

【公報種別】特許公報の訂正

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和2年9月9日(2020.9.9)

【特許番号】特許第6230994号(P6230994)

【登録日】平成29年10月27日(2017.10.27)

【特許公報発行日】平成29年11月15日(2017.11.15)

【年通号数】特許・実用新案公報2017-044

【出願番号】特願2014-516392(P2014-516392)

【訂正要旨】特許権者の住所の誤載により下記のとおり全文を訂正する。

【国際特許分類】

A 0 1 H 5/10 (2018.01)

A 0 1 H 5/06 (2018.01)

A 0 1 H 5/04 (2018.01)

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 47/46 (2006.01)

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 K 9/70 (2006.01)

A 6 1 L 15/36 (2006.01)

A 0 1 G 7/00 (2006.01)

A 0 1 C 1/06 (2006.01)

【F I】

A 0 1 H 5/10

A 0 1 H 5/06

A 0 1 H 5/04

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 47/46

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 31/04 1 7 1

A 6 1 K 9/70

A 6 1 L 15/36

A 0 1 G 7/00 6 0 5 Z

A 0 1 C 1/06 Z

【記】別紙のとおり

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6230994号
(P6230994)

(45) 発行日 平成29年11月15日 (2017.11.15)

(24) 登録日 平成29年10月27日 (2017.10.27)

(51) Int. Cl.	F I
AO 1 H 5/10 (2006.01)	AO 1 H 5/10
AO 1 H 5/06 (2006.01)	AO 1 H 5/06
AO 1 H 5/04 (2006.01)	AO 1 H 5/04
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 47/46 (2006.01)	A 6 1 K 47/46

請求項の数 16 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-516392 (P2014-516392)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月25日 (2012.6.25)
 (65) 公表番号 特表2014-528694 (P2014-528694A)
 (43) 公表日 平成26年10月30日 (2014.10.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/062270
 (87) 国際公開番号 W02012/175749
 (87) 国際公開日 平成24年12月27日 (2012.12.27)
 審査請求日 平成27年6月24日 (2015.6.24)
 (31) 優先権主張番号 1110647.3
 (32) 優先日 平成23年6月23日 (2011.6.23)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)

前置審査

(73) 特許権者 516236805
 フィクスト ファージ リミテッド
 イギリス国 ジー2 5エイビー グラス
 ゴー, レンフィールド ストリート 20
 , スターリング ハウス, バーウェル
 Barwell, Sterling Ho
 use, 20 Renfield Str
 eet, Glasgow G2 5AP
 GB
 (74) 代理人 100163647
 弁理士 進藤 卓也
 (74) 代理人 100182084
 弁理士 中道 佳博
 (74) 代理人 100123489
 弁理士 大平 和幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス剤の送達

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バクテリオファージが共有結合によって付着されている植物材料であって、該植物材料が、種子、根および塊茎から選択され、そして該バクテリオファージが感染力を保持している、植物材料。

【請求項 2】

消費種子または種子ストックである、請求項 1 に記載の植物材料。

【請求項 3】

前記種子がトマト種子である、請求項 2 に記載の植物材料。

【請求項 4】

植物疾患の予防または治療における使用のための、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の植物材料。

【請求項 5】

前記植物材料を摂食する動物の疾患の予防または治療における使用のための、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の植物材料。

【請求項 6】

消化管内での細菌感染の予防または治療における使用のための、請求項 5 に記載の植物材料。

【請求項 7】

鳥類の疾患の予防または治療における使用のための、請求項 5 または 6 に記載の植物材

料。

【請求項 8】

前記バクテリオファージが粒子に共有結合によって付着され、かつ、該粒子が前記植物材料に共有結合によって付着されている、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の植物材料。

【請求項 9】

植物材料を処理する方法であって、該植物材料が、種子、根および塊茎から選択され、該植物材料を化学的または電氣的に活性化させる工程、および次いで該活性化植物材料にバクテリオファージを共有結合によって付着させる工程を含み、該バクテリオファージが感染力を保持している、方法。

【請求項 10】

前記植物材料が消費用種子または種子ストックを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記バクテリオファージを粒子または複数粒子に共有結合によって付着させる工程、および該粒子または該複数粒子を前記植物材料に共有結合によって付着させる工程を含む、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

植物材料を摂食する動物の疾患の治療または予防における使用のための植物材料を処理する方法であって、該植物材料が、果実、野菜、葉、茎、花、根、塊茎、および苗から選択され、バクテリオファージが共有結合によって付着された複数粒子の水性製剤を植物材料と接触させて、該バクテリオファージ、該粒子および該植物材料の組み合わせを得る工程、および該組み合わせを乾燥させて該複数粒子を該植物材料に付着させる工程を含む、方法。

【請求項 13】

請求項 1 から 8 のいずれかに記載の植物材料を含む組成物。

【請求項 14】

(i) フィラメント、(ii) 平面材料、ならびに (iii) 粒子および / またはビーズから選択されるキャリアと該キャリアに共有結合によって付着されたバクテリオファージとを含む組成物であって、深創傷における細菌感染の治療または予防に用いられ、該組成物は、次いで閉鎖される深創傷内に設置され、そして該バクテリオファージが感染力を保持している、組成物。

【請求項 15】

前記キャリアが、生分解性および / または生体適合性である、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記キャリアがフィラメントである、請求項 14 または 15 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、持続可能な生存状態で、かつ細菌感染、コロニー形成、および / または汚染の防止および抑制に適した多様な形式で、ウイルス剤（例えばバクテリオファージもしくは他のウイルス）を送達する手段に関する。治療もしくは免疫化のときに特異的な遺伝子 / タンパク質の送達に適した、遺伝子改変された生存ウイルスを設置しかつ送達する手段としても働き得るシステムが、提供される。本発明は、微生物 / 細菌の汚染、コロニー形成、もしくは感染が生じているか、または起こり得るような、および、バクテリオファージなどのウイルスの持続した抗菌活性が有益となり得る、ほとんど全ての状況において、微生物 / 細菌の増殖および / またはコロニー形成に対抗するのに適用され得る。

【背景技術】

【0002】

多くの生物学的系および過程において、微生物 / 細菌の汚染または感染が、正常な生物学的 / 生理的機能（治療または成長のような）および腐敗速度に影響する主要な要因である

10

20

30

40

50

ことは、今では一般的に受け入れられている。創傷の治癒において、創傷の感染を予防することは、創傷のケアおよび回復の生命に関わる側面である。全ての創傷は感染を受けやすいので、創傷のケアは、これを考慮して最善の努力が実践されてきた。典型的には、創傷は、細菌を保有し得る異物を取り除くように洗浄され、そして組織が重篤な外傷を受けている場合、組織の修復は、しばしば縫合により促進される。股関節置換のような主要な外科的な手法においては、これは、いくつかの組織層の修復に続いて、一般的に入手可能な種類の滅菌創傷ドレッシングを伴う。典型的には、清潔を補助し、感染を防ぐために、滅菌創傷ドレッシングを皮膚表面に付与する。

【 0 0 0 3 】

これらの予防措置にもかかわらず、損傷中または不注意にも種々の内科的 / 外科的手順の間の物質の侵入を介して、感染は確立し得る。さらに、創傷の感染の問題は、深創傷に限られない。感染は比較的小さな病変を慢性の創傷へと変え得、これは、特に、老人、糖尿病患者、または虚弱者にとってますます大きな健康上の問題となる。

【 0 0 0 4 】

創傷の洗浄に加えて、深部の創傷の感染の確立を防ぐために様々なアプローチが採用されてきた。典型的には、深創傷から感染性の細菌を除去するために、（例えば歯の再建において）抗生物質が全身的におよび局所的に使用されたり、または強消毒性化学物質が使用されたりしてきた。不運にも、強抗菌性化学物質を付与しても、感染の確立もしくは再発の防止にたびたび失敗する。大部分において、これは、消毒薬が問題の細菌全てを完全に根絶することができないことに起因し得る。加えて、周知のとおり、多くの細菌は現在、抗生物質に対して耐性を持っており、抗生物質の有効性は徐々に希釈している。

【 0 0 0 5 】

それゆえ、細菌の感染および汚染に対抗する、より有効な手段が必要となっている。1つのアプローチは、バクテリオファージ（細菌を攻撃し破壊するウイルス）を利用することを伴うものであり、種々のグループが、それらの適用に成功したと報告している。感染に対抗する手段としてのバクテリオファージの適用に伴う中心的な問題は、バクテリオファージが強力な抗菌効果を及ぼすのに十分なほど長時間安定で生存できることを保証しつつ、適切な送達手段を得ることにあった。

【 0 0 0 6 】

液中の投与は多くの場合、現実的でないか実用的でない。必要なのは、殺菌剤としてのバクテリオファージの適用に一般的に適切であり、創傷のケアを含む多くの状況において実用性を持つ、送達手段である。バクテリオファージは、分解および乾燥の影響を受けやすいため、これは、理想的には強化された生存性および安定性を与えるべきである。

【 0 0 0 7 】

多くの従来のドレッシングは、創傷内からの余分な液を吸収するように設計された材料を使用しており、そのような液は、しばしば栄養素に富み、十分な細菌の増殖を後押しし得る。手術の開口または皮膚表面に細菌が完全に存在しないことは滅多にないので、ドレッシング材または包帯材はすぐに細菌数の増加を後押しする。細菌は、重篤な感染を引き起こし得るだけでなく、有害な毒素を出すこともあり、創傷の取り扱いの観点から著しい問題を引き起こす。1つの解決手段は、細菌の集積を妨げるために創傷ドレッシングまたは包帯を定期的に取り換えることであるが、これは常に、望ましいおよび/または実用的であるわけではない。

【 0 0 0 8 】

別のアプローチは、微生物の増殖を制限するように設計された物質でドレッシングを処理することである。しかしながら、多くのそのような物質は、創傷の滲出液と一旦接触するとドレッシングから浸出され得るため、ドレッシングの有効性は限られており、活性物質が周囲の組織に炎症または損傷を与える問題が生じ得る。

【 0 0 0 9 】

それゆえに、抗細菌剤がドレッシングから容易に放出されることがない、または抗細菌剤の放出が治療される被験体に有害とならない、抗菌性ドレッシングの提供が望まれる。

【 0 0 1 0 】

WO 03/093462は、バクテリオファージのようなウイルスを、ウイルスがなお感染力を保持するように基質に固定化する方法を開示している。

【 0 0 1 1 】

バクテリオファージを、その安定性が増強されかつ抗菌活性が保持されるように、汚染された領域や環境に導入する手段を提供することは、本発明の目的に含まれる。これは、感染した創傷を含み、表面病変から深創傷環境にまで及ぶ。

【 0 0 1 2 】

それとは別に、植物の細菌感染は、発芽、成長、および/または収穫高の減少を起こし得る。そうした感染を治療もしくは予防することが望まれているが、そうすることに対するアプローチは、現在、植物の成長に影響する別の要因に悪影響を及ぼすリスクを有する。

10

【 0 0 1 3 】

本発明のもう一つの目的は、植物の細菌感染に対処すること、ならびに本発明により処理された植物材料およびその使用を提供することである。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【図 1】図 1 は、創傷ドレッシングの概略図を示す。創傷ドレッシングには、LVCC（バクテリオファージが単独または組み合わせで付着した 1 またはそれ以上のフィラメントまたはストリップとして）が付加される。

20

【図 2 a】図 2 a は、LVCC を取り込んだドレッシングの概略図を示す。

【図 2 b】図 2 b は、LVCC を取り込んだドレッシングの概略図を示す。

【図 3】図 3 は、多数のバクテリオファージを同定可能なパターンで有するドレッシングの概略図を示す。

【図 4 a】図 4 a は、通常またはバクテリオファージで処理した LVCC を使用して、5 %の豚胃ムチンに懸濁した $70 \mu\text{l}$ の $1 \times 10^5 \text{ cfu/ml}$ E15 を感染させた深創傷を持つ動物の創傷統計を示す（術後 7 日目）。

【図 4 b】図 4 b は、深創傷を持つ動物の細菌量を示す。深創傷には、5 %の豚胃ムチンに懸濁された $70 \mu\text{l}$ の $1 \times 10^5 \text{ cfu/ml}$ E15 を感染させ、通常またはバクテリオファージで処理した LVCC を手術後 7 日目に使用した。

30

【図 5】図 5 は、感染創傷への挿入後 14 日目のラットから回収した縫合糸に固定化されたバクテリオファージによる MRSA の除去を示す。

【図 6 a】図 6 a は、乾燥に対する LVCC により付与される安定性を示す。

【図 6 b】図 6 b は、紫外線照射に対する LVCC により付与される安定性を示す。

【図 6 c】図 6 c は、温度に対する LVCC により付与される安定性を示す。

【図 7】図 7 は、土壌における固定化されたバクテリオファージの生残を示す。

【図 8】図 8 は、2 つのバクテリオファージを有する LVCC のおのおのがそれらのバクテリオファージの一方に感染性の 2 つの細菌種への暴露を示す図である。

【図 9】図 9 は、感染した対照区の創傷部位の 14 日目の側面の外側を示す図である。

【図 10】図 10 は、感染した対照区の創傷部位の 14 日目の背面の内側を示す図である。

40

【図 11】図 11 は、本発明のフィラメントで処置された創傷部位の 14 日目の側面の外側を示す図である。

【図 12】図 12 は、図 11 の部位の背面の内部を示す図である。14 日目の傍脊柱筋内部の腫れ上がりの減少および膿の生成の減少を示している。

【図 13】図 13 は、トマト発芽種子（対照区）を示す。

【図 14】図 14 は、本発明に従い、種子表面にファージを固定化したトマト発芽種子を示す。

【図 15】図 15 は、コロナ放電により処理した（がファージ無しの）トマト発芽種子を示す。

50

【図 16】図 16 は、遊離のファージで処理したトマトの発芽種子を示す。

【図 17】図 17 は、本発明に従うセルロース粒子周囲の細菌の除去を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

第 1 の局面では、本発明は、生ウイルス（例えばバクテリオファージ）を所望の場所またはその内部（例えば傷またはその内部）に提供するデバイスを提供し、該デバイスは、生ウイルスキャリア複合体（LVCC）として定義され、キャリア基質に付着した生ウイルスを含む。このような LVCC は、ウイルスの生物学的作用が、治療上または他の抗菌面の利益を伝えることが有利な状況において使用され得る。典型的には、このことは、ウイルスがそれらの生物学的特性を保持していることを必要とし、バクテリオファージの場合 10 は、細菌細胞を標的にし、感染し、破壊する能力を保持することが必要である。ウイルスは、創傷の感染の原因となる細菌を標的とするバクテリオファージであり得る。本発明において、それらは、感染または汚染された環境においてそれらの生物学的特性が維持されるように、キャリア基質材料の表面に付着されている。

【0016】

キャリア表面は、例えば、フィラメント状、平面的な（シート）材料（例えばストリップとして）により、または、粒子および／またはビーズの表面により提供され得、それは、ウイルスの生存性が保持されるようなウイルスの付着および固定化を可能にするのに十分である。

【0017】

LVCC は、付着した生ウイルスの有益な特性が必要に応じて提供および送達されるように、深創傷内にまたは別の関連部位に、単独または組み合わせで提供され得る。キャリア / 基質は任意の材料であり得、生存性の持続と、LVCC としての適用に適した抗菌特性の維持とを同時に行いつつ、ウイルスがその上に固定化され得る。

【0018】

本発明の組成物は、(i) フィラメント、(ii) 平面材料、ならびに (iii) 粒子および／またはビーズから選択されるキャリアと、キャリアに共有結合的に付着しているバクテリオファージとを含み得、当該バクテリオファージは感染力を保持している。

【0019】

キャリアは、適切には、生分解性および／または生体適合性である。それとは別に、キャリアは、組織適合性がありインサイチュで吸収され得るものであり得る。

【0020】

組成物の使用は深創傷での細菌感染の治療または予防にあり、深創傷とは、体の露出面上にない創傷を意味する。深創傷は、内部の創傷であり得、体表面上で縫合系により閉鎖された内部の創傷を含む。典型的には、本発明の組成物は、深創傷の内部に設置され、この創傷は次いで閉鎖される。このように、本発明のフィラメントは、深創傷の位置に設置されて、その内部に残され得る。以下により詳細に記載する本発明の 1 つの実施形態では、バクテリオファージが付着しているフィラメントを深創傷に設置することにより、対照に比較して創傷が良く治癒されるという結果をもたらした。

【0021】

有利なことに、組成物の材料は、生分解性および／または生体適合性材料であるか、または組織適合性でありかつインサイチュで吸収され得るポリマーもしくは他の材料製である。付着したウイルス（バクテリオファージのような）の抗菌作用または他の関連した特性が実質的に影響を受けないように、分解が経時的に起こり得る。

【0022】

本発明の 1 つの実施形態では、LVCC は、様々な外科用インプラント、例えば、人工装具、ステント、カテーテル、外科的修復のための膜もしくは骨格材、または再生目的のための骨格もしくは骨組み、縫合アンカー、縫合系および他の創傷閉鎖デバイス（例えば、接着ストリップまたはステープル）、シャント、カテーテル、留置カニューレ、チューブおよび同様なデバイスならびにそれらの部品等に付着される。それらは、表面上に付着 50

されてもよく、または様々な非生分解性ポリマー、生分解性ポリマー、コラーゲン、ケラチン、セルロース、綿、絹および他の同様な物質から単独でもしくは組合せで構成される骨格もしくは支持材に組み込まれてもよい(下記参照)。

【0023】

本発明は、ウイルスを急速に変性させるような好ましくない環境(例えば、感染または汚染領域)において、ウイルスの生存性および生物学的特性(バクテリオファージについては殺菌特性を含む)が持続され、延長されるように、ウイルスをキャリア基質材料の表面に固定化することによってLVCCを構築することについて記載している。以下に、LVCCにおいてキャリア基質として用いられるのに適している、単独でもしくは組み合わせてもしくは混合物としてもしくは共重合ポリマーとして使用される材料の例を列挙する。

10

【0024】

適したポリマー種類としては、バイオポリマー、導電性ポリマー、コポリマー、フッ化ポリマー、ポリテルペン、フェノール樹脂、ポリ酸無水物、ポリエステル、ポリオレフィン(ポリアルケン)、ゴム、シリコーン、シリコーンゴム、超吸収ポリマー、合成ゴム、ビニルポリマー、核酸、ポリペプチド、糖、ポリ乳酸(PLA)、ポリ-3-ヒドロキシブチレート、無機ポリマー、ホモアトミックポリマー、ポリシラン、ポリゲルマン、ポリスタンナン、ヘテロアトミックポリマー、ポリボラジレン、ポリシロキサン、ポリジメチルシロキサン(PDMS)、ポリメチルヒドロシロキサン(PMHS)、およびポリジフェニルシロキサン、パーヒドリドポリシラザン(PHPS)のようなポリシラザン、ポリ

フォスファゼン、ポリチアジル、ポリスルフィド、超高分子量ポリエチレン(UHMWPE)、一般プラスチック、ポリプロピレンポリエステル(PES)、ポリエチレンテレフタレート(PET)、ポリエチレン(PE)、高密度ポリエチレン、ポリ塩化ビニル(PVC)、ポリ塩化ビニリデン(PVDC)(サラン)、低密度ポリエチレン(LDPE)、ポリプロピレン(PP)、ポリスチレン(PS)、ハイインパクトポリスチレン(HIPS)、ポリアミド(PA)(ナイロン)、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン(ABS)、ポリカーボネート(PC)、ポリカーボネート/アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン(PC/ABS)、ポリウレタン(PU)、特別目的プラスチック、モノマーおよびポリマー(生分解性/再吸収性材料を含む)、エチレンメチルアクリレート、メラミンホルムアルデヒド(MF)、プラスターチ材料、フェノリクス(PF)または(フェノールホルムアルデヒド)、ポリカプロラクトン(PCL)、ポリジオキサノン(PDOまたはPDS)、ポリエーテルエーテルケトン(PEEK)、ポリエーテルイミド(PEI)(ウルテム)、ポリグリコール酸(PGA)、ポリヒドロキシブチレート(PHB)、ポリ乳酸(PLA)D体およびL体立体異性体、ポリラクチドポリ-D-L-ポリ乳酸共重合体-ポリグリコール酸(PDLLA-co-PGA)、ポリL-乳酸(PLLA)、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ポリトリメチレンカーボネート(TMC)、ポリカーボネート、ポリ酸無水物、ポリ-(イミド無水物)およびポリオルトエステルが挙げられる。

20

30

【0025】

他の材料としては、ウレアルホルムアルデヒド(UF)、リン酸三カルシウム(TCP)、天然材料、木、セラミックス、岩、砂および岩;角およびケラチン;骨;皮;紙;絹;綿;麻;ガラス;鉄および非鉄金属および合金が挙げられる。

40

【0026】

使用され得る専門材料としては、加工セルロース(繊維または布として(カルボキシメチル化された))、コラーゲン、ヒアルロン酸、ハイドロコロイド、ハイドロゲル、フィルム、泡、アルギン酸塩、エチルメチルアクリレート、専門ガラス(生分解性のおよび非生分解性の)、専門ナイロン、多糖が挙げられる。

【0027】

本発明の別の実施形態では、ウイルス(例えばバクテリオファージ)は、デバイスを含む材料の表面に直接固定化され得る。要するに、デバイスが形成される材料はLVCCキ

50

キャリア材料となる。例えば、外科用縫合糸にバクテリオファージをすぐに固定化することは、二重の目的、すなわち強力な抗細菌能力を送達しつつ創傷を閉鎖し得るLVCCを提供する。縫合糸は、生分解性ポリマーを含む多様な種類からなるものであり得る。

【0028】

本発明のさらなる実施形態では、LVCC（バクテリオファージが単独でまたは組み合わせて付着されているフィラメントもしくはストリップとして）が創傷ドレッシングに加えられても、および/または創傷ドレッシングの真下に置かれてもよく、または他のタイプのドレッシングまたはデバイスと共に用いられ得、これは特定の利点を伝え得るが、LVCCの同時適用の結果として増幅された抗菌機能を受ける。

【0029】

本発明のさらなる実施形態は、LVCCを創傷ドレッシングの一部として組み込むことを含む。このことは、ドレッシングの一体部となるように整えられた独立した（LVCC）構成要素としてでもよく、またはドレッシングからは区別されるが、抗菌機能を提供するためにドレッシングの内部および/または真下に導入されてもよい。あるいは、キャリア材料がドレッシングの一部であり得る。LVCCまたはキャリア材料は下記のような、種々の様式で整えられ得るが、これに制限されると解釈されるべきではない。

【0030】

本発明の特定の創傷ドレッシングは、バクテリオファージが付着した複数のフィラメントを含み、第1のバクテリオファージが付着している第1のフィラメントおよび第2のバクテリオファージが付着している第2のフィラメントが少なくとも存在し、該第1および該第2のバクテリオファージが異なった株または種の細菌に感染する。

【0031】

第1のフィラメントと第2のフィラメントとは異なった色とし得る。このことは、ドレッシングの色コードを提供する。ゆえに、使用の際、色は、所与のドレッシングにより治療し得るまたは予防し得る疾患を識別するために使用され、その色は、そのフィラメントまたはドレッシングの一部に付着したファージによりどの細菌特異性が呈示されているかを一貫して示す。特定の例では、一つの色のフィラメントは、スタフィロコッカス・アウレウスに感染するファージを付着し、第2の色のフィラメントはクロストリジウム・ディフィシルに感染するファージを付着している。

【0032】

典型的には、創傷ドレッシングまたは包帯は、創傷の保護の提供および/または創傷液の吸収のためのドレッシング層と、創傷接触面とを含み、この接触面の少なくとも一部が、固定化されたウイルスを含み得る。

【0033】

接触面は、ドレッシング層の一部であり得るか、またはさらなる構成要素の一部であり得、第1の材料を囲むかもしくはその上に重なるカバーの一部である。1つの実施形態では、接触面は、液を通過させ、ドレッシング層に進入させるように浸透性であり得る。創傷接触面は、一般的に、治療される傷と接触して置かれ得る材料の部分であるが、接触は直接的でなくてもよい。それゆえ、例えば、さらなる透過性基質が、創傷とウイルスが固定化されている接触面との間に置かれてもよい。このように、創傷液（これは微生物を含み得る）は透過性基質を透過して、接触面に存在する固定化されたウイルスと接触することができる。

【0034】

確かに、接触面は、ドレッシング中に形成された袋などの中に入れられるように設計された構成要素として、LVCCを組み込み得る。このように、種々の固定化されたウイルスを含む種々の挿入物が提供され得、治療される創傷の種類によって、望ましい挿入物が選択されドレッシング中に置かれ得る。確かに、どのタイプの微生物が存在し得るかを説明するために創傷が試験され得、そのような微生物を標的にするのに適切な挿入物が選択され得る。あるいは、一般の広スペクトルの抗菌作用を提供するいくつかのバクテリオファージから構成されたLVCCが、用いられてもよい。

【 0 0 3 5 】

1つの実施形態では、創傷ドレッシングは3つの構成要素を含み得る：外側カバーは、例えばバンデージまたは粘着剤のいずれかによって、ドレッシングを皮膚に付着させる；ドレッシング中間層は、衝撃および摩耗に対する緩衝材として働き、かつ治癒過程において助けとなる機能を提供し得、その一例は吸収リント布であり得、これは、長年にわたり基本的なドレッシング形式において用いられてきた材料である；内膜は、接触面を形成し、傷と接触する。これは、例えば、シートやメッシュに織られ、かつドレッシングが容易に取り除けるような物質、おそらくコートされた合成高分子を含み得る。

【 0 0 3 6 】

バクテリオファージを取り込んだドレッシングの単純な例では、ファージが、内層の表面（接触面）に付着され得るか、または、その内層が、ドレッシングとは区別されるが創傷との接触がもたらされるL V C Cとして導入され得る。一般的な位置決めは、創傷の細菌感染が確立する／し得る領域にファージを設置する役割を果たし、そして初期感染バクテリオファージ事象が起こり得る可能性を最適化し、その後細菌破壊を増幅するサイクルを開始させる。

【 0 0 3 7 】

1つの実施形態では、ドレッシングまたはL V C Cは、細菌の1つのタイプに対し活性であるように考案されてもよく、よって、細菌の1つのタイプに対し活性であるファージ（またはファージら）の固定化を含み得る。

【 0 0 3 8 】

他の実施形態では、接触面の全領域にわたって固定化されたファージを含み得る。しかしながら、いくつかの例では、これは、固定化または製造のために不必要であるか、最も経済的な方法ではないことが判明し得る。他の形式は利用可能であり得る。例えば、ファージは、接触面の定められた領域にのみ付着され得る。これは、表面の一部のみの活性化および付着工程により達成され得、この付着工程は、ファージを表面すべてにアクセス可能とするが、固定化は活性化領域でのみ起こる。あるいは、一種のプリント技術によって、活性化領域のみにファージを向かわせ得る。これは、付着プロセスおよびその後の適切な表面への「プリント」の前にファージが活性化される配置（上述の逆）を必要とし得る。あるいは、ファージおよび表面は同時に活性化され得るか、または、複数のファージを保有する場合は、異なる時に活性化され得、複数ファージ保有型ドレッシングを製造する別の方法を提供する。

【 0 0 3 9 】

上記のすべては、適切な緩衝剤中に含まれるウイルス／ファージを含み得、それは、製品の識別のため、またはドレッシングの取り換えが必要か否かのシグナルを提供するための指標として、染料を含んでも含まなくてもよい。あるいは、指標としての染料は、マーカーとして、または特定のウイルス／ファージの付着領域を区別するために別に利用され得る。染料はまた、ウイルス／ファージを特定の表面に付着させるリンカーを形成し得る。

【 0 0 4 0 】

加えて、ウイルス／バクテリオファージは特定の領域に付着され、様々なパターンに適用され、それにより製造に要求されるウイルス／ファージの量を減らし得る。さらに、パターンニングおよび／またはカラーマーカーがL V C Cまたはドレッシングの識別に用いられ得る。さらに、ウイルス／ファージの種類に従ってあらかじめ着色された領域にウイルス／ファージが付着され得る。あるいは、それらは、着色されていない領域に付着されてもよい。

【 0 0 4 1 】

変型では、次の微生物の侵入を防ぐために上記のウイルス／ファージがドレッシングの表面に付着され得るか、または従来型の抗細菌剤（殺菌剤または抗生物質）を表面に用いてもよい。したがって、ファージは、単独で、または抗細菌化合物（殺菌剤、抗生物質またはその他）および／または酵素（これらもまた、付着したファージの効果を増加させ、

10

20

30

40

50

その作用を助ける特定目的で、例えばバイオフィルムを除去する、またはファージとともに抗菌バリアを提供するために適用されることにより固定化され得る)と組み合わせて、ドレッシングやL V C Cに適用され得る。このように、ドレッシングおよびL V C Cは、1種類より多く抗菌剤を含んでもよく、いくつかのウイルス/ファージを従来の抗菌性化学物質または酵素のようないくつかの他の物質と結びついて含んでもよい。確かに、そのような組み合わせは、相乗的に作用し得る。

【0042】

選択肢は、上述したように、ファージをL V C C繊維またはストランドに付着させることを含み、繊維またはストランドは着色されていてもよく(これも上述したように)、そして表面に付着され得るか、または表面内に織り合わされ得るか、またはその両方であり得る。繊維は、ドレッシングまたはL V C Cのタイプを表すために種々のパターンで織り込まれ得るか、または付着され得る。その繊維は、ファージを、活性/接触面上/中への組み込みの前または後に付着させてもよい。さらに、L V C C繊維は、用いられるファージに従って着色されてもよく、または交互に、着色されていないが、ドレッシングの接触面の着色印刷された領域またはそのドレッシングの他の領域に織り込まれてもよい。

10

【0043】

あるいは、繊維のL V C Cは、着色されているかまたは着色されていない2本以上のストランドを含み、1本のストランドもしくは両方にウイルス/ファージを付着させ(複数ファージドレッシングの場合について以下に述べる)、そしてドレッシング内に付着させるか、またはおそらく完全に統合されたものであってもよい。

20

【0044】

他の選択は、標的微生物へのアクセスが創傷に隣接して位置する透過性もしくはメッシュ状の膜を通して起こるように、上記の方法のいずれかに従って、ドレッシングの中間層への付着を通じてウイルス/ファージをドレッシング中に組み込むことである。

【0045】

追加の実施形態は、種々のキャリア物質で構成される粒子および/またはビーズに付着しているファージで構成されるL V C Cの組み込みを含み得る。このことは、粒子/ビーズへの直接的な付着、または多数の小さい粒子もしくは微細なストリップを生成するように細かく分割され得るシートもしくは平面上の表面への固定化を通じて、達成され得る。粒子はエアロゾルまたはネブライザーを通じて投与され得、ドレッシングもしくはL V C Cに、または必要な領域上/中に直接、スプレーまたは印刷され得る。

30

【0046】

加えて、バクテリオファージは、2段階の活性化プロセスを通して様々な表面に付着され得、それにより、L V C Cを生成するためにファージがフィラメント、粒子またはビーズに固定化される。第2工程では、L V C C自体が、前述したようなデバイスの表面に固定化/付着される。あるいは、ファージが固定化され得る材料がデバイス(人工器官のような)に不可逆的に結合された後第2の活性化工程が続き、デバイスに結合しているキャリア基質にファージを固定化する。

【0047】

多数の微生物/細菌に対して活性であるL V C Cもしくはドレッシングの構築は可能である。1つのアプローチは、いくつかの異なるファージの種類を含む不均一の混合物を利用することを含み得、それは、接触面全体にわたってまたは上述したように特定の場所で固定化するための、大量のファージ源として使用される。

40

【0048】

もう一つのアプローチは、それぞれ均一な溶液中に区別して別々に保持した特定のファージを含み得、これらの溶液が並行して活性化されて投与される(2(もしくは多)ジェット印刷タイプ)。この実施形態によると、ウイルス/ファージは、それらが印刷ジェットを退いて移動するより前もしくは移動と同時に、活性化され、固定化の準備ができている。

【0049】

50

もう一つの実施形態は、特定のファージタイプを既定の順序でLVCCもしくはドレッシング接触面に、いくつかの表面活性化工程を経て固定化することを含む。このアプローチは、逐次的活性化および付着工程がそれ以前に固定化されたファージに影響を与えないように、最初の固定化プロセス後に残っている結合部位を用いる。

【0050】

あるいは、ファージは、必要とされる治療の種類によって個々にまたは組合せで、ドレッシング接触面の特定の領域にその特定領域の逐次的活性化を通じて、付着されてもよい。領域は色でコードされ得る。

【0051】

さらに、特定のウイルス/ファージが、個々の繊維もしくは微細なストリップで構成されるLVCCに付着されて、そして上述したように、ドレッシングの表面に付着もしくは織り込まれ得るか、または他のデバイスに付着され得る。繊維が、ウイルス/ファージをその上に既に固定化し得るか、または一旦組み込まれたウイルス/ファージを受容するように活性化され得るか、または活性化されたファージを単に受容し得る。

10

【0052】

繊維は、ウイルス/ファージの種類に従って色でコードされ、そして2以上のフィラメントで構成されるストランドにねじられ得る（床屋のボールのように）、次いで、ドレッシングまたは接触面に織りこまれ得るか付着され得る（またはその両方）。さらに、着色された指標ストリップが加えられ得（付着、織り込み、もしくは印刷）、それは、ドレッシングの取り換えの最適なタイミングを示すために時間が経つと色が変わる。

20

【0053】

繊維もしくはストリップを組み込むよりむしろ、上記のすべては、ウイルス/ファージを付着しているかもしくは付着を許容する位置にあり、そしてそれ自体が、織り合わされた繊維で構成されてもよく、または両方の組合せでもよい平面LVCC材料（種々の形状の）のドレッシング表面‘パッチ’への組み込みもしくは付着によって達成され得る。

【0054】

接触面、繊維またはストリップは、カラーマーカー等のインジケーターを含み得、それは使用者に付着しているウイルスの種類を知らせ、および/またはLVCCもしくはドレッシングの正しいポジショニングに役立つ。

【0055】

30

固定化されたウイルスは、そのウイルスが緑色蛍光タンパク質等のようなマーカー蛋白質を発現させ得るように、微生物がウイルスに感染されたときにマーカー遺伝子が発現して、マーカー蛋白質が製造されるように、それ自体が改変されてもよい。これは順に検出され得、医師は傷に微生物が存在するという事実を警告される。次いで医師は、汚染部位に活性バクテリオファージ集団を保持するように適時ドレッシングを変え、微生物が傷になくなったことを示す色の変化がない状態が観察されるまでに行い得る。これを容易にするため、ドレッシングは透明であるか、または部分的に透明であることが望ましく、それにより創傷表面での着色が観察できる。

【0056】

40

創傷は、内部創傷、いくつかの組織層を含む創傷、皮膚層中の創傷、もしくは被験体の皮膚表面にある創傷であり得る。多くの種類の創傷が知られており、それらは外傷、手術、火傷、切り傷、擦り傷、潰瘍および床ずれで引き起こされるもの、および糖尿病、血行不良等で引き起こされる他の病変を含む。この用語はまた非常に幅広く使われており、体液を吸収して重篤な微生物感染が起こるのを予防するのが望ましいとされ得る他の適用を包含する。このような1つの適用は、タンポンのような女性の衛生用品であり、これは月経を吸収し、同時にトキシックショック症候群の発症を防ぐかまたは最小化する。それはまた、実際の術部を含み得、それゆえに、固定化されたファージは、吸収性材料（過剰な液を吸収するために術野内にしばしば置かれる）または保護材料（例えば使い捨て製品）に、抗菌特性をもたらし得る。

【0057】

50

被験体は、飼育動物または家畜のような動物被験体であってもよいが、特にヒトであってもよい。

【0058】

本発明の1つの実施形態は、固定化したウイルスを有する吸収性材料を含む、吸収性の医療用または衛生用製品を提供することであり、固定化したウイルスを吸収性材料にまたは吸収性材料の内部に付着、または吸収性材料を覆う透過性表面の少なくとも一部に付着している。そのような製品には、生理用ナプキン、タンポン、おむつ、スポンジ、および衛生ティッシュなどが含まれる。上記および他所に記載の吸収性材料は、セルロースもしくは綿、ヒドロゲルポリマー、カルボキシメチルセルロース、または他の適切な材料を含む天然もしくは合成の製品であり得る。

10

【0059】

別の実施形態では、LVCCは、微生物分解を受けやすい材料および製品の貯蔵、梱包、および輸送を助けるために用いられ得る。このことは、媒体もしくは梱包中に含有することによってであり得、または材料および製品の貯蔵を補助および促進するためであり得る。そのような材料は、器官、および移植予定の他の組織もしくは材料を含み得る。例として、角膜移植体があり得、これは使用前に貯蔵し運搬され、そして組織が使用不能になる微生物汚染および分解を受けやすい。

【0060】

別の実施形態では、LVCCは、消費用もしくは貯蔵された種子ストックとして使用される、果実、野菜、葉、茎、花、根、塊茎、苗、および種子を含む、幅広い植物材料に適用される。本発明の実施形態に従って、種子が生存性を維持し、実質的にその表面がLVCCのキャリア成分となるように、バクテリオファージは種子の表面に直接固定化される。そして、貯蔵、発芽、収穫、運搬および販売の間に発生する細菌性植物疾患と闘う手段を提供する。

20

【0061】

ゆえに、本発明は、バクテリオファージが付着された植物材料であって、該バクテリオファージが感染力を保持している、植物材料を提供する。

【0062】

異なった細菌に感染する複数のバクテリオファージが付着されてもよく、これはより広い活性スペクトルを与える。

30

【0063】

適切な植物材料は、果実、野菜、葉、茎、花、根、塊茎、苗、および種子を含む。消費用種子（例えば動物もしくは鳥によるもの）は1つの例である。種子ストック（例えば播種前に貯蔵されたもの）は別の例である。

【0064】

本発明の植物材料は、植物疾患、または、該植物材料を摂食する動物の疾患（例えば、消化管内での細菌感染）の予防または治療のために用いられ得る。

【0065】

本発明の組成物の例は、本発明の植物材料（特に種子）を含む動物もしくは鳥用食品である。食品は、本発明の種子から作られるかまたは種子を含む、ケーキまたはペレット状であり得る。食品は、ファージを付着させるように処理されるケーキもしくはペレット状であり得る。この処理は例えば、食品をファージが共有結合的に付着した粒子の水溶液で処理し、次いで典型的には食品を乾燥して粒子を付着させることによる。あるいは、粒子を乾式調製して食品と合わせ得る。

40

【0066】

一般的に、バクテリオファージは植物材料に間接的に付着され得る。例えば、植物疾患に対抗するためにファージを送達する方法を提供する粒子（群）に付着される。例えば、ファージが付着した粒子の溶液を植物材料上にスプレーし、乾燥させてそれらをくっつけ得る。本発明の実施形態では、そのような方法によって、そのような粒子をジャガイモ塊茎に付着させる。ファージは生存性を保持し、塊茎の疾患を予防するのに有効である。

50

【 0 0 6 7 】

ゆえに、本発明は、バクテリオファージが共有結合で付着された粒子の水性製剤を植物材料と組み合わせる工程、およびためにこの組合せを乾燥させて粒子を植物原料に付着させる工程を含む方法を包含する。あるいは、例えば植物材料にまぶすといったように、粒子の乾式調製が植物材料と組み合わせられ得る。

【 0 0 6 8 】

下により詳しく記載された、本発明の特定の実施形態においては、バクテリオファージをトマト種子に共有結合で付着させた。他の実施形態におけるテストにより、この様式（トマト種子表面で見られたように）でセルロースに付着しているファージが生存性を保持していたことが確認された。トマト種子を一例として使用した。他の種子も使用でき、小さな種子（タバコ）から大きな種子（トウモロコシ）まで同様の結果が得られた。種子の化学的およびコロナ活性化により、種皮表面の一時的な修飾がなされる。この種皮表面は、様々な量のタンパク質および脂肪酸とともにセルロースまたはペクチンに関連するポリマーを含む。そのような全ての材料は、コロナ電場にさらされると、反応性のフリーラジカル種を生み出す。これは、バクテリオファージのタンパク質外皮または他の存在と反応して、崩壊し、数秒のうちに安定な共有結合を与える。この結果は、コロナ活性化は表面現象であることを示し、種子の生存性は、発芽によりテストされたところでは、悪影響はなかった。実際、コロナ処理をしていないものに比べ発芽は改善された。

【 0 0 6 9 】

他の植物材料（例えば、葉、茎、花、根）をコロナ電場で処理した場合にも、同様の効果が見られる。活性化および反応は、クチクラ表面で起こり、結果としてバクテリオファージが付着する。植物材料の先端とコロナ電極との間で火花が生じるときにのみ、植物への損傷が起こる。したがって、植物材料は、直接付着（例えば、共有結合で）付着したファージを有する保持できる。植物材料はまた、ファージが共有結合で付着した粒子と結合させ、または組み合わせることもできる。ファージを有する粒子は植物材料の上で乾燥させ得る。この粒子は、そうでなければ、他の植物材料と結合することができる。

【 0 0 7 0 】

本発明のさらに特定の実施形態によれば、ジャガイモ塊茎を固定化されたファージで処理する。詳細には、ファージをセルロース粒子の表面に付着させ、これらを、この粒子が付着できるように、この粒子の溶液を塊茎にスプレーし、次いでこの塊茎を乾燥させることにより、ジャガイモの表面に固定化させる。ジャガイモ植物の生長は、この処理により、驚くほど改善される。感染の発生が減少し、処理した植物の生長も顕著に良くなる。

【 0 0 7 1 】

ある実施形態では、LVCCの種子ベースの形態は、消化管の細菌感染のような細菌感染に感受性である種子摂食生物の治療のために、バクテリオファージを送達するために用いられ得る。同様に、LVCCは、消化性疾患および他の病気の治療のために他の食料品に適用され得る。あるいは、LVCCは、粗挽きの穀の代わりに用いて、鳥類の病気の治療のために用いられ得る。このように、病原細菌に対抗するバクテリオファージは、動物の細菌病の治療のために、消化管に投与され得る。

【 0 0 7 2 】

LVCCはまた、抗細菌治療を下部消化管に送達するために、直腸投与され得る。

【 0 0 7 3 】

さらに他の実施形態では、LVCCは全身感染性のバクテリオファージ治療を動物に送達するために用いられ得る。これには、例えば抗細菌作用を供給するために、循環系またはリンパ系に、または直接脳脊髄液またはこれが望ましい他の体腔または器官に注射することによる。あるいは、LVCCは、気道の感染に対抗するために、吸入によるバクテリオファージまたは他のウイルスの送達を可能にし得る。

【 0 0 7 4 】

固定化は、例えば、化学結合（共有結合、イオン結合、水素結合またはファンデルワールス結合）による特定の物理的固定化に関連するものとして理解される。それゆえ固定化

10

20

30

40

50

は、他の受動的なウイルス突起の基質に対する結合とは区別される。さらに、固定化は、ウイルスが細胞への感染能を保持するようなものである。それゆえ、固定化は、所望の標的細胞にウイルスがなお感染できることを条件として、頭部またはカプシドタンパク質またはウイルスの他の表面タンパク質を介して起こり得る。より好ましくは、バクテリオファージ/ウイルスは、その頭部の基またはヌクレオカプシドを介して基質に固定化される。固定化は、バクテリオファージ/ウイルスを添加し、連結させる前に基質を活性化することにより行われる。共有結合での付着が付着のの好ましい手段である。

【 0 0 7 5 】

本発明の用語「ウイルス」は、2本鎖または1本鎖のRNAまたはDNAウイルスを含む。細菌に感染し、一般的にバクテリオファージと言われるものも含む。より好ましい実施形態では、ウイルスはバクテリオファージである。

10

【 0 0 7 6 】

多くの異なるタイプのバクテリオファージ/ウイルスが当該分野において知られている。適切なバクテリオファージ/ウイルスを、対処すべき細菌問題に応じて選択し得る。例えば、創傷治療のために、臨床医は、特定の傷に感染しやすい細菌/原虫/カビの共通のタイプに気づいていると思われる。創傷ドレッシングは特定の傷に感染し得る細菌/原虫/カビに感染してその増殖を最小化させるように設計される1またはそれ以上の異なるタイプのバクテリオファージ/ウイルスを含んでいても良い。

【 0 0 7 7 】

潜在的な創傷の病原体の例としては、ストレプトコッカス、例えば、ストレプトコッカス・ピロジェネス；エンテロコッカス、例えば、エンテロコッカス・ファエカリス；スタフィロコッカス、例えば、スタフィロコッカス・アウレウス、特にメチシリン耐性のスタフィロコッカス・アウレウス(MRSA)；シュードモナス・エルギノーサ；エンテロバクター；大腸菌；クレブシエラ種；プロテウス種；バクテロイデス属；クロストリジウム；カンディダのような酵母；およびアスペルギルスが挙げられる。

20

【 0 0 7 8 】

本発明の用語「キャリア/基質」は、ウイルスが固定化され得る、あらゆる固相材料を意味すると理解される。例えば、前記キャリアは、例えば、複雑なバクテリオファージのようなウイルスの頭部基特異的結合を可能にするように有利に活性化され得る材料であり得る。前記基質は、多数の形態を取り得、例えば、ナイロンおよび他の類似のポリマー、反応基(例えば、アミノまたはカルボキシ表面基)を有するポリマー、セルロースまたは他のヒドロキシル含有ポリマー、ポリスチレンまたは他の類似のポリマーである。基質はまた、多数の共有結合モノマーサブユニットから構成される、および単一の繰り返しモノマーまたはモノマー種の組合せから構成される長鎖のマクロ分子のようなポリマーであり得る。典型的には、基質には、モノマーまたはポリマーの形態にて、単一または組み合わせまたはコポリマーとしての天然の、合成、または生物合成の生体吸収性/生体再吸収性材料が含まれる。例えば、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ乳酸エナンチオマー(PLA)、およびポリ D-L-乳酸コポリマーポリグリコール酸(PDLLA-co-PGA)、ポリジオキサノン(PDO)およびポリトリメチレンカーボネート(TMC)、ポリエーテルエーテルケトン(PEEK)およびそれらの組み合わせおよび複合物が挙げられる。基質にはまた、プラスチックまたは他の前述のポリマーまたはビーズまたは粒子が含まれる。それらは磁気性であり得るか、またはアルギン酸のような生物材料、ガラスまたはガラス繊維、ステンレス鋼、シリコン、絹、コラーゲン、またはセラミック材料から構成されていてもよい。より好ましくは、前記基質は、治療または治療補助における医療デバイスに通常使われる材料から作られる。例えば、縫合糸として通常使用される材料、およびまた、開放創傷を手当するために使用されるリントまたはガーゼ材。ある実施形態においては、基質は、生分解性/生体再吸収性であってもよく、それゆえ、体液と接触させて配した際に、経時的に生体内で分解し再吸収され得る。ドレッシング層は、例えばヒドロゲル材料から形成されるものであってもよく、これにウイルスが付着される。これはまた、創傷からの液体を吸収して、そのような液体を固定化されたウイルスと接触さ

30

40

50

せる役割を果たし得る。

【 0 0 7 9 】

本発明の用語「活性化された／活性化する／活性化」は、基質および／またはウイルスを、前記基質／ウイルスを様々な化学基と反応させることにより活性化することを意味すると理解される（バクテリオファージの頭部またはカプシド表面のタンパク質または基のような表面化学は、ウイルスに結合できるままとする）。あるいは、固定化は、電気的活性化または他の電氣的放電、電場または電界効果（例えば、プラズマ）、マイクロ波、光電効果、高周波場効果、ガンマ線および他のエネルギー放射などにより達成されてもよい。これは、キャリア基質またはウイルスまたは基質とウイルスとの両方に適用されてもよい。

10

【 0 0 8 0 】

基質の活性化はまた、例えば、酸、好ましくはHClによる予備的加水分解により達成されてもよい。予備的加水分解に続いて、酸を除去するために水とアルカリによる洗浄工程が行われる。好ましくは、前記アルカリは、重炭酸ナトリウムである。頭部基を介したウイルス（例えば、バクテリオファージ）の結合が重要である。例えば、複雑なバクテリオファージの場合、頭部基を介した結合により、尾部基（細菌特異的な認識に必要である）は、宿主細菌細胞への感染、すなわち、結合および浸透を自由に行うことができる。宿主細胞のこの感染メカニズムは、細菌のみに感染して増殖するウイルス以外の他の多くのウイルスについても同様であると理解される。複数のウイルス（例えば、様々な株特異的バクテリオファージ）が、常に基質に固定化され得る。

20

【 0 0 8 1 】

基質に対するウイルスの結合は、ウイルス外皮タンパク質と基質との間の共有結合のような結合の形成の結果であり、例えば、ペプチド上のアミノ基を介し、例えばペプチド結合である。このプロセスを助ける「結合剤」は、使用される基質に応じて変わる。例えば、基質ナイロン、またはアミノ基またはカルボキシ表面基を有する他のポリマーに結合させるために、結合剤カルボジイミドまたはグルタルアルデヒドが使用され得る。

【 0 0 8 2 】

基質セルロースまたは他のヒドロキシ基含有ポリマーに結合させるために、結合剤ビニルスルフォニルエチレンエーテルまたはトリアジンが用いられ得る。

【 0 0 8 3 】

ウイルスを基質ポリエテンまたは他の類似のポリマーまたは他の多くのタイプのポリマーと結合させるための結合剤には、コロナ放電または過マンガン酸塩酸化が含まれる。

30

【 0 0 8 4 】

コロナ放電技術を用いて、遊離のウイルスを変性させる環境条件下でもウイルス抗細菌活性が長期間持続されるように、広い範囲の基質にウイルスを固定化することができることが証明された。本明細書中、包括的なリストが上に示され、以下のような基質を含む：ナイロンおよび関連ポリマー、ダクロン、ポリスチレン、プラスチックおよび関連ポリマー、天然および合成ゴム、単一のまたは組み合わせまたはコポリマーとして生体吸収性／生体再吸収性モノマー、ポリマーおよびコポリマー（例えばポリグリコール酸（PGA）、ポリ乳酸エナンチオマー（PLA）およびポリD-L-乳酸コポリマーポリグリコール酸（PDLL-co-PGA）、ポリジオキサノンおよびポリトリメチレンカーボネート（TMC）、ポリエーテルエーテルケトン（PEEK）ならびにそれらの組み合わせおよび複合物）、シリコン、セラミックス、ガラスおよびガラス繊維、金属（鋼鉄、アルミニウムおよび金属合金を含む）、カラーゲン、ケラチン、アクリルおよび様々な塗料、骨、絹、セルロース（紙、綿、リント、テープおよびガーゼ）、レーヨン、天然および合成スポンジ、アルギン酸、ヒアルロン酸、ゲル表面（例えばヒドロゲル）。

40

【 0 0 8 5 】

一般的に言って、バクテリオファージを基質に結合させるための結合剤は以下を含む：S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、S-アセチルチオグリコール酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル；アジピン酸ジヒドラジド；4-アジド安息香酸N-ヒドロキシス

50

クシンイミドエステル；N - (5 - アジド - 2 - ニトロベンジルオキシ)スクシンイミド；6 - (4 - アジド - 2 - ニトロフェニルアミノ)ヘキサ酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル；p - アジドフェニル臭化物；4 - アジドサリチル酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル；プロモ酢酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル；1, 4 - ブタンジオールジグリシジルエーテル；2 - ジアゾ - 3, 3, 3 - トリフルオロプロピオン酸p - ニトロフェニルエステル；ジエチルマロニミデート；4, 4' - ジイソチオシアナトスチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸；ジメチルアジピミデート；ジメチル3, 3' - ジチオビスプロピオンイミデート；ジメチルピメリミデート；ジメチルスベリミデート；4, 4' - ジチオビスフェニルアジド；ジチオビス(プロピオン酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル)；エチレングリコールビス - (コハク酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル)；4 - フルオロ - 3 - ニトロフェニルアジド；p - フォルミル安息香酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル；グルタルアルデヒド；2 - イミノチオラン；6 - (ヨードアセトアミド)カプロン酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル；ヨード酢酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル；3 - マレイミド酢酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル；3 - マレイミド安息香酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル；4 - (N - マレイミド)ベンゾフェノン；y - マレイミド酪酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル；s - マレイミドカプロン酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル；4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサカルボン酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル；4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサカルボン酸3 - スルホ - N - ヒドロキスクシンイミドエステル；マレイミドプロピオン酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル；N, N' - ビス(3 - マレイミドプロピオニル) - 2 - ヒドロキシ - 1, 3 - プロパンジアミン；1, 4 - フェニレンジイソチオシアネート；N, N' - o - フェニレンジマレイミド；ポリオキシエチレンビス(グリシジルエーテル)；ビス(ポリオキシエチレンビス(グリシジルエーテル))；ポリオキシエチレンビス(イミダゾリルカルボニル)；ビス(ポリオキシエチレンビス[イミドリルカルボニル])；ポリオキシエチレンビス(p - ニトロフェニル)カーボネート)；3 - (2 - ピリジルジチオ)プロピオン酸N - ヒドロキスクシンイミドエステル；スベリン酸ビス(N - ヒドロキスクシンイミド)エステル；コハク酸マレイミドエチル - N - ヒドロキスクシンイミドエステル；1, 5 - ビス(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ) - ペンテン；ビス(N - スクシンイミジル)カーボネート。

【0086】

好都合なことに、ウイルスがキャリア基質に固定化されると、前記固定化は安定性を付与し得る。例えば、固定化されたウイルスは、さもなければ、急速にウイルスを不活性化し得る例えばプロテアーゼ薬剤と接触した場合でも、その生存性および感染性を維持するように安定化される。さもなければウイルスを不活性化する脱水、温度、またはpHのような物理的ストレスにさらされても同様である。

【0087】

本発明は、以後、実施例によって、かつ図を参照してさらに記載される。

【実施例】

【0088】

実施例1 - 深創傷の感染に対抗するためのバクテリオファージの送達のためのLVCCの有効性

【0089】

図1は、ドレッシング(2)により組織(3)中の傷(4)上に圧迫した、本発明のLVCC(1)を概略的に示す。

【0090】

図2aは、LVCCを取り込んだ本発明のドレッシングを逆さにした断面を示す。袋(5)はLVCC(6)を包み込み、ドレッシング(7)に接着しており、頂部ドレッシング表面(8)を持つ - それゆえ図では逆になっている。

【0091】

図 2 b は、ドレッシング (1 0) に織り込まれた L V C C (9) を概略的に示す。2 つのフィラメント (9 a および 9 b) は異なる色で、異なるバクテリオファージが付着している。図 3 は、さらに、ファージが付着したフィラメント (1 2) が取り込まれたドレッシング (1 1) の概略を示す。

【 0 0 9 2 】

第一の例では、インピボモデルを用いた、感染した深創傷環境への細菌感染に対抗するバクテリオファージを送達する L V C C の有効性が証明されている。いくつかの組織層を貫通し、あらゆるレベルでメチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (M R S A) (E 1 5) に感染した深創傷を、感染する M R S A 株に対して活性なバクテリオファージで構成された L V C C で処置した。

10

【 0 0 9 3 】

バクテリオファージを、創傷閉鎖縫合糸の製造で使用されるものと同様の合成ナイロンポリマーフィラメントに固定化した。様々なレベルで感染した創傷を、縫合糸として L V C C を用いて閉鎖した。フィラメントの L V C C は、その表面に固定化した抗 M R S A バクテリオファージを有するもの (テストされるべきプロトタイプの L V C C) か、または有しないもの (対照) とした。

【 0 0 9 4 】

L V C C で処置した全ての被検体において、感染は制御され、減少され (目視と細菌数により証明されたように (図 4 a および図 4 b 参照) 、正常に傷の治癒が進んだ。対照的に、対照の被検体における M R S A の増殖は抑制が効かず、傷は炎症を起こして化膿し、治らなかった。

20

【 0 0 9 5 】

結果は、L V C C を用いることで、バクテリオファージが、インピボモデルにおいて長期間、強力な殺菌効果を送達することを示す - 表 1 A および 1 B 参照。

【 0 0 9 6 】

実施例 2 - 長期安定性

感染した被検体から回収した L V C C を、洗浄して、4 で保存し、インピトロで生育させた M R S A に対する抗菌活性継続について定期的に評価した。一連の実験において、抗 M R S A 活性は、細菌叢内に置かれた L V C C により証明されたように維持された。バクテリオファージ活性 (回収された L V C C の周囲に見られる除去により示される) は保存後数週間にわたっていた - 図 5 参照。

30

【 0 0 9 7 】

実施例 3 - 乾燥、紫外線照射および温度に対する L V C C により付与された安定性

これらの実施例において、L V C C を、活性化されたナイロンポリマーまたは木綿繊維をキャリア基質として用いて生成した。バクテリオファージが付着した L V C C を、一連の環境条件に曝露した。環境条件は、乾燥 (バクテリオファージの生残に対する相対湿度の効果によって示される) (図 6 a 参照) 、紫外線 (図 6 b 参照) および高温 (図 6 c 参照) を含む。これら全ての条件は、遊離のバクテリオファージを変性させることが知られている。

【 0 0 9 8 】

40

3 つの 2 × 1 c m ファージストリップを L B M 寒天の上に置き、無菌箱中で 5 分間、1 5 分間および 3 0 分間紫外光に曝露した。次いで、そのストリップをひっくり返して寒天の新鮮な場所に置き、U V 照射を繰り返した。対照区のファージストリップを同様に処理したが、U V から遮蔽した。次いで、そのストリップを 1 5 m l の L B 培養液に移し、5 0 μ l のスタフィロコッカス・アウレウス懸濁液を接種し、培養した。

【 0 0 9 9 】

結果 - 表 2 参照。

結論：付着したファージは無菌箱 U V への 3 0 分曝露まで持ちこたえることができる。スタフィロコッカス・アウレウス細菌細胞は U V 源に 5 分間曝露することにより死滅する。

【 0 1 0 0 】

50

実施例 4 - 極端な環境における持続的生存性

この実施例では、L V C C バクテリオファージの高められた安定性および生存性が、土壌により供給される厳しい条件にさらすことで決定された。研究は、ナイロンポリマーまたはセルロースに固定化されたバクテリオファージを用いた 2 つのタイプの L V C C の構築を含んだ。次いで、おのこの L V C C を非滅菌または滅菌した土壌に埋め、サンプルを 3 週間の期間にわたって採取し、L V C C の抗細菌活性を評価した。

【 0 1 0 1 】

結果は、遊離のバクテリオファージと比べて、両方の L V C C バクテリオファージタイプが、バクテリオファージの生残性を高めることを示す (図 7 参照) 。

【 0 1 0 2 】

実施例 5 - 多数のバクテリオファージで構成された L V C C
2 つの異なる標的細菌に対して活性である 2 つのバクテリオファージを用いて、共通のキャリア基質上に固定し、抗細菌活性を試験した L V C C 性能の評価。細菌叢上の除去パーセンテージは、宿主株における各々のファージによる平均除去 (m m で測定) に基づく。

【 0 1 0 3 】

結果は、抗細菌活性は減少せず、L V C C バクテリオファージは両標的細菌に対して依然として活性であったことを示す (図 8 参照) 。 2 つの細菌種 (1 宿主、1 非宿主) への処理材料の曝露が、なお感受性宿主の除去を生じる。

【 0 1 0 4 】

実施例 6 - 深創傷の治療

10 匹の対照動物 (ラット) において、傍脊柱筋中に深く切開し、5 % の豚胃ムチンに懸濁した $100 \mu\text{l}$ の $5 \times 10^7 \text{ c f u / m l}$ の E 1 5 M R S A を感染させ、傷を通常の縫合により閉じた。同じ切開を有する 10 匹の試験動物に 5 % の豚胃ムチンに懸濁した $100 \mu\text{l}$ の $5 \times 10^7 \text{ c f u / m l}$ の E 1 5 M R S A を与え、バクテリオファージ処理フィラメントを深創傷に挿入し、固定化したバクテリオファージはファージ K であった。

【 0 1 0 5 】

全ての動物を、術後に鎮痛剤で処置し、最初の 12 時間は 1 時間間隔で、感染後、次の 12 時間は 3 時間間隔で、次の 2 日間は 6 時間間隔で、それ以降は 1 日 2 回観察した。

【 0 1 0 6 】

創傷部位を、これらの時間間隔で、14 日まで炎症および感染 (膿の形成) の兆候について調べた。目視による結果を表 3 に示す。

【 0 1 0 7 】

感染対照区を示す図 9 を参照すると、示されたように、部位は依然として大きく腫れた状態であり、仮にあったとしてもほとんど治癒されておらず、14 日目には切開部位は隆起していた。図 10 に示すように、開くと、膿で満たされた切開部位が明らかになった。

【 0 1 0 8 】

バクテリオファージを付着させたテストフィラメントの使用を図 11 に示す。これはよく治癒された切開部位で、14 日目において腫れが最小であった。内部部位は、14 日目において、創傷部位への腫れが減少し、傍脊柱内の膿の形成も減少したことを示した。

【 0 1 0 9 】

実施例 7 - トマト種子へのバクテリオファージの固定化

バクテリオファージの調製

我々は、ペクトバクテリウム・カロトバラム株を 20 % トリプチック・ソイ・ブロス (他の適切な培地も知られている) 上で生育させ、対数増殖期に培養物に溶菌性バクテリオファージを感染させた。溶菌が起こると、我々は、遠心によりバクテリオファージを精製し、蒸留水に再懸濁し、遠心により濃縮することにより、バクテリオファージペレットを 3 度洗浄した。

【 0 1 1 0 】

コロナ処理

10

20

30

40

50

トマト種子を、75 kVで1秒間コロナ場で処理し、次いでバクテリオファージ懸濁液中に浸漬した（代替としては、処理した種子をバクテリオファージ懸濁液でスプレーすることである）。我々は、水で3回種子を洗浄し、結合していないバクテリオファージを除去した（代替としては、コロナ処理の前に種子にバクテリオファージ懸濁液を適用することである）。他の場強度もまた効果的であり、洗浄は、観察された抗細菌効果が、吸着した「遊離の」バクテリオファージよりも共有結合したバクテリオファージにより生じるものであることを証明するためにのみ必要であることに留意されたい。

【0111】

発芽

それゆえ、我々は、(i) 非処理、(ii) コロナ放電処理、(iii) バクテリオファージ存在下でコロナ放電処理および(iv) 遊離のバクテリオファージ処理の種子を調製し、それらの種子をシャーレ内にて水で湿らせた濾紙上で、室温で発芽させた（代替としては、ペクトバクテリウムが存在下および非存在下で、トリプチック・ソイ寒天（プロスに2%寒天を加えたもの）上で発芽させることである）。

【0112】

結果

トマト種子は、コロナ（図15）および抗ペクトバクテリウムファージとコロナ（図14）において、対照区（図13、コロナ無し）およびファージ無し（図16）に比べ、発芽が増進された。適切なペクトバクテリウム株（使用したバクテリオファージに感受性の）を接種した寒天上で、コロナおよび抗ペクトバクテリウムファージで処理した種子の周りに、除去ゾーンは、見られる。トマト種子表面は、主としてセルロースである。そこで、我々は、セルロース粒子上に固定化したバクテリオファージの生存性を別途テストした - 下記参照。

【0113】

実施例8 - インビボ植物病原菌アッセイ

我々は、W02007/072049のコロナ放電方法後のセルロース粉末（サイズの範囲は、約100ミクロン - 1mm）の上にペクトバクテリウムファージを固定化した。

【0114】

我々は、適切なペクトバクテリウム株（使用されるバクテリオファージに感受性である）を寒天プレートに接種し、3カ所に処理したセルロース粒子を加えた。

【0115】

図17に示す結果を参照すると、粉末粒子周囲の除去を見ることができ、固定化されたバクテリオファージの腐敗病細菌に対する活性を示す。これにより、活性バクテリオファージがセルロース材料に付着したことを確認した。

【0116】

実施例9 - セルロース粒子上のバクテリオファージ

我々は、W02007/072049のコロナ放電方法後のセルロース粉末（サイズ範囲は約100ミクロン - 1mm）上にペクトバクテリウムファージを固定した。

【0117】

我々は、適切なペクトバクテリウム株（使用するバクテリオファージに感受性である）を寒天プレートに接種し、3カ所にセルロース粉末を加えた。

【0118】

我々は、プレートを(i) 無し = 対照区、(ii) 溶液中の遊離のファージおよび(iii) 溶液中のセルロース粒子に付着したファージで処理した。そしてバクテリア除去において同様の活性が観察されるまで、(ii) および(iii) を滴定した。同様の活性は、セルロース粒子に1つのファージが付着したときに比べて、約100の遊離のファージが使用されたときに起こった。これにより、遊離のファージに比べて固定化されたファージの改善された特性を確認した。

【0119】

10

20

30

40

【表 1】

表1A

非処理LVCCまたは5%豚胃ムチン中に懸濁した100 μ lの10 ⁸ cfu/mlのE15を感染させた非処理LVCCで処理した傷の目視による結果		
非処理縫合系		
動物数	手法	目視による観察
3	切開のみ(陰性対照)	腫れも炎症も無し。やや隆起が見られる。内部に透明な液体の存在
4	100 μ lの10 ⁷ cfu/mlのE15および豚胃ムチンを感染させた切開(陽性対照)	顕著に隆起した固い塊。黒ずんだ濃い壊死性の膿が内部に存在

10

表1B

非処理またはバクテリオファージ処理LVCCおよび5%豚胃ムチン中に懸濁した100 μ lの5 \times 10 ⁷ cfu/mlのE15で処理した傷の目視による結果		
非処理縫合系		
動物数	傷の外見	内部観察
10	大きな、固く腫れた塊	黒ずんだ膿が形成
バクテリオファージ処理LVCC		
10	小さな、隆起した腫れ	透明な液体で満たされた切開部位

20

【 0 1 2 0 】

【表 2】

(透明な培養液により示されるファージ活性(P)。混濁した培養液で示される細菌の増殖(+))

	露出された細片			遮蔽された細片		
	r1	r2	r3	r1	r2	r3
UV(分)						
5	P	P	P	P	P	P
15	P	P	P	P	P	P
30	P	P	P	P	P	P

30

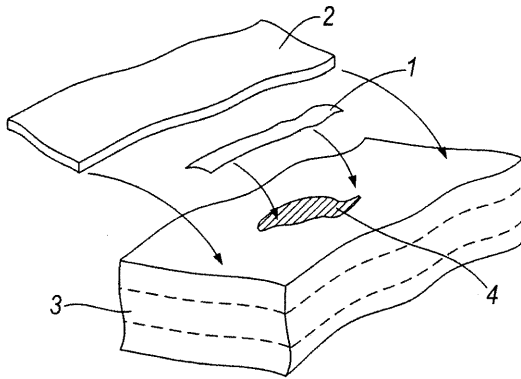
【 0 1 2 1 】

【表 3】

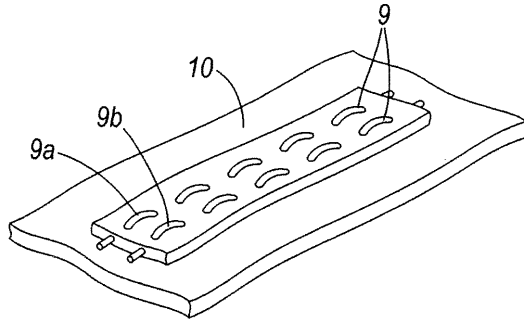
非処理またはバクテリオファージ処理フィラメントで処理された創傷の目視による結果		
非処理フィラメント		
動物数	創傷の外観	内部観察
10	大きな固く腫れた塊	黒ずんだ膿の形成
バクテリオファージ処理フィラメント		
10	小さな、隆起した腫れ	透明な液体で満たされた切開部位

40

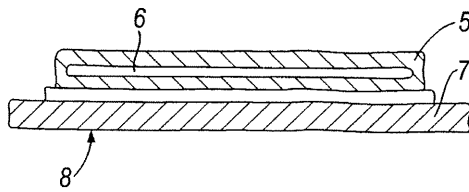
【図 1】



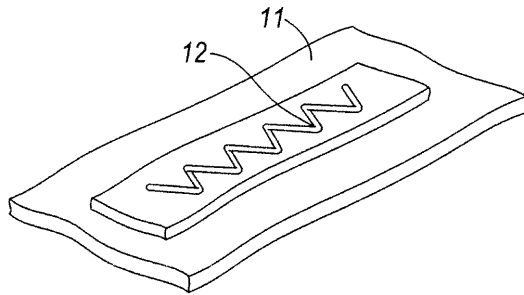
【図 2 b】



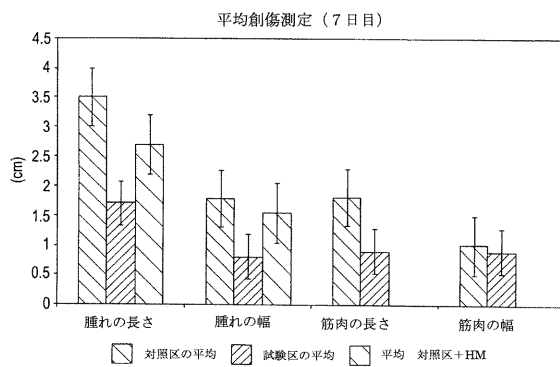
【図 2 a】



【図 3】



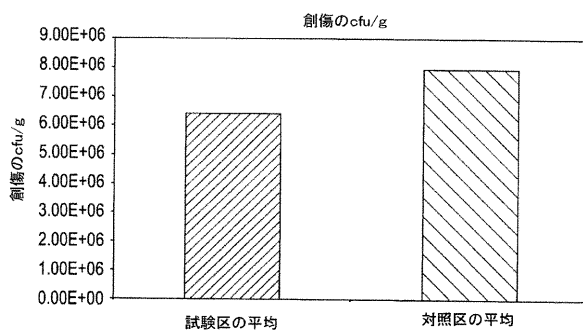
【図 4 a】



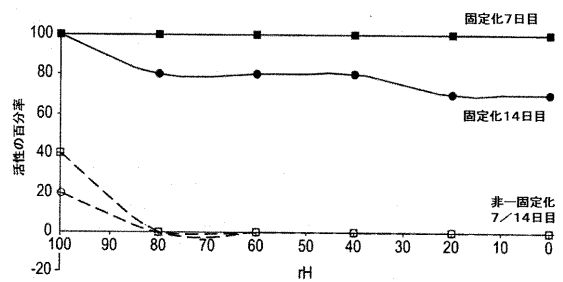
【図 5】



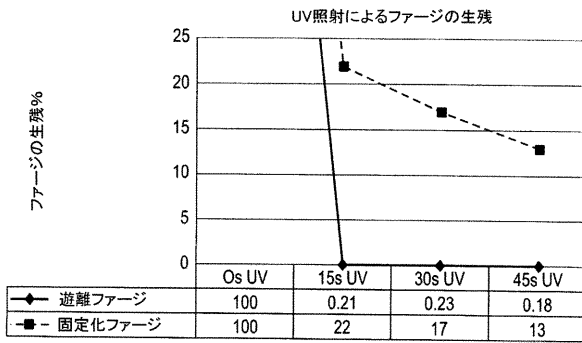
【図 4 b】



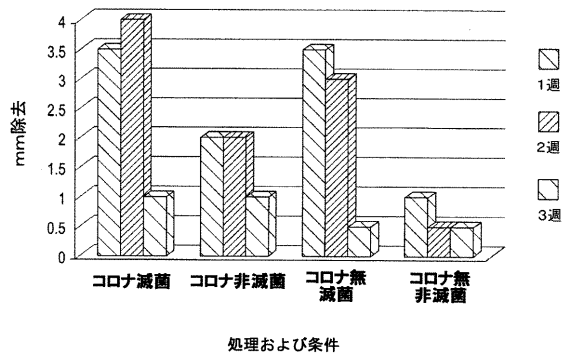
【図 6 a】



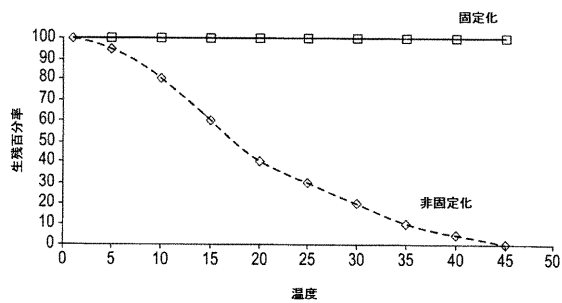
【図 6 b】



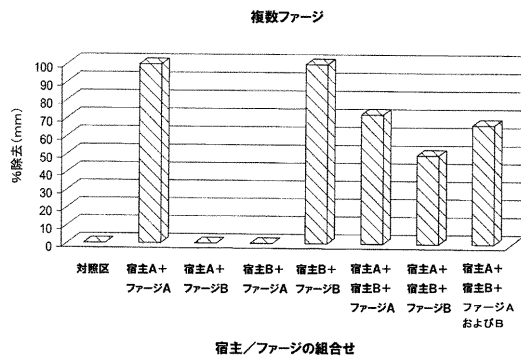
【図 7】



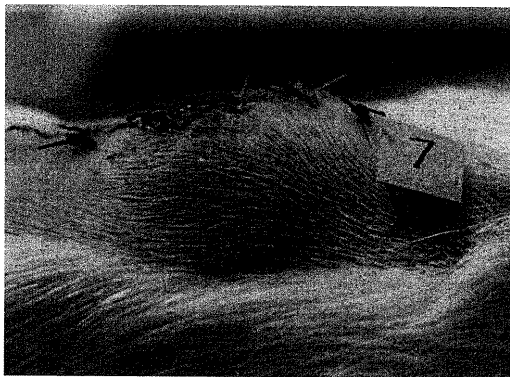
【図 6 c】



【図 8】



【図 9】



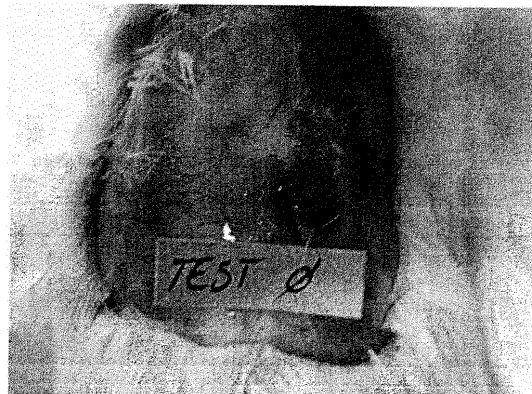
【図 1 1】



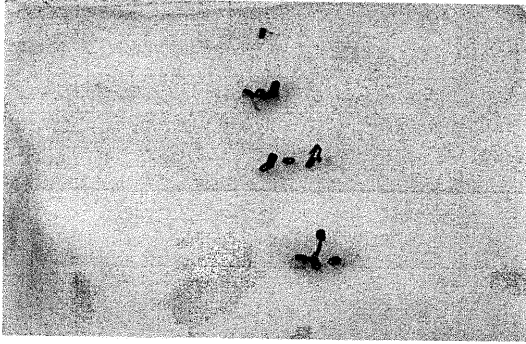
【図 1 0】



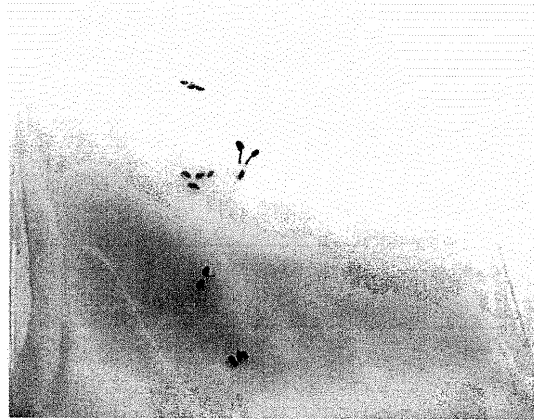
【図 1 2】



【図 13】



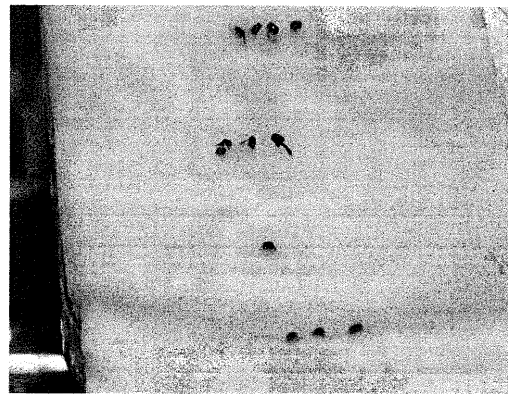
【図 15】



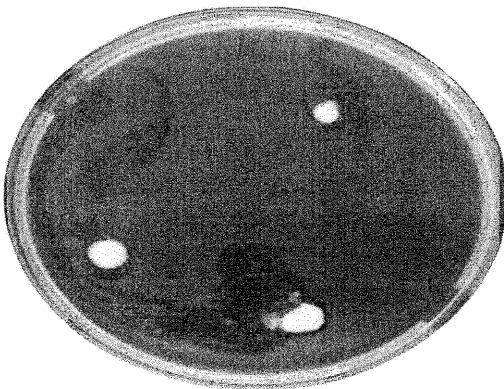
【図 14】



【図 16】



【図 17】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 K	9/70	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	1 7 1
A 6 1 L	15/36	(2006.01)	A 6 1 K	9/70	
A 0 1 G	7/00	(2006.01)	A 6 1 L	15/36	
A 0 1 C	1/06	(2006.01)	A 0 1 G	7/00	6 0 5 Z
			A 0 1 C	1/06	Z

- (72)発明者 チャドウィック, ジェイムズ
イギリス国 ケイエイ5 6エルエイ イースト エアシャー, モシュリン, バーロッホマイ
ル ウェイ 4
- (72)発明者 マティ, マイケル
イギリス国 ケイエイ5 6エルエイ イースト エアシャー, モシュリン, バーロッホマイ
ル ウェイ 4

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 国際公開第2006/047872(WO, A1)
特表2005-523943(JP, A)
国際公開第2005/083165(WO, A1)
米国特許第04828999(US, A)
国際公開第2006/125319(WO, A1)
Appl. Environ. Microbiol., 2010年 6月, Vol. 76, No. 12, pp. 3978-3988

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- A 0 1 H 5 / 0 0 - 5 / 1 2
A 2 3 K 1 0 / 0 0 - 5 0 / 9 0
A 6 1 L 1 5 / 0 0 - 3 3 / 1 8
A 6 1 K 3 5 / 7 6 - 3 5 / 7 6 8
A 6 1 P 3 1 / 0 0 - 3 1 / 2 2
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
D W P I (T h o m s o n I n n o v a t i o n)