している創傷（例えば、出血している外傷）における細菌の感染を治療または予防するためには使用されない。

【0151】

本明細書に記載されている組成物は、皮膚の創傷（例えば、皮膚の表皮層および皮層に影響を与える創傷）ならびに角膜および上皮系列の器官における損傷における細菌の感染を治療または予防することを目的として、上記創傷における細菌の感染を治療または予防するために有用であり得る。上記創傷は、切り傷、擦過傷、やけど、化学物質への曝露、外科的処置（例えば、外科的切開、皮膚移植）を包含する種々の外傷によって引き起こされ得る。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、眼の上皮層、支質層および内皮層に影響を与える創傷を包含する角膜および強膜の創傷における細菌の感染を治療または予防することを目的として、上記創傷を治療するために使用され得る。さらに別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、皮膚の創傷における細菌の感染を治療または予防するためには使用されない。

30

【0152】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染と診断された患者の創傷を治療するために使用され得る。本明細書に記載されている組成物が細菌に感染した創傷を治療するために使用される特定の実施形態において、創傷は、細菌性抗原の存在に対する試験またはアッセイによって、細菌に感染していると決定される。1つの実施形態において、患者の創傷における細菌の感染を検出するために、創傷の培養が行われる。さらに別の実施形態において、創傷は、細菌の感染の1つ以上の症状の存在の結果、感染していると決定される。

40

【0153】

他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、患者が例えば以下の細菌の感染の症状の1つ以上を示している場合に、患者の創傷を治療するために使用され得る：創傷の治癒が遅い；創傷の部位における熱、赤みおよび/もしくは腫れ；創傷の部位における圧痛；創傷の部位における体液または膿の排出；ならびに/または熱。創傷における細菌の感染の症状としては、以下に限定されないが、限局性の紅斑、限局性の痛み、限

50

局性の熱、蜂巣炎、水腫、膿瘍、粘性があり、変色し、かつ化膿している状態であり得る分泌物、創傷治癒の遅延、創縁の中および／もしくは創縁上の両方の組織の変色、もろい（friable）、出血している肉芽組織、創傷部位に由来する異臭、包帯を交換した部位における予期せぬ痛みおよび／もしくは圧痛、リンパ管炎（すなわち、創傷に起因する赤い線であって、腫れあがって、圧痛のあるリンパ腺の患部からの排膿を引き起こす）、ならびに、創底における創傷のポケット形成（pocketing）／ブリッジ形成（bridging）に関連した創傷の崩壊（wound breakdown）（すなわち、創床全体にわたる肉芽組織の均一な広がりとは対照的に、創傷によって、創底における肉芽組織の細長い一片が発達する）が包含される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、上記症状の１つ以上の発生または発達を予防する、または、上記症状の１つ以上の期間および／もしくは重症度を減少させる。

10

【 0 1 5 4 】

１つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、創傷治癒、および、創傷における細菌の感染の治療のため、または創傷治癒、および、創傷における細菌の感染の予防のために使用され得る。１つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、創傷における細菌の感染を治療または予防すると同時に、創傷治癒を促進するために使用される。創傷治癒における s N A G ナノファイバー組成物の効果、および、創傷治癒への適用における s N A G ナノファイバーの利用のいくつかは、米国特許公開第2009/0117175号に記載されており、当該内容は、全て参照によって本明細書中に引用される（例えば、実施例 2 参照）。

20

【 0 1 5 5 】

〔 5 . 4 . 2 他の細菌の感染の治療または予防 〕

特定の実施形態において、本明細書に記載されている s N A G ナノファイバー組成物は、皮膚、胃腸管、呼吸器、尿路、生殖器官、血液、喉、耳、眼、洞（sinus）、または体の他のいずれかの器官もしくは組織における細菌の感染の治療および／または予防のために使用され得る。別の実施形態において、本明細書に記載されている s N A G ナノファイバー組成物は、細菌の感染に関連した、皮膚の病気、胃腸の病気、呼吸器の病気、および／または他のいずれかの器官もしくは組織の病気を治療および／または予防するために使用され得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている s N A G ナノファイバー組成物は、細菌の感染を治療または予防するために、患者の皮膚、口、耳、目、肛門または股間の領域に局所的に適用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、創傷の部位ではなく、かつ／または、創傷に関連していない、もしくは、創傷によって引き起こされたのではない、体の器官または組織における細菌の感染を治療および／または予防するために使用され得る。

30

【 0 1 5 6 】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている s N A G ナノファイバー組成物は、既存の細菌の感染を治療するために使用され得る。例えば、上記組成物は、試験またはアッセイ（例えば、本明細書に記載されている試験または当該分野にて公知の試験の１つ）によって細菌の感染と診断された被験体を治療するために使用され得る。または、上記組成物は、細菌の感染、または細菌の感染に関連した疾患の１つ以上の症状（例えば、当業者にとって公知、および／または本明細書に記載されている細菌の感染の１つ以上の症状（例えば、治療を行う医者または内科医によって、細菌の感染の症状であると決定される））を示している被験体を治療するために使用され得る。

40

【 0 1 5 7 】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌叢における不均衡に関連した病気、または異常もしくは変化した細菌叢に関連した病気を治療するために使用され得る。例えば、上記組成物は、皮膚の細菌叢がコントロールの被験体（例えば、皮膚の病気の症状を示していない被験体）と異なっている患者の皮膚の病気を治療するために使用され得る。他の実施形態において、上記組成物は、胃腸の細菌叢（または他のいずれかの組織もしくは器官の微生物相）がコントロールの被験体（例えば、胃腸の病気の症

50

状を示していない被験体)と異なっている患者の胃腸の病気(または他のいずれかの組織もしくは器官の病気)を治療するために使用され得る。

【0158】

他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染に関連していると知られている、または細菌の感染によって悪化すると知られているいずれかの疾患(例えば、にきび)を治療するために使用され得る。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、*P. aeruginosa*に感染した嚢胞性線維症患者を治療するために使用され得る。

【0159】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌によって分泌または排出される毒素に対して効果的である。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌毒素(および/または細菌毒素によって引き起こされる病気もしくは症状)を阻害する/減少させるために使用され得る。細菌毒素の例としては、例えば、*Bacillus anthracis*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheria*, *Pseudomonas aeruginosa*; 内毒素および/または細胞溶解素が挙げられる。いくつかのデフェンシンは、*Bacillus anthracis*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheria*, *Pseudomonas aeruginosa*によって生産される毒素、および細胞溶解素(グラム陽性細菌によって生産され、赤血球を溶解する内毒素)を包含する細菌毒素を阻害することができる。上記デフェンシンの機能を考慮すれば、結果としてデフェンシンの発現および分泌をもたらす経路の活性化は、抗生物質に依存しない細菌の感染の解消を可能にし、細菌の耐性の発生を回避し得る。

【0160】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、皮膚における1つ以上の細菌の感染、または細菌の感染に関連した皮膚の疾患を治療および/または予防するために使用され得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、限局性の皮膚感染および/またはびまん性の皮膚感染を治療するために使用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、表皮、真皮、および/または皮下組織(下皮)に影響を与える、皮膚感染、または細菌の感染に関連した皮膚の疾患を治療または予防するために使用される。上記実施形態のいくつかにおいて、感染している皮膚の層には、表皮の1つ以上の層(すなわち、基底層、有棘層、顆粒層、透明層、および角質層)、真皮の1つ以上の種類の組織(すなわち、コラーゲン、弾性組織および細網繊維)、真皮の1つ以上の層(すなわち、上層、乳頭層、および下部の網状層); および/または下皮の1つ以上の種類の組織(すなわち、脂肪、エラスチンおよび結合組織)が包含される。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、皮膚表面上の細菌の感染を治療または予防するために使用される。別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、皮膚に対する*Staphylococcus* (Staph)の感染および/または皮膚に対する*Streptococcus* (Strep)の感染を治療または予防するために使用される。さらに別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、皮膚に対する*Staphylococcus albus*および/または*Staphylococcus aureus*の感染を治療するために使用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、蜂巣炎、膿疱疹、毛嚢炎、紅色陰癬、癬、せつ腫、膿瘍、丹毒、および/または皮膚炭疽を治療または予防するために使用される。別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、蜂巣炎を治療または予防するために使用される。蜂巣炎は、深い真皮および皮下組織に影響を与え、通常、顔、腕および足に影響を与え、ほとんどの場合に、細菌の感染を引き起こす皮膚のひび割れに起因して起こる。蜂巣炎の症状には、以下の1つ以上が包含される: 皮膚のひび割れ周辺の皮膚の腫れ、痛み、圧痛、水疱の外見上の徴候、リンパ節の間の赤い線、熱、および悪寒。別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、毛嚢の皮膚における細菌の感染(例えば、毛嚢炎)を治療または予防するために使用される。毛嚢炎の症状には、腫れ、毛髪周辺の膿疱、硬性小結節、および痛みが包含される。別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、にきびを治療または予

防するために使用される。にきびの出現は高い頻度で細菌の感染の症状である。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染に関連した皮膚炎または細菌の感染によって引き起こされた皮膚炎を治療または予防するために使用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、上記の症状の1つ以上の発生もしくは発達を予防する、または上記症状の1つ以上の期間および/または重症度を減少させる。

【0161】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、1つ以上の腸/消化管の細菌の感染、または細菌の感染に関連した胃腸疾患を治療または予防するために使用され得る。腸における細菌の感染の一般的な形態には、salmonella, shigella, E. coli, Clostridium, Staphylococcus, Listeria, および Yersiniaが包含される。上記細菌は、下痢、ならびに、胃および腸の炎症（胃腸炎としても知られている）を引き起こす。腸における細菌の感染の症状としては、以下に限定されないが、腹部の痙攣および痛み、血便、食欲不振、時に嘔吐を伴う吐き気、熱、ならびに、下痢が包含される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、しばしば細菌の感染に関連している食中毒の1つ以上の症状を示している患者を治療するために使用される。

【0162】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、Staphの感染（例えば、Staphylococcus aureusの感染）に関連した疾患を治療するために使用され得る。上記実施形態のいくつかにおいて、上記疾患は、皮膚、鼻、口、および/または生殖器の領域におけるStaphの感染である。いくつかの実施形態において、上記疾患は、肺炎、髄膜炎、心内膜炎、毒素性ショック症候群、および/または敗血症である。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、1つ以上の抗生物質に対する耐性を有するStaph細菌（例えば、メチシリン耐性Staphylococcus aureus（MRSA））を処置するために使用され得る。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、Staphの感染であると診断された被験体、またはStaphの感染の1つ以上の症状（例えば、以下のうちの1つ以上の存在：赤い小さな瘤、赤く堅い瘤、膿んだ瘤もしくは膿瘍、おでき、眼の麦粒腫、水疱および/もしくはかさぶたのある赤い皮膚（例えば、鼻および口の周辺のかさぶたのある赤い皮膚）、または毒素性ショック症候群（単数または複数）の症状）を示している被験体に対して投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、上記の症状の1つ以上の発生もしくは発達を予防する、または上記症状の1つ以上の期間および/または重症度を減少させる。

【0163】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染に関連した風邪を治療または予防するために使用され得る。例えば、本明細書に記載されている組成物は、標準的な鎮痛剤の使用にもかかわらず持続する風邪を治療または予防するために使用され得る。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、洞、耳または喉における細菌の感染を治療または予防するために使用され得る。上記細菌の感染の症状としては、限局性の痛みおよび腫れが包含される。洞における細菌の感染は、鼻汁、ならびに、顔もしくは顔の一部における激痛を引き起こし得る。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、連鎖球菌性咽頭炎（Streptococcus pyogenes）を治療するために使用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、上記の症状の1つ以上の発生もしくは発達を予防する、または上記症状の1つ以上の期間および/または重症度を減少させる。

【0164】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、生殖器、尿路もしくは肛門における細菌の感染、または細菌の感染に関連した尿路または生殖器の疾患を治療または予防するために使用され得る。上記実施形態のいくつかにおいて、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染に関連した性感染症を治療するために使用される。上記感染の症状としては、以下に限定されないが、痛みを伴う尿排泄、濁った排出物、およ

び／または性交時の痛みが包含される。上記実施形態のいくつかにおいて、本明細書に記載されている組成物は、梅毒、淋病、クラミジア感染症、およびトリコモナス症のうちの1つ以上を治療または予防するために使用される。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、クラミジア感染症を治療するために使用される。別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、淋病を治療するために使用される。淋病の症状としては、限局性の骨盤の痛み、痒みおよび炎症、痛みを伴う尿排泄、濃い黄色または緑色の排出物、月経期の出血が包含される。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌性膣炎の感染を治療または予防するために使用される。細菌性膣炎の症状としては、膣排泄物、臭気、膣の痒み、および腹部の痛みが包含される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、上記の症状の1つ以上の発生もしくは発達を予防する、または上記症状の1つ以上の期間および／または重症度を減少させる。

10

【0165】

他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、呼吸器感染（例えば、肺における細菌の感染）、または細菌の感染に関連した呼吸器疾患を治療または予防するために使用され得る。いくつかの実施形態において、上記組成物は、上気道感染症を治療または予防するために使用される。1つの実施形態において、上記組成物は、結核を治療または予防するために使用される。結核は、結核菌によって引き起こされ、くしゃみまたは唾液によって人から人へ蔓延する感染性の強い疾患である。従って、本明細書に記載されている組成物は、結核であると診断された被験体または結核の症状を示している被験体だけではなく、当該被験体に接触した個体（例えば、家族のメンバー、介護者または医療関係者）をも治療するために使用され得る。結核の症状としては、喀血、過度の体重減少、倦怠感、食欲不振および持続性発熱が包含される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、上記の症状の1つ以上の発生もしくは発達を予防する、または上記症状の1つ以上の期間および／または重症度を減少させる。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、肺炎および／または*Streptococcus pneumoniae*の感染を治療するために使用される。別の実施形態において、上記組成物は、気管支炎を治療するために使用される。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、*Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*および／または*Haemophilus influenzae*を処置するために使用される。

20

30

【0166】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、粘膜表面（例えば、口腔粘膜）における細菌の感染、または細菌の感染に関連した粘膜表面の疾患／病気を治療するために使用される。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、口腔における細菌の感染を治療または予防するために使用される。例えば、上記組成物は、歯肉炎、カリエス、および／または虫歯等の口における細菌の感染に関連した病気を治療または予防するために使用され得る。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、口腔衛生製品に使用され得る。

【0167】

1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、耳における細菌の感染（例えば、中耳における感染）、または当該感染に関連した疾患を治療するために使用される。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染に起因する中耳炎を治療するために使用される。

40

【0168】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、埋め込まれた人口器官（例えば、心臓弁およびカテーテル）における細菌の感染を治療または予防するために使用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染を予防することを目的として、動物による咬傷（例えば、ネコまたはイヌによる咬傷）を治療するために使用される。

【0169】

50

本明細書に記載されている組成物は、以下を包含する（これらに限定されるわけではない）細菌の感染に関連した種々の疾患を治療または予防するために使用され得る：癩病（ハンセン病）、コレラ、炭疽（例えば、皮膚炭疽、肺炭疽、胃腸炭疽）、百日咳（pertussis）、鼠蹊部肉芽腫、細菌性膣炎、淋病、新生児眼炎、敗血症性関節炎、梅毒、先天性梅毒、百日咳（whooping cough）、マイコバクテリウム アビウムコンプレックス、類鼻疽、レプトスピラ症、破傷風、猩紅熱、連鎖球菌感染、A群溶血性連鎖球菌による疾患、連鎖球菌による毒素性ショック症候群、髄膜炎菌性疾患、菌血、連鎖球菌性咽頭炎（strept throat）、腸チフス型サルモネラ症、赤痢、大腸炎、胃腸炎および全腸炎を伴うサルモネラ症、細菌性赤痢（bacillary dysentery）、アメーバ赤痢、細菌性赤痢（shigellosis）、ジフテリア、皮膚ジフテリア、呼吸器ジフテリア、レジオネラ症、結核、潜伏結核、ヘモフィルスインフルエンザB、腸チフス、腸炎ピブリオ、ピブリオ バルニフィカス、ピブリオ菌、エルシニア症、ウィップル病、急性虫垂炎、髄膜炎、脳炎、膿痂疹、蜂巣炎、癰、おでき、にきび、敗血症（sepsis）、敗血症（septicemia）、肺炎、マイコプラズマ肺炎、髄膜炎菌性疾患、髄膜炎、ウォーターハウス・フリーデリクセン症候群、ブトマイン中毒、ブドウ球菌食中毒、毒素性ショック症候群、壊死性肺炎、敗血症（septicemia）、急性感染性心内膜炎、汗腺における感染（例えば、汗腺膿瘍）、ダニによって媒介される細菌性疾患（例えば、ロッキー山発疹熱、ライム病）、ボツリヌス中毒症、ペスト（例えば、腺ペスト、肺ペスト）、野兔病、ブルセラ症、急性腸炎、非淋菌性尿道炎、鼠径リンパ肉芽腫、トラコーマ、新生児の封入体結膜炎、オウム病、偽膜性大腸炎、ガス壊疽、急性食中毒、下痢、旅行者下痢、乳児の下痢、出血性大腸炎、溶血性尿毒症症候群、気管支炎、リステリア症、嫌気性蜂巣炎、消化性潰瘍、ポンティアック熱、膀胱炎、子宮内膜炎、中耳炎、副鼻腔炎、連鎖球菌咽頭炎（streptococcal pharyngitis）、リウマチ熱、丹毒、産褥熱、壊疽性筋膜炎、院内感染、シュードモナスの感染、ならびに／または猫ひっかき病。

10

20

【0170】

〔5.5 患者の集団〕

特定の実施形態において、本明細書に記載されているs N A Gナノファイバー組成物は、ナイーブな被験体（すなわち、細菌に感染していない被験体）に対して投与され得る。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染にかかる危険性があるナイーブな被験体に対して投与される。

30

【0171】

1つの実施形態において、本明細書に記載されているs N A Gナノファイバー組成物は、細菌の感染であると診断されている患者に対して投与される。別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染の1つ以上の症状を示している患者に対して投与され得る。

【0172】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染であると診断された患者に対して投与される。特定の実施形態において、患者は、本明細書に記載されている組成物を投与される前に、細菌の感染であると診断される。例えば、本明細書に記載されている組成物は、患者から採取された生物学的サンプルにおいて細菌性抗原が検出された場合に、当該患者に対して投与される。1つの実施形態において、生物学的サンプルは、本明細書に記載されている組成物によって治療された部位もしくは領域、または本明細書に記載されている組成物が投与される領域から得られる。1つの実施形態においては、細菌の感染を検出することを目的として、感染の疑いがある部位から細胞または膿を採集するために、綿棒が使用される。別の実施形態においては、細菌の感染を検出するために、感染の疑いがある部位から体液が吸引される。さらに別の実施形態においては、細菌の感染を検出するために、組織の生検が行われる。感染の疑いがある部位が創傷である実施形態においては、細菌の感染を検出するために、創傷の培養が行われる。別の実施形態において、生物学的サンプルは、患者の血液、尿、唾液または便から得られる。いくつかの実施形態において、細菌の感染を検出するために、血液または尿検査が行われ得る

40

50

(例えば、細菌の感染が、血液または他の組織／器官に蔓延している疑いがある場合)。いくつかの実施形態において、上記採集されたサンプル(例えば、細胞、組織または体液)は、1種以上の細菌の存在について、PCR等のDNA検出法を用いて試験される。他の実施形態においては、細菌の感染を検査室で診断するために、免疫蛍光分析、血清学的検査、培養(例えば、血液寒天培養)、または当該分野にて公知および／もしくは実施されている他のいずれかの試験が利用され得る。

【0173】

他の特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染に関連した疾患であると診断された患者、または当該疾患の1つ以上の症状を示している患者に対して投与される。特定の実施形態において、患者は、本明細書に記載されている組成物を投与される前に、細菌の感染に関連した疾患であると診断されるか、または細菌の感染に関連した疾患の1つ以上の症状を示している。細菌の感染に関連した疾患は、患者の症状の評価、および／または患者の生物学的サンプルにおける細菌性抗原の検出(例えば上述したような)を包含する、当業者に知られたいずれかの方法によって診断され得る。1つの実施例において、本明細書に記載されている組成物は、治療を行う内科医または別の医療専門家によって、細菌の感染に関連した疾患であると診断された患者に対して投与され得る。別の実施例において、患者は、細菌の感染に関連した疾患の1つ以上の症状の検出において、本明細書に記載されている組成物を使用し得る。

10

【0174】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、例えば、以下の細菌による感染であると診断されている患者に対して投与される：*Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumonia*, *Chlamydia trachomatis*, *Clamidophila psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Pneumocystis jiroveci*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibria cholerae*, *Yersinia pestis*、ならびに／または、本明細書に記載されている、もしくは当該分野にて公知の他のいずれかの細菌の感染。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、MRSAまたは*Pseudomonas aeruginosa*による感染であると診断されている患者に対して投与される。

20

30

【0175】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、例えば以下の細菌の感染に関連した疾患であると診断されている患者に対して投与される：癩病(ハンセン病)、コレラ、炭疽(例えば、皮膚炭疽、肺炭疽、胃腸炭疽)、百日咳(*pertussis*)、鼠蹊部肉芽腫、細菌性膣炎、淋病、新生児眼炎、敗血症性関節炎、梅毒、先天性梅毒、百日咳(*whooping cough*)、マイコバクテリウム アビウムコンプレックス、類鼻疽、レプトスピラ症、破傷風、猩紅熱、連鎖球菌感染、A群溶血性連鎖球菌による疾患、連鎖球菌による毒素性ショック症候群、髄膜炎菌性疾患、菌血、連鎖球菌性咽頭炎(*strep throat*)、腸チフス型サルモネラ症、赤痢、大腸炎、胃腸炎および全腸炎を伴うサルモネラ症、細菌性赤痢(*bacillary dysentery*)、アメーバ赤痢、細菌性赤痢(*shigellosis*)、ジフテリア、皮膚ジフテリア、呼吸器ジフテリア、レジオネラ症、結核、潜伏結核、ヘモフィルス インフルエンザ B、腸チフス、腸炎ビブリオ、ビブリオ バルニフィカス、ビブリオ菌、

40

50

エルシニア症、ウィッブル病、急性虫垂炎、髄膜炎、脳炎、膿痂疹、蜂巣炎、癰、おでき、にきび、敗血症（sepsis）、敗血症（septicemia）、肺炎、マイコプラズマ肺炎、髄膜炎菌性疾患、髄膜炎、ウォーターハウス・フリーデリクセン症候群、ブトマイン中毒、ブドウ球菌食中毒、毒素性ショック症候群、壊死性肺炎、敗血症（septicemia）、急性感染性心内膜炎、汗腺における感染（例えば、汗腺膿瘍）、ダニによって媒介される細菌性疾患（例えば、ロッキー山発疹熱、ライム病）、ボツリヌス中毒症、ペスト（例えば、腺ペスト、肺ペスト）、野兔病、ブルセラ症、急性腸炎、非淋菌性尿道炎、鼠径リンパ肉芽腫、トラコーマ、新生児の封入体結膜炎、オウム病、偽膜性大腸炎、ガス壊疽、急性食中毒、下痢、旅行者下痢、乳児の下痢、出血性大腸炎、溶血性尿毒症症候群、気管支炎、リステリア症、嫌気性蜂巣炎、消化性潰瘍、ボンティアック熱、膀胱炎、子宮内膜炎、中耳炎、副鼻腔炎、連鎖球菌咽頭炎（streptococcal pharyngitis）、リウマチ熱、丹毒、産褥熱、壊疽性筋膜炎、院内感染、シュードモナスの感染、ならびにノミまたは猫ひっかき病。

【0176】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、感染の症状が現れる前、または感染の症状が重大になる前（例えば、患者が治療または入院を必要とする前）に、細菌に感染している患者に対して投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、疾患の症状が現れた後、または疾患の症状が重大になった後（例えば、患者が治療または入院を必要とした後）に、疾患にかかっている患者に対して投与される。

【0177】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、動物である。特定の実施形態において、上記動物は鳥である。特定の実施形態において、上記動物はイヌ科である。特定の実施形態において、上記動物はネコ科である。特定の実施形態において、上記動物はウマである。特定の実施形態において、上記動物はウシである。特定の実施形態において、上記動物は哺乳類であり、例えば、ウマ、ブタ、マウス、または霊長類であり、好ましくはヒトである。いくつかの実施形態において、上記動物は、ペットまたは家畜である。

【0178】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、ヒトの成人である。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、50歳を超えているヒトの成人である。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、高齢のヒト被験体である。

【0179】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、ヒトの早産児である。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、ヒトの幼児である。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、ヒトの子供である。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、ヒトの乳児である。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、6か月未満の乳児ではない。特定の実施形態において、本明細書に記載されている投与される被験体は、2歳以下である。

【0180】

さらに他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染を発現させる（developing）危険性がある（例えば、危険性が高い）患者に対して投与され得る。細菌の感染を発達させる危険性が高い患者としては、以下に限定されないが、高齢者（例えば、高齢のヒト）および免疫不全者が包含される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、限定されないが例えば以下の、細菌の感染を発現させる危険性がある患者に対して投与される：免疫抑制患者（例えば、癌治療または移植処置の結果として）、ヒトの子供、ヒトの早産児、高齢のヒト、糖尿病の人、癌であると診断された人、従来の一連の抗生物質を用いて治療されている患者、手術を経験している患者

、および／または創傷を有する患者。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染を発現させる危険性がある患者に対して予防的に投与され、例えば、年齢、栄養不良状態、疾患、化学療法に起因する免疫不全の患者、従来の一連の抗生物質を用いて治療されている患者、または創傷（例えば、開放創）を有する患者に対して投与される。他の実施形態において、細菌の感染を発現させる危険性がある患者は、H I V / A I D S 患者、癌患者、移植処置を経験している患者、喘息（例えば、重度の喘息）の患者、薬物の使用者、皮膚病変の患者、侵襲的な装置（例えば、血管内カテーテル）を用いている患者、ならびに医療従事者および限定された施設内で時間を過ごしている患者（例えば、囚人、兵士、療養施設等の長期的な医療施設の患者等）である。本明細書に記載されている組成物を投与される患者はまた、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、気腫、鼻炎、気管支炎、喉頭炎、扁桃炎、および／または嚢胞性線維症の患者であり得る。

10

【0181】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、ウイルス感染症（例えば、H I V / A I D S）、真菌感染症、またはイースト菌感染症であると診断されていない患者に対して投与される。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、以下の患者のグループのうちの1つ以上に属していない患者に対して投与される：免疫不全の患者、癌患者、H I V / A I D S 患者、喘息の患者、移植処置を経験している患者、手術を経験している患者、および／または創傷を有する患者。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される患者は、創傷を有していない（例えば、慢性的な創傷、または開放創（例えば、手術または戦場での外傷に起因する））。

20

【0182】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、1つ以上のデフェンシンペプチドを発現しないか、もしくは低レベルで発現する被験体、または1つ以上のデフェンシンペプチドをコードする遺伝子（単数または複数）において変異／欠失を有する被験体である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、1つ以上の - デフェンシン（例えば、D E F A 1、D E F A 1 B、D E F A 3、D E F A 4、D E F A 5、D E F A 6）、1つ以上の - デフェンシン（例えば、D E F B 1、D E F B 2、D E F B 4、D E F B 1 0 3 A、D E F B 1 0 4 A、D E F B 1 0 5 B、D E F B 1 0 7 B、D E F B 1 0 8 B、D E F B 1 1 0、D E F B 1 1 2、D E F B 1 1 4、D E F B 1 1 8、D E F B 1 1 9、D E F B 1 2 3、D E F B 1 2 4、D E F B 1 2 5、D E F B 1 2 6、D E F B 1 2 7、D E F B 1 2 8、D E F B 1 2 9、D E F B 1 3 1、D E F B 1 3 6）、および／または1つ以上の - デフェンシン（例えば、D E F T 1 P）を発現しないか、または低レベルもしくは変化したレベルで発現する被験体である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、D E F A 1、D E F A 3、D E F A 4、D E F A 5、D E F B 1、D E F B 3、D E F B 1 0 3 A、D E F B 1 0 4 A、D E F B 1 0 8 B、D E F B 1 1 2、D E F B 1 1 4、D E F B 1 1 8、D E F B 1 1 9、D E F B 1 2 3、D E F B 1 2 4、D E F B 1 2 5、D E F B 1 2 6、D E F B 1 2 8、D E F B 1 2 9、および D E F B 1 3 1 のうちの1つ以上を発現しないか、または低レベルもしくは変化したレベルで発現する被験体である。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、1つ以上の T o l l レセプター（例えば、T L R 1、T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、T L R 1 0、T L R 1 1、および／または T L R 1 2）を発現しないか、または低レベルもしくは変化したレベルで発現する被験体である。さらに他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、I L - 1、C E A C A M 3、S P A G 1 1、S I G I R R（I L 1 様レセプター）、I R A K 1、I R A K 2、I R A K 4、T B K 1、T R A F 6 および I K K i のうちの1つ以上を発現しないか、または低レベルもしくは変化したレベルで発現する被験体である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物を投与される被験体は、I R A K 2、S I G I R R、T L R 1、T L R 2、T L R 4、T L R 7、T L R 8、T L R 1 0 および T R A F 6 のうちの1つ以上を発現

30

40

50

しないか、または低レベルもしくは変化したレベルで発現する被験体である。遺伝子の発現が低レベルであるとは、発現の通常のレベルに比べて低いレベル（例えば、1.25倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍を上回る倍率で低い）であることを指し、上記発現の通常のレベルとは、当業者によって、被験体が属する種において通常であると考えられる発現のレベル、および/または同じ種の被験体の大多数における発現のレベルである。遺伝子の発現が変化したレベルであるとは、発現の通常のレベルとは異なる（例えば、20%、25%、30%、50%、75%、100%、150%、200%、250%、300%を上回って）レベルであることを指し、上記発現の通常のレベルとは、当業者によって、被験体が属する種において通常であると考えられる発現のレベル、および/または同じ種の被験体の大多数における発現のレベルである。上記1つ以上のデフェンシン遺伝子の通常の発現とは、以下を指す：(i) 症状を示していない被験体、または治療される疾患もしくは感染であると診断されていない被験体において見られることが知られている平均的な発現のレベル；(ii) 症状を示していない被験体、または治療される疾患もしくは感染であると診断されていない被験体の3、5、10、20、25、50個体以上において検出された平均的な発現のレベル；(iii) 疾患または感染の発生の前に本明細書に記載されている組成物を投与される患者において検出された平均的な発現のレベル。

10

【0183】

〔5.6 sNAGナノファイバー組成物の投与方法〕

特定の実施形態において、本明細書には、細菌の感染、または細菌の感染に関連した疾患を治療または予防するための方法であって、上記治療の必要がある患者に対して、上記sNAGナノファイバーを含んでいる組成物が局所的に投与される方法が記載されている。いくつかの実施形態において、sNAGナノファイバー組成物は、細菌の感染または疾患の危険性が増加した組織または器官に対して局所的に適用される。

20

【0184】

いくつかの実施形態において、効果的な量のsNAGナノファイバー、またはsNAGナノファイバー組成物が、被験体に対して投与される。

【0185】

いくつかの実施形態において、上記sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、患者において細菌に感染している部位、または細菌の感染に関連した疾患によって影響を受けている部位に対して局所的に投与される。さらに他の実施形態において、上記sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、患者において細菌に感染している部位、もしくは細菌の感染に関連した疾患によって影響を受けている部位、ならびに当該部位の周辺に対して局所的に投与される。さらに他の実施形態において、上記sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、患者において細菌に感染している部位に近接して、または細菌の感染に関連した疾患によって影響を受けている部位に近接して局所的に適用される。さらに別の実施形態において、上記sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、細菌の感染の危険性が高い部位に対して局所的に投与される。

30

【0186】

本明細書に記載されているsNAGナノファイバー組成物は、当業者によく知られた多数の好適な局所的投与の手段のいずれかによって投与され得る。上記手段としては、以下に限定されないが、皮膚に対して局所的に、他のいずれかの体の表面（例えば、粘膜表面）に対して局所的に、吸入によって、鼻腔内に、経膣的に、直腸を経由して、口内に（buccally）、または舌下に投与する手段が包含される。局所的投与の方法は、治療または予防する疾患に応じて変更され得る。上記sNAGナノファイバー組成物は、様々な種類の局所的投与のために製剤化され得る。

40

【0187】

1つの実施形態において、sNAGナノファイバーを含んでいる組成物は、患者の皮膚に対して適用される。例えば、上記組成物は、皮膚における細菌の感染、または細菌の感染に関連した皮膚の疾患を治療および/または予防するために、患者の皮膚に対して局所

50

的に適用され得る。

【0188】

別の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、患者の粘膜表面に対して局所的に適用され得る。例えば、上記組成物は、口もしくは歯茎における細菌の感染、または細菌の感染に関連した口もしくは歯茎の疾患を治療および／または予防するために、口腔粘膜に対して局所的に適用され得る。

【0189】

いくつかの実施形態において、s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、患者の創傷に対して適用される。例えば、上記組成物は、創傷における細菌の感染、または創傷における細菌の感染に関連した疾患を治療および／または予防するために、患者の創傷の部位に対して直接的に、または創傷の部位に近接して局所的に適用され得る。上記実施形態の1つにおいて、上記創傷は細菌に感染した創傷であり、例えば、本明細書に記載されている方法の1つによって診断される。上記創傷は、本明細書に記載されている創傷の種類のいずれか1つであり得る。さらに他の実施形態において、s N A G ナノファイバーを含んでいる組成物は、患者の創傷に対して適用されないか、または患者の細菌に感染した創傷に対して適用されない。

10

【0190】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、患者の生殖器、泌尿器または肛門の表面／領域に対して局所的に適用され得る。例えば、上記組成物は、生殖器感染、尿路感染もしくは細菌の感染、または細菌の感染に関連した当該組織の疾患を治療および／または予防するために、生殖器、泌尿器または肛門の表面／領域に対して局所的に適用され得る。

20

【0191】

上記の局所的投与方法には、クリーム、軟膏、ゲル、溶液、膜、フィルム、スプレー、ペースト、粉末、または本明細書に記載されているか、もしくは当該分野にて公知の他のいずれかの剤形の形態のs N A G ナノファイバーの投与が包含され得る。上記s N A G ナノファイバーはまた、例えば、患者の皮膚における限局性の感染／病気を治療するために、包帯(a dressingまたはa bandage)に適用され得る。

【0192】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、患者の口腔および／または呼吸器系に対してスプレーとして適用され得る。例えば、口、鼻、歯茎、喉、もしくは肺における細菌の感染、または細菌の感染に関連した口、鼻、歯茎、喉、もしくは肺の疾患／病気を治療および／または予防するために、スプレーとして局所的に適用され得る。上記実施形態の1つにおいて、上記組成物は、吸入器として投与されるために製剤化され得る。

30

【0193】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、患者の直腸、膣または尿道において坐薬として適用され得る。例えば、消化管、尿路もしくは生殖器官における細菌の感染、または細菌の感染に関連した当該組織の疾患を治療および／または予防するために、坐薬として適用され得る。

40

【0194】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、外科手術の部位において適用され得る。例えば、上記組成物は、外科手術を受ける、または外科手術を受けている組織または器官の表面に対して、クリーム、軟膏、ゲル、膜、もしくは粉末として、または上記表面をコーティングするように適用され、散布され得る。1つの実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、外科的切開の部位、切除した組織の部位、または外科縫合(stitchesもしくはsutures)の部位において適用される。上記の本明細書に記載されている組成物の投与は、術後の感染を予防し得る。例えば、本明細書に記載されている組成物は、細菌の感染の危険性を高めると知られている外科手術の間または後に使用され得る。細菌の感染の危険性を高めると知られている外科手術には、腸切除、胃

50

腸手術、腎臓手術等が包含される。本明細書に記載されている組成物は、上記の、または他の外科手術のいずれかの部位において適用され得る。

【0195】

さらに他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、患者における細菌の感染を予防することを目的として、患者の中で使用するため、または患者に挿入するために、装置（例えば、口腔衛生製品、カテーテル、手術器具または別の製品）上にコーティングされ得る。

【0196】

いくつかの実施形態において、本明細書にて検討されている方法は、患者における細菌の感染の検出／診断を包含する工程を含んでいる。いくつかの実施形態において、検出／診断には、患者の生物学的サンプル中の1つ以上の細菌または細菌性抗原に対する試験またはアッセイが包含される。他の実施形態において、診断には、患者が、細菌の感染、または細菌の感染に関連した疾患の1つ以上の症状を有しているかどうかを評価する工程が包含される。

10

【0197】

本明細書に記載されている組成物は、徐放性を示し、かつ／または結果的に当該組成物の徐放をもたらす剤形にて投与され得る。いくつかの実施形態において、上記sNAGナノファイバーは、上記のセクション5.1に記載されているように時間とともに生物分解され、sNAGナノファイバーの当該特性は、本明細書に記載されている組成物の徐放を引き起こし得るか、または当該徐放に寄与し得る。さらに他の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、当該分野にて公知のいずれかの方法に使用することができる徐放性を示すように製剤化される。本明細書に記載されている組成物は、当該組成物を患者に対して投与した後、約6時間、12時間、18時間、24時間（1日）、2日、3日、5日、7日（1週間）、10日、14日（2週間）、3週間または4週間以上の期間にわたる徐放性を示す。

20

【0198】

検討される治療計画には、sNAGナノファイバー組成物（例えば、クリーム、膜または包帯）の1回の投与もしくは1回の適用、sNAGナノファイバー組成物の複数回の投与または複数回の適用が包含される。投与または適用は、毎時間、毎週、毎日または毎月行われ得る。例えば、sNAGナノファイバー組成物の投与は、1日に1回、1日に2回、1日に3回、1日に4回、1日に5回、3時間ごと、6時間ごと、12時間ごと、24時間ごと、48時間ごと、72時間ごと、1週間に1回、1週間に2回、1週間に3回、1日おき、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、または1か月に1回、行われてもよい。

30

【0199】

sNAGナノファイバー組成物は、1週間、2週間、3週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、9か月、1年、1.5年、2年、2.5年、3年、4年、5年、7年、10年以上の期間にわたって投与されてもよい。上記実施形態の1つにおいて、sNAGナノファイバー組成物は、上記治療期間において副作用を全く引き起こさないか、またはわずかな副作用を引き起こす。上記実施形態の1つにおいて、sNAGナノファイバー組成物は、その効果を失わないか、または上記治療に対する反応において細菌の耐性株の発生を引き起こさない。別の実施形態において、sNAGナノファイバー組成物は、炎症（例えば、中程度または重度の炎症）またはアレルギー（例えば、中程度または重度のアレルギー）を引き起こさない。

40

【0200】

組成物中のsNAGナノファイバーの濃度は、様々であり得る。一般的に、上記sNAGナノファイバーの効果的な量が使用される。効果的な量は、本明細書に記載されている効果のうちの1つ以上を達成するために十分な量であり、例えば、細菌の感染を減少させるため、もしくは除去するために効果的な量、または細菌の感染の1つ以上の症状を減少させるため、もしくは除去するために効果的な量であり得る。例えば、組成物は、患者に

50

対して投与するために好適な形態の組成物の投与量/適用量あたりに、約0.2~20 mg/cm²のs N A G ナノファイバーを含んでいてもよい。特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は、患者に対して投与するために好適な形態の組成物の投与量/適用量あたりに、約0.25~20 mg/cm²、約0.5~20 mg/cm²、約1~20 mg/cm²、約1~15 mg/cm²、約1~12 mg/cm²、約1~10 mg/cm²、約1~8 mg/cm²、約1~5 mg/cm²、約2~8 mg/cm²、または約2~6 mg/cm²のs N A G ナノファイバーを含んでいる。

【0201】

〔5.7 併用療法〕

上記s N A G ナノファイバー組成物は、例えば、免疫システムを促進する物質、抗菌剤（例えば、抗生物質）、デフェンシンペプチド、デフェンシン様ペプチド、痛みを軽減する治療法（例えば、鎮痛剤）、熱を軽減する治療法、ならびに/または、細菌の感染もしくは細菌の感染に関連した疾患に対して効果的であると知られている、もしくはその治療および/もしくは予防のために一般的に使用される他の薬剤もしくは薬物等の他の治療法と併用して投与され得る。

10

【0202】

いくつかの実施形態において、本明細書において記載されている組成物は、追加の抗菌剤（例えば、抗生物質）と併用して投与される。上記実施形態の1つにおいて、本明細書において記載されている組成物は、細菌の感染または細菌の感染に関連した疾患を治療するために一般的に使用される標準的な治療法と併用して、当該細菌の感染または当該疾患を治療するために使用され得る。1つの実施形態において、本明細書において記載されている組成物は、細菌の感染もしくは細菌の感染に関連した疾患であると診断された患者、または細菌の感染もしくは細菌の感染に関連した疾患の症状を示している患者に対して、当該細菌の感染または当該疾患に対して効果的であると知られている標準的な抗菌剤（例えば、抗生物質）と併用して投与され得る。

20

【0203】

特定の実施形態において、本明細書において記載されている組成物は、以下の種類の抗生物質のうちの1つの抗生物質と併用して投与される：マイクロライド系（例えば、エリスロマイシン、アジスロマイシン）、アミノグリコシド系（例えば、アミカシン、ゲンタマイシン、ネオマイシン、ストレプトマイシン）、セファロスポリン系（例えば、セファドロキシル、セファクロール、セフォタキシム、セフェピム）、フルオロキノロン系（例えば、シプロフロキサシン、レボフロキサシン）、ペニシリン系（例えば、ペニシリン、アンピシリン、アモキシシリン）、テトラサイクリン系（例えば、テトラサイクリン、ドキシサイクリン）、およびカルバペネム系（例えば、メロペネム、イミペネム）。いくつかの実施形態において、本明細書において記載されている組成物は、S. aureusの感染、MRSAの感染、Pseudomonasの感染、もしくはC. difficileの感染を治療もしくは予防するために効果的な薬剤（例えば、抗生物質）、または上記感染を治療もしくは予防するために一般的に使用される薬剤と併用して投与される。

30

【0204】

特定の実施形態において、本明細書において記載されている組成物は、バンコマイシン、サルファ剤（例えば、コトリモキサゾール/トリメトプリム-スルファメトキサゾール）、テトラサイクリン（例えば、ドキシサイクリン、ミノサイクリン）、クリンダマイシン、オキサゾリジノン（例えばリネゾリド）、ダブトマイシン、テイコブラニン、キヌプリスチン/ダルフォプリスチン（シナシッド）、チゲサイクリン、アリシン、バシトラシン、ニトロフラントイン、過酸化水素、ノボピオシン、ネチルミシン、メチルグリオキサール、およびハチデフェンシン-1のうちの1つ以上と併用して投与される。本明細書において記載されている組成物はまた、過酸化水素、トブラマイシン、グルコン酸クロルヘキシジン（chlorhexidine digluconate）、グルコン酸クロルヘキシジン（chlorhexidine gluconate）、レボフロキサシン、および銀のうちの1つ以上を含んでいる包帯と併用して投与され得る。1つの実施形態において、本明細書において記載されている組成物は、S.

40

50

aureusの感染（特にMRSAの感染）を治療または予防するために、上記薬剤のうちの1つ以上とともに投与される。

【0205】

いくつかの実施形態において、本明細書において記載されている組成物は、別の治療法の投与の前（例えば、1分、15分、30分、1時間、2時間、3時間、6時間、12時間、24時間以上前、またはその間のいずれかの時間）、投与と同時、または投与の後（例えば、1分、15分、30分、1時間、2時間、3時間、6時間、12時間、24時間以上後、またはその間のいずれかの時間）に投与される。例えば、上記組成物は、抗菌剤（例えば、抗生物質）の投与の前、投与と同時、または投与の後に投与され得る。

【0206】

上記実施形態のいくつかにおいて、本明細書において記載されている組成物は、患者が別の抗菌剤（例えば、抗生物質）を用いた細菌の感染の一連の治療を経験した後に、細菌の感染または細菌の感染に関連した疾患を治療または予防するために、患者に対して投与され得る。いくつかの実施形態において、本明細書において記載されている組成物は、1つ以上の抗菌剤（例えば、抗生物質）に対して耐性を発達させている患者に対して投与され得る。1つの実施形態において、本明細書において記載されている組成物は、抗生物質（例えば、上記細菌の感染の治療のために標準的に使用される抗生物質）を用いた一連の治療を経験し、当該抗生物質に対して耐性を発達させている患者に対して投与され得る。

【0207】

しかしながら、特定の実施形態において、sNAGナノファイバー組成物は単独で投与される。上記実施形態の1つにおいて、sNAGナノファイバー組成物は他のいずれの治療法とも併用して投与されず、例えば、免疫賦活剤、抗菌剤（例えば、抗生物質）、デフェンシンペプチド、デフェンシン様ペプチド、痛みを軽減する治療法（例えば、鎮痛剤）、または熱を軽減する治療法と併用して投与されない。1つの実施形態において、sNAGナノファイバー組成物は、抗生物質と併用して投与されない。特定の実施形態において、sNAGナノファイバー組成物は、抗ウイルス薬、抗真菌薬、または抗酵母薬と併用して投与されない。

【0208】

〔5.8 キット〕

上述のsNAGナノファイバー組成物のいずれかを含んでいる薬学的なパックまたはキットも検討される。上記パックまたはキットは、本明細書において記載されている組成物を含んでいる1つ以上の成分で満たされた1つ以上の容器を備えていてもよい。上記組成物は、密封され、防水加工された無菌のパッケージであって、汚染することなく上記組成物を除去することを容易にするパッケージの中に格納されていることが好ましい。上記容器の材料には、アルミ箔、プラスチック、または容易に滅菌される別の従来の材料が含まれる。上記キットは、上記組成物の1回の投与、または複数回の投与のための材料を含んでいてもよく、上記それぞれの投与のための材料は別個の防水加工された無菌のパッケージ中で提供されることが好ましい。

【0209】

別の実施形態において、2つの区画を有する容器が提供される。第1の区画は、上述のsNAGナノファイバー組成物のいずれかを備えており、一方、第2の区画は、別の活性を有する薬剤（例えば、別の抗菌剤）を備えている。野外または診察室において、後に続く患者への投与のために、上記第1の区画中の組成物は直ちに上記第2の区画中の薬剤と混合され得る。

【0210】

さらに、緊急の使用、または軍隊での使用のために設計されたキットはまた、使い捨ての予め滅菌された器具（例えば、はさみ、外科用メス、クランプ、止血帯、伸縮性または非伸縮性の包帯等）を備えていてもよい。

【0211】

上記キットまたはパックに関連して、任意で、医薬品または生物学的製品の製造、利用

10

20

30

40

50

または販売を管理している政府機関によって定められた書式の通知があってもよい。例えば、キットはFDAの承認に関する通知書および/または使用説明書を備えていてもよい。

【0212】

本発明に包含されるキットは、上記適用および方法において使用され得る。

【0213】

〔6. 実施例〕

〔6. 1 実施例1：海洋珪藻に由来するsNAGナノファイバーは、創傷治癒、および、Akt1/Ets1に依存する経路を介したデフェンシンの発現を促進する〕

本実施例は、sNAGナノファイバーが、皮膚の創傷の治癒およびデフェンシンの発現を促進すること、ならびに、Akt1/Ets1経路がsNAGナノファイバーによる皮膚の創傷の治癒の制御において中心的な役割を果たしていることを実証している。

【0214】

〔6. 1. 1 材料および方法〕

sNAG/Talidermナノファイバーは、Marine Polymer Technologiesによって製造および供給され、創傷治療に好適なパッチへと形成される。野生型C57ブラックおよびAkt1ヌルマウスは、Medical University of South Carolina animal facilitiesにて飼育された。野生型およびAkt1ヌルマウス（8週齢から12週齢）を、50%の純酸素および50%のイソフルレンガスを用いて麻酔した。創傷を形成する直前に、不要な毛を除去するために、当該マウスの背中にNair Hair Removal Lotionを塗布した。切除生検パンチを用いて、背中における4mmの円形の領域の皮膚を除去した。0日目にそれぞれの創傷の上にTalidermを配置するか、または創傷を未処理のまま放置した。1、3、5および7日目に、上記創傷を撮影および測定し、上記創傷および周囲の皮膚を完全に除去するために8mmの生検パンチを用いて切除した。H&Eおよび免疫蛍光染色に備えて、Talidermあり、またはなしの野生型およびAkt1ヌルの創傷をパラフィンに包埋した。

【0215】

染色のために、パラフィンに包埋した切片を切断し、顕微鏡用スライドに配置した。キシレンを用いてスライドを洗浄してパラフィンを取り除き、等級分けされた一連のアルコールを用いてスライドに水分を付与した。透過処理のために、上記切片を0.1% Triton x100中で培養した。切片は、沸騰した抗原回収溶液中で培養された。一次ヤギ抗体、-デフェンシン3-1：400希釈液中で培養する前に、ブロッッキングするために1%の動物血清を使用した。その後、上記切片を、湿度室中で4で一晩、一次抗体中でインキュベートした。免疫蛍光二次ロバ-ヤギ488抗体の1：200希釈液を使用し、その後、TOPRO-3を用いて核染色を行った。共焦点顕微鏡を用いて、画像を保存した。

【0216】

ヘマトキシリンおよびエオジン染色法を使用し、表皮、真皮、筋肉および血管等の基本構造を視覚化し、上記創傷の方向、および、おおよその位置を決定した。H&E染色はまた、Akt1に依存しない様式において、どの細胞型がTalidermによって刺激されているのかについて特定を開始するために使用された。

【0217】

他の材料および方法は、図面の記載および以下の結果のセクションに記載されており、当該分野にて公知の方法に従って行われる。

【0218】

〔6. 1. 2 結果〕

sNAGナノファイバーは、Ets1の上流にある調節因子である、Akt1の活性化を刺激した。図1Aは、血清飢餓ECのNAGおよびsNAGによる刺激に対する反応におけるホスホ-Aktのウェスタンブロット分析を示している。図1Bは、スクランブルコントロール(SCR)またはAkt1-shRNAレンチウイルスのいずれかに感染したECのRT-PCR分析を示しており、当該分析ではローディングコントロールとしてEts1およびS26の発現が評価されている。図1Cは、sNAGナノファイバーから

A k t 1、E t s 1 およびデフェンシンへのシグナルを伝達するシグナル伝達経路が図示されている。

【 0 2 1 9 】

A k t 1 ヌル動物における創傷の治癒の遅延は、Taliderm (s N A G) 処理によって部分的に救済される。図 2 A は、Taliderm 処理あり、および、Taliderm 処理なしの創傷を形成された W T マウスおよび A K T 1 ヌルマウスの代表的な図を示している。図 2 B は、代表的なマウスの 3 日目の創傷に由来する皮膚切片の H & E 染色を示している。野生型および A k t 1 の創傷切除における H & E 染色は、ケラチノサイトの増殖および移動において、Taliderm に依存した増加を示している。破線は、創縁上でケラチノサイトが増殖している領域を示している。野生型および A k t 1 の両方の処理された創傷においては、野生型および A k t 1 のコントロールに比べて、創縁上で再上皮化が明らかに増加している。このことは、Taliderm が、A k t 1 経路には依存せずにケラチノサイトの動員を増加させることを示している。Taliderm は創縁上の完全な再上皮化を誘導するが、依然として、下層組織における血管再開通は、野生型に比べて実質的に欠けている。このことは、A k t 1 動物における実質的な出血および赤血球の浸潤によって明らかにされている。

10

【 0 2 2 0 】

s N A G ナノファイバーは、初代内皮細胞におけるサイトカインおよびデフェンシンの発現を刺激する。図 3 A は、a - デフェンシンに対する抗体を用いた、s N A G を用いて処理した E C、または s N A G を用いずに処理した E C の免疫組織学的試験を示している。図 3 B は、E C のナノファイバー処理の結果、- デフェンシン 1 - 3 が分泌されたことを示す E L I S A を示している。

20

【 0 2 2 1 】

s N A G ナノファイバーは、A k t 1 に依存する様式で、初代内皮細胞におけるデフェンシンの発現を刺激する。図 4 A および 4 B は、P D 9 8 0 5 9 (M A P K 阻害剤)、ウォルトマンニン (P 1 3 K 阻害剤、「w t m」) ありもしくはなし、またはスクランブルコントロールもしくは A k t 1 s h R N A レンチウイルスに感染した、s N A G ありまたはなし (s n a g) で処理された血清飢餓 E C (s s) の定量的 R T - P C R を示しており、示された遺伝子の発現が評価されている。

【 0 2 2 2 】

s N A G ナノファイバーは、マウスのケラチノサイトにおける - デフェンシン 3 の発現を刺激する。図 5 A は、3 日目の W T 動物および A k t 1 ヌル動物に由来するマウス皮膚の創傷切片であって、パラフィンに包埋された切片の、- デフェンシン 3 およびインボルクリンを用いた免疫蛍光染色を示している。in vivo における Taliderm の効果を評価するために、W T マウスおよび A k t 1 ヌルマウスの両方において、皮膚創傷治癒モデルが発達した。上記研究結果は、Taliderm を用いて処理された動物において、- デフェンシン 3 の発現が A k t 1 に依存する様式で増加することを示している。回復期創傷においてデフェンシンの発現を増加させる Taliderm の能力は、創傷感染を治療および制御するために重要な意味を持っている。図 5 B は、NIH Image J ソフトウェアを用いた、- デフェンシン 3 の免疫蛍光染色の定量を示している。図 5 C は、- デフェンシン 3 および T O P R O - 3 を用いた、W T および A k t 1 ヌルの処理されたケラチノサイトおよび未処理のケラチノサイトの免疫蛍光染色を示している。W T および A k t 1 ヌルの Taliderm で処理された創傷における - デフェンシン 3 の緑の染色の増加に注目されたい。創傷切片の免疫蛍光標識は、Taliderm で処理された創傷が、A k t 1 に依存する様式で - デフェンシン 3 の発現の増加を示すことを示している。A k t 1 の処理された創傷は、- デフェンシン 3 の妥当な増加を示すが、野生型の処理された創傷は、より顕著な増加を示している。以上のことは、- デフェンシン 3 の発現が、上記ナノファイバーによって増加されるだけでなく、少なくとも部分的には、A k t 1 経路に依存することを示している。- デフェンシン 3 の発現は、ケラチノサイトに限定されていると考えられ、当該発現はケラチノサイトに対して特異的であることが示されている。

30

40

【 0 2 2 3 】

50

A k t 1 に依存した転写因子の結合部位。図 6 は、A k t 1 に依存した転写因子の結合部位の模式図を示している。Genomatixソフトウェアを用いて、D E F 1、4 および 5 の m R N A の保存部位について、転写開始部位の 5 0 0 b p 上流を分析した。

【 0 2 2 4 】

〔 6 . 1 . 3 結論 〕

上記の提示されたデータは、s N A G ナノファイバーによる E t s 1 への刺激が、当該ナノファイバーによる A k t 1 の活性化による結果であることを示している。ナノファイバーによる処理は、結果として、細胞の動員に関連した遺伝子（例えば、I L - 1（公知の E t s 1 の標的）、V E G F およびいくつかのデフェンシン（3、1、4 および 5）、化学誘引物質として作用することが近年示された小さな抗菌性ペプチド）の発現の顕著な増加をもたらした。P 1 3 K / A k t 1 経路の薬理的阻害、および、s h R N A を用いた A k t 1 のノックダウンは、結果として、上記化学走化性因子の発現を減少させた。A k t 1 ヌルマウスは、創傷治癒が遅延する表現型を示し、当該表現型は部分的に T a l i d e r m ナノファイバーによって救済される。T a l i d e r m を用いて処理された創傷はまた、A k t 1 に依存したデフェンシンの発現の増加を示した。

10

【 0 2 2 5 】

T a l i d e r m を用いて処理された創傷における、- デフェンシン 3 の発現の増加およびケラチノサイトの増殖は、効果的な創傷治癒製品としての T a l i d e r m の有益な利用を実証している。T a l i d e r m は、A k t 1 に依存した様式で、ケラチノサイト中の抗菌性ペプチドの発現を増加させるように作用し、このことは s N A G ナノファイバーの機能における A k t 1 の重要な役割を示唆している。以上のことは、P 1 3 K / A k t 1 経路の阻害および s h R N A を用いた A k t 1 のノックダウンが、結果として、上記化学走化性因子の発現を減少させるといふ、実験室での他の研究の結果（B u f f, M u i s e - H e l m e r i c k s, 未発表）と相互に関連している。

20

【 0 2 2 6 】

- デフェンシン 3 の発現の増加は A k t 1 に依存しているが、8 m m の創傷切除の H & E 染色（図 2 B）は、T a l i d e r m は、創傷の再上皮化において、A k t 1 に依存せずに作用することを示している。新しいケラチノサイトが創縁全体に広がる場合であっても、下層組織は、血管成長において同じ刺激を示さなかった。以上のことは、A k t 1 が存在しないことが、真皮における血管の漏出および多量の赤血球の浮遊の原因となることを示している。以上のことは、T a l i d e r m が脈管化の増加のために A k t 1 経路に依存していることを示唆している。

30

【 0 2 2 7 】

要約すれば、(i) s N A G ナノファイバー（T a l i d e r m）は、血管形成を刺激することによって、部分的に創傷治癒を促進する；(i i) s N A G ナノファイバーによる内皮細胞の処理は、A k t 1 / E t s 1 に依存した経路を活性化し、細胞運動およびサイトカインの分泌における変化を引き起こす；(i i i) T a l i d e r m を用いて処理した創傷は、A k t 1 に依存した様式で、- デフェンシン 3 の発現の増加を示す；(i v) T a l i d e r m を用いた A k t 1 ヌル動物の処理は、部分的に表現型を救済し、ケラチノサイトの増殖 / 移動の顕著な増加をもたらす；ならびに、(v) バイオインフォマティクスによる解析は、E T S 1 が s N A G によって活性化される経路に関連していると考えられ、創傷治癒およびサイトカインの分泌の増加をもたらすことを示している。

40

【 0 2 2 8 】

以上の研究結果をまとめて考えると、当該研究結果は、s N A G ナノファイバーによる皮膚の創傷治癒の制御において A k t 1 - E t s 1 経路が果たす中心的な役割を示唆しており、創傷治癒を促進する新規かつ効果的な方法としての当該ナノファイバーの利用を支持している。

【 0 2 2 9 】

〔 6 . 2 実施例 2 : s N A G ナノファイバーは、デフェンシンの発現を増加させ、創傷閉鎖の速度（K i n e t i c s）を増加させ、かつ、間接的にデフェンシンに依存する抗菌効果

50

を有する]

本実施例は、s N A G ナノファイバーがin vivoにおいてStaphylococcus aureusに対する強力な抗菌効果を有することを実証している。当該抗菌効果は、間接的であり、デフェンシンに依存している。本実施例はまた、s N A G ナノファイバーが、ケラチノサイトおよび内皮細胞においてはin vitroで、皮膚創傷においてはin vivoで、A k t 1 に依存した様式でデフェンシンの発現を誘導し、創傷閉鎖の速度を増加させることを示している。

【0230】

〔6.2.1 材料および方法〕

組織培養、薬理的な障害、E L I S A : ヒト臍帯静脈 E C (Lonza) を、内皮基礎培地 2 (Lonza) 中で 5 % C O ₂ を用いて 37 °C で維持した。内皮基礎培地 2 (E B M 2) には、Lonza の手順によって記載されているように E C 増殖培地 2 SingleQuots、および 1 % ペニシリン / ストレプトマイシン (Invitrogen) を追加した。0.1 % ウシ胎仔血清 (Valley Biomedical) を追加した E B M 2 中で 80 ~ 90 % の密度にて 24 時間、血清飢餓の状態にさせ、その後、滅菌水 (Marine Polymer Technologies, Inc., Danvers, Mass., USA によって提供) 中で、高純度の p G l c N A c (50 μg / ml) ナノファイバー (s N A G) を用いて刺激した。本実験で使用した上記 p G l c N A c 珪藻由来ナノファイバーは、より長い形態の繊維 (N A G) に由来する短い生分解性の繊維であり、平均の長さが 4 ~ 7 μm、ポリマーの分子量がおよそ 60,000 Da である。P D 0 9 8 0 5 9 (50 μM) またはウォルトマンニン (100 μM) を使用した障害のために、細胞を 45 分間前処理し、その後、s N A G (50 μg / ml) を用いて 3 時間刺激を行った。

10

20

【0231】

統計解析：それぞれの定量的な実験を、少なくとも 3 反復行い、かつ、少なくとも独立して 3 回行った。全ての統計解析は、平均値および標準偏差を求め、スチューデントの t 検定を行うために、Microsoft Excell を使用して行われた。

【0232】

レンチウイルスの感染：A k t 1 に対するミッション s h R N A レンチウイルスコンストラクトを Sigma/Aldrich から購入した。スクランブル p L K O . 1 s h R N A ベクターは、Addgene から購入された。レンチウイルスを 293 T 細胞中で増殖させ、上述のように追加した D M E M 中で維持した。Addgene から購入した p s P A X 2 および p M D 2 . G パッケージングベクターを使用し、Addgene から購入したレンチウイルス粒子を製造するためのプロトコルを使用して、レンチウイルスによる生産を行った。標的細胞の感染のために、7.5 × 10⁵ 個の細胞を 100 mm² プレートに配置し、一晚培養した。翌日、最終濃度 1 μg / ml のポリブレン、ならびに、スクランブルコントロールまたは A k t 1 s h R N A レンチウイルスを使用して細胞に形質導入した。形質導入後、内皮細胞を一晚血清飢餓の状態にさせ、s N A G (50 g / ml) を用いて 3 時間刺激を行った。全ての感染を、R T - P C R による適切なノックダウンのためにモニタリングした。

30

【0233】

R T - P C R : 半定量的 R T - P C R のために、製造者の指示に従って、RNAsol (Teltest, Inc.) を用いて R N A を抽出した。製造者の指示に従って、オリゴ (d T) を使用し、Superscript First Strand Synthesis Kit (Invitrogen) を用いて 2 μg の全 R N A から c D N A を合成した。P C R 反応には、等量の c D N A および 1.25 μM の適切なプライマーのペア (Sigma- Proligo, St. Louis, MO, USA) を含めた。当該解析に使用した全てのプライマーの配列を以下に示す：

40

【0234】

【表 1】

Akt1 F	5' GAGGCCGTCAGCCACAGTCTG 3'
Akt1 R	5' ATGAGCGACGTGGCTATTGTG 3'
β -デフェンシン 3 F	5' GTGGGGTGAAGCCTAGCAG 3'
β -デフェンシン 3 R	5' TTTCTTTCTTCGGCAGCATT 3'
α -デフェンシン 1 F	5' CACTCCAGGCAAGAGCTGAT 3'
α -デフェンシン 1 R	5' TCCCTGGTAGATGCAGGTTC 3'
S26 F	5' CTCCGGTCCGTGCCTCCAAG 3'
S26 R	5' CAGAGAATAGCCTGTCTTCAG 3'

10

【0235】

サイクルの条件を以下に示す：94 で5分；94 で1分、55～65（プライマーの T_m に基づく）で1分、72 で1分を30～35サイクル；72 で7分、そして4 まで冷却。サイクル数は、使用した各プライマーのペアについて、当該アッセイの線形的範囲（linear range）内に収まるように実験的に決定された。全ての半定量的R T - P C Rは、内部標準としてリボソームタンパク質サブユニットS 2 6プライマーを用いて行われた。生産物をBioRad Molecular Imaging System (Hercules, CA, USA)上で視覚化した。リアルタイムP C Rは、Stratageneから購入されたBrilliant CYBR green QPCR kitとMx3000P Real-Time PCR systemとを組み合わせ使用して行われた。リボソームサブユニットS 2 6を検出するプライマーは内部コントロールとして使用された。

20

【0236】

切除型創傷治癒モデル（Excisional Wound Healing Model）：全ての実験において、野生型C 5 7 B 1 / 6およびA k t 1 - / - [43]が使用された。全タンパク質の発現をブロックする、翻訳開始部位における挿入突然変異法を用いて、A k t 1ヌル動物を作製した。8～12週齢の間の雄のマウス成体に麻酔をかけて、創傷を形成した。4 mmの生検パンチ（Miltex）を使用して、2つの完全な厚さの皮膚創傷を形成し、それぞれの脇腹に2つの同一の創傷を形成した。マウスには、O₂/Isoflurane vaporizing anesthesia machine (VetEquip, Inc.)を使用して麻酔をかけた。イソフルレンは、誘導のために4%、手術のために2%を使用した。手術の前に、脱毛によって体毛を除去し、70%エタノールを用いて当該脱毛された領域を洗浄および滅菌した。創傷は、蒸留水を用いて湿らせたs N A G膜を用いて処理するか、または未処理のまま放置するかのいずれかとした。3日目および5日目に動物を安楽死させ、8 mmの生検パンチ（Miltex）を使用して全創傷を周囲の皮膚も含めて採集した。4%パラホルムアルデヒドを用いて4 で一晩、創傷を固定し、パラフィン中に包埋し、分析のために切断した。

30

【0237】

ヘマトキシリンおよびエオジン染色（H & E）：全てのH & E染色は、Medical University of South Carolina, Department of Regenerative Medicine and Cell BiologyのHistology Core Facilityにて行われた。要約すれば、キシレン中で切片を洗浄し（cleared）、等級分けされた一連のアルコールを用いて水分を付与し、当該切片をヘマトキシリン中に配置した後、酸アルコール中に配置した。その後、サンプルをアンモニア水中に配置し、エタノール中ですすぎ、エオジンに接触させた。その後、当該サンプルを、等級分けされたアルコールを用いて脱水し、キシレン中で洗浄した。Cytoseal-XYL (Richard-Allan Scientific)を使用して切片を固定した。Olympus BX40 microscope（4×対物レンズ、0.13）を用いてH & E切片を視覚化し、Olympus Camera (Model DP25) および DP2-BSW acquisition ソフトウェアを用いて撮影した。

40

【0238】

細菌の接種、組織のグラム染色、コロニー形成単位の定量：8～12週齢の雄のマウス

50

に上述のように創傷を形成した。Staphylococcus aureus (ATCC 25923)の単一のコロニーを採集し、37℃で一晩培養して吸光度OD₆₀₀ = 0.53になるまで調整した。1 mLのS. aureusを10,000 rpmでスピンし、無菌のPBS中で再懸濁させ、15 µlを使用して各創傷に接種した。処理済みグループには、接種後に30分間、sNAG膜を適用した。創傷形成後3日目および5日目にマウスを安楽死させ、8 mmの生検パンチを使用して創傷を採集した。動物1匹あたり1つの創傷を、4%パラホルムアルデヒドを用いて4℃で一晩固定し、細菌の定量のために、他の創傷を培養し、抗生物質を含まないLB培地中に蒔いた(以下を参照)。組織のグラム染色に使用する創傷をパラフィン中に包埋し、切断した。キシレン中で切片を洗浄し、等級分けされた一連のアルコールを用いて水分を付与し、製造者によって記載された処置によって組織グラム染色(Sigma-Aldrich)を用いて当該切片を染色した。

10

【0239】

培養のために、創傷切片を0.5 mL細菌培地中に配置し、37℃で30分間振動させながら培養した。37℃で一晩培養した連続希釈液を使用して、コロニー形成単位(CFU)を定量した。1回の培養/1つの希釈液あたりのコロニーの数を数え、CFU/mLを計算した。

【0240】

sNAGを用いて処理した細菌培養物からCFU/mLを決定するために、溶液中のS. aureusの培養物を、種々の濃度のsNAG(10.8 mg/mLのsNAGを10 µlおよび20 µl)を用いて3時間処理した。その後、培養物を37℃で一晩培養し、CFU/mLを決定した。

20

【0241】

- デフェンシン3ペプチドの適用: 3つの試験濃度(1.0 µM、2.5 µM、5.0 µM)の生物学的に活性なヒト-デフェンシン3ペプチド(Peptide Institute, Inc.)を用いて、上述の感染創傷治療モデルにおける細菌の増殖に対する効果について試験を行った。各濃度は、細菌の増殖に対して負の影響を与えるため、分析には最も低い濃度を選択した。各創傷をS. aureusに感染させた後、10 µlのペプチドを適用した。3日後、創傷を採集し、切片作製のために包埋してグラム染色を行うか、または上述のようにCFU/mLを定量するために培養した。

【0242】

- デフェンシン3抗体によるブロック: 野生型の雄のマウスに創傷を形成して、上述のように15 µlのS. aureusを用いて感染させた。接種後、0.2 µg/mLの-デフェンシン3抗体(Santa Cruz)を用いて1つの創傷を処理し、0.2 µg/mLの通常のヤギIgGコントロール抗体(Santa Cruz)を用いて他の創傷を処理した。抗体による処理を行った0日目に、全てのマウスに対してsNAG膜を適用した。24時間ごとに抗体を適用した。3日目にマウスを安楽死させ、8 mmの生検パンチを使用して創傷を採集した。創傷を、4%パラホルムアルデヒドを用いて4℃で一晩固定し、パラフィン中に包埋し、切断して、組織のグラム染色を用いて分析した。上述のように3日目に採集した創傷からCFU/mLの定量を行った。

30

【0243】

免疫蛍光、顕微鏡検査: キシレンおよび等級分けされた一連のアルコールを用いて、パラフィンに包埋された組織切片に水分を付与した。0.01%のTriton-X100を用いて切片を処理し、抗原アンマスキング溶液(Vector Laboratories)を用いて加圧調理器の中で5分間、抗原を回収し、冷却した。-デフェンシン3ヤギポリクローナル抗体(Santa Cruz)、インボルクリンウサギポリクローナル抗体(Santa Cruz)、およびTO-PRO 3-iodide(Molecular Probes)を用いて皮膚切片を標識した。切片を4℃で一晩、一次抗体中で培養し、室温で1時間、適切な二次免疫蛍光抗体(Invitrogen)中で培養した。各抗体に対するコントロールの切片を一次抗体なしで染色した。Olympus FluoView laser scanning confocal microscope(Model IX70)を用いて組織切片を視覚化し、Olympus camera(Model FV5-ZM)およびFluoview 5.0 acquisitionソフトウェアを用いて室温で当該切

40

50

片を撮影した。全ての切片を60×油浸レンズ(Olympus Immersion Oil)を用いて撮影した。

【0244】

HUVECは、血清飢餓の状態にさせるか、もしくは培地中でsNAGを用いて5時間処理し、かつ、 α -デフェンシン5(FITC)、 α -デフェンシン3(テキサスレッド)、もしくはTOPRO3(青)に対する抗体を用いて染色した。画像は、免疫蛍光顕微鏡を用いて取得した。細胞培養物のデフェンシンの発現を、Zeiss Axiovert 100M confocal microscopeを用いて視覚化し、培地として水を使用し、LSM 510 camera (Zeiss Fluor 63xW/1.2A objective)を用いて室温で撮影した。

【0245】

ウェスタンブロット分析：内皮細胞を血清飢餓の状態にさせ、その後、sNAG(50 g/ml)を用いて所定の時間経過にて刺激を行った。その後、細胞を溶解させ、ウェスタンブロット分析を行った。ウェスタンブロット分析に使用した抗体を以下に示す：P13Kの抗p85サブユニットおよびリン特異的Akt抗体(Cell Signaling Technologies)。

【0246】

〔6.2.2 結果〕

〔6.2.2.1 ケラチノサイトおよび内皮細胞は、sNAGを用いて刺激された場合に、デフェンシンを発現し、分泌する〕

本実施例は、sNAGを用いた処理が、デフェンシン(先天性免疫応答の一部である小さな抗菌性ペプチド)の発現を調節することを実証している。

【0247】

in vitroにおけるデフェンシンの発現に対するsNAGを用いた処理の影響を調べるために、培地中の初代ヒト臍静脈内皮細胞を使用した。内皮細胞は、sNAGを用いて刺激された場合に、 α 型および β 型のデフェンシンの両方を発現する。図7Aに示されているように、sNAGを用いて処理された内皮細胞は、刺激から1時間以内に、 α -デフェンシン3および α -デフェンシン1のmRNAの発現の上方制御を示している。sNAGを用いた処理による β -デフェンシン4および5の同様の上方制御もまた、観察された(データは示されていない)。初代内皮細胞中の α 型デフェンシンおよびケラチノサイト中の β 型デフェンシンの発現を確認するために、25個の異なるデフェンシン遺伝子を含む特別注文の遺伝子配列を使用した。sNAGによる内皮細胞の刺激は、特に α -デフェンシン1、4および5、ならびに β -デフェンシン3の発現を増加させることが示された。さらに、sNAGによるヒトケラチノサイトの刺激は、 β -デフェンシン様遺伝子(そのいくつかは表Iに列挙されている)の発現を増加させた。上記の研究結果は、sNAGによる刺激に対する応答において、少なくとも3つの β -デフェンシン遺伝子および α -デフェンシン3が初代内皮細胞中で発現されていること、ならびに、複数の β -デフェンシン遺伝子が初代ケラチノサイト中で発現されていることを示唆している。

【0248】

【表2】

表I：遺伝子配列解析は、sNAGによって上方制御されている多数のデフェンシン遺伝子を明らかにした

HUVEC	遺伝子名	変化倍率	ケラチノサイト	遺伝子名	変化倍率
	α -デフェンシン 1	+1.36		β -デフェンシン 1	+1.4
	α -デフェンシン 4	+2.74		β -デフェンシン 126	+1.73
	α -デフェンシン 5	+2.46		β -デフェンシン 105B	+2.55
	β -デフェンシン 1	+2.19		β -デフェンシン 123	+1.65
	β -デフェンシン 4	+3.06		β -デフェンシン 129	+1.46

【0249】

sNAGに依存したデフェンシンの発現がタンパク質レベルでも起こっているのかどう

か試験するために、s N A Gによって刺激された内皮細胞について、およびデフェンシンの両方に対する抗体を使用して免疫蛍光試験を行った。図7Bに示されているように、-デフェンシン3および-デフェンシン1は両方とも、当該細胞型においてs N A Gによる刺激によって上方制御された。しかしながら、s N A Gを用いた初代ヒトケラチノサイト(H a C a t)の刺激は、-デフェンシンの発現の増加を引き起こさず、-デフェンシン3の発現の増加を引き起こした(図7C)。以上のことを含めて考えると、上記実験は、s N A Gによる刺激が結果として初代ケラチノサイトおよび初代内皮細胞の両方においてデフェンシンペプチドの上方制御をもたらすことを示唆している。

【0250】

〔6.2.2.2 s N A Gに依存したデフェンシンの発現は、A k t 1を必要とする〕

以前に公開されたデータは、s N A Gによる初代内皮細胞の刺激は結果として、インテグリンの活性化、E t s 1の発現およびM A Pキナーゼの活性化を引き起こすことを示している(Vournakis, J.N., et al., 2008, J Vasc Res. 45(3):222-32.)。研究結果では、内皮細胞およびDrosophilaにおいてA k t 1をE t s 1の上流に位置付けている(Lavenburg, K.R., et al., 2003, FASEB J.17(15): 2278-80.)。デフェンシンの発現に与えているシグナル経路の決定を開始するために、内皮細胞を血清飢餓の状態にさせて、P 1 3 K (ウォルトマンニン)またはM A Pキナーゼ(P D 0 9 8 0 5 9)に対する薬理的阻害剤を用いて前処理を行い、その後、s N A Gによる刺激を行った。定量的リアルタイムP C R分析によって、-デフェンシン1のm R N Aのレベルは、P 1 3 K / A k t 経路またはM A Pキナーゼ経路のいずれかに対する阻害の後、大きく減少することが示されている(図8A)。-デフェンシン3のR T - P C R分析もまた同様に、上記経路に対する阻害によってレベルが減少することを示している(図8B)。内皮細胞に対するs N A Gによる短時間の刺激は、A k t 1の活性化の標準的な指標であるA k t 1のリン酸化を引き起こす(図8C)。A k t 1が実際にデフェンシンの発現に必要であることを確認するために、A k t 1に対するs h R N Aのレンチウイルスによる導入を利用した。s N A Gを用いた処理を行った後に、スクランブル(S C R)コントロールまたはA k t 1 s h R N Aを用いて感染させた血清飢餓内皮細胞の定量的R T - P C R分析によって、A k t 1の発現が、s N A Gに依存した-デフェンシンの発現に必要であることが確認された(図8D)。-デフェンシンは内皮細胞中で発現されることが知られているため、A k t 1に対するs h R N Aのレンチウイルスによる導入を、ヒトケラチノサイト(H a C a t)において利用した。スクランブル(S C R)コントロールに感染した血清飢餓ケラチノサイトに対するs N A Gによる処理は、A k t 1ノックダウンによって無効にされる-デフェンシン3の発現の顕著な増加を引き起こした(図8E)。以上の結果は、s N A Gによる処理が内皮細胞においてA k t 1を活性化することを示しており、s N A Gに依存したデフェンシンの発現が内皮細胞およびケラチノサイトの両方においてA k t 1を必要としていることを強く示唆している。

【0251】

〔6.2.2.3 皮膚創傷に対するs N A Gによる処理は、In Vivoにおいてデフェンシンの発現を増加させる〕

in vivoにおけるデフェンシンの発現のためのA k t 1への依存を確認するために、切除型創傷治癒モデルにおいて野生型動物およびA k t 1ヌル動物を使用した。多くの哺乳類の白血球は-デフェンシンを発現するが(ヒト、ウサギ、ラットおよびハムスター)、マウスの白血球は-デフェンシンを発現しない。それゆえ、上記マウスモデルにおける-デフェンシンの発現に注目した。乾燥した形態のs N A G(薄い生分解性の膜)を用いた3日間にわたる皮膚創傷の処理は、結果として、野生型動物のケラチノサイトにおいて、-デフェンシン3の発現の統計的に有意な増加をもたらした(図9A)。ケラチノサイトの細胞層をマークするために、インボルクリン(Watt, F.M., 1983, J Invest Dermatol. 81(1 Suppl):100s-3s)染色(赤)を用いた。当該染色によって、-デフェンシン3の発現が表皮層に限定されることが示された。s N A Gに依存したデフェンシン

の発現が A k t 1 に依存しているのかどうかを評価するために、A k t 1 ヌル動物モデルを使用して同様のアッセイを行った。s N A G 膜を用いて処理した A k t 1 ヌルマウスに由来する創傷は、- デフェンシン 3 の発現の誘導の顕著な減少を示している (図 9 A) 。 - デフェンシン 3 を発現している表皮層をより視覚化するために、図 9 B には、3 日目に採集された、s N A G を用いて処理された野生型の創傷の画像が示されている。s N A G による皮膚創傷の処理は、主に皮膚の基底上層において - デフェンシン 3 の発現を誘導した (図 9 B) 。図 9 C に示されている定量的分析では、s N A G を用いて処理された野生型動物において - デフェンシン 3 のおよそ 5 倍の増加が示され、当該増加のために A k t 1 が必要とされていることが示されている。

【 0 2 5 2 】

〔 6 . 2 . 2 . 4 s N A G 処理は W T 動物における創傷閉鎖の速度を増加させる 〕
以前の結果は、s N A G による処理に対する反応において、糖尿病マウスモデルにおける創傷閉鎖の速度の増加を示していた。野生型動物における同様の効果について、s N A G を用いて試験を行った。膜の形態である s N A G を用いて処理されたか、または未処理のまま放置されているかのいずれかである野生型動物において、切除型の創傷 (excisional wounds) を形成した。組織切片は、創傷形成後の 1、3 および 5 日目に採集し、H & E 染色を行った。図 1 0 に示されているように、野生型の創傷に対する s N A G による処理は、結果として、創傷形成後 3 日目において、実線で視覚化されているように完全な閉鎖をもたらした。上記閉鎖は、コントロールの創傷に比べて 2 日早く起こった。A k t 1 ヌル動物は創傷閉鎖の遅延を示した；当該動物では、創傷形成後 7 日目までに創傷が完全には閉鎖しない。A k t 1 ヌルマウスの創傷閉鎖における遅延は、s N A G 処理によっては救済されない (データは示されていない) 。上記の研究結果は、s N A G はデフェンシンの発現を誘導するだけでなく、野生型マウスにおける創傷治癒速度を増加させており、新規かつ効果的な治療であり得る。

【 0 2 5 3 】

〔 6 . 2 . 2 . 5 s N A G は S . aureus に対する効果的な抗菌剤である 〕
デフェンシンペプチドは、グラム陽性およびグラム陰性細菌に対して活性である抗菌特性を有していることが知られている。s N A G による内皮細胞の処理はデフェンシンの発現 (型および 型の両方) を増加させ、s N A G による皮膚創傷の処理は in vivo において - デフェンシン 3 の発現を劇的に増加させるため、細菌に感染した創傷における s N A G 処理の抗菌効果を評価した。

【 0 2 5 4 】

s N A G が皮膚創傷において細菌量を減少させるかどうか決定するために、野生型動物および A k t 1 ヌル動物に対して皮膚創傷治癒を行い、その後、Staphylococcus aureus に感染させた。感染した創傷は、感染後の 3 および 5 日間、s N A G を用いて処理するか、または未処理のまま放置するかのいずれかとした。図 1 1 A および 1 1 B の組織グラム染色によって示されているように、s N A G を用いて処理された野生型動物は、未処理の創傷に比べて、創傷形成後 5 日目までのグラム陽性染色において顕著な減少を示している。これに対して、創傷形成後 5 日目の A k t 1 ヌル動物における未処理の創傷に由来するグラム染色された組織は、グラム陽性染色された好中球の蓄積を示している (図 1 1 B) 。以上のことは、上記動物では、細菌の排除機構の潜在的な欠如が見られ、当該欠如は s N A G 処理によって救済されないことを示している。上記研究結果は、A k t 1 ヌル動物が免疫クリアランス機構において欠陥を有しており、当該欠陥が s N A G 処理によって救済されないことを示唆している。

【 0 2 5 5 】

コロニー形成単位 (C F U) における s N A G に特異的な細菌の変化を定量するために、s N A G を用いて処理されているか、または未処理の野生型マウスおよび A k t 1 ヌルマウスの両方に由来する感染した創傷を採集し、培養した。図 1 1 C に示されているように、s N A G を用いて処理された野生型動物においては、創傷形成後 5 日目に細菌の数が顕著に (1 0 倍) 減少している。しかしながら、A k t 1 ヌル動物において検出された細菌

菌の数は野生型に比べて減少しており、s N A G 処理は、A k t 1 ヌル動物における絶対的な細菌の数に対しては効果が小さかった。感染後3日目(図11D)では、未処理のコントロールに比べて、s N A G を用いて処理された野生型マウスのC F U は同様に10倍減少している。s N A G を用いて処理されたA k t 1 ヌル動物は、未処理のA k t 1 ヌル動物に比べて、2倍のC F U の減少を示した。一般的に、上記A k t 1 ヌル動物は、1つの創傷あたりの細菌の量がより少なく、当該細菌量は、デフェンシンの発現に加え、他のプロセスにおけるA k t 1 に依存する効果を反映している可能性がある。上記研究結果は、s N A G による処理が、結果として、野生型マウスの感染した皮膚創傷における細菌量の顕著な減少をもたらすが、A k t ヌルマウスでは、当該減少をもたらさないことを示唆しており、デフェンシンが抗菌反応を媒介している可能性を示唆している。

10

【0256】

s N A G による処理の抗菌効果は、細菌の増殖または生存に対するナノファイバーの直接的な効果によるものではないことを示すために、S. aureusの細菌培養物を異なる量のs N A G を含む溶液中で3時間処理し、コロニー形成単位を決定した。図11Eに示されているように、s N A G による処理は、S. aureusの増殖に対して直接的な効果を及ぼさず、このことは、s N A G が細菌の増殖を直接的には阻害しておらず、それゆえに、デフェンシンの上方制御を介して作用している可能性があることを示している。

【0257】

〔6.2.2.6 デフェンシンペプチドの適用は、s N A G の抗菌効果に似た効果を生じる〕

20

s N A G による処理において示された効果と同様に、デフェンシンの追加によって細菌の感染を防ぐことができるかどうかを決定するために、上述のように、野生型マウスに創傷を形成してS. aureusを接種し、その後、生物学的に活性なヒト - デフェンシン3ペプチド(1.0 μ m)を用いて3日間処理した。組織生検では、組織グラム染色を用いて染色を行い、C F U を定量した。図11F~Gは、当該実験の結果を示している。 - デフェンシン3ペプチドを用いて処理された感染したマウスでは、s N A G を用いて処理した野生型マウスにおいて示された効果と同様に、細菌量が減少し、生きている細菌がおよそ7.5倍減少した(図11G)。

【0258】

デフェンシンの発現が誘導されるメカニズムの1つは、細菌L P S による刺激を介するものであり、おそらくT o l l 様レセプターの活性化を介するものである(Selsted, M.E. and A.J. Ouellette, 2005, Nat Immunol. 6(6):551-7.)。細菌の感染のみによって、試験期間内に - デフェンシンの発現を誘導することができるかどうか試験するために、創傷形成から3日後の野生型動物に由来する感染した創傷において - デフェンシンの発現を評価した。図12Aに示されているように、細菌の感染のみでは、感染から3日以内に、s N A G による処理において見られたような - デフェンシンの発現は誘導されなかった。しかしながら、野生型動物においては、感染した創傷に対するs N A G による処理は、同様の期間内に、 - デフェンシンの発現をおよそ3~5倍増加させた(図12B)。上記研究結果は、s N A G による処理がデフェンシンの発現を急速に誘導し、その結果、S. aureusに感染した創傷において細菌を顕著に排除することを示唆している。

30

40

【0259】

〔6.2.2.7 - デフェンシン3に対する抗体は、s N A G の抗菌効果をブロックする〕

デフェンシンは分泌タンパク質であるため、本発明者らは、 - デフェンシン3に対する抗体は、抗菌活性をブロックすることができるかもしれないと仮説を立てた。当該仮説について試験するために、上述のように創傷を形成してS. aureusに感染させ、s N A G を用いて処理を行った。上記創傷は、 - デフェンシン3抗体を用いて処理するか、またはアイソトープコントロールとするかのいずれかとした；3日間、1日に1回の適用。創傷切片を得て、グラム陽性細菌について染色を行った。図13Aに示されているように、 - デフェンシン抗体を用いて処理された創傷に由来する切片は、アイソトープコントロ

50

ール抗体を用いて処理された創傷に由来する切片に比べて、より多くのグラム陽性細菌を有している。示された各切片は、かさぶたのすぐ下にある創傷の領域に由来するものであった。上記創傷におけるCFUの定量は、*S. aureus*に感染した創傷においてsNAGによる処理の前に - デフェンシン3を中和することが結果として細菌の顕著な増加を引き起こすことを示している。IgGアイソトープコントロールを用いて処理した動物は、生きている細菌においておよそ5倍の減少を示している(図13B)。以上のことをまとめて考えると、上記結果は、sNAGによる処理が、結果として創傷治癒の速度を増加させるだけではなく、内生的な抗菌反応を促進することを示唆しており、新規な治療法としての上記ナノファイバーの利用が創傷治癒を促進すると同時に、創傷感染を減少させることを支持している。

10

【0260】

〔6.2.3 結論〕

本明細書において提示されている研究結果は、海洋珪藻に由来するナノファイバーであるsNAGが、創傷治癒を促進すると同時に、創傷感染を減少させる新規かつ効果的な方法として利用され得ることを実証している。上記データは、FDAに認証されている当該材料(現在、止血のために利用されている)が、初代内皮細胞における型および型のデフェンシンの発現、ならびに、初代ケラチノサイトにおける型の上方制御を刺激することを実証している。

【0261】

デフェンシンは、先天性免疫システムにおいて不可欠な成分である。上記ペプチドは、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌、菌類、ならびに多くのウイルスに対して活性である抗菌特性を備えている。デフェンシンは小さく(3~4kDa)、システインに富む陽イオン性ペプチドであり、哺乳類、昆虫、および植物において見られる。デフェンシンは、ジスルフィド結合のパターンに基づいて異なるファミリー(、および)に分類される。 - デフェンシンは、好中球に特異的であると考えられ、非常に高い濃度で見られ(全細胞タンパク質のおよそ5~7%を含んでいる)(Ganz, T. and R.I. Lehrer, 1994, Curr Opin Immunol. 6(4):584-9)、かつ抗菌反応の間に分泌される(Ganz, T., 1987, Infect Immun. 55(3):568-71)。また、ウサギの歯槽のマクロファージは、ウサギの好中球に匹敵するレベルの - デフェンシンを有している(Ganz, T., et al., 1989, J Immunol. 143(4):1358-65.)。 - デフェンシンは、ケラチノサイト、粘膜上皮細胞(Harder, J., et al., 1997, Nature 387(6636):861; および Harder, J., et al., 2001, J Biol Chem. 276(8):5707-13)、口腔組織および唾液分泌物(Mathews, M., et al., 1999, Infect Immun. 67(6):2740-5)、ならびに腎臓等の上皮細胞のタイプにおいて見られ、当該上皮細胞において - デフェンシンは、感染性または炎症性の刺激に対する反応において上方制御され得る(Ganz, T. and R.I. Lehrer, 1994, Curr Opin Immunol. 6(4):584-9)。ヒト - デフェンシン1(hDEFB1)は、上皮細胞において最も重要な抗菌性ペプチドの1つである。デフェンシンの発現および分泌は、創傷治療学を創造するために極めて重要であり得る。デフェンシンによる抗菌作用は、先天性免疫の一部であると考えられ、非特異的であり、かつ広範囲で見られるものである。それゆえに、抗生物質の乱用に見られるような、細菌の獲得耐性は問題にならない。

20

30

40

【0262】

本明細書において提示されているデータはまた、in vitroおよびin vivoの両方において、Akt1がデフェンシンの発現のために必要とされていることを実証している。sNAGによる処理は、野生型のコントロールの動物において皮膚創傷でのStaph aureusの感染を減少させるが、同様に処理されたAkt1ヌル動物においては感染を減少させない。野生型の皮膚創傷におけるsNAGによる刺激が、結果として、創傷閉鎖の速度を増加させることに注目することにもまた重要である。抗体による - デフェンシンのブロックは、結果としてsNAGの抗菌活性を減少させる。以上のことをまとめて考えると、上記研究結果は、細菌の感染の解消に關与するデフェンシンの発現の制御におけるAkt1の中心的な役割を示唆しており、sNAGによる処理が野生型動物における上記経路を活性化す

50

ることを示唆している。

【0263】

上記データは、感染した創傷に対する s N A G による処理が、少なくとも部分的には、デフェンシンの発現の誘導によって患者の細菌量を大幅に減少させ得ることを示唆している。Staphylococcus aureusは、皮膚および鼻におけるコロニーの形成が頻繁に見られる細菌である。上記細菌は、依然として院内感染の一般的な原因であって、しばしば術後の創傷感染を引き起こす。病院内でのS. aureusの感染は、医療従事者を長年苦しめており、治療のための抗生物質の使用は、抗生物質耐性株を発生させている。本明細書において提示されているデータは、ブドウ球菌に感染した創傷に対する s N A G による処理は、細菌量を劇的に減少させたことを示している。例えば、図 1 1 A および 1 1 B において、処理済みの野生型マウスにおける濃い紫色のグラム染色が見られないことは、S. aureusの感染が上記創傷において解消されたことを示している。in vitroおよびin vivoのデータは両方とも、創傷の治療におけるTaliderm / s N A G の利用が細菌の感染を減少させ、それゆえに創傷治癒を促進することに対する有力な証拠を提供している。

10

【0264】

コントロール実験は、s N A G の抗菌効果が細菌と上記材料との直接的な相互作用によるものではなく、A k t 1 の活性化によるデフェンシンの制御等の下流の効果によるものであることを示している。デフェンシンが先天性免疫において重要な役割を果たしており、抗菌活性において機能することは広く認められている。上記機能に対する証拠の多くは、精製されたデフェンシンペプチドを用いたin vitroにおける混合実験 (Selsted, M.E. and A.J. Ouellette, 2005, Nat Immunol. 6(6):551-7)、または精製された活性ペプチドを直接的に適用した図 1 1 に示す同様の実験によって直接的に殺菌されていることである。本明細書におけるデータは、s N A G の局所的な適用を利用した野生型動物におけるデフェンシンの発現の誘導が結果として、抗菌反応をもたらすことを示している。近年、ヒトデフェンシン5遺伝子を発現する遺伝子導入マウスモデルが、感染すれば結果的に野生型動物に死をもたらすS. typhimuriumに対する耐性を有していることが示されており (Salzman, N.H., et al., 2003, Nature 422(6931):522-6)、また、抗菌反応の制御におけるデフェンシンの重要性が示唆されている。

20

【0265】

デフェンシンの サブタイプは好中球において特異的に発現されており、一方、型デフェンシンは、元来は上皮において発現されるものであることが認められている。ヒトケラチノサイトにおける s N A G に対する反応において誘導された型デフェンシンの発現は、培地および皮膚創傷治癒モデルの両方において、検出された。in vivoのデータは、

30

- デフェンシン3が s N A G を用いた処理の後に基底上層において主に発現されていることを示している。以上のことは、ヒト - デフェンシン2の位置を皮膚の有棘層および顆粒層に特定した以前のデータと一致している (Oren, A., et al., 2003, Exp Mol Pathol. 74(2):180-2.)。皮膚は創傷および感染と常に接しており、機械的な障壁として機能するだけでなく、感染に対する積極的な防御を仕掛ける能力を維持している。皮膚の外層における - デフェンシンの発現は、皮膚の先天性免疫における役割を支持している。しかしながら、上記データは、s N A G が、内皮細胞において3つの異なる - デフェンシン (1、4 および 5) の発現を特異的に刺激していることを示している。以上のことは R T - P C R、遺伝子配列解析、免疫蛍光および E L I S A によって示されている (データは示されていない)。組織の修復における内皮細胞と白血球との間の相互作用は、創傷治癒における最初のステップかつ最も重要なステップの1つである。脈管構造からの白血球の遊出の工程は、化学走化性因子によって開始され、それゆえに； - デフェンシンが s N A G によって誘導され、必要な好中球 / 内皮細胞の相互作用に寄与し得ることは興味深い。さらに近年では、樹状細胞 (Hubert, P., et al., 2007, FASEB J. 21(11):2765-75)、ならびに、T細胞、単球およびマクロファージ (Garcia, J.R., et al., 2001, Cell Tissue Res. 306(2):257-64)、ならびにケラチノサイト (Niyonsaba, F., et al., 2007, J Invest Dermatol. 127(3):594-604) に対する化学走化性を示すことによる適応的

40

50

免疫反応へのデフェンシンの寄与を含めて、デフェンシンが細菌の細胞に対する阻害を超える生物学的活性を示すことが注目されている。以前の研究は、ヒトベータデフェンシン 1 および 2 が C C - ケモカインレセプター 6 (C C R 6) を介して未熟な樹状細胞および T 細胞を化学的に引き付ける能力を備えていること (Yang, D., et al., 1999, Science 286(5439):525-8)、ならびに、ヒトベータデフェンシン 2 が T N F を用いて処理された好中球を、C C R 6 レセプターを介して化学的に引き付け得ること (Niyonsaba, F., H. Ogawa, and I. Nagaoka, 2004, Immunology 111(3):273-81) を示している。ヒト - デフェンシン 2 および 3 はまた、マクロファージ、単球および好中球において発現されるレセプターである C C R 2 と相互作用することによって走化性を誘導することが示されている (Rohrl, J., et al., 2010, J Immunol, 2010.)。興味深いことに、上記データは、s N A G による処理が、内皮細胞における - デフェンシンおよび - デフェンシンの両方の発現を誘導することを示している。以上のことをまとめて考えると、上記近年のデータは、デフェンシンが、抗菌特性によるのみではなく、適切な治癒に必要な他のタイプの細胞に対する化学走化性によって創傷治癒を媒介し得ることを示唆している。しかしながら、- デフェンシン 3 のみの適用では、結果として、創傷閉鎖の増加をもたらさず (データは示されていない)、このことは、単一のデフェンシンの局所的な適用では、化学誘引、細胞の動員および創傷閉鎖を増加させるために必要な細胞の相互作用を維持できないことを示唆している。

10

【 0 2 6 6 】

野生型動物および A k t 1 ノックアウト動物を使用した *in vivo* でのデータによって、s N A G によって誘導される - デフェンシン 3 の発現における A k t 1 の必要性が確認された。マウスの白血球は他の多くの哺乳類の白血球のようには - デフェンシンを発現しないため (Ganz, T., 2004, C R Biol. 327(6):539-49)、浸潤した免疫細胞の *in vivo* における - デフェンシンの染色は不可能であった。アルファデフェンシン 1 ~ 3 を用いた *in vitro* における気道上皮細胞に対する処理は、P 1 3 K および M A P K 経路の活性化を必要とする、投与量および時間に依存した細胞移動の増加を引き起こす (Aarbiou, J., et al., 2004, Am J Respir Cell Mol Biol. 30(2):193-201.)。内皮細胞に対する s N A G による刺激は、結果として M A P K の活性化を引き起こしており (Vournakis, J.N., et al., 2008, J Vasc Res. 45(3):222-32)、本明細書に提示されているデータでは、M E K の薬理的阻害によっても *in vitro* におけるデフェンシンの発現が阻害されている。上記研究結果は、両方の経路が s N A G によるデフェンシンの発現の制御に影響を与えているが、A k t 1 の除去は結果として *in vitro* および *in vivo* の両方においてデフェンシンの発現を顕著に減少させることを示唆している。骨髄性細胞において、- デフェンシン 1 の発現は、転写レベルで制御されており、部分的には E t s ファミリーメンバー P U . 1 によって制御されている (Yaneva, M., et al., 2006, J Immunol. 176(11):6906-17; および Ma, Y., Q. Su, and P. Tempst, 1998, J Biol Chem. 273(15):8727-40.)。P U . 1 は B 細胞系列における A k t 1 の下流の標的である (Rieske, P. and J.M. Pongubala, 2001, J Biol Chem. 276(11):8460-8.)。初代内皮細胞に関しては、Drosophila の気管の発達の間、*in vitro* および *in vivo* の両方において A k t 1 は E t s 1 の上流にあることが示されている (Lavenburg, K.R., et al., 2003, FASEB J. 17(15):2278-80.)。内皮細胞に対する s N A G による刺激は、結果として、E t s 1 の発現の増加をもたらす (おそらく A k t 1 を介して)。当該 E t s 1 の発現の増加は、内皮細胞の移動のために必要とされる (Vournakis, J.N., et al., 2008, J Vasc Res. 45(3):222-32.)。

20

30

40

【 0 2 6 7 】

ここまでは、s N A G による処理は、結果として一連の下流の活性をもたらしてきた；止血、細胞移動、細胞増殖、創傷閉鎖の増加、および本明細書に記載されているような、結果的に抗菌機能をもたらす先天性免疫応答に対する刺激。

【 0 2 6 8 】

慢性的な創傷、および、創傷感染に起因する合併症を示している集団中における糖尿病患者の劇的な増加を考慮すると、新しい臨床治療について大きな需要がある。本明細書に

50

は、海洋由来の p G l c N A c ナノファイバーが記載されており、当該ナノファイバーは創傷治癒の速度を増加させるだけではなく、先天性免疫を刺激するように作用し、抗菌活性を提供する。上記観察において明らかに重要な点は、院内感染への適用である。院内感染においては、外科創傷の感染が主流である；統計では、最大で全ての外科患者の 8 % であることが示されている。上記の種類の感染の直接的なコストは、1 年あたり、およそ 4 . 5 億ドルである。デフェンシンが先天性免疫システムの一部であることを考慮すれば、上記経路の活性化は、抗生物質に依存しない細菌の感染の解消を可能にするとともに、耐性を有する生物の発生を防ぎ得る。院内の環境での s N A G の利用は、上記コストの多くを負担し、抗生物質耐性の種の産生を顕著に減少させ得る。以上のことをまとめて考えれば、上記研究結果は、上記海洋由来の p G l c N A c ナノファイバーが臨床的領域において非常に有益であり得ることを示唆している。 10

【 0 2 6 9 】

〔 6 . 3 実施例 3 : s N A G は *Pseudomonas aeruginosa* に対して効果的な抗菌剤である 〕

本実施例は、s N A G ナノファイバーが *in vivo* において *Pseudomonas aeruginosa* に対する抗菌効果を備えていることを実証している。

【 0 2 7 0 】

材料および方法：8 ~ 12 週齢の間の雄の野生型 C 5 7 B 1 / 6 マウスに、4 mm の生検パンチ (Miltex) を使用して創傷を形成し、それぞれの脇腹に 2 つの同一の創傷を形成した。マウスには、O₂/Isoflurane vaporizing anesthesia machine (VetEquip, Inc.) を使用して麻酔をかけた。イソフルレンは、誘導のために 4 %、手術のために 2 % を使用した。手術の前に体毛を除去した。*Pseudomonas aeruginosa* を採集し、37 °C で一晩培養して吸光度 O D₆₀₀ = 0 . 53 になるまで調整した。各創傷には、1 . 5 × 10⁹ c f u / m l の *P. aeruginosa* を接種した。創傷は、感染から 30 分後に蒸留水を用いて湿らせた s N A G 膜を用いて処理するか (試験グループ、n = 6)、または未処理のまま放置するか (コントロールグループ、n = 6) のいずれかとした。3 日目に動物を安楽死させ、8 mm の生検パンチ (Miltex) を使用して全創傷を周囲の皮膚も含めて採集した。動物 1 匹あたり 1 つの創傷を、4 % パラホルムアルデヒドを用いて 4 °C で一晩固定し、パラフィン中に包埋し、分析のために切断した。また、細菌の定量のために、他の創傷を培養し、抗生物質を含まない L B 培地中に蒔いた。培養のために、創傷切片を 0 . 5 m l 細菌培地中に配置し、37 °C で 30 分間振動させながら培養した。37 °C で一晩培養した連続希釈液を使用して、コロニー形成単位 (C F U) を定量した。1 回の培養 / 1 つの希釈液あたりのコロニーの数を数え、C F U / m l を計算した。 20 30

【 0 2 7 1 】

結果：グラム陰性細菌に感染した創傷に対する s N A G による処理の効果を評価した。図 1 4 に示されているように、s N A G を用いて処理された動物では、未処理の動物に比べて、細菌の数が顕著に減少した (2 倍を上回る倍率で)。上記研究結果は、s N A G による処理が、結果として、感染した皮膚創傷においてグラム陰性細菌 (特に *P. aeruginosa*) の細菌量を顕著に減少させることを示唆している (実施例 2 に示されているグラム陽性細菌の細菌量の減少に加えて)。 40

【 0 2 7 2 】

〔 6 . 4 実施例 4 : s N A G ナノファイバーは、多くのデフェンシンおよび T o l l 様レセプター遺伝子の発現を上方制御する 〕

本実施例は、多くのデフェンシンおよび T o l l 様レセプターが、ヒト内皮細胞に対する s N A G による処理によって上方制御されることを実証している。

【 0 2 7 3 】

材料および方法：Human Chip probes をエポキシスライド上にプリントした。H U V E C 細胞を、セクション 6 . 2 に記載したように培養し、s N A G ナノファイバー (s N A G) を用いて 5 時間処理した。RNAsol (Teltest, Inc.) を用いて、製造者の指示に従って R N A を抽出し、当該 R N A を Amino Allyl MessageAMPTM II aRNA amplification kit (50

Applied Biosystems)を用いて増幅し、標識した。aRNAとのハイブリダイゼーションのために、上記スライドを、RT O/Nにてブロッキング溶液(1% BSA(w/v)、0.05%までのNaN₃を含む1000mlのdH₂O中に、Sigma Tris-buffered saline pH8.0を含む)に浸すことによって調製し、その後、当該スライドをすすぎ、乾燥させた。sNAGを用いて処理された細胞に由来する標識された標的aRNAを含んでいるサンプルを、上記スライドを用いてハイブリダイズさせ(65ul/スライド; 95で5分間変性; 0.1% SDSおよび5×SSCならびに1% BSA中で、37で48時間ハイブリダイズ)、その後、当該スライドをすすぎ、乾燥させた。Perkin-Elmer Scan Array equipmentおよびアップデートされたScanArray Express software V3.0を使用して、上記スライドをスキャンし、ハイブリダイゼーションを検出した。上方制御されている遺伝子を同定するために、Agilent GeneSpring GX v.11 Bioinformation Data Analysisを用いてマイクロアレイデータを分析した。

10

【0274】

分析を行った興味のある遺伝子: IL-1、CEACAM3、SPAG11、デフェンシン(「DEFA」= -デフェンシンおよび「DEFB」= -デフェンシン); Toll様レセプター(TLR)、SIGIRR(単一IG IL-1関連レセプター)、およびTRAF6(TNFレセプター関連因子6)。ポジティブコントロール: 1433Z(チロシン-3-モノヒドロゲナーゼ/トリプトファン5モノヒドロゲナーゼ活性化タンパク質); GAPD(グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ); RPL13A(リボソームタンパク質L13a); UBC(ユビキチンC); ACTB(アクチンB)。

20

【0275】

結果: マイクロアレイ遺伝子チップ解析の結果およびマイクロアレイの結果のQ-PCRによる検証が下記の表II~IVに示されている。特別注文の遺伝子チップを用いて、多くのデフェンシンおよびToll様レセプターがヒト内皮細胞のsNAGによる処理によって上方制御されると判断した。

【0276】

Toll様レセプター(TLR)は高度に保存されたレセプターであり、先天性免疫の活性化を引き起こす細菌の成分の特定の分子パターンを認識する。興味深いことに、Drosophilaは、適応的免疫システムを備えていないが、依然として微生物の感染に対して耐性を有している(Imler, J.L. and J.A. Hoffmann, 2000, Curr Opin Microbiol, 3(1):16-22.)。当該宿主防御は、TLRによって誘導される抗菌性ペプチドdTollおよび18ウィーラー(18-wheeler)を合成することによって防御を提供する先天性免疫システムの結果である(Lemaitre, B., et al., 1996, Cell 86(6):973-83;およびWilliams, M.J., et al., 1997, EMBO J. 16(20):6120-30.)。近年の研究はまた、ヒトのデフェンシンの発現をTLRの活性化と結びつけている。ヒト - デフェンシン2は、TLR-2に依存した様式で、気道上皮細胞中で誘導されることが示されていた(Hertz, C.J., et al., 2003, J Immunol. 171(12): p. 6820-6.)。Toll様レセプター4は、単球におけるChlamydia pneumoniaeに対する反応においてヒト - デフェンシン2の誘導を媒介することが示されている(Romano Carratelli, C., et al., 2009, FEMS Immunol Med Microbiol. 57(2):116-24.)。重要なことは、病原体に対する細胞応答を制御するTLRシグナル伝達において、P13K/Akt経路が鍵となる要素であるということである(Weichhart, T. and M.D. Saemann, 2008, Ann Rheum Dis. 67 Suppl 3:iii70-4.)。TLRの刺激はデフェンシンの合成を増加させ得るため、上記研究は、Akt1の活性化を介した先天性免疫および細菌除去の刺激因子としてのsNAGの可能性を示唆している。

30

40

【0277】

【表 3】

表 II :sNAGによる刺激に対する反応において上方制御されるいくつかの遺伝子の表

遺伝子	機能
IL-1	免疫防御に関連する炎症誘発サイトカイン
CEACAM3	いくつかの細菌の種の食作用に対する細胞接着分子
SPAG11	抗菌性を示す β -デフェンシン-3様分子
デフェンシン	抗菌活性を示す一連のデフェンシン
TLRs	Toll様レセプター:感染に対する細胞応答の刺激のために重要

遺伝子	リガンド/機能	誘導倍率
TLR1	細菌およびマイコバクテリアに由来するトリアシルリポペプチド	7.6
TLR4	LPS, ウイルスタンパク質, Hsp60 (クラミジア)	5.064
TLR7	合成化合物	3.271
TLR8	合成化合物	2.067
TRAF6	下流シグナル調節因子	6.167
SIGIRR	TLR調節因子に関連するIL-1レセプター	5.895

10

【 0 2 7 8 】

【表 4】

表Ⅲ:デフェンシンマイクロアレイ遺伝子発現

(sNAG 10ug/ml 5 時間に対する HUVEC の応答)

遺伝子名 (オリゴ ID)	正規化された HUVEC_10s_48h37C (倍率)
D107A_HUMAN [H300005354]	4.2 (2.6 to 5.2)
DEFA4 [H200000646]	4.2 (3.243 to 4.946)
DEFA5 [H200005803]	4.8 (3.664 to 6.123)
DEFB1 [H200004191]	2.7 (1.7 to 3.7)
DEFB103A [H300008014]	9.8 (7.4 to 12.5)
DEFB118 [H200017001]	2.7 (1.502 to 4.779)
DEFB119 [H300002796]	6.2 (4.68 to 8.04)
DEFB123 [H300009262]	8.9 (7.791 to 11.1)
DEFB124 [H300001942]	3.8 (1.6 to 5.1)
DEFB126 [H200012496]	9.2 (8.286 to 10)
DEFB129 [H300005026]	5.2 (4.338 to 6.277)
ACTB_HUMAN [H300006234]	6.8 (6.603 to 7.284)
GAPD [H200007830]	16.9 (12.81 to 21.13)
RPL13A [opHsV04TC000041]	9.4 (7.311 to 12.01)
UBC [H200014214]	7.2 (5.789 to 9.979)
1433Z_HUMAN [opHsV04TC000038]	0.6 (0.4 to 0.844)

10

20

30

【 0 2 7 9 】

【表 5】

表IV:DEFB3 マイクロアレイ遺伝子検証

(AB Prism 7000; sNAG (10ug/ml), HUVEC 5時間)

TaqMan 相対的 qPCR の変化倍率の計算 (A B I 法)

サンプル	DEFB3	1433z	$\Delta Ct =$ DEFB3 - 1433z	$\Delta\Delta Ct =$ ΔCt 処理済み - ΔCt 未処理	未処理と比較した DEFB3 における 倍率の差
未処理	37.41±0.74	14.71±0.26	22.7±0.78	0.00±0.78	1.4 (1.22-1.7)
処理済み	40.30±1.0	17.84±0.07	22.46±1.0	-0.24±1.0	1.8 (1.24-2.36)

10

20

【 0 2 8 0 】

【表 6】

表 V :Toll 様レセプターマイクロアレイ遺伝子発現

遺伝子名 (オリゴ I D)	変化倍率
SIGIRR [opHsV0400002471]	5.895 (3.916 to 7.926)
TLR1 [H300000701]	7.612 (3.796 to 11.33)
TLR4 [H200007406]	5.064 (1.085 to 10.66)
TLR7 [H200008345]	3.271 (1.938 to 3.938)
TLR7 [H300006695]	2.2 (1.5 to 2.7)
TLR8 [H200016915]	2.067 (1.8 to 2.2)
TRAF6 [H200010465]	6.167 (5.2 to 7)
1433Z_HUMAN [opHsV04TC000038]	0.573 (0.4 to 0.844)

30

40

【 0 2 8 1 】

【表 7】

表VI:TLR1 および 4 のリアルタイム Q-PCR 遺伝子検証
(HUV EC, 10ug/ml sNAG 5時間)

サンプル	標的 C_T 平均	標的 C_T sd	参照 (14332) C_T 平均	参照 (14332) C_T sd	$\Delta C_T =$ 標的 C_T - 14332 C_T	ΔC_T sd = $(S^2_{\text{標的}} + S^2_{\text{参照}})^{1/2}$	$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ 試験 サンプル (処理済み) - ΔC_T 校正 (未処理)	$\Delta\Delta C_T$ sd = ΔC_T sd	上昇 倍率 $2^{-(\Delta\Delta C_T \text{sd})}$	下降 倍率 $2^{-(\Delta\Delta C_T \text{sd})}$	平均 倍率
TLR1											
未処理	31.12	1.2	17.84	0.34	13.28	1.25	0	1.25	0.42	2.37	0.83
処理済み	28.54	0.37	17.53	0.2	11.01	0.42	-2.27	0.42	3.60	6.46	5.03
TLR4											
未処理	26.97	0.44	17.84	0.34	9.13	0.56	0	0.56	0.68	1.47	0.62
処理済み	25.04	0.38	17.53	0.2	7.51	0.43	-1.62	0.43	2.28	4.14	3.21

【0282】

〔6.5 実施例5：sNAGと長い繊維であるNAGとは、遺伝子発現プロファイルにおいて異なる〕

本実施例は、sNAGナノファイバーが、長いp-GlcNAc繊維とは遺伝子発現に対する効果において異なり、特に、いくつかのデフェンシンおよびToll様レセプターの発現に対する効果において異なることを実証している。

【0283】

材料および方法：標準的な技術を用いて、Human Defensin Chip probes (濃度：20 uM、質量 18 - 20、溶媒：SSCをベースとするスポッティングバッファー) をエポキシスライド上にプリントした。HUV ECおよびHaCat細胞を、セクション6.2

10

20

30

40

50

に記載されているように培養し、長い繊維 (L N A G) または s N A G ナノファイバー (s N A G) のいずれかを用いて 2 時間または 2 0 時間処理した。RNAsol (Teltest, Inc.) を用いて、製造者の指示に従って R N A を抽出し、当該 R N A を Amino Allyl MessageAMPTM II aRNA amplification kit (Applied Biosystems) を用いて増幅した。R N A の増幅の間、L N A G を用いて処理した細胞に由来する a R N A と s N A G を用いて処理した細胞に由来する a R N A とを、C y 3 または C y 5 蛍光色素を用いて別々に標識した。a R N A とのハイブリダイゼーションのために、上記スライドを、R T O / N にてブロッキング溶液 (1 % B S A (w / v)、0 . 0 5 % までの N a N ₃ を含む 1 0 0 0 m l の d H ₂ O 中に、Sigma Tris-buffered saline pH8.0 を含む) に浸すことによって調製し、その後、当該スライドをすすぎ、乾燥させた。L N A G を用いて処理された細胞および s N A G を用いて処理された細胞に由来する別々に標識された標的 a R N A を等量で含んでいるサンプルを混合し、上記スライドを用いてハイブリダイズさせ (6 5 u l / スライド ; 9 5 ° で 5 分間変性 ; 0 . 1 % S D S および 5 × S S C ならびに 1 % B S A 中で、3 7 ° で 4 8 時間ハイブリダイズ)、当該スライドをすすぎ、乾燥させた。以下の表 V I I 中の典型的な図は、実験条件を示している :

10

【 0 2 8 4 】

【表 8】

表VII:

aRNA の標識

名前	aRNA ng/ul (100ul)	260/280 nm	標識(ul)に 対して 20ug	使用した 色素	標識された 濃度 Pmol/ul	260/280 aRNA の総量 (20ul)	標識された
HaCat_e14d3_ctr	897.42	2.09	22.29	cy3	851.58	1.34	17031.6
HaCat_e14d3_LNAG100	1339.08	2.07	14.94	cy5	687.01	1.87	13740.2
HaCat_e14d3_sNAG100	1515.62	2.05	13.20	cy5	519.15	1.93	10383
HUVEC_e18d4_ctr	1656.37	2.05	12.07	cy3	529.11	1.88	19577.07
HUVEC_e18d4_LNAG100	1078.63	2.07	18.54	cy5	760.26	1.9	15205.2
HUVEC_e18d4_sNAG100	1447.87	2.06	13.81	cy5	617.57	1.84	12351.4
							37ul

標識された aRNA のハイブリダイゼーション

サンプルID	aRNA の 総量/ スライド (ng)	aRNA の濃度 (ng/ul)	総体積 (ul)	10% SDS (ul)	20xSSC (ul)	D H ₂ O (ul)	総体積 (ml)	チップ	
								ID	チップ
HaCat	Actr	800	0.9	2	50	125.9	200	D1038	D1034
	ALNAG100 (Mix 1)	800	1.2	0	0				
	Actr	800	0.9	2	50	125.5	200	D1037	D1033
	AsNAG100 (Mix 2)	800	1.5	0	0				
HUVEC	Vctr	800	1.5	2	50	125.4	200	D1036	D1032
	VLNAG100 (Mix 3)	800	1.1						
	Vctr	800	1.5	2	50	125.2	200	D1035	D1031
	VsNAG100 (Mix 4)	800	1.3						

【0285】

Perkin-Elmer Scan Array equipmentおよびアップデートされたScanArray Express software V3.0を使用して、上記スライドをスキャンし、ハイブリダイゼーションを検出した。各スライドについて、Cy 3、Cy 5および混合した蛍光 (composite fluorescence) を視覚化した。上方制御および下方制御されている遺伝子を同定するために、Agilent GeneSpring GX v.11 Bioinformation Data Analysisを用いてマイクロアレイデータを分析した。分析を行った興味のある遺伝子: DEFA1、DEFA3、DEFA4、DEFA5、DEFA6、DEFB1、DEFB013A、DEFB104A、DEFB105B、DEFB108B、DEFB112、DEFB114、DEFB118、DEFB119、DEFB123、DEFB124、DEFB125、DEFB126、DEFB127、DEFB128、DEFB129、DEFB131、およびDEFB4 (「DEFA」 = -デフェンシンおよび「DEFB」 = -デフェンシン); TLR1、TLR10

、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7およびTLR8（「TLR」= Toll レセプター）；SIGIRR（単一IL-1関連レセプター）；IRAK2（IL-1レセプター関連キナーゼ1）；TRAF6（TNFレセプター関連因子6）；D106A（-デフェンシン106）、D107A（-デフェンシン107）。ネガティブコントロール：3つのランダム配列（1、2、3）。ポジティブコントロール：1433Z（チロシン-3-モノヒドロゲナーゼ/トリプトファン5モノヒドロゲナーゼ活性化タンパク質）；GAPD（グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ）；RPL13A（リボソームタンパク質L13a）；UBC（ユビキチンC）；ACTB（アクチンB）。

【0286】

10

結果：マイクロアレイ遺伝子チップ解析の結果が下記の表VIIおよびIXに示されている。表VIIは、ヒト臍静脈内皮細胞（HUEC）における、LNA GファイバーまたはsNAGナノファイバーのいずれかに2時間または24時間接触させた後の遺伝子の発現を示している。表IXは、ヒトケラチノサイト細胞株（HaCat）における、LNA GファイバーまたはsNAGナノファイバーのいずれかに2時間または24時間接触させた後の遺伝子の発現を示している。上記結果は、長いポリ-N-アセチルグルコサミン繊維（LNA G）によって誘導された遺伝子発現プロファイルがsNAGナノファイバー（sNAG）によって誘導された遺伝子発現プロファイルとは異なることを実証している。特に、LANGとsNAGとは、デフェンシン遺伝子およびToll様レセプター遺伝子の発現に対する効果において異なる。

20

【0287】

【表 9】

表Ⅷ:ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)におけるマイクロアレイデフェンシン遺伝子発現、変化倍率

名前	[2h, LNAG]	[2h, sNAG]	名前	[20h, LNAG]	[20h, sNAG]
1433Z_HUMAN	0.039	0.329	1433Z_HUMAN	-0.046	-0.180
ACTB_HUMAN	-0.140	0.032	ACTB_HUMAN	0.874	-0.413
D106A_HUMAN	-1.376	-0.195	D106A_HUMAN	1.107	0.522
D107A_HUMAN	1.825	1.431	D107A_HUMAN	-1.007	0.372
DEFA1	0.407	-1.107	DEFA1	-0.333	0.384
DEFA3	0.000	0.528	DEFA3	1.195	-2.335
DEFA4	-1.007	-0.123	DEFA4	0.496	2.636
DEFA5	-0.863	0.451	DEFA5	-0.287	-0.476
DEFA6	1.969	0.805	DEFA6	0.333	-1.402
DEFB1	0.315	1.441	DEFB1	1.933	0.413
DEFB103A	1.426	1.486	DEFB103A	0.628	1.348
DEFB104A	1.296	2.260	DEFB104A	1.543	0.344
DEFB105B	0.616	0.667	DEFB105B	0.723	-0.162
DEFB108B	2.210	0.441	DEFB108B	0.351	1.895
DEFB112	0.000	-0.528	DEFB112	-0.862	1.107
DEFB114	0.000	0.667	DEFB114	-0.862	1.799
DEFB118	-0.142	0.631	DEFB118	0.456	0.577
DEFB119	0.137	1.472	DEFB119	0.808	-1.530
DEFB123	1.664	1.814	DEFB123	0.390	-0.375
DEFB124	1.242	1.533	DEFB124	1.113	1.357
DEFB125	1.169	1.969	DEFB125	1.269	-2.053
DEFB126	-0.064	0.801	DEFB126	1.818	0.385
DEFB127	1.723	0.000	DEFB127	0.000	1.085
DEFB128	1.602	-0.528	DEFB128	0.805	2.238
DEFB129	1.528	0.407	DEFB129	1.936	-0.005
DEFB131	-0.333	0.636	DEFB131	-0.723	-0.608
DEFB4	0.406	0.567	DEFB4	0.401	-0.190
GAPD	0.420	0.602	GAPD	0.616	0.324
IRAK2	-0.035	1.106	IRAK2	1.084	0.984
RPL13A	0.671	1.329	RPL13A	0.789	0.208
SIGIRR	0.358	1.481	SIGIRR	1.870	-0.050
TLR1	-0.194	1.089	TLR1	0.196	-0.631
TLR10	0.000	-0.333	TLR10	-0.528	0.644
TLR2	0.653	2.078	TLR2	1.848	4.494
TLR3	-0.528	-0.333	TLR3	-1.484	-1.361
TLR4	0.613	2.073	TLR4	2.616	0.634
TLR5	1.723	1.181	TLR5	0.723	-0.417
TLR6	1.333	0.528	TLR6	0.246	-0.482
TLR7	1.839	1.274	TLR7	-0.160	0.199
TLR8	-0.033	0.843	TLR8	-0.371	1.219
TRAF6	1.569	0.472	TRAF6	0.731	3.266
UBC	-0.285	0.072	UBC	-0.009	-0.265

【 0 2 8 8 】

【表 10】

表IX:ヒトケラチノサイト細胞株(HaCat)におけるマイクロアレイデフュージョン遺伝子発現、
変化倍率

名前	2h, LNAG	2h, sNAG		名前	20h, LNAG	20h, sNAG
1433Z	0.255	-0.282		1433Z	0.000	0.205
GAPD	0.041	-0.191		GAPD	0.000	0.378
RPL13A	-0.532	0.698		RPL13A	0.000	-1.187
UBC	0.136	-0.065		UBC	0.834	-0.023
ACTB	0.130	0.447		ACTB	0.333	0.988
ネガティブ コントロール	0.000	0.000		ネガティブ コントロール	0.000	0.000
ネガティブ コントロール	0.000	0.000		ネガティブ コントロール	0.000	0.000
ネガティブ コントロール	0.000	0.000		ネガティブ コントロール	0.000	0.000
DEFB1	-0.647	1.390		DEFB1	-0.333	-0.426
DEFB126	0.348	1.737		DEFB126	1.000	0.744
DEFB129	0.382	1.464		DEFB129	-0.528	-0.931

【0289】

〔6.6 実施例6：sNAG膜に対する放射線照射の効果〕

sNAG膜の調製方法。当該sNAG膜は、以前に記載されているように生産された微細藻類のpGlcNAc繊維に由来している（Vournakis et al. 米国特許第5,623,064号；および第5,624,679号を参照されたい。それぞれの文献の内容は、全て参照によって本明細書中に引用される）。要約すれば、規定された増殖培地を使用して、独自のバイオリアクター条件にて微細藻類を培養した。高密度の培地から微細藻類を採集した後、段階的な分離および精製工程を介して繊維を単離し、結果として注射用蒸留水（wfi）中に懸濁した純粋な繊維のバッチを得た。繊維を凝縮してオープンを用いて乾燥させることによってバッチを形成し、包装し、ガンマ線を放射して滅菌した。繊維の寸法は、平均的には20～50nm×1～2nm×～100μmである。化学的および物理的な試験パラメータを用いて、繊維のバッチの品質を個別に管理した。各バッチは発売前に厳しい純度の基準を満たしていた。最終的なバッチは実質的にタンパク質、金属イオンおよび他の成分を含んでいないことが要求された。その後、放射線の照射によって上記繊維を短くし、sNAG膜を製造した。要約すれば、上記出発物質は、60gのpGlcNAcスラリーを1mg/mLの濃度で含んでいた。上記pGlcNAcスラリーの濃度は、5mLを0.2μmフィルターを用いて濾過することで確認した。15gのpGlcNAcを含んでいる15LのpGlcNAcスラリーを、ウェットケーキが形成されるまで濾過した。その後、上記ウェットケーキを、ガンマ線照射に対応した容器であるホイルの袋へと移し、当該ウェットケーキに200kGyのガンマ線を照射した。図15Aに反映されているように、pGlcNAc組成物に対する他の照射条件が与える効果についても試験した。

【0290】

10

20

30

40

50

p G l c N A c 膜に対する放射線照射の効果。放射線照射は、p G l c N A c の分子量を減少させる一方、上記繊維の分子構造を乱すことはなかった。p G l c N A c には異なる条件下で放射線を照射した：凍結乾燥させた材料；乾燥させた膜；濃縮したスラリー（30：70（体積あたりの重量））；希釈したスラリー（5 m g / m l ）。好適な分子量の減少（分子量 500,000 ~ 1,000,000 ダルトンまでの減少）は、乾燥したポリマーに対しては 1,000 k g y の照射線量、湿ったポリマーに対しては 200 k g y の照射線量にて達成された（図 15 A）。

【0291】

繊維の化学的構造および物理的構造は、赤外線（I R）スペクトルによって検証されている放射線照射（図 15 B）、元素アッセイ、および走査型電子顕微鏡（S E M）による分析の間、維持された。放射線が照射された繊維の顕微鏡による観察結果は、粒子の長さの減少を示している（図 15 C および 15 D）。上記繊維の大多数は、約 15 μ m 未満の長さであり、平均的な長さは約 4 μ m である。

10

【0292】

〔6.7 実施例 7：s N A G ナノファイバーと長い形態の p - G l c N A c 繊維とは、臍帯静脈内皮細胞の代謝率および血清除去における効果が異なる〕

材料および方法：複数のドナーに由来するプールされたヒト臍帯静脈内皮細胞（E C）（Cambrex）を、Cambrex の手順によって記載されているように E C 増殖培地 2 SingleQuots を追加した内皮基礎培地 2（Cambrex）中で 5 % C O₂ を用いて 37 で維持した。0.1 % ウシ胎仔血清（Gibco BRL）を追加した RPMI-1640 中で 80 ~ 90 % の密度にて 24 時間、血清飢餓の状態にさせ、その後、滅菌水（Marine Polymer Technologies, Inc., Danvers, Mass., USA によって提供）中で、VEGF 165 (20 ng/ml, R&D Systems) または高純度の p G l c N A c ナノファイバーもしくは s N A G ナノファイバーを図の記載に示されている量で用いて刺激した。細胞の増殖 / 生存を評価するために、2 つの異なるアッセイを利用した：血球計を用いた直接的な細胞計数によるトリパンブルー排除アッセイ、および、MTT（3 - (4,5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2,5 - ジフェニルテトラゾリウムプロミド）アッセイ。上記アッセイは製造者（Promega）によって記載されている手順に従った。

20

【0293】

結果 - p G l c N A c :

30

p G l c N A c は代謝率に影響を与えなかった。図 16 に示されているように、p G l c N A c は、結果として M T T アッセイによって計測される高い代謝率をもたらさなかった。以上のことは、当該ポリマー材料が細胞増殖の顕著な増加を引き起こしていなかったことを示している。

【0294】

p G l c N A c は、血清飢餓によって誘導される E C の細胞死を防止した。p G l c N A c 繊維が E C に対して直接的な影響を与えるかどうかを試験するために、VEGF、または異なる濃度の p G l c N A c 繊維を用いて、血清飢餓 E C 細胞を処理した。図 17 の血清飢餓の状態から 48 時間後および 72 時間後に示されているように、培養された細胞の総数（コントロール）に比べて、48 時間後および 72 時間後の細胞数は約 2 倍減少していた。48 時間では、当該細胞数の減少は、VEGF の追加、または、50 μ g / m l もしくは 100 μ g / m l のいずれかの p G l c N A c 繊維の追加によって救済された。72 時間では、当該細胞数の減少は、VEGF の追加によって救済され、または、100 μ g / m l の p G l c N A c 繊維の追加によって大多数が救済された。上記の結果は、VEGF のように p G l c N A c 繊維を用いた処理が、血清飢餓によって誘導される細胞死を防止したことを示している。

40

【0295】

結果 - s N A G :

s N A G によって誘導された代謝率の顕著な増加。M T T アッセイによって測定されたように、50、100 または 200 μ g / m l の s N A G は結果として、VEGF よりも

50

さらに高いECの代謝率をもたらした(図18)。

【0296】

sNAGは、血清除去によって誘導されるECの細胞死を防止しなかった。sNAG繊維がECに対して直接的な影響を与えるかどうかを試験するために、VEGF、または異なる濃度のsNAG繊維を用いて、血清飢餓EC細胞を処理した。図19に示されているように、血清飢餓の状態から48時間後では、培養された細胞の総数(コントロール)に比べて、細胞数は約2倍減少していた。当該細胞数の減少は、VEGFの追加によって救済されたが、50、100または200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のsNAG繊維の追加によっては救済されなかった。上記の結果は、sNAG繊維を用いた処理が、血清飢餓によって誘導される細胞死をVEGFのように防止しなかったことを示している。

10

【0297】

結論：上記の結果は、sNAGは、長い形態のpGlcNAcとは異なり、MTTアッセイにおける血清飢餓ECの代謝率を増加させ、トリパンブルー排除試験における血清飢餓ECのアポトーシスを救済しないことを実証している。

【0298】

〔6.8 実施例8：sNAGの前臨床試験〕

〔6.8.1 被験物質〕

上記のセクション6.2.1にて既に記載されている方法で製造されたsNAGを含んでいる被験物質を利用した。被験物質は、Marine Polymer Technologies, Inc.によって無菌状態で供給された。

20

【0299】

〔6.8.2 生体適合性試験 - L929 MEM溶出試験 - ISO 10993-5〕

マウス繊維芽細胞L929哺乳類細胞において、上記被験物質の生体適合性を試験した。被験物質に接触させた48時間後のL929細胞においては、生物反応性が観察されなかった(グレード0)。ポジティブコントロールの物質(グレード4)およびネガティブコントロールの物質(グレード0)から得られた細胞応答の観察により、試験システムの適切性が確認された。プロトコルの基準に基づけば、上記被験物質は、非毒性であり、国際標準化機構(ISO)の10993-5ガイドラインの溶出試験の要件を満たす。以下の表Xを参照されたい。

【0300】

30

【表 1 1】

表X:

時間	反応性のグレード											
	被験物質			コントロール								
				中間			ネガティブ			ポジティブ		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0時間	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24時間	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3
48時間	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4

10

グレード	反応性	反応ゾーンの説明
0	なし	細胞内の顆粒は離散しており、細胞溶解はない
1	わずか	細胞の20%以下は丸く、緩く付着しており、細胞内の顆粒は見られない； 時折、溶解した細胞が存在する
2	軽度	細胞の50%以下は丸く、細胞内の顆粒は見られない； 広範な細胞溶解はなく、細胞間の空の領域はない
3	中程度	細胞層の70%以下は、円形の細胞を含んでいるか、または溶解している
4	重度	細胞層のほぼ完全な崩壊

20

【0301】

〔6.8.3 筋肉内への埋め込み試験 - ISO - 4週間の埋め込み〕

〔6.8.3.1 材料および方法〕

上記被験物質が局所毒性を誘導する可能性を評価するために、筋肉内への埋め込み試験 - ISO - 4週間の埋め込み（筋肉内への埋め込み試験）を利用した。要約すれば、ニュージーランドホワイト種のウサギの傍脊椎筋肉組織中に4週間、被験物質を埋め込んだ。その後、2つのコントロールの物質を用いて、別々に上記試験物質を評価した：ポジティブコントロールであるSurgicel（Johnson and Johnson, NJ）およびネガティブコントロールである高密度ポリエチレン（ネガティブコントロールプラスチック）。

30

【0302】

被験物質およびコントロール物質の調製。上記被験物質を測定すると、幅がおよそ1 mmであり、長さが10 mmであった。上記2つのコントロール物質を調製した。上記ポジティブコントロールのSurgicel（C1）を測定すると幅がおよそ1 mm、長さが10 mmであった。当該Surgicelは滅菌された。ネガティブコントロールプラスチック（C2）は、測定すると幅がおよそ1 mm、長さが10 mmであり、70%エタノール中に浸すことによって滅菌された。

【0303】

投与前の処理。埋め込みの前に各動物の体重を計測した。試験の日に、上記動物の背面を毛がなくなるように刈り、電気掃除機を用いてまとまっていな毛を除去した。各動物には適切に麻酔をかけた。埋め込みの前に、手術準備用の溶液を用いて上記領域を拭いた。

40

【0304】

投与（Dose Administration）。4つの被験物質の試験片（strip）をそれぞれのウサギの傍脊椎筋肉へと外科的に埋め込んだ（中線からおよそ2.5 cmであって、脊柱に平行であり、かつ、互いにおよそ2.5 cmの位置）。上記被験物質の試験片を脊椎の片側に埋め込んだ。同様に、ポジティブコントロール物質の試験片（Surgicel）を反対側の筋肉に埋め込んだ。2つのネガティブコントロールの試験片（ネガティブコントロールプラスチック）を、上記被験物質が埋め込まれた部位およびC1コントロールが埋め込まれた部

50

位に対して尾の側であって（尾に向かって）、脊椎の両側である部位に埋め込んだ（合計で4つの試験片）。評価には、合計で少なくとも8つの被験物質の試験片および8つの各コントロール物質の試験片が必要である。

【0305】

投与後の処理。上記動物を4週間維持した。埋め込み位置における適切な治癒を裏付けるため、および、毒性の臨床的徴候のため、上記期間は毎日、上記動物を観察した。観察には全ての臨床症状が含まれた。上記観察期間の最後には、上記動物の体重を測定した。各動物を、注射可能なバルビツール酸系催眠薬によって殺した。出血させずに組織を切断するために十分な時間を経過させた。

【0306】

巨視的な観察。上記被験物質またはコントロール物質が埋め込まれた傍脊椎筋肉を、各動物から完全に切除した。外科用メスを用いて埋め込み部位周辺を慎重に切り、組織を取り出すことによって、筋肉組織を除去した。組織病理学的評価のために完全な組織を崩壊させ得る過度の侵襲的処置を用いずに、上記切除された埋め込み組織を肉眼で見て調べた。上記組織を、10%中性緩衝ホルマリンを含んでいる適切に標識された容器中に配置した。

【0307】

組織病理学的検査。ホルマリン中で固定した後、上記埋め込み部位のそれぞれを、より大きな組織の塊から切除した。埋め込み材料を含んでいる上記埋め込み部位を肉眼によって調べた。炎症、被包、出血、壊死および変色の徴候について、以下の基準を用いて各部位を検査した：

- 0 = 通常
- 1 = 軽度
- 2 = 中程度
- 3 = 顕著

肉眼による観察の後、上記埋め込み材料をそのままの位置に放置し、埋め込み部位を含んでいる組織の薄片を処理した。ヘマトキシリン・エオジン染色切片の組織学的スライドをToxikonによって調製した。上記スライドを光学顕微鏡検査によって評価し、グレード付けをした。

【0308】

埋め込みによる影響の病理学的評価。各埋め込み部位について、顕微鏡観察によって生体反応の以下のカテゴリーを評価した：

- 1. 炎症反応
 - a. 多形核白血球
 - b. リンパ球
 - c. 好酸球
 - d. 形質細胞
 - e. マクロファージ
 - f. 巨細胞
 - g. 壊死
 - h. 変質
- 2. 治癒反応
 - a. 線維形成
 - b. 脂肪浸潤。

【0309】

以下の基準を用いて、反応の各カテゴリーをグレード付けした。

- 0 = 通常
- 0.5 = ごくわずか
- 1 = 軽度
- 2 = 中程度

10

20

30

40

50

3 = 顕著。

【0310】

埋め込み／組織界面から、影響を受けていない領域（通常の組織および通常の血管分布の特性を示す領域）までの幅を評価することによって、病変部の相対的なサイズを採点した。病変部の相対的なサイズは、以下の基準を用いて採点された：

0 = 0 mm、部位なし

0.5 = 最大で 0.5 mm まで、ごくわずか

1 = 0.6 ~ 1.0 mm、軽度

2 = 1.1 ~ 2.0 mm、中程度

3 = > 2.0 mm、顕著。

10

【0311】

筋肉内への埋め込み試験は、以下の参考文献に基づいて行われた：

1. ISO 10993-6, 1994, Biological Evaluation of Medical Devices - Part 6: Tests for Local Effects After Implantation.
2. ISO 10993-12, 2002, Biological Evaluation of Medical Devices - Part 12: Sample Preparation and Reference Materials.
3. ASTM F981-04, 2004, Standard Practice for Assessment of Compatibility of Biomaterials for Surgical Implants with Respect to Effect of Materials on Muscle and Bone.
4. ASTM F763-04, 2004, Standard Practice for Short Term Screening of Implant Materials.
5. ISO/IEC 17025, 2005, General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories.

20

【0312】

筋肉内への埋め込み試験の結果は、以下の基準に基づいて評価された：

1. 算出された評価：各埋め込み部位について、合計スコアを決定した。各動物の試験部位の平均スコアを、当該動物のコントロール部位の平均スコアと比較した。全ての動物の試験部位とコントロール部位との間の差の平均を求め、初期生物反応性評価を以下のように割り当てた：

0 ~ 0.5 反応なし *

> 1.5 ~ 3.5 軽度の反応

> 3.5 ~ 6.0 中程度の反応

> 6.0 顕著な反応

30

* 負の計算値は 0 として報告される。

2. 上記評価の修正：病理学的観察者が、算出された生物反応性のレベルを再検討した。全ての要因の観察に基づいて（例えば、相対的なサイズ、反応のパターン、炎症 vs 回復）、病理学的観察者が生物反応性評価を修正し得る。当該評価に対する修正の正当性は、説明的報告によって提示される（試験材料の生体適合性に関する記述的な説明的報告が病理学的観察者によって提示される）。

40

【0313】

〔6.8.3.2 結果〕

結果は、ポジティブコントロールの Surgicel に比べると、4 週間埋め込まれた場合の被験物質は非反応性（生物反応性評価は 0.2）であり、ネガティブコントロールの高密度ポリエチレン（ネガティブコントロールプラスチック）に比べると、非反応性（生物反応性評価は 0.0）であった。

【0314】

臨床的観察。下記の表 X I は、被験物質およびコントロールの埋め込み部位についての肉眼による評価の結果が、4 週間で顕著な炎症、被包、出血、壊死または変色の徴候を示さなかったことを表している。いくつかの試験部位およびポジティブコントロールの Surgicel の大多数は肉眼では見られず、一連の切片について顕微鏡による評価を行った。

50

【 0 3 1 5 】

【 表 1 2 】

表XI:

肉眼での観察
4週間の埋め込み

動物 No.: 60959

組織の部位	T1	T2	T3	T4	試験 平均	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	コントロール C1平均	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	コントロール C2平均
炎症	0	NSF	0	NSF	0	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
被包	0	NSF	0	NSF	0	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
出血	0	NSF	0	NSF	0	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
壊死	0	NSF	0	NSF	0	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
変色	0	NSF	0	NSF	0	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
全て	0	N/A	0	N/A		N/A	N/A	N/A	N/A		0	0	0	0	

10

動物 No.: 60961

組織の部位	T1	T2	T3	T4	試験 平均	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	コントロール C1平均	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	コントロール C2平均
炎症	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	NSF	0	0
被包	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	NSF	0	0
出血	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	NSF	0	0
壊死	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	NSF	0	0
変色	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	NSF	0	0
全て	N/A	N/A	N/A	N/A		N/A	N/A	N/A	N/A		0	0	N/A	0	

20

動物 No.: 60968

組織の部位	T1	T2	T3	T4	試験 平均	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	コントロール C1平均	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	コントロール C2平均
炎症	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
被包	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
出血	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
壊死	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
変色	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
全て	N/A	N/A	N/A	N/A		N/A	N/A	N/A	N/A		0	0	0	0	

30

T=試験部位(代表的な切片を顕微鏡による評価に使用した)

C1=Surgicel(材料の性質のため、代表的な切片を顕微鏡による評価に使用した)

C2=ネガティブコントロールの高密度ポリエチレン(ネガティブコントロールプラスチック)

グレード付けの基準

0=反応なし

1=軽度の反応

2=中程度の反応

3=顕著な反応

NSF=部位が見られない

N/A=該当なし

【 0 3 1 6 】

埋め込み部位の観察(顕微鏡による観察)。下記の表XIIは、顕微鏡による観察の結果、被験物質の埋め込み部位は、各コントロール物質の部位に比べて、炎症、線維形成、出血、壊死または変質の顕著な徴候を示さなかったことを表している。4週間における生物反応性評価は0.2(C1-Surgicel)および0.0(C2-ネガティブコントロールプラスチック)であり、どちらのコントロール埋め込み部位と比べても非反応性であったことを示している。病理学者は、in situの被験物質周辺で中程度の多形かつ組織球性(マクロファージ)の浸潤があったことを記述しており、このことは試験材料の性質を考慮しても予想外のことであった。

40

【 0 3 1 7 】

【表 1 3】

表XII:

顕微鏡での観察
4週間の埋め込み

動物 No.: 60959

カテゴリー	試験部位 **			コントロール部位							
反応	T1	T2	T3	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4
異物の破片	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
包含される領域の相対的なサイズ	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
* 多形	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* リンパ球	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* 好酸球	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* 形質細胞	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* マクロファージ	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
* 巨細胞	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* 変性	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* 壊死	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* 線維形成	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
* 脂肪浸潤	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.5	0.5	0.0	0.5
合計	1.5	2.0	2.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.0	1.5

T = 試験部位

C1 = Surgicel

C2 = ネガティブコントロールの高密度ポリエチレン(ネガティブコントロールプラスチック)

動物の試験スコア(平均*) = 2.0

動物のC1スコア(平均*) = 1.5

動物のC2スコア(平均*) = 1.4

動物のスコア(平均の試験スコア－平均のC1スコア) = 0.5

動物のスコア(平均の試験スコア－平均のC2スコア) = 0.6

※ 生物反応性の評価に使用される

※※ T4においては部位が見られなかった

【表 1 4】

表XII:

顕微鏡での観察(続き)
4週間の埋め込み

動物No: 60961

カテゴリー	試験部位 **			コントロール部位**					
反応	T1	T3	T4	C1-1	C1-3	C1-4	C2-1	C2-3	C2-4
異物の破片	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
包含される領域の相対的なサイズ	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
* 多形	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.5	0.5	0.5	0.5
* リンパ球	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* 好酸球	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* 形質細胞	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* マクロファージ	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
* 巨細胞	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* 変性	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
* 壊死	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* 線維形成	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
* 脂肪浸潤	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.5	0.5	0.5
合計	1.5	2.0	2.0	2.5	1.5	2.5	2.5	2.5	2.5

T = 試験部位

C1 = Surgicel

C2 = ネガティブコントロールの高密度ポリエチレン(ネガティブコントロールプラスチック)

動物の試験スコア(平均*) = 1.8

動物のC1スコア(平均*) = 2.2

動物のC2スコア(平均*) = 2.5

動物のスコア(平均の試験スコア－平均のC1スコア) = -0.4

動物のスコア(平均の試験スコア－平均のC2スコア) = -0.7

* 生物反応性の評価に使用される

*** T2、C1－2、およびC2－4においては部位が見られなかった

【表 15】

表XII:

顕微鏡での観察(続き)
4週間の埋め込み

動物 No.: 60968

カテゴリー	試験部位				コントロール部位**							
反応	T1	T2	T3	T4	C1-1	C1-2	C1-3	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	
異物の破片	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
包含される領域の相対的なサイズ	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
* 多形	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.5	
* リンパ球	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
* 好酸球	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
* 形質細胞	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
* マクロファージ	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
* 巨細胞	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
* 変性	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
* 壊死	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
* 線維形成	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
* 脂肪浸潤	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
合計	2.0	2.5	2.0	2.5	2.0	1.5	2.0	2.5	2.5	2.0	2.5	

T = 試験部位

C1 = Surgicel

C2 = ネガティブコントロールの高密度ポリエチレン(ネガティブコントロールプラスチック)

動物の試験スコア(平均*) = 2.3

動物のC1スコア(平均*) = 1.8

動物のC2スコア(平均*) = 2.4

動物のスコア(平均の試験スコア－平均のC1スコア) = 0.5

動物のスコア(平均の試験スコア－平均のC2スコア) = -0.1

* 生物反応性の評価に使用される

** C1-4においては部位が見られなかった

	C1	C2
動物のスコア 60759 =	0.5	0.6
動物のスコア 60961 =	-0.4	-0.7
動物のスコア 60968 =	0.5	-0.1

生物反応性の評価 = 0.2 = 反応なし

生物反応性の評価 = -0.1 = 反応なし

【0320】

〔6.8.4 皮内注射試験 - ISO 10993 - 10〕

注射用のUSP0.9%塩化ナトリウム(NaCl)および綿実油(CSO)による被験物質の抽出物について、ニュージーランドホワイト種のウサギに皮内注射した後に炎症を生じる可能性を評価した。上記被験物質部位は、コントロール物質を注射した部位に比べて顕著な生体反応を示さなかった。プロトコルの基準に基づけば、上記被験物質は無視できるほどの刺激物であると考えられ、ISO 10993 - 10のガイドラインの要件

を満たしている。結果は下記の表 X I I I に示されている：

【 0 3 2 1 】

【 表 1 6 】

表XIII:

皮内試験における皮膚反応スコア

NaCl 抽出物

動物 #	媒体	時間	部位番号 採点 (ER/ED)									
			T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
61917	NaCl	0 時間†	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		24 時間	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		48 時間	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		72 時間	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
61919	NaCl	0 時間†	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		24 時間	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		48 時間	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		72 時間	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
合計			0.0					0.0				

[†] = 注射の直後であり、評価基準としては使用しない

被験物質に対する全体の平均スコア* = 0.0

コントロール物質に対する全体の平均スコア* = 0.0

被験物質およびコントロール物質に対する全体の平均スコアの間の差 = 0.0-0.0 = 0.0

CSO 抽出物

動物 #	媒体	時間	部位番号 採点 (ER/ED)									
			T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
61917	CSO	0 時間†	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		24 時間	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		48 時間	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		72 時間	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
61919	CSO	0 時間†	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		24 時間	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		48 時間	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		72 時間	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
合計		0.0					0.0					

[†] = 注射の直後であり、評価基準としては使用しない

被験物質に対する全体の平均スコア* = 0.0

コントロール物質に対する全体の平均スコア* = 0.0

被験物質およびコントロール物質に対する全体の平均スコアの間の差 = 0.0-0.0 = 0.0

ER = 紅斑; ED = 水腫; T = 試験部位; C = コントロール部位

* 全体の平均スコア = 紅斑および水腫を足した合計スコアを 12 で割った値

(2 匹の動物 × 3 つの採点期間 × 2 つの採点カテゴリ)

【 0 3 2 2 】

〔 6 . 8 . 5 Kligman 極大化試験 - I S O 1 0 9 9 3 - 1 0 〕

注射用の U S P 0 . 9 % 塩化ナトリウム (N a C l) および綿実油 (C S O) による被験物質の抽出物は、Hartley系モルモットでは、誘導期に続く感作期間において皮内反応を発現しなかった (感作 0 %)。それゆえに、Kligmanの採点システムに規定されているように、上記結果はグレード I の反応であり、上記被験物質は弱いアレルギーポテンシャルを持っていると分類される。プロトコルの基準に基づけば、グレード I の感作率は顕著なものとは考えられず、上記被験物質は I S O 1 0 9 9 3 - 1 0 のガイドラインの要件を満たしている。結果は下記の表 X I V に示されている。

【 0 3 2 3 】

【表 17】

表XIV:

皮膚実験データ

グループ	動物 #	性別	スコア			感作された 動物の割合	アレルギー ポテンシャル
			25日目	26日目	27日目		
被験物質 (NaCl 抽出物)	1	雄	0	0	0	0%	弱い
	2	雄	0	0	0		
	3	雄	0	0	0		
	4	雄	0	0	0		
	5	雄	0	0	0		
	6	雌	0	0	0		
	7	雌	0	0	0		
	8	雌	0	0	0		
	9	雌	0	0	0		
	10	雌	0	0	0		
被験物質 (CSO 抽出物)	11	雄	0	0	0	0%	弱い
	12	雄	0	0	0		
	13	雄	0	0	0		
	14	雄	0	0	0		
	15	雄	0	0	0		
	16	雌	0	0	0		
	17	雌	0	0	0		
	18	雌	0	0	0		
	19	雌	0	0	0		
	20	雌	0	0	0		
ネガティブ コントロール (NaCl)	21	雄	0	0	0	0%	弱い
	22	雄	0	0	0		
	23	雌	0	0	0		
	24	雌	0	0	0		
	25	雌	0	0	0		
ネガティブ コントロール (CSO)	26	雄	0	0	0	0%	弱い
	27	雄	0	0	0		
	28	雌	0	0	0		
	29	雌	0	0	0		
	30	雌	0	0	0		
ポジティブ コントロール (DNCB)	31	雄	2	1	0	100%	極度に強い
	32	雄	2	2	1		
	33	雌	3	2	1		
	34	雌	3	2	1		
	35	雌	3	3	2		

感作率 (%)	グレード	階級
0-8	I	弱い
9-28	II	軽度
29-64	III	中程度
65-80	IV	強い
81-100	V	極度に強い

試験結果は、観察された感作の割合に基づいて解釈されている

【0324】

〔7. 参照による引用〕

個々の刊行物または特許出願のそれぞれが具体的に、かつ独立して参照によって引用されていることが示されているように、本明細書において引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、本明細書中に参照によって引用される。上記発明は明確な理解を目的として、図および実施例を用いて多少詳しく記載されているが、本発明の教示を考慮すれば、添付された請求項の精神または範囲から離れることなく特定の変更および修正が可能であることは当業者にとって直ちに明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0325】

【図1】ナノファイバーは、E t s 1の上流の調節因子であるA k t 1の活性化を刺激する。(A)血清飢餓E CのN A Gおよびs N A Gによる刺激に対する反応におけるホスホ-A k tのウェスタンブロット分析。(B)スクランブルコントロール(S C R)またはA k t 1 s h R N Aレンチウイルスのいずれかに感染したE CのR T - P C R分析であって、ローディングコントロールとしてE t s 1およびS 2 6の発現が評価されている。(C) s N A GナノファイバーからA k t 1、E t s 1またはデフェンシンへのシグナルを伝達するシグナル伝達経路の模式図。

【図2 A】A k t 1ヌル動物における創傷の治癒の遅延は、Taliderm処理によって部分的に救済される。(A) Taliderm処理あり、および、Taliderm処理なしの創傷を形成されたW TマウスおよびA K T 1ヌルマウスの代表的な図。

【図2 B】A k t 1ヌル動物における創傷の治癒の遅延は、Taliderm処理によって部分的に救済される。(B) 代表的なマウスの3日目の創傷に由来する皮膚切片のH & E染色。

【図3】s N A Gナノファイバーは、初代内皮細胞におけるサイトカインおよびデフェンシンの発現を刺激する。(A) a - デフェンシンに対する抗体を用いた、s N A Gあり、またはs N A Gなしで処理したE Cの免疫組織学的試験。(B) E Cのナノファイバー処理の結果、- デフェンシン1 - 3が分泌されたことを示すE L I S A (血清飢餓、5 μ g / m lまたは10 μ g / m lのs N A Gを用いて処理)。

【図4】s N A Gナノファイバーは、A k t 1に依存する様式で、初代内皮細胞におけるデフェンシンの発現を刺激する。(A) および(B) P D 9 8 0 5 9 (M A P K阻害剤、「P D」)、ウォルトマンニン(P 1 3 K阻害剤、「w t m」)ありもしくはなし、または、スクランブルコントロール(S C R)もしくはA k t 1 (A K T 1) s h R N Aレンチウイルスに感染した、s N A Gありまたはなし(s n a g)で処理された血清飢餓E C (s s)の定量的R T - P C Rであって、上記遺伝子の発現が評価されている。

【図5 A】s N A Gナノファイバーは、マウスのケラチノサイトにおける- デフェンシン3の発現を刺激する。(A) 3日目のW T動物およびA k t 1ヌル動物に由来するマウス皮膚の創傷切片であって、パラフィンに包埋された切片の、- デフェンシン3 (右上側のパネルにおいて明るい染色として見える; 例えば、太い白矢印を参照されたい) およびインボルクリンを用いた免疫蛍光染色。

【図5 B】s N A Gナノファイバーは、マウスのケラチノサイトにおける- デフェンシン3の発現を刺激する。(B) NIHImageJソフトウェアを用いた、- デフェンシン3の免疫蛍光染色の定量(T X = Taliderm; A k t 1 = A k t 1ヌル)。

【図5 C】s N A Gナノファイバーは、マウスのケラチノサイトにおける- デフェンシン3の発現を刺激する。(C) - デフェンシン3 (明るい染色として見える; 例えば、太い白矢印を参照されたい) およびT O P R O - 3 (核染色; 例えば、細い白矢印を参照されたい)を用いた、W TおよびA k t 1ヌルの処理済みのケラチノサイトおよび未処理のケラチノサイトの免疫蛍光染色。W TおよびA k t 1ヌルのTalidermで処理された創傷における- デフェンシン3の染色の増加に注目されたい。

【図6】A k t 1に依存した転写因子の結合部位。A k t 1に依存した転写因子の結合部位の模式図。Genomatixソフトウェアを用いて、D E F 1、4および5のm R N Aの保存部位について、転写開始部位の5 0 0 b p上流を分析した(E T S - 黒い楕円; F K H D - 縞模様の楕円; C R E B - 白い楕円; N F K B - チェックの楕円)。

【図7】s N A G処理の結果、in vitroにおいてデフェンシンが発現および分泌される。(A) 示された時間において、s N A G (50 μ g / m l)を用いて処理された血清飢餓(s s)初代内皮細胞のR T P C R分析であって、- デフェンシン3および- デフェンシン1の発現について評価されている。(B) 血清飢餓(未処理)の内皮細胞、またはs N A Gナノファイバー(10 μ g / m lで5時間)を用いて処理された内皮細胞のいずれかの免疫蛍光標識。抗体は、- デフェンシン5 (F I T C、左上側のパネル)、- デフェンシン3 (テキサスレッド、右上側のパネル)に対するものである。核はT O P R

10

20

30

40

50

O-3を用いて染色されている（青、左下側のパネル）。右下側のパネルは3重のオーバーレイを示している。（C）血清飢餓（未処理）のケラチノサイト、またはsNAGナノファイバー（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で5時間）を用いて処理されたケラチノサイトのいずれかの免疫蛍光標識（HaCat）。抗体は、
 - デフェンシン5（FITC、左上側のパネル）、
 - デフェンシン3（テキサスレッド、右上側のパネル）に対するものである。核はTOPRO-3を用いて染色されている（青、左下側のパネル）。

【図8】sNAGによって誘導されたデフェンシンの発現は、Akt1に依存している。（A）PD98059（PD）（ $50 \mu\text{M}$ ）、ウォルトマンニン（WTM）（ 100 nm ）あり、またはなしの、sNAGを用いた3時間の処理あり、またはなしの血清飢餓内皮細胞から分離された全RNAに由来する
 - デフェンシン1に対するプライマーを使用した定量的RT-PCR分析。定量はS26タンパク質サブユニットと比較されている。（B）PD98059（ $50 \mu\text{M}$ ）、ウォルトマンニン（ 100 nm ）を用いた処理あり、またはなしの、sNAGを用いた3時間の処理あり、またはなしの血清飢餓内皮細胞から分離された全RNAに由来する
 - デフェンシン3の発現の定量であって、当該定量はS26と比較されている。（C）示された時間においてsNAGを用いて刺激された血清飢餓内皮細胞（SS）中のホスホ-Aktのウェスタンブロット分析。ラインは、レーンが除去されている箇所を示している。（D）sNAGを用いた処理あり、またはなしの、スクランブルコントロール（SCR）またはAkt1 shRNAレンチウイルスに感染した血清飢餓内皮細胞の定量的RT-PCR分析であって、
 - デフェンシン4について評価されている。定量はS26と比較して示されている。（E）sNAGを用いた処理あり、またはなしの、スクランブルコントロール（SCR）またはAkt1 shRNAレンチウイルスに感染した血清飢餓内皮細胞から分離された全RNAに由来する
 - デフェンシン3の発現の定量。定量はS26と比較して示されている。全ての実験は、少なくとも3反復行われ、かつ、少なくとも独立して3回繰り返され、p値が示されている。

【図9】sNAGによって誘導されたin vivoにおけるデフェンシンの発現は、Akt1を必要とする。（A）WTマウス（ $n=3$ ）およびAkt1マウスの両方から、創傷形成から3日後に採集した皮膚の創傷の切片であって、パラフィンに包埋された切片。創傷は未処理であるか、またはsNAG膜を用いて処理されているかのいずれかであった。
 - デフェンシン3（緑、右上側のパネルにおいて明るい染色として見える；例えば、太い白矢印を参照）、インボルクリン（赤）およびTOPRO（青、核染色；例えば、細い白矢印を参照）に対する抗体を用いて、免疫蛍光を行った。（B）3日目に採集された、sNAGを用いて処理されたWT由来の切片であって、パラフィンに包埋された切片。
 - デフェンシン3（緑、右上側のパネルにおいて明るい染色として見える；例えば、太い白矢印を参照）、インボルクリン（赤）およびTOPRO（青、核染色；例えば、細い白矢印を参照）に対する抗体を用いて、免疫蛍光を行った。
 - デフェンシン3を発現している表皮層をうまく示すために、当該低倍率（ $20\times$ ）が含まれている。スケールバー = $50 \mu\text{m}$ 。（C）パラフィンに包埋された切片からの
 - デフェンシン3の発現の定量を、NIH ImageJソフトウェアを用いて行った。実験は、独立して3回繰り返され、p値が示されている。

【図10】sNAG処理は野生型マウスでの創傷の閉鎖を増加させる。未処理であるか、またはsNAG膜を用いて処理されているかのいずれかであるC57B16野生型動物に由来する創傷組織切片のH&E染色。創傷形成後の日数は各パネルの左側に示されている。黒い実線は、創傷の閉鎖を示しているケラチノサイト細胞層を示している。黒い矢印は、創床の縁を示している。

【図11A】sNAG処理は、Akt1に依存する様式で、細菌の感染を減少させる。（A）WTマウスに由来する、S. aureusに感染した創傷の組織グラム染色。WTマウスには4mm生検パンチを用いて創傷を形成した。創傷を形成した直後に、マウスに $1 \times 10^9 \text{ cfu}/\text{ml}$ 接種した。感染して30分後、Talidermを用いて処理グループのマウスを処理した。皮膚サンプルは処理から5日後に採集され、分析のために切断された。組織グラム染色を行った。暗い紫色の染色は、グラム陽性細菌と細菌を取り込んだ好中球とを示

している。20倍および40倍での断面図が示されている。

【図11B】sNAG処理は、Akt1に依存する様式で、細菌の感染を減少させる。(B)WTマウスおよびAkt1ヌルマウス($n=3$)に由来する、*S. aureus*に感染した創傷であって、パラフィンに包埋された創傷の組織グラム染色。感染した創傷は、未処理であるか、またはsNAG膜を用いて処理されているかのいずれかであって、分析のために創床を3日目および5日目に採集した。暗い紫色の染色は、創床におけるグラム陽性細菌の存在を示している。黒い矢印はグラム陽性染色の例を示している。未処理のWTにおける陽性染色の蓄積に注目されたい(当該蓄積は、sNAGを用いて処理されたWT動物においては見られない)。スケールバー=50 μ m。

【図11C】sNAG処理は、Akt1に依存する様式で、細菌の感染を減少させる。(C)創傷形成後5日目に由来するCFUを、処理された、および未処理のWTマウス($n=3$)およびAkt1ヌルマウス($n=3$)の両方を用いて、*S. aureus*に感染した創傷から定量した。Akt1ヌル動物に比べて、sNAGを用いて処理された野生型マウスでは、創床における細菌の量の顕著な減少を示した。全ての実験は、独立して3回繰り返され、p値が示されている。

【図11D】sNAG処理は、Akt1に依存する様式で、細菌の感染を減少させる。(D)(C)に記載された方法と同様にして、創傷形成後3日目における感染した創傷から定量されたCFU。感染した創傷のsNAG処理によって、3日目のWT動物およびAkt1ヌル動物の両方のCFUの顕著な減少が示されたが、Akt1動物では2倍の差であったのに比べて、WT動物では、およそ10倍の差を示した。

【図11E】sNAG処理は、Akt1に依存する様式で、細菌の感染を減少させる。(E)未処理であるか、または様々な量のsNAGナノファイバーを用いて処理されたかのいずれかである*S. aureus*培養物におけるCFUの定量。各実験は、独立して3回繰り返され、p値が示されている。

【図11F】sNAG処理は、Akt1に依存する様式で、細菌の感染を減少させる。(F)-デフェンシン3ペプチド(1.0 μ M)を用いて処理された、または当該ペプチドを用いずに処理されたWTマウス($n=3$)から創傷形成後3日目に採集された、*S. aureus*に感染した創傷の組織グラム染色。-デフェンシン3ペプチドを用いて処理された感染創傷におけるグラム陽性染色の減少に注目されたい。

【図11G】sNAG処理は、Akt1に依存する様式で、細菌の感染を減少させる。(G)-デフェンシン3ペプチドを用いて処理された、または当該ペプチドを用いずに処理された、*S. aureus*に感染したWTマウス($n=3$)からのCFUの定量。ペプチドを用いて処理された感染創傷では、CFUの顕著な減少が示された($p<.05$)。スケールバー=50 μ m。各実験は、独立して3回繰り返され、p値が示されている。

【図12】*S. aureus*に感染した創傷のsNAG処理によるデフェンシンの発現の急激な誘導。(A)3日目に採集された、*S. aureus*に感染した創傷に由来する組織切片であって、パラフィンに包埋された切片に対して、sNAGを用いて処理されたWTマウス($n=3$)および未処理のWTマウス($n=3$)の両方に由来する-デフェンシン3(緑、右上側のパネルおよび中央の下側のパネルにおいて明るい染色として見える；例えば、太い白矢印を参照)、ケラチノサイト層を標識するためのインボルクリン(赤)およびToppo(青、核染色；例えば、細い白矢印を参照)に対する抗体を用いて、免疫蛍光を行った。ケラチンの非特異的染色が、二次抗体のみを用いて染色された、一次抗体なしのコントロールによって示された。スケールバー=50 μ m。(B)NIH ImageJソフトウェアを用いた、パラフィンに包埋された切片からの-デフェンシン3の発現の定量。sNAGを用いて処理された、*S. aureus*に感染した創傷では、-デフェンシン3の染色の顕著な増加が示された($p<.05$)。実験は、独立して3回繰り返され、p値が示されている。

【図13】-デフェンシン3に対する抗体は、sNAG処理の抗菌効果を妨げる。(A)3日目に採集された、WTマウス($n=3$)に由来する、sNAGを用いて処理された*S. aureus*に感染した創傷であって、パラフィンに包埋された創傷の組織グラム染色。s

NAGを用いて処理された創傷は、sNAG処理の前に、-デフェンシン3抗体またはアイソトープコントロールIgG抗体のいずれかを用いて処理された。代表的な画像は、-デフェンシン3に対する抗体を用いて処理されたマウスの創床におけるグラム陽性染色（黒い矢印）の蓄積の増加を示している。スケールバー = 20 μm 。(B) sNAG処理の前に、-デフェンシン3抗体 (n = 3) またはコントロールIgG抗体 (n = 3) のいずれかを用いて処理された、*S. aureus*に感染したWTマウスに由来するCFUの定量。-デフェンシン3の適用により、CFUが顕著に増加した ($p < .05$)。

【図14】sNAG処理は、*Pseudomonas aeruginosa*による細菌感染を減少させる。マウスに4mm生検パンチを用いて創傷を形成し、 $1.5 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$ の*P. aeruginosa*を接種した。感染した創傷は、未処理 (n = 6) であるか、または感染から30分後にsNAG膜 (n = 6) を用いて処理 (n = 6) を行うかのいずれかとした。分析のために3日目に創床を採集し、30分間培養して蒔き (plated)、未処理の感染した創傷および処理済みの感染した創傷のCFUを定量した。sNAGを用いて処理されたマウスでは、未処理の動物に比べて、創床における細菌の量の顕著な減少が示された ($p < .05$)。

10

【図15A】pGlcNAc繊維の化学的構造および物理的構造における放射線照射の影響。(A) 放射線照射におけるpGlcNAcの分子量と放射線レベル/剤形との間の相関関係。

【図15B】pGlcNAc繊維の化学的構造および物理的構造における放射線照射の影響。(B) 放射線を照射されていないpGlcNAcスラリー (上のライン)、100 kGyにて放射線を照射されたpGlcNAcスラリー (下のライン)、および200 kGyにて放射線を照射されたpGlcNAcスラリー (中央のライン)。

20

【図15C】pGlcNAc繊維の化学的構造および物理的構造における放射線照射の影響。(C) 走査型電子顕微鏡 (SEM) によるpGlcNAcの分析。

【図15D】pGlcNAc繊維の化学的構造および物理的構造における放射線照射の影響。(D) 走査型電子顕微鏡 (SEM) によるsNAGの分析。

【図16】pGlcNAcは代謝率に影響を与えなかった。各期間 (すなわち、24時間および48時間) において、4つのバーはそれぞれ、以下を示している (左から右へ) : 血清飢餓 (SS)、VEGF、ならびに、 $50 \mu\text{g/ml}$ および $100 \mu\text{g/ml}$ におけるpGlcNAc (NAG)。

30

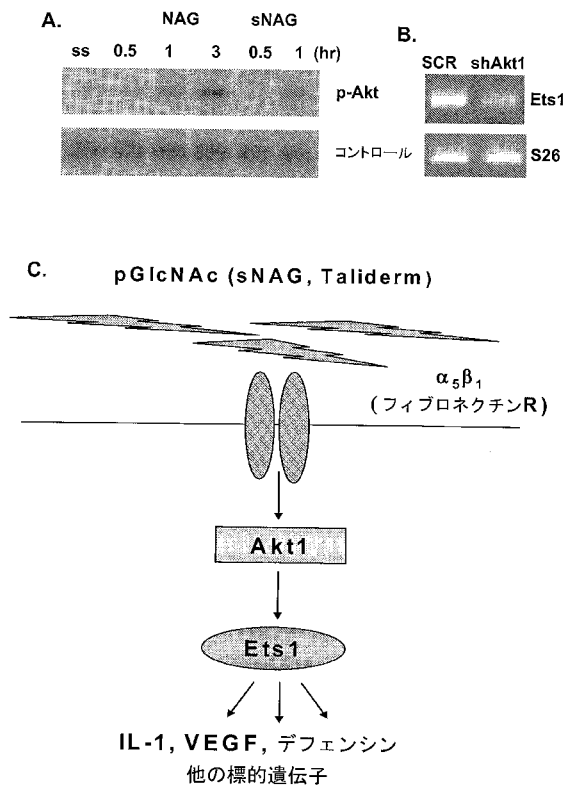
【図17】pGlcNAcは、血清飢餓によって誘導されるヒト臍静脈内皮細胞 (EC) の細胞死を防止した。各期間 (すなわち、24時間、48時間および72時間) において、5つのバーはそれぞれ、以下を示している (左から右へ) : 血清飢餓 (SS)、VEGF、ならびに、 $50 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ および $250 \mu\text{g/ml}$ におけるpGlcNAc (NAG)。

【図18】sNAGは、代謝率の顕著な増加を誘導した。5つのバーはそれぞれ、以下を示している (左から右へ) : 血清飢餓 (SS)、VEGF、ならびに、 $50 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ および $200 \mu\text{g/ml}$ におけるsNAG。

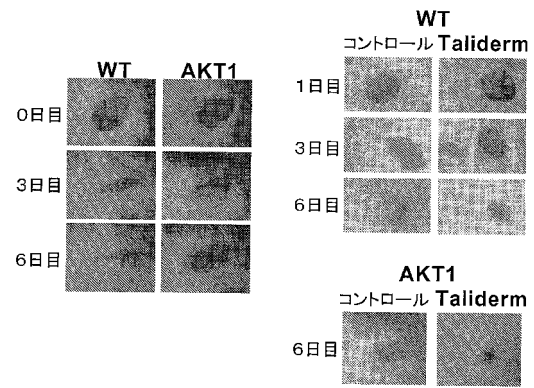
【図19】sNAGは、血清飢餓によって誘導されるECの細胞死を防止しなかった。各期間 (すなわち、24時間および48時間) において、5つのバーはそれぞれ、以下を示している (左から右へ) : 血清飢餓 (SS)、VEGF、ならびに、 $50 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ および $200 \mu\text{g/ml}$ におけるsNAG。

40

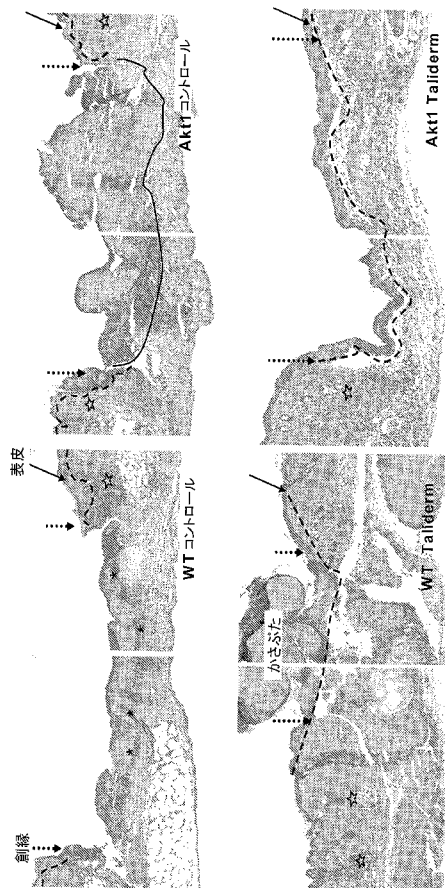
【図 1】



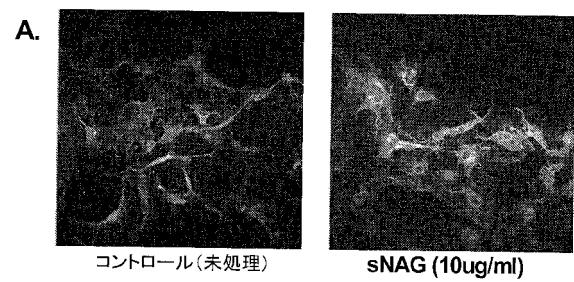
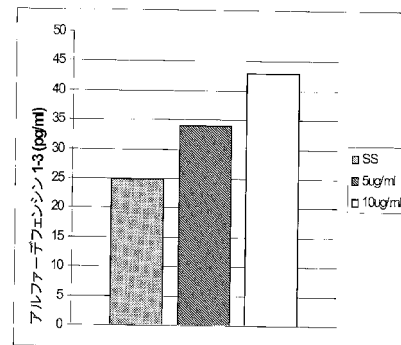
【図 2 A】



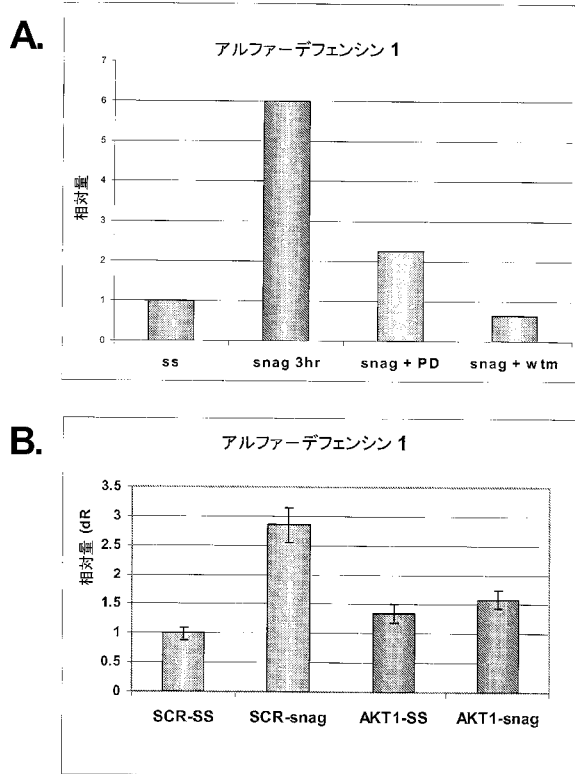
【図 2 B】



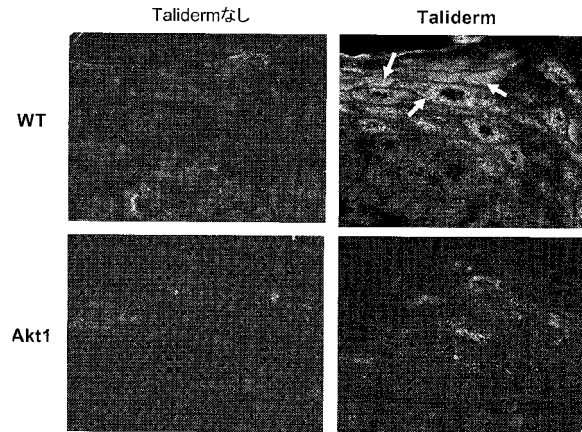
【図 3】

**B.**

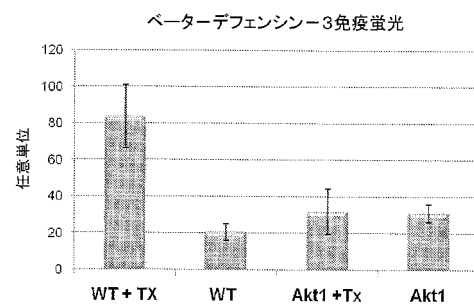
【図 4】



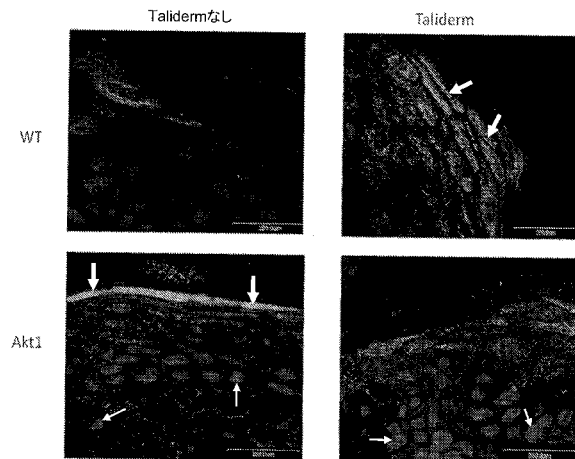
【図 5 A】



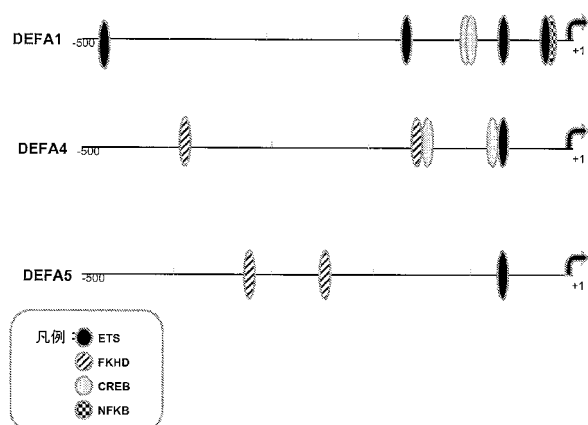
【図 5 B】



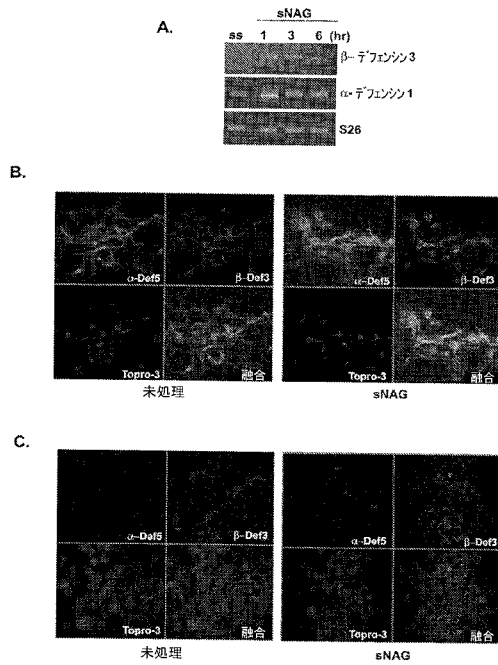
【図 5 C】



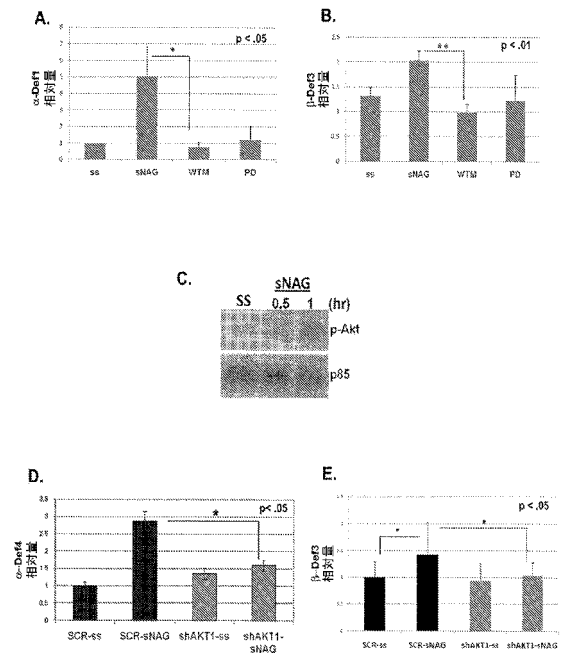
【図 6】



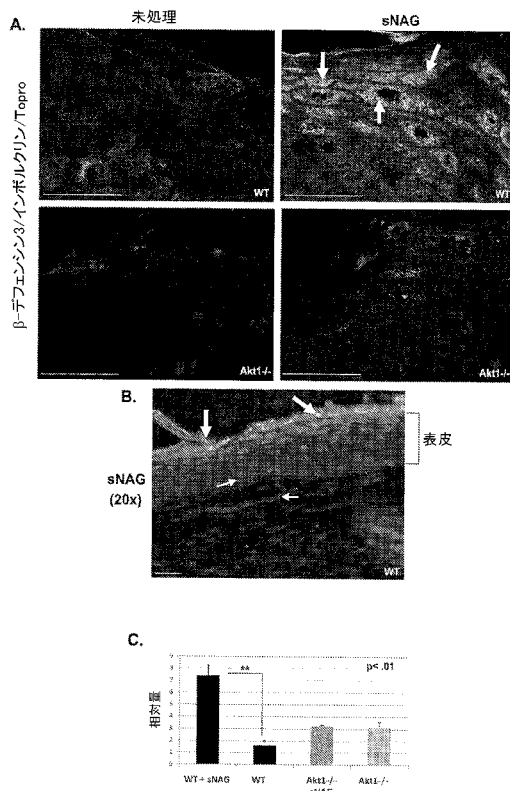
【 図 7 】



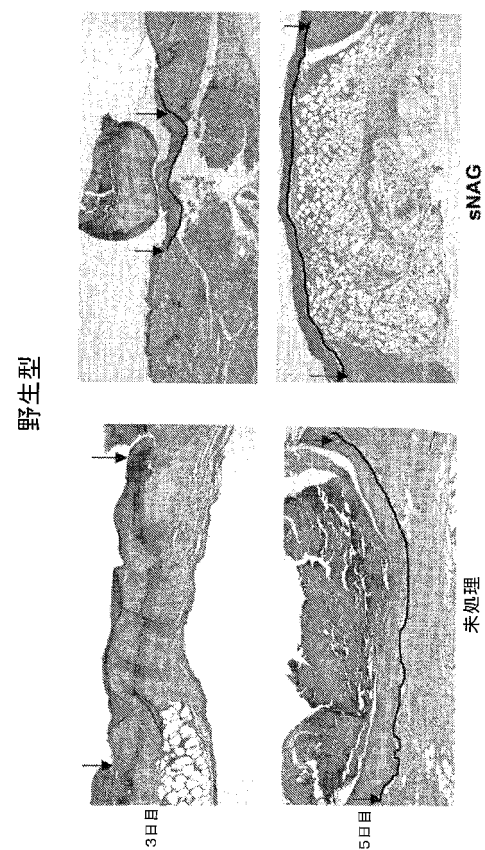
【 図 8 】



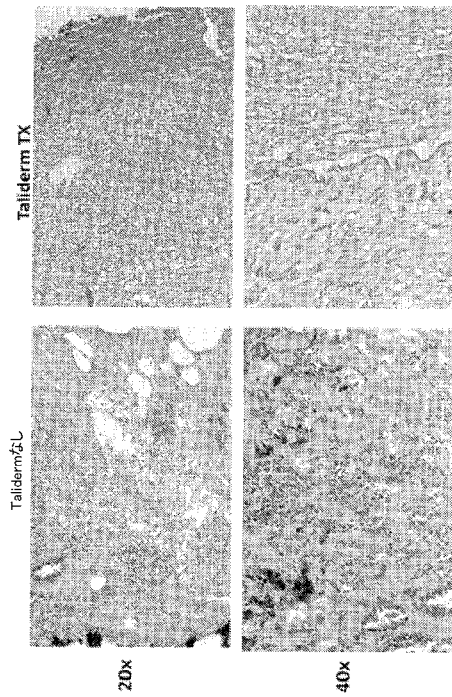
【 図 9 】



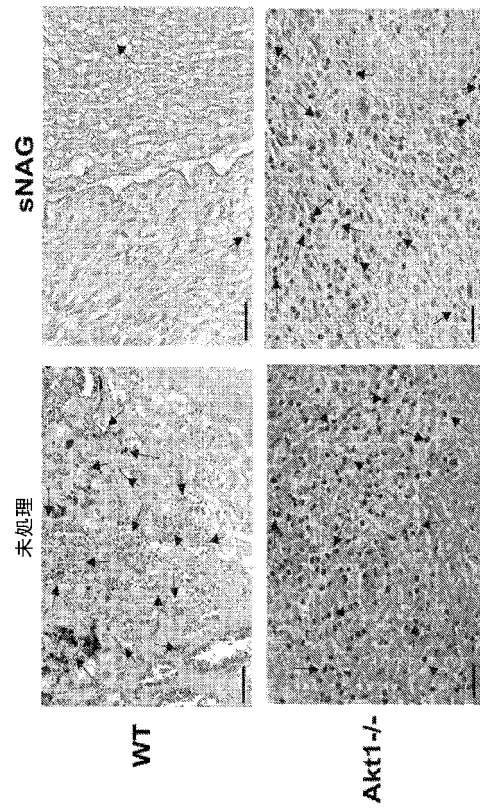
【 図 10 】



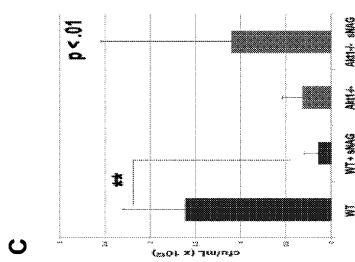
【図 1 1 A】



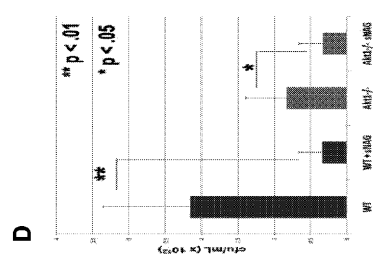
【図 1 1 B】



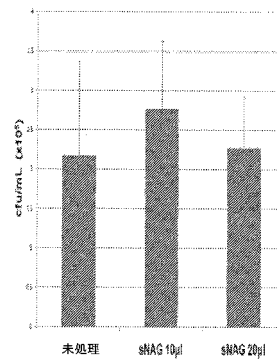
【図 1 1 C】



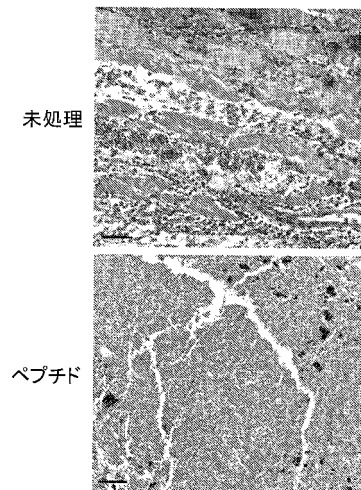
【図 1 1 D】



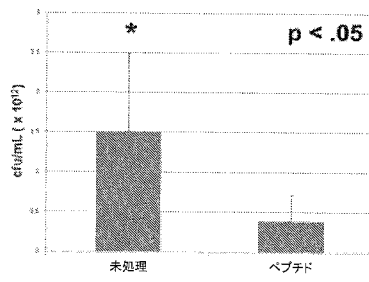
【図 1 1 E】



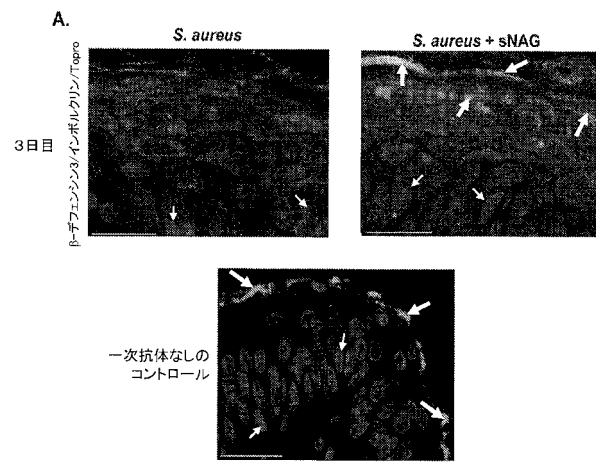
【図 1 1 F】



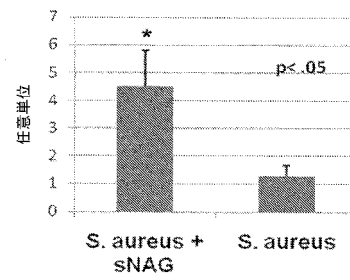
【図 1 1 G】



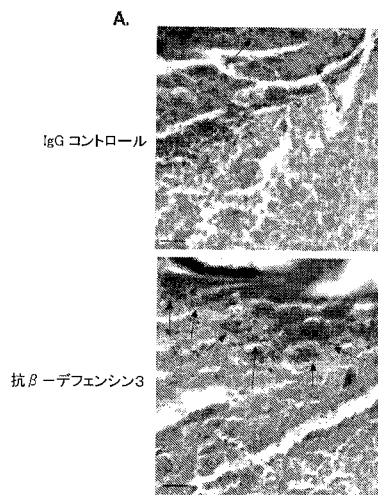
【図 1 2】



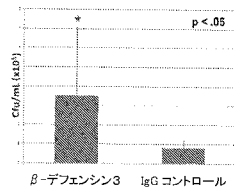
B.



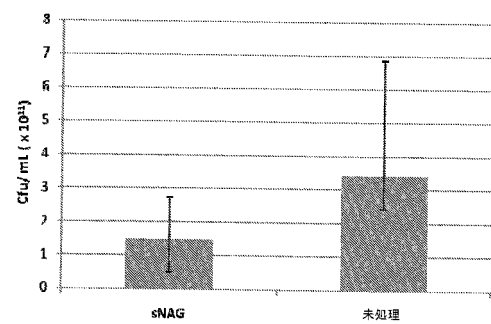
【図 1 3】



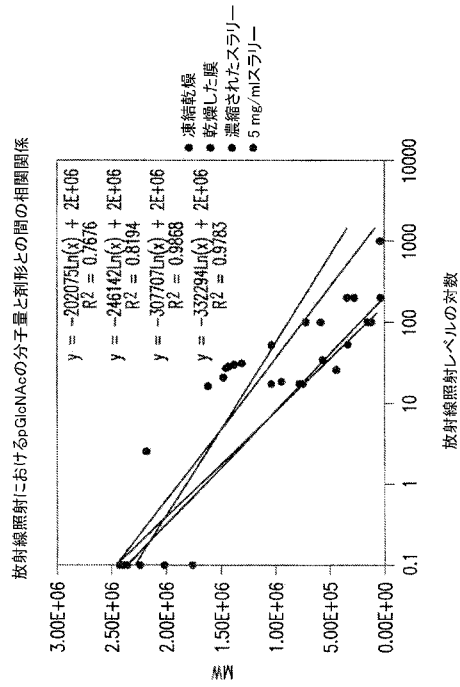
B.



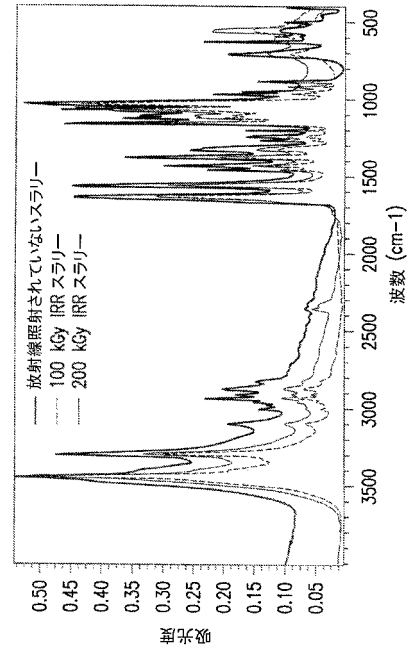
【図 1 4】



【図 15 A】



【図 15 B】



【図 15 C】

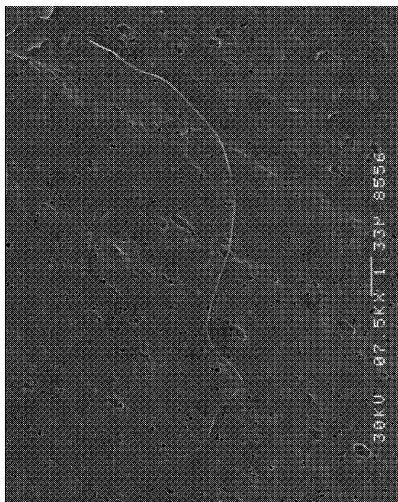


Fig. 15C

【図 15 D】

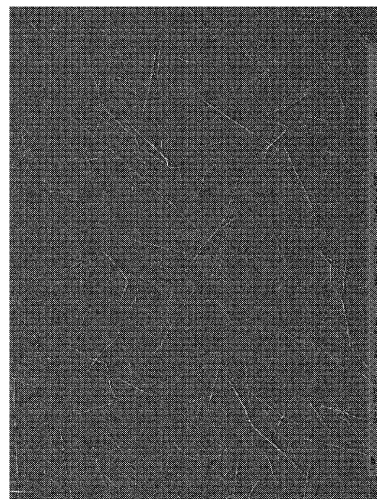
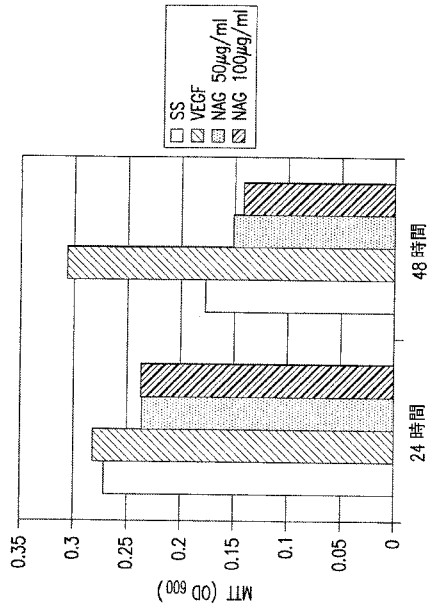
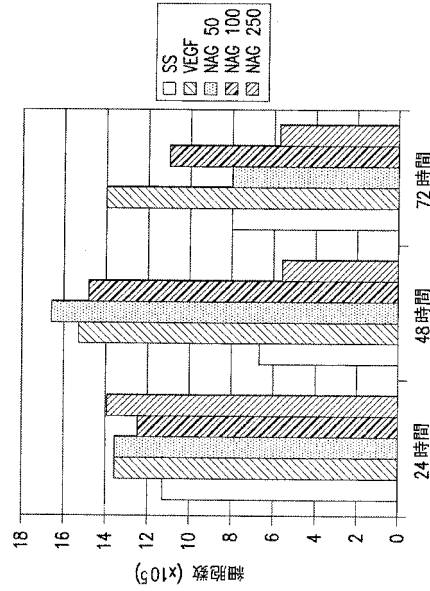


Fig. 15D

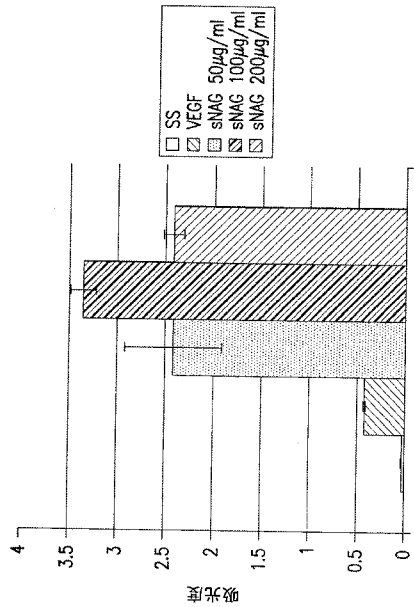
【図 16】



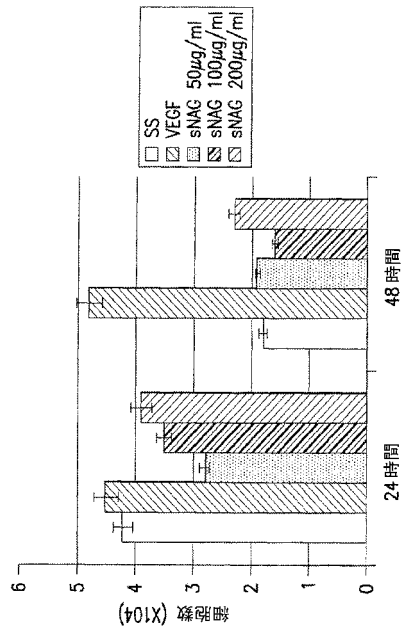
【図 17】



【図 18】



【図 19】



【配列表】

2013523898000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/32709
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - PCT/US 11/32709 USPC - 514/62 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 514/62 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 514/62; 435/65 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patents/Scholar Search Terms Used: N-acetylglucosamine, chitin, nanofiber, bactericide, wound dressing, catheter, hemodialysis		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/0130186 A1 (McCARNEY et al.) 21 May 2009 (21.05.2009) para [0031]-[0032], [0080], [0082]-[0083], [0089], [0091]-[0092], [0105], Fig. 21, 22	1-5, 7-12, 27-29
Y	US 2009/0247738 A1 (VOURNAKIS et al.) 01 October 2009 (01.10.2009) para [0006], [0204], [0222], [0270]-[0271], [0233], [0244], [0281]-[0284], Fig. 8	1-5, 7-12, 27-29
Y	US 2007/0036846 A1 (TSANG) 15 February 2007 (15.02.2007) para [0004], [0006]	12
Y	US 2007/0237812 A1 (PATEL et al.) 11 October 2007 (11.10.2007) para [0028], [0055]	29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 August 2011 (01.08.2011)		Date of mailing of the international search report 15 AUG 2011
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/32709

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6 and 13-26
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 13/02 (2006.01)	A 6 1 P 13/02	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	1 0 1
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 K 33/30 (2006.01)	A 6 1 K 33/30	
A 6 1 K 31/7048 (2006.01)	A 6 1 K 31/7048	
A 6 1 K 31/7052 (2006.01)	A 6 1 K 31/7052	
A 6 1 K 31/7036 (2006.01)	A 6 1 K 31/7036	
A 6 1 K 31/545 (2006.01)	A 6 1 K 31/545	
A 6 1 K 31/496 (2006.01)	A 6 1 K 31/496	
A 6 1 K 31/43 (2006.01)	A 6 1 K 31/43	
A 6 1 K 31/65 (2006.01)	A 6 1 K 31/65	
A 6 1 K 31/407 (2006.01)	A 6 1 K 31/407	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW), EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM), EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR), OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG), AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 フィンキールシュタイン, セルジオ

アメリカ合衆国, 0 2 4 5 9 マサチューセッツ州, ニュートン, リトルフィールド ロード 2
4

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA20 DA03 EA02
4B065 AA15X AC20 CA44
4C084 AA19 MA43 MA63 NA05 ZA592 ZA662 ZA812 ZA822 ZA892 ZB352
4C086 AA01 AA02 BC50 CC04 CC08 CC10 DA29 EA09 EA12 EA13
EA23 GA07 GA12 HA03 MA02 MA04 MA43 MA63 NA14 ZA59
ZA66 ZA81 ZA82 ZA89 ZB35