

(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2017-512477

(P2017-512477A)

(43) 公表日 平成29年5月25日(2017.5.25)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 1/20 (2006.01)	C 12 N 1/20	A 4 B 06 5
A 61 K 35/74 (2015.01)	A 61 K 35/74	A 4 C 07 6
A 61 P 13/02 (2006.01)	A 61 P 13/02	1 O 5 4 C 08 1
A 61 K 9/06 (2006.01)	A 61 K 9/06	4 C 08 7
A 61 K 47/32 (2006.01)	A 61 K 47/32	4 C 16 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 40 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2016-559588 (P2016-559588)	(71) 出願人 510033594 コンジュゴン, インコーポレーテッド アメリカ合衆国 53719 ウィスコン シン州, マディソン, スイート 29, サ ウス ローザ ロード 505
(86) (22) 出願日	平成27年3月27日 (2015.3.27)	(74) 代理人 110000338 特許業務法人HARAKENZO WOR LD P A T E N T & T R A D E M A R K
(85) 翻訳文提出日	平成28年11月11日 (2016.11.11)	(72) 発明者 ワット, スティーヴン アール. アメリカ合衆国, 53719 ウィスコン シン州, マディソン, スイート29, サウ ス ローザ ロード 505
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/023026	
(87) 國際公開番号	W02015/148943	
(87) 國際公開日	平成27年10月1日 (2015.10.1)	
(31) 優先権主張番号	61/971, 913	
(32) 優先日	平成26年3月28日 (2014.3.28)	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】治療細菌の小型コロニー変種の調製

(57) 【要約】

本発明は、大腸菌の小型コロニー変種 (SCV)、好ましくは大腸菌 83972 または大腸菌 HU2117、もしくはその改質または変種形態、の分化、分離、増殖及び保管の方法、ならびに、製造された SCV 細菌を用いて、処理対象内及び / または処理医療機器上に、共生生物膜を設ける方法、に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

共生細菌を培養する方法であって、

a) 大腸菌小型コロニー変種 (S C V) 細菌を分離することと、

b) 液体成長培地に前記 S C V 細菌を接種することであって、前記液体成長培地は、

i) 緩衝液と、

i i) 糖または糖アルコールと、

i i i) システイン、メチオニン、セリン及びリシンと、を含んだ添加最小培地であり、

前記液体成長培地は、添加アデニン、シトシン、グアニン、ウラシル、イースト抽出物、または、複合タンパク質の酵素消化物を備えない、前記液体成長培地に前記 S C V 細菌を接種することと、

c) 前記 S C V 細菌株が成長して前記 S C V 細菌細胞の液体培養を生産する条件下で、前記液体成長培地を培養することと、

を備える前記方法。

【請求項 2】

前記糖または糖アルコールが、グリセリンを備える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記糖または糖アルコールが、前記液体成長培地の单一添加炭素源としてグリセリンから成る、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記大腸菌 S C V 細菌が、大腸菌 8 3 9 7 2 及び大腸菌 H U 2 1 1 7 、またはその変種もしくは誘導体から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 S C V 細菌細胞の前記液体培養では、対応する大型コロニー変種 (L C V) 細菌細胞の 50 % 未満、好ましくは 40 % 未満、好ましくは 30 % 未満、好ましくは 20 % 未満、好ましくは 10 % 未満、好ましくは 5 % 未満、好ましくは 1 % 未満、さらに好ましくは 0.1 % 未満、を備える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 S C V 細菌細胞の前記液体培養が、対応する L C V 細菌細胞を含まない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記分離することが、前記 S C V 細菌を尿から分離することを備える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記分離することが、前記 S C V 細菌を尿内で成長させることを備え、前記尿は、1つ以上の天然尿と合成尿とを備える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記分離することが、固体培養培地上で前記 S C V 細菌を成長することを備える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記固体培養培地が、マッコンキー寒天である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記緩衝液が、3 - (N - モルホリノ) プロパンスルホン酸 (M O P S) 緩衝液である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 M O P S 緩衝液が、M O P S / トリシンである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記液体成長培地が、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、フェニルアラニン及びトリプトファンから選択される1つ以上のアミノ酸をさらに備える、請求項 1 に記載の

10

20

40

50

方法。

【請求項 1 4】

前記液体成長培地が、硫酸第一鉄、塩化アンモニウム、硫酸カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム及び塩化ナトリウムを1つ以上含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記液体成長培地が、モリブデン酸アンモニウム、ホウ酸、塩化コバルト、硫酸第二銅、塩化マンガン及び硫酸亜鉛を1つ以上さらに備える、請求項1に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記液体成長培地が、本質的に以下から成る：

M O P S	40 mM	
3-(N-モルホリノ)-プロパンスルホン酸		
トリシン	4 mM	
硫酸鉄	10 μ M	
塩化アンモニウム	9.5 mM	
硫酸カリウム	276 μ M	
塩化カルシウム一水和物	0.5 μ M	
塩化マグネシウム	525 μ M	
塩化ナトリウム	50 mM	
モリブデン酸アンモニウム	2.92×10^{-9} M	10
ホウ酸	4×10^{-7} M	
塩化コバルト	3.02×10^{-8} M	
硫酸第二銅	9.62×10^{-9} M	
塩化マンガン	8.08×10^{-8} M	
硫酸亜鉛	9.74×10^{-9} M	
リン酸カリウム、二塩基	1.32 mM	
アラニン	0.798 mM	
アルギニン H C 1	5.2 mM	
アスパラギン	0.4 mM	
アスパラギン酸、カリウム	0.4 mM	
塩		
システイン一水和物 H C 1	0.1 mM	20
グルタミン酸、カリウム塩	0.7 mM	
グルタミン	0.6 mM	
グリシン	0.8 mM	
ヒスチジン一水和物 H C 1	0.2 mM	
イソロイシン	0.4 mM	
ロイシン	0.8 mM	
リシン二塩化水素化物	0.4 mM	
メチオニン	0.2 mM	
フェニルアラニン	0.4 mM	
プロリン	0.4 mM	30
セリン	10.0 mM	
スレオニン	0.4 mM	
トリプトファン	0.1 mM	
チロシン	0.2 mM	
バリン	0.6 mM	
チアミン H C 1	0.01 mM	
パントテン酸カルシウム	0.01 mM	
ρ -アミノ安息香酸	0.01 mM	
ρ -ヒドロキシ安息香酸	0.01 mM	
2,3-ジヒドロキシ安息香酸	0.01 mM	
グリセリン	0.4 %	40
水	(w/v)	

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

共生 S C V 細菌細胞を備える医療用潤滑剤ゲルを調製する方法であつて、

a)

- i) 共生 S C V 細菌細胞の液体培養と、
 - i i) 薬理学的に許容されるゲル化剤と、
 - i i i) 薬理学的に許容される第 1 の保護剤と、
- を備える混合物を、液体内に提供することと、

b) 前記混合物を凍結して、凍結製剤を生産することと、
を備える前記方法。

【請求項 18】

前記凍結製剤を真空下で乾燥して、乾燥製剤を生産する、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

前記共生 S C V 細菌細胞の前記液体培養が、請求項1~16のいずれか1項により生成される前記大腸菌 S C V 細菌細胞の液体培養である、請求項17または請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

前記ゲル化剤が、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルグアガム、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボマー、アルギン酸塩、ゼラチン及びポロクサマーから成る群より選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項 21】

前記混合物が、薬理学的に許容される第2の保護剤をさらに備え、前記第2の保護剤が、前記第1の保護剤と異なっており、前記第1の保護剤及び前記第2の保護剤が、脱脂乳固形分、トレハロース、グリセリン、ベタイン、ショ糖、ブドウ糖、ラクトース、デキストラン、ポリエチレングリコール、ソルビトール、マンニトール、ポリビニルプロピレン、グルタミン酸カリウム、グルタミン酸ソーダ、T w e e n 2 0 界面活性剤、T w e e n 8 0 界面活性剤及びアミノ酸塩酸塩からなる群より選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項 22】

請求項17に記載の方法により生成される前記共生 S C V 細菌細胞を備える、凍結組成物。

【請求項 23】

前記共生 S C V 細菌細胞を備える、医療用潤滑剤ゲルを調製するための凍結乾燥組成物であって、前記組成物は、請求項18に記載の方法により生成される、凍結乾燥組成物。

【請求項 24】

請求項19の方法により生成される、請求項22または請求項23に記載の組成物。

【請求項 25】

前記大腸菌 S C V 細菌細胞が、大腸菌 8 3 9 7 2 及び大腸菌 H U 2 1 1 7 細胞、またはその変種もしくは誘導体から選択される、請求項24に記載の組成物。

【請求項 26】

前記 S C V 細菌細胞の前記製剤では、対応する前記 L C V 細菌細胞の 5 0 % 未満、好ましくは 4 0 % 未満、好ましくは 3 0 % 未満、好ましくは 2 0 % 未満、好ましくは 1 0 % 未満、好ましくは 5 % 未満、好ましくは 1 % 未満、さらに好ましくは 0 . 1 % 未満、を備える、請求項22または請求項23に記載の組成物。

【請求項 27】

前記 S C V 細菌細胞の前記製剤は、対応する L C V 細菌細胞を含まない、請求項22または請求項23に記載の組成物。

【請求項 28】

前記ゲル化剤が、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルグアガム、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボマー、アルギン酸塩、ゼラチン及びポロクサマーから成る群より選択される、請求項22または請求項23に記載の組成物。

【請求項 29】

前記第1の保護剤が、脱脂乳固形分、ショ糖、トレハロース、グリセリン、ベタイン、ブドウ糖、ラクトース、デキストラン、ポリエチレングリコール、ソルビトール、マンニトール、ポリビニルプロピレン、グルタミン酸カリウム、グルタミン酸ソーダ、T w e e

10

20

30

40

50

n 2 0 界面活性剤、T w e e n 8 0 界面活性剤及びアミノ酸塩酸塩から成る群より選択される、請求項 2 2 または請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

薬理学的に許容される第 2 の保護剤をさらに備え、前記第 2 の保護剤が、前記第 1 の保護剤と異なっており、かつ、脱脂乳固形分、トレハロース、グリセリン、ベタイン、ショ糖、ブドウ糖、ラクトース、デキストラン、ポリエチレングリコール、ソルビトール、マンニトール、ポリビニルプロピレン、グルタミン酸カリウム、グルタミン酸ソーダ、T w e e n 2 0 界面活性剤、T w e e n 8 0 界面活性剤及びアミノ酸塩酸塩から成る群より選択される、請求項 2 2 または請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

生物膜を医療機器上に生成する方法であって、

- a) S C V 細菌細胞と、薬理学的に許容されるゲル化剤と、薬理学的に許容される保護剤とを備える凍結乾燥製剤を提供することと、
 - b) 前記凍結乾燥製剤を液体に露出して、有効量の前記 S C V 細菌細胞を備える医学的に許容可能な潤滑剤ゲルを生成することと、
 - c) 前記医療機器を前記潤滑剤ゲルに接触させて、処理機器を生産することと、
 - d) 前記処理器具上に前記 S C V 細菌細胞の生物膜を形成する条件で、前記処理器具を露出することと、
- を備える前記方法。

【請求項 3 2】

生物膜を医療機器上に生成する方法であって、

- a) S C V 細菌細胞と、薬理学的に許容されるゲル化剤と、薬理学的に許容される保護剤の製剤とを備える凍結製剤を提供することと、
 - b) 前記凍結製剤を解凍して、有効量の前記 S C V 細菌細胞を備える医学的に許容可能な潤滑剤ゲルを生成することと、
 - c) 前記医療機器を前記潤滑剤ゲルに接触させて、処理機器を生産することと、
 - d) 前記処理器具上に前記 S C V 細菌細胞の生物膜を生成する条件で、前記処理器具を露出することと、
- を備える前記方法。

【請求項 3 3】

前記医療機器が尿路カテーテルである、請求項 3 1 または請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記処理器具の前記露出が、対象を前記処理器具に接触させることを含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

S C V 細菌細胞を対象に投与する方法であって、

- a) S C V 細菌細胞の製剤と、薬理学的に許容されるゲル化剤と、薬理学的に許容される保護剤とを備える凍結乾燥製剤を提供することと、
 - b) 前記凍結乾燥製剤を液体に当てて、有効量の前記 S C V 細菌細胞を含む医学的に許容可能な潤滑剤ゲルを生成することと、
 - c) 前記対象を前記潤滑剤ゲルに接触させることと、
- を備える前記方法。

【請求項 3 6】

S C V 細菌細胞を対象に投与する方法であって、

- a) S C V 細菌細胞の製剤と、薬理学的に許容されるゲル化剤と、薬理学的に許容される保護剤とを備える凍結製剤を提供することと、
 - b) 前記凍結製剤を解凍して、有効量の前記 S C V 細菌細胞を備える医学的に許容可能な潤滑剤ゲルを生成することと、
 - c) 前記対象を前記潤滑剤ゲルに接触させることと、
- を備える前記方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 7】

前記対象を前記ゲルに接触させることが、医療機器を前記潤滑剤ゲルに接触させて処理機器を生産することと、前記対象を前記処理器具に接触させることとを備える、請求項 3 5 または請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記医療機器が尿路カテーテルである、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記 S C V 細菌細胞が、大腸菌 H U 2 1 1 7 または大腸菌 8 3 9 7 2 である、請求項 3 5 または請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 0】

請求項 2 2 ~ 3 0 のいずれか 1 項による組成物を備えるキット。

【請求項 4 1】

滅菌水性流体の容器をさらに備える、請求項 4 0 に記載のキット。

【請求項 4 2】

前記滅菌水性流体が水である、請求項 4 1 に記載のキット。

【請求項 4 3】

医療機器をさらに備える、請求項 4 0 に記載のキット。

【請求項 4 4】

前記医療機器が尿路カテーテルを含む、請求項 4 2 に記載のキット。

【請求項 4 5】

前記大腸菌 S C V 細菌は、大腸菌 8 3 9 7 2 及び大腸菌 H U 2 1 1 7 、またはその変種もしくは誘導体から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記 S C V 細菌細胞の前記液体培養では、対応する L C V 細菌細胞の 5 0 % 未満、好ましくは 4 0 % 未満、好ましくは 3 0 % 未満、好ましくは 2 0 % 未満、好ましくは 1 0 % 未満、好ましくは 5 % 未満、好ましくは 1 % 未満、さらに好ましくは 0 . 1 % 未満、を備える、請求項 1 ~ 3 及び 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

S C V 細菌細胞の前記液体培養が、対応する L C V 細菌細胞を含まない、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記分離することが、尿から S C V 細菌を分離することを含む、請求項 1 ~ 3 及び 4 5 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記分離することが、S C V 細菌を尿内で成長させることを備え、前記尿は、1 つ以上の天然尿と合成尿とを備える、請求項 1 ~ 3 及び 4 5 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

。

【請求項 5 0】

前記分離することが、前記 S C V 細菌を固体培養培地上に成長させることを備える、請求項 1 ~ 3 及び 4 5 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記固体培養培地がマッコンキー寒天である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記緩衝液が、3 - (N - モルホリノ) プロパンスルホン酸 (M O P S) 緩衝液である、請求項 1 ~ 3 及び 4 5 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記 M O P S 緩衝液が M O P S / トリシンである、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記液体成長培地が、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、フェニルアラニン及びトリプトファンから選択される 1 つ以上のアミノ酸をさらに備える、請求項 1 ~ 3 及び

10

20

30

40

50

4 5 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記液体成長培地が、硫酸第一鉄、塩化アンモニウム、硫酸カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム及び塩化ナトリウムの 1 つ以上を備える、請求項 1 ~ 3 及び 4 5 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記液体成長培地が、モリブデン酸アンモニウム、ホウ酸、塩化コバルト、硫酸第二銅、塩化マンガン及び硫酸亜鉛の 1 つ以上をさらに備える、請求項 1 ~ 3 及び 4 5 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記液体成長培地が、本質的に以下から成る：

M O P S	40 mM	
3-(N-モルホリノ)-プロパンスルホン酸		
トリシン	4 mM	
硫酸鉄	10 μM	
塩化アンモニウム	9.5 mM	
硫酸カリウム	276 μM	
塩化カルシウム一水和物	0.5 μM	
塩化マグネシウム	525 μM	
塩化ナトリウム	50 mM	
モリブデン酸アンモニウム	2.92x10 ⁻⁹ M	10
ホウ酸	4x10 ⁻⁷ M	
塩化コバルト	3.02x10 ⁻⁸ M	
硫酸第二銅	9.62x10 ⁻⁹ M	
塩化マンガン	8.08x10 ⁻⁸ M	
硫酸亜鉛	9.74x10 ⁻⁹ M	
リン酸カリウム、二塩基	1.32 mM	
アラニン	0.798 mM	
アルギニン H C 1	5.2 mM	
アスパラギン	0.4 mM	
アスパラギン酸、カリウム	0.4 mM	
塩		
システイン一水和物 H C 1	0.1 mM	20
グルタミン酸、カリウム塩	0.7 mM	
グルタミン	0.6 mM	
グリシン	0.8 mM	
ヒスチジン一水和物 H C 1	0.2 mM	
イソロイシン	0.4 mM	
ロイシン	0.8 mM	
リシン二塩化水素化物	0.4 mM	
メチオニン	0.2 mM	
フェニルアラニン	0.4 mM	
プロリン	0.4 mM	30
セリン	10.0 mM	
スレオニン	0.4 mM	
トリプトファン	0.1 mM	
チロシン	0.2 mM	
バリン	0.6 mM	
チアミン H C 1	0.01 mM	
パントテン酸カルシウム	0.01 mM	
ρ-アミノ安息香酸	0.01 mM	
ρ-ヒドロキシ安息香酸	0.01 mM	
2,3-ジヒドロキシ安息香酸	0.01 mM	
グリセリン	0.4 % (w/v)	40
水		

請求項 1～3 及び 4 5～5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 8】

共生 S C V 細菌細胞を備える医療用潤滑剤ゲルを調製する方法であって、

a)

i) 請求項 1～3 及び 4 5～5 7 のいずれか 1 項により生成される大腸菌 S C V 細菌細胞の液体培養と、

i i) 薬理学的に許容されるゲル化剤と、

i i i) 薬理学的に許容される第 1 の保護剤と、
を備える混合物を液体内に提供することと、
b) 前記混合物を凍結させて、凍結製剤を生産することと、
を備える前記方法。

【請求項 5 9】

前記凍結製剤を真空下で乾燥して、乾燥製剤を生産する、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記ゲル化剤が、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルグーガム、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボマー、アルギン酸塩、ゼラチン及びポロクサマーから成る群より選択される、請求項 5 8 または請求項 5 9 に記載の方法。

10

【請求項 6 1】

前記混合物が、薬理学的に許容される第 2 の保護剤をさらに備え、前記第 2 の保護剤が、前記第 1 の保護剤と異なっており、前記第 1 の及び前記第 2 の保護剤が、脱脂乳固形分、トレハロース、グリセリン、ベタイン、ショ糖、ブドウ糖、ラクトース、デキストラン、ポリエチレングリコール、ソルビトール、マンニトール、ポリビニルプロピレン、グルタミン酸カリウム、グルタミン酸ソーダ、Tween 20 界面活性剤、Tween 80 界面活性剤及びアミノ酸塩からなる群から選択される、請求項 5 8 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 6 2】

請求項 5 8 及び 6 0 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法により生成される共生 S C V 細菌細胞を備える、凍結組成物。

【請求項 6 3】

共生 S C V 細菌細胞を備える、医療用潤滑剤ゲルを調製するための凍結乾燥組成物であって、前記凍結乾燥組成物が、請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれか 1 項の方法により生成される、凍結乾燥組成物。

【請求項 6 4】

請求項 6 2 及び / または請求項 6 3 による組成物を備える、キット。

【請求項 6 5】

滅菌水性液体、好ましくは滅菌水、の容器をさらに備える、請求項 6 4 に記載のキット。

30

【請求項 6 6】

医療機器をさらに備える、請求項 6 4 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 6 7】

前記医療機器が尿路カテーテルを備える、請求項 6 6 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2014年3月28日に出願の米国仮出願番号第 6 1 / 9 7 1 , 9 1 3 号における優先権を主張するものであり、これは参照事項として本出願に組み込まれる。

40

【0 0 0 2】

本発明は、例えば大腸菌の非病原性菌種等、共有生物体の小型コロニー変種を調製及び使用する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

細菌尿症及び膿尿症は、尿道留置カテーテルを有する患者に均一に存在する。抗菌療法により、細菌を一時的に根絶することができるが、細菌尿はすぐに再発し、感染細菌は抗生素質に対して進行的に抵抗するようになる。カテーテル処置した患者における無症候性尿路感染症 (UTI) の抗菌 (例えば抗生素及び / または消毒剤) 処理には、処理及び非

50

処理のカテーテル処置患者が処理終了の数週間後における感染症の類似した罹患率を有しかつ症候性UTI発作を発症する同等の可能性を有しているとの効果があるとは、示されていない(Nicolle, L. E., Drugs Aging 22(8): 627-39(2005))。さらに、無症候性カテーテル関連のUTIの抗菌処理(CAUTI)が、薬剤耐性生物体の出現に関連し、症状のある感染が生じる際の処置を複雑にしていた。

【0004】

大腸菌の所定の非病原性菌種による膀胱の前コロニー形成が、様々な尿病原体により尿路カテーテルコロニー形成の生体内の発生率を防止または低減するための、安全かつ有効な方法であることを、研究が示唆した。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、非病原性大腸菌の特定変種形の製剤及び増殖に関する。ある実施形態では、小型コロニー変種が、治療的製剤、例えば共有微生物を含む潤滑剤ゲルの凍結乾燥製剤で使用するために選択される。本発明は、大腸菌、好ましくは大腸菌83972または大腸菌HU2117、またはその改質または変種形の、小型コロニー変種(SCV)の分化、分離、増殖及び保管の方法、及び、製造された細菌を用いて処理した対象内に生物膜を設ける方法、に関する。

【0006】

ある実施形態では、本技術は、好ましくは液体培養内で、共有細菌のSCVを培養する方法を提供する。ある実施形態では、本方法は、大腸菌小型コロニー変種(SCV)細菌を分離することと、液体成長培地にSCV細菌を接種することとを備えており、液体成長培地は、糖または糖アルコール等の炭素源を備え、かつ、アミノ酸システィン、メチオニン、セリン及びリシンをさらに備える、添加最少培地である。好ましくは、液体成長培地は、添加アデニン、シトシン、グアニン、ウラシル、イースト抽出物、または、複合タンパク質の酵素消化物を備えない。ある実施形態では、液体培地は、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)緩衝液等の緩衝液を備えている。所定の好ましい実施形態では、MOPS溶液は、MOPS/トリセン溶液を備えている。

20

【0007】

SCV細菌を培養する方法はさらに、SCV菌種が成長して、通常のまたは「大型コロニー変種」(LCV)形への最小限の復帰で、SCV形を保持する細菌性細胞の液体培養を生産する条件下で、接種される液体成長培地を培養することを備える。ある実施形態では、SCV細菌細胞の液体培養は、細菌の対応する通常形またはLCV形の50%未満、好ましくは40%未満、好ましくは30%未満、好ましくは20%未満、好ましくは10%未満、好ましくは5%未満、好ましくは1%未満、より好ましくは0.1%未満を備えている。一部の好ましい実施形態では、SCV細菌細胞の液体培養は、対応するLCV細菌性細胞に対してフリー、または本質的にフリーである。

30

【0008】

ある実施形態では、炭素源はグリセリンを含み、所定の好ましい実施形態では、炭素源は本質的にグリセリンから成り、そこではグリセリンが液体成長培地の単一添加炭素源である。

40

【0009】

ある実施形態では、大腸菌のSCV型を分離することは、尿からSCV細菌を分離することを備えている。ある実施形態では、尿は生体であり、すなわちヒトまたは動物により生成される尿である一方、一部の実施形態では、尿は合成または人工尿である。ある実施形態では、SCV細菌は、尿で培養される。体内(生体内、例えば個人の尿路内で)で、SCV細菌を尿で培養してもよく、または、体外(生体外で、例えば実験室の血管内で)で培養してもよい。

【0010】

ある実施形態では、SCV細菌を分離することは、固体培養培地上、例えばマッコンキ

50

－寒天またはL B 寒天等の寒天を含有する培地上で、S C V 細菌を成長させることを備えている。

【0 0 1 1】

ある実施形態では、例えば上記の添加最少培地等の液体成長培地は、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、フェニルアラニン及びトリプトファンから選択される1つ以上のアミノ酸をさらに備えている。また、液体培地は1つ以上の塩を含有していてもよい。ある実施形態では、液体成長培地は、1つ以上の硫酸第一鉄、塩化アンモニウム、硫酸カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム及び塩化ナトリウムを含んでおり、一部の実施形態では、液体成長培地は、1つ以上のモリブデン酸アンモニウム、ホウ酸、塩化コバルト、硫酸第二銅、塩化マンガン及び硫酸亜鉛をさらに備えている。

10

【0 0 1 2】

特定の実施形態では、液体成長培地は、本質的に以下から成る組成培地である。

M O P S	40 mM	
3-(N-モルホリノ)-プロパンスルホン酸		
トリシン	4 mM	
硫酸鉄	10 μM	
塩化アンモニウム	9.5 mM	
硫酸カリウム	276 μM	
塩化カルシウム一水和物	0.5 μM	
塩化マグネシウム	525 μM	
塩化ナトリウム	50 mM	
モリブデン酸アンモニウム	2.92x10 ⁻⁹ M	10
ホウ酸	4x10 ⁻⁷ M	
塩化コバルト	3.02x10 ⁻⁸ M	
硫酸第二銅	9.62x10 ⁻⁹ M	
塩化マンガン	8.08x10 ⁻⁸ M	
硫酸亜鉛	9.74x10 ⁻⁹ M	
リン酸カリウム、二塩基	1.32 mM	
アラニン	0.798 mM	
アルギニン H C 1	5.2 mM	
アスパラギン	0.4 mM	
アスパラギン酸、カリウム	0.4 mM	
塩		
システイン一水和物 H C 1	0.1 mM	20
グルタミン酸、カリウム塩	0.7 mM	
グルタミン	0.6 mM	
グリシン	0.8 mM	
ヒスチジン一水和物 H C 1	0.2 mM	
イソロイシン	0.4 mM	
ロイシン	0.8 mM	
リシン二塩化水素化物	0.4 mM	
メチオニン	0.2 mM	
フェニルアラニン	0.4 mM	
プロリン	0.4 mM	30
セリン	10.0 mM	
スレオニン	0.4 mM	
トリプトファン	0.1 mM	
チロシン	0.2 mM	
バリン	0.6 mM	
チアミン H C 1	0.01 mM	
バントテン酸カルシウム	0.01 mM	
ρ-アミノ安息香酸	0.01 mM	
ρ-ヒドロキシ安息香酸	0.01 mM	
2,3-ジヒドロキシ安息香酸	0.01 mM	
グリセリン	0.4 %	40
水	(w/v)	

【0013】

ある実施形態では、本技術は、例えば使用前に医療機器に潤滑剤を入れるために、医療用潤滑剤ゲル内に生存可能共生 S C V 病原性大腸菌を提供する。好ましい実施形態では、共生ゲル組成物を使用することにより、例えば、患者の尿路内等における、処理医療機器の表面上、及び/または、処理機器に露出される組織表面上への、前記病原性大腸菌の生物膜の生成が誘導される。

【0014】

ある実施形態では、S C V 病原性大腸菌を含む潤滑剤ゲルを提供することは、a) 液体

内に、 i) 上記の共生 S C V 細菌細胞の液体培養、 i i) 薬理学的に許容されるゲル化剤、及び i i i) 薬理学的に許容される保護剤、を含む混合物を提供するステップ；ならびに、 b) 混合物を凍結して、潤滑剤ゲルを混合した細菌の凍結製剤を生産するステップ、を備えている。ある実施形態では、その後凍結製剤を真空下で乾燥して、例えば安定保管のため、凍結乾燥製剤を生産する。

【 0 0 1 5 】

共生病原性大腸菌の凍結乾燥製剤及び潤滑剤ゲルは、例えば米国特許出願第 1 2 / 6 7 1, 3 7 0 号に記載されるように製造されてもよく、これは参考事項として本出願に組み込まれる。製剤が（凍結であるならば）解凍される場合、または（凍結乾燥であるならば）液体で再組成される場合のいずれかの場合に、ゲル化剤を選択して、使用中に適した潤滑剤機能を提供する。ある実施形態では、ゲル化剤は、1つ以上のヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルグーガム、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボマー、アルギン酸、ゼラチン、またはポロクサマーを備えている。所定の好ましい実施形態では、ゲル化剤は、ヒドロキシエチルセルロースを含むまたはヒドロキシエチルセルロースを備えている。

10

【 0 0 1 6 】

ある実施形態では、 S C V 細菌を含む水性混合流体は、第 1 の保護剤と異なる薬理学的に許容される第 2 の保護剤をさらに備えている。特定の実施形態では、第 1 及び第 2 の保護剤は、1つ以上の脱脂乳固体分、トレハロース、グリセリン、ベタイン、ショ糖、ブドウ糖、ラクトース、デキストラン、ポリエチレングリコール、ソルビトール、マンニトール、ポリビニルプロピレン、グルタミン酸カリウム、グルタミン酸ソーダ、T w e e n 2 0 界面活性剤、T w e e n 8 0 界面活性剤、及び／またはアミノ酸ハイドロクロライドを備えている。

20

【 0 0 1 7 】

ある実施形態では、本技術は、上記に記載する方法で生成する共生大腸菌 S C V 細菌細胞を含んでいる凍結または凍結乾燥組成物を提供する。ある実施形態では、 S C V 細菌細胞の製剤は、対応する通常または細菌 L C V 形の 5 0 % 未満、好ましくは 4 0 % 未満、好ましくは 3 0 % 未満、好ましくは 2 0 % 未満、好ましくは 1 0 % 未満、好ましくは 5 % 未満、好ましくは 1 % 未満、さらに好ましくは 0 . 1 % 未満を、備えている。一部の好ましい実施形態において、 S C V 細菌細胞の製剤は、対応する L C V 細菌性細胞がフリー、または本質的にフリーである。

30

【 0 0 1 8 】

ある実施形態では、本技術は、医療機器上の生物膜を、この機器を S C V 病原性大腸菌細胞の製剤で治療することにより、生成する方法を提供する。ある実施形態では、本技術は、 a) S C V 細菌細胞と、薬理学的に許容されるゲル化剤と、薬理学的に許容される保護剤と、を備える凍結乾燥製剤を提供すること； b) 凍結乾燥製剤を液体に露出して、有効量の S C V 細菌細胞を含む医学的に許容可能な潤滑剤ゲルを生成すること； c) 医療機器を潤滑剤ゲルに接触させて、処理機器を生産すること；及び、 d) 処理機器上及び／または処理器具に曝露される組織上に、細菌細胞の生物膜が組織する条件で、処理機器を露出すること、を備えている。

40

【 0 0 1 9 】

ある実施形態では、生物膜を医療機器上に生成する方法は、 a) S C V 細菌細胞の製剤、例えば上記のように薬理学的に許容されるゲル化剤及び薬理学的に許容される保護剤、を含む、凍結製剤を提供すること； b) 凍結製剤を解凍して、有効量の S C V 細菌細胞を含む医学的に許容可能な潤滑剤ゲルを生成すること； c) 医療機器を潤滑剤ゲルに接触させて、処理機器を生産すること；及び、 d) 生物膜が S C V 細菌細胞から、処理機器上及び／または処理機器に露出される組織上に組織する条件で、処理機器を露出すること、を備えている。

【 0 0 2 0 】

50

ある実施形態では、医療機器は、尿路カテーテルである。特定の実施形態では、処理機器を生物膜・成形条件に露出することは、例えば患者等の対象を、処理機器に接触させることを備えている。

【0021】

付加的な実施形態では、本技術は、SCV細菌細胞を対象に投与する方法を提供し、この方法は、a) SCV細菌細胞の製剤の混合物と、薬理学的に許容されるゲル化剤と、薬理学的に許容される保護剤と、を含む凍結乾燥製剤を提供すること；b) 凍結乾燥製剤を液体に露出して、SCV細菌細胞の有効量を含む医学的に許容可能な潤滑剤ゲルを生成すること；及び、c) 対象を潤滑剤ゲルに接触させること、を備えている。他の実施形態において、本技術は、SCV細菌細胞を対象に投与する方法を提供し、この方法は、a) SCV細菌細胞の製剤の混合物と、薬理学的に許容されるゲル化剤と、薬理学的に許容される保護剤と、を備える凍結製剤を提供すること；b) 凍結製剤を解凍して、有効量のSCV細菌細胞を含む医学的に許容可能な潤滑剤ゲルを生成すること；及び、c) 潤滑剤ゲルを対象に接触させること、を備えている。

10

【0022】

特定の実施形態では、ゲルを対象に接触させることは、潤滑剤ゲルを医療機器に接触させて処理機器を生産することと、処理機器を対象に接触させることと、を備えている。所定の好ましい実施形態では、医療機器は、尿路カテーテルである。

【0023】

本技術は、組成物の便利な使用のためのキットと、上記の方法とを、更に提供する。例えば、ある実施形態では、本技術は、例えばi)上記のようにSCV病原性大腸菌細胞を含む、凍結乾燥または凍結組成物混合物を備えるキットとして提供される。組成物が凍結乾燥形態で提供される特定の実施形態では、キットは、凍結乾燥混合物を再懸濁して有効量のSCV細菌を含む潤滑剤ゲルを生産するための、例えば水等の滅菌水性流体の容器を、さらに備えていてもよい。ある実施形態では、キットは、カテーテル、例えば尿路カテーテル等の、医療機器を、さらに備えている。

20

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1A～1Cは、マッコンキー寒天（A）上、LB寒天（B）上、または、改質MOPS最小寒天（C）上の、大腸菌HU2117の大型及び小型コロニー変種のコロニー形態を示す図である。大型コロニー変種は各平板の左上に条痕され、小型コロニー変種は右上に条痕される。

30

【図2】SCV-形態大腸菌HU2117の2つの異なるグリセリンフリーザーストックで条痕されるマッコンキー寒天平板を示す図である。左平板はHU2117ストックAを示し、右平板はHU2117ストックBを示す。

【図3】SCV-形態大腸菌HU2117の2つの異なるグリセリンフリーザーストックで条痕されるLB寒天平板を示す図である。左平板はHU2117ストックAを示し、右平板はHU2117ストックBを示す。

【図4】LCV-形態大腸菌83972の2つの異なるグリセリンフリーザーストックで条痕されるマッコンキー寒天平板を示す図である。左平板は83972ストックAを示し、右平板は83972ストックBを示す。

40

【図5】LCV-形態大腸菌83972の2つの異なるグリセリンフリーザーストックで条痕されるLB寒天平板を示す図である。左平板は83972ストックAを示し、右平板は83972ストックBを示す。

【図6】大腸菌83972のSCV及びLCV形態のグリセリンフリーザーストックに条痕されるマッコンキー寒天平板を示す図である。左平板はSCV-形態CON42-5を示し、右平板はLCV-形態CON19-4Aを示す。

【図7】大腸菌83972のSCV及びLCV形態のグリセリンフリーザーストックで条痕されるLB寒天平板を示す図である。左平板はSCV-形態CON42-5を示し、右平板はLCV-形態CON19-4Aを示す。

50

【図8】図8Aおよび8Bは、ここに記載のように調製される大腸菌83972及びH U 2117のSCV形態のグリセリンストックで条痕される、マッコンキー及びLB寒天平板を示す図である。図8A及び図8Bの左平板は83972を示し、右平板はH U 2117を示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

定義

本発明の理解を容易にするため、多数の用語及び熟語を、下記のように定義する。

【0026】

小型コロニー変種(SCV)とは、固体培地上で成長する際に、対応する親菌の通常コロニーサイズより実質的に小型であるコロニーを生成することを特徴とする、大腸菌の変種のことをいう。例えば、大腸菌のSCVは、自分が成長する寒天上でのサイズが一晩の培養後でも少量であるコロニーを典型的に生成する一方、LCVは、他のコロニーと十分に分離すれば、直径で例えば1mmまたはこれより大きな通常サイズのコロニーを生成する。例えば、マッコンキー寒天上、ルリア-ベルターニ(LB)寒天上、及び改質MOPS最小寒天上での、大腸菌H U 2117のLCV及びSCVを比較する図1を参照されたい。大腸菌種のSCVコロニーは、同じ生物体の通常またはこれより大きいコロニー変種の直径の1/10またはこれより小さい大きさを一般に測定する。コロニーは一般には、液体培地内での培養中には生成されないが、液体培養が固体培地の上で条痕され培養されてコロニーを生成する際に得られたコロニーが、支配的にまたは排他的にSCV形態であるならば、この微生物の形態は、「SCV」であると考えられる。

10

20

30

【0027】

ここで用いられる大きなコロニー変種は、標準サイズを有する変種のことをいい、一般に直径で、同じ生物体のSCVが同様に成長した場合の少なくとも10倍大きい。

【0028】

ここに用いられる場合において、用語「対象」とは、本発明の方法または組成物により処理される個体(例えばヒト、動物または他の生物体)のことをいう。対象は、哺乳類(例えば、ネズミ、サル、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ等)を含むが限定的ではなく、そして最も好ましくは、ヒトを含む。本発明との関連で、用語「対象」とは一般に、病原性細菌の存在に特徴がある状態または病原性細菌へのあり得る被曝を予想する状態で、処理(例えば1つの共生微生物及び任意に1つ以上の他の薬剤の投与)を受ける予定であるまたは受けた処理を有する個体のことをいう。

30

【0029】

ここで用いられる用語「診断される」とは、その徴候及び病徵(例えば従来の治療法への抵抗)による、または遺伝分析、病理分析、組織学分析等による、疾病の認知(例えば病原性細菌の存在により引き起こされる)のことをいう。

【0030】

ここに用いられる場合において、用語「生体外の」とは、人工環境のこと、及び人工環境の範囲内で生じるプロセスまたは反応のことをいう。生体外の環境とは、実験管及び細胞培養を含むが、これに限定されない。用語「生体内」とは、自然環境(例えば動物または細胞)及び、自然環境の範囲内で生じるプロセスまたは反応のことをいう。

40

【0031】

ここに用いられる場合において、用語「菌力」とは、微生物の病原性の程度のことをいい、例えば、生成される疾病的重症度、または対象の組織に侵入するその能力によって示される。これは一般に、半数致死量(LD₅₀)または半数感染量(ID₅₀)により、実験的に測定される。また、この用語を用いて、病理作用を生じるためのいずれかの感染因子の能力のことをいうこともできる。

【0032】

ここに用いられる場合において、用語「有効量」とは、有益なまたは望ましい結果を生じるに十分な組成物(例えば共生微生物)の量のことをいう。有効量は、1つ以上の投与

50

、適用または投与で施すことができ、特定の処方または投与ルートに限定することを目的としない。共生微生物または他の治療組成物の有効量を相対的かつ容易に決定することは、当業者の能力の範囲内である。

【0033】

ここに用いられる場合において、用語「投与」とは、生理的システム（例えば対象、または生体内、体外または生体外の細胞、組織及び器官）へ、薬品、プロドラッグもしくは他の薬剤、または治療処置（例えば本発明の組成物）を与える作用のことをいう。人体への投与の典型的な経路としては、尿道、目（眼）、口（経口）、皮膚（経皮）、鼻（経鼻）、肺（吸入）、口腔粘膜（口内）、耳によるか、または注入（例えば静注、皮下、腫瘍内、腹膜内等）によるか、等とすることができます。

10

【0034】

ここに用いられる場合において、用語「表面を治療する」とは、例えばカテーテル等の表面を、本発明の1つ以上の組成物にさらす作用のことをいう。表面を治療する方法は、散布、噴霧、浸水及びコーティングを含むが、これに限定されるものではない。

【0035】

ここに用いられる場合において、用語「共投与」とは、少なくとも2つの薬剤（複数）（例えばそれぞれ異なるプラスミドを含む2つの別々の供与菌）の投与または対象への治療のことをいう。ある実施形態では、2以上の薬剤または治療の共投与は、同時である。他の実施形態では、第1の薬剤／治療は、第2の薬剤／治療の前に投与される。用いられる様々な薬剤または治療の投与の調合及び／または経路を変化させてよいことを、当業者は理解する。共投与のための適切な投与を、当業者により容易に決定することができる。ある実施形態では、薬剤または治療が共同投与される場合は、それらの投与のみのため、各薬剤または治療は、妥当量よりも低い用量で投与される。したがって、共投与は特に実施形態において望ましく、そこでは、薬剤または治療の共投与が、潜在的に有害な（例えば有毒な）薬剤の必要量を下げる。

20

【0036】

ここに用いられる場合において、用語「有毒である」とは、対象上、細胞（例えばこの方法に従って調製される細菌性細胞を含む）上、または同じ細胞と比較した組織上、または毒物の投与前の組織上での、あらゆる不利益なまたは有害な影響のことをいう。

30

【0037】

ここに用いられる場合において、用語「製薬組成物」とは、体外、生体内または生体外での診断または治療使用に特に適切な組成物を作製する際の、キャリア、不活性、または活性での活性薬剤（例えば共生微生物）の組み合わせのことをいう。

【0038】

ここに用いられる用語「薬理学的に許容される」または「薬理的に許容可能である」とは、対象に施される際、例えば有毒性、アレルギー性の有害反応、または免疫反応を、さほど生じない組成物のことをいう。

【0039】

ここに用いられる場合において、用語「局所的に」とは、皮膚及び粘膜細胞と組織の表面（例えば上皮、肺胞、口内、舌、そしゃく剤または経鼻粘膜、及び管腔臓器または体腔を補強する他の組織及び細胞）に対する、本発明の組成物の適用のことをいう。

40

【0040】

ここに用いられる場合において、用語「薬理学的に許容されるキャリア」とは、標準製薬キャリアのいずれかのことをいい、リン酸緩衝食塩水溶液、水、エマルション（例えば、例えば油／水または水／乳化油）、及び、さまざまな湿潤剤、すべての溶媒、分散媒、コーティング、ラウリル硫酸ナトリウム、等張性及び生体吸収遅延物質、崩壊剤（例えばジャガイモ澱粉またはデンブングリコール酸ナトリウム）等を含むが、これらに限定されない。また、組成物は安定剤及び防腐剤を含むことができる。例えば、キャリア、安定剤及び補助剤である。（例えば、Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第15版、Mack Publ. Co., East

50

on, Pa. (1975), を参照されたい。これは参考事項として本願に組み込まれる)。更に、特定の実施形態では、本発明の組成物は、園芸または農業の使用のために調製されてもよい。この調合は、ディップ、スプレー、種子粉衣、莖部注入、スプレー及び霧を含む。

【0041】

ここに用いられる場合において、用語「薬理学的に許容される塩」とは、ターゲット対象(例えば哺乳類対象、及び/または生体内または生体外の細胞、組織または器官)内で生理的に認容される本発明の化合物のいずれかの塩(例えば酸または塩基との反応により得られる)のことをいう。本発明の化合物の「塩」は、無機または有機の酸及び塩基から得られてもよい。酸の例は、塩化水素、臭化水素、硫黄、窒素、過塩素、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン-*p*-スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタン硫酸、エタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、スルホン酸、ナフタレン-2スルホン酸、ベンゼンスルホン酸、等を含むが、これに限定されるものではない。例えばシュウ酸等の他の酸は、それら自身薬理学的に許容されるものではないが、本発明の化合物及びそれらの薬理学的に許容される酸付加塩を得る際に、中間物として有用な塩の製剤で用いられてもよい。

10

【0042】

塩基の実例は、アルカリ金属(例えばナトリウム)水酸化物、アルカリ土類金属(例えばマグネシウム)水酸化物、アンモニア、及び式 NW_4^+ の化合物を含むが、これに限定されるものではなく、ここでWは C_{1-4} アルキルである等である。

20

【0043】

塩の実例は:酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、樟脑酸塩、カンファースルホン酸塩、シクロペタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、フルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩化塩、臭化塩、ヨウ化塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、ペクチン酸塩、ペルオキソ硫酸塩、フェニルプロピオン酸塩、ピクルート、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアノ酸塩、トリル酸塩、ウンデカン酸塩、等を含むが、これらに限定されない。塩の他の実例としては、 Na^+ 、 NH_4^+ 及び NW_4^+ (ここでWは C_{1-4} アルキル基である)等の適切な陽イオンと混合する本発明の化合物のアニオンを含む。治療使用のため、本発明の化合物の塩が、薬理学的に許容されるよう考慮される。しかしながら、非薬理学的に許容される酸及び塩基の塩はまた、例えば薬理学的に許容される化合物の製剤または精製で使用されることが見出されてもよい。

30

【0044】

治療使用のため、本発明の化合物の塩が、薬理学的に許容されるように考慮される。しかしながら、非薬理学的に許容される酸及び塩基の塩はまた、例えば、薬理学的に許容される化合物の製剤または精製で使用されることが見出されてもよい。

40

【0045】

ここに用いられる場合において、用語「医療機器」とは例えば、(例えば疾病または外傷のための)治療の間に、対象のまたは患者の身体の上、身体の中、または身体の間で用いられるいずれかの材料または器具を含む。医療機器は、医学的な移植としてのこの項目、創傷治癒器具、ドラッグデリバリー器具、及び体腔及び対人保護器具を含むが、これに限定されるものではない。医学的な移植は、尿路カテーテル、血管内カテーテル、透析用シャント、創傷排液管、皮膚縫合、代用血管、埋込可能メッシュ、眼内器具、心臓弁、等を含むが、これに限定されるものではない。創傷治癒器具は、一般的な創傷被覆材、生物学的移植片材料、テープ閉鎖及び施肥、及び、外科的切開カーテンを含むが、これに限定されるものではない。ドラッグデリバリー器具は、針、ドラッグデリバリー皮膚用パッチ、ドラッグデリバリー粘膜用パッチ及び医療用スポンジを含むが、これに限定されるもの

50

ではない。体腔及び対人保護器具は、タンポン、スポンジ、外科及び試験手袋及び歯ブラシを含むが、これに限定されるものではない。産児制限器具は、子宮内避妊器具（IUD）、ペッサリー及びコンドームを含むが、これに限定されるものではない。

【0046】

ここに用いられる場合において、用語「治療剤」とは、病原微生物に接触する対象の死亡率の感染性、罹患率または発症を低下させる組成物、または病原微生物に接触する宿主での死亡率の感染性、罹患率または発症を予防する組成物のことをいう。ここに用いられる場合において、治療剤は、例えば病原体がない場合において、将来の危険な病原体への曝露を考慮して、予防的に用いられる物質を含んでいる。この薬剤は、薬理学的に許容される化合物（例えば補助剤、賦形剤、安定剤、希釈剤等）をさらに備えていてもよい。ある実施形態では、本発明の治療剤は、局所的な組成物、注射可能な組成物、摂取可能な組成物等の形態で投与される。経路が局所的である場合、形態は、例えば、溶液、クリーム、軟膏、膏薬またはスプレーであってもよい。

10

【0047】

ここに用いられる場合において、用語「病原体」とは、宿主における病態（例えば感染症、癌等）を引き起こす生体物質のことをいう。「病原体」とは、ウイルス、細菌、古細菌、真菌、原生動物、マイコプラズマ、プリオン及び寄生生物を含むが、これに限定されるものではない。

【0048】

ここに用いられる場合において、用語「共生」及び「共生微生物」とは、互換可能に用いられ、宿主に健康効果を与えるために適度な量で投与される生成微生物のことをいう。例えば、*Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice*, G. Reid, et al., *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 2003, p 658 - 672, を参照されたい。これは参考事項として本出願に組み込まれる。共生は、いずれかの特定経路により投与される微生物に限定されない。人体への投与の典型的な経路は、目（眼科）、口（口腔）、皮膚（経皮）、鼻（経鼻）、肺（吸入）、口腔粘膜（口内）、膣、直腸、尿道、耳、注射（例えば、静注、皮下、腫瘍、腹膜その他）等により行うことができる。ここに用いられる場合において、用語「共生」とは、天然に存在する生物及びその派生物、例えば、大腸菌 83972 及び大腸菌 HU2117 を含むが、これに限定されるものではない。また、例えば選択的培養または組み換え工学等により、共生生命体を修正して、特性を改質してもよい。例えば、受容者細胞を改質する（例えば病原体受容者細胞の病原性を死滅させるか低減する）共役的伝染性プラスミドを有するように構成される共生微生物も、本発明での使用を見出す。米国特許出願番号第 11/137,950 号及び第 11/137,948 号を参照されたい。これら各々の全体が、参考事項として本出願に組み込まれる。

20

【0049】

ここに用いられる場合において、用語「微生物」とは、微生物をいい、個々の生命体、またはいずれかの数の生命体を備える調製、の両方を含むことを目的とする。

30

【0050】

用語「細菌（複数）」及び「細菌（単数）」とは、原核生物界の門の全てに含まれる生物を含む全ての原核生物の生命体をいう。この用語は、マイコプラズマ、クラミジア、放線菌、ストレプトマイセス及びリケッチャを含む細菌であると考えられる全ての微生物を含むことが、意図されている。細菌の全ての形態は、球菌、細菌、スピロヘータ、スフェロプラスト、プロトプラスト等を含むこの定義に含まれる。また、原核生物の生命体は、この用語に含まれており、グラム陰性またはグラム陽性である。「グラム陰性」と「グラム陽性」とは、グラム-染色プロセスを有する染色パターンをいい、これは当該技術分野で周知である。（例えば、*Finegold and Martin, Diagnostic Microbiology*, 第 6 版, CV Mosby St. Louis, pp. 13-15 (1982) を参照されたい）。「グラム陽性細菌」とは、染色された細胞が一

40

50

般に顕微鏡下でダークブルーと紫との間に見えるようになる、グラム液で用いられる主染料を保有する細菌である。「グラム陰性細菌」とは、グラム液に用いられる主染料を保有しないものの、対比染色剤により染色される。従って、グラム陰性細菌は、一般に赤色に現れる。

【0051】

ここに用いられる場合において、用語「微生物」とは、微生物のいずれかの種またはタイプをいい、細菌、古細菌、真菌、原生動物、マイコプラズマ及び寄生性生命体を含むが、これに限定されるものではない。本発明は、その中に包含される多くの微生物が、対象に対しても病原性であることを熟慮する。

【0052】

ここに用いられる場合において、用語「真菌」とは、例えば糸状菌及びイースト等の真核生物に関して用いられ、これは二形真菌を含んでいる。

【0053】

用語「非病原性細菌（複数）」または「非病原性細菌（単数）」とは、全ての既知及び未知の非病原性細菌（グラム陽性またはグラム陰性）、及び、非病原性細菌に突然変異または変換したいずれかの病原細菌である。さらに、当業者は、一部の細菌が、特定の種には病原的でありかつ他の種には非病原的であるようにしてよいことを認識し、したがって、これらの細菌は、非病原性であるように、または非病原性となるよう突然変異するように、これらの種で利用することができる。

【0054】

ここに用いられる場合において、用語「非ヒト動物」とは、全ての非ヒト動物のことをいい、例えば齧歯動物、非ヒト靈長類、羊、ウシ、反芻類、ウサギ、ブタ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、鳥類等の脊椎動物を含むが、これに限定されるものではない。

【0055】

ここに用いられる場合において、用語「細胞培養」とは、例えば原核細胞及び真核細胞を含む細胞のいずれかの生体外の培養のことをいう。この語には、連続細胞株（例えば不死化表現型）、一次細胞培養、形質転換細胞系、有限細胞株（例えば非形質転換細胞）、固体または液体培地の中またはその上の細菌培養、及び、生体外に保持される他のいずれの細胞集団が、含まれる。

【0056】

ここに用いられる場合において、用語「液体培養」とは、得られた液体が生物体、例えば細菌の分布を含むよう、例えばLBプロース、MOPS最少培地等の液体培地内で成長した生物体の製剤のことをいう。

【0057】

「液体培地」とは、成長のための栄養分を生物体に提供するために適切な、いずれかの液組成であってもよい。例えば寒天等の凝固物質を添加して、例えば、寒天平板及び寒天斜面ともいわれる培養平板またはスラント等の、「固体培養培地」を生産する。

【0058】

ここに用いられる場合において、動詞としての用語「接種する」と「接種」とは、大腸菌の菌株を培養する目的で無菌培養培地に予防接種を行うため、例えば大腸菌のサンプルまたはコロニーを用いる等、生命体を、その生命体がフリーな環境に導入する行為のことをいう。

【0059】

ここに用いられる場合において、用語「培養する」とは、品目またはサンプル（例えば接種培養、化学または酵素反応混合物）を、ある期間中、または特定の結果（例えばオルガスム成長または反応結果）が発生するまで、一つの温度に保持することをいう。

【0060】

ここに用いられる場合において、用語「尿」とは、生物学的尿、すなわちヒトまたは動物により生成される尿に見出される、必須元素を有する液体製剤のことをいう。尿は、天然尿であってもよく、または合成尿であってもよい。例えば、合成尿製剤は、ペプトンL

10

20

30

40

50

37イースト抽出物、乳酸、クエン酸、重炭酸ナトリウム、尿素尿酸、クレアチニン、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、硫酸鉄(II)、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸カリウム、及び、塩化アンモニウムの混合物を備えてもよく、これら各々が、水中で生理的濃度となっている。例えば、Brooks and Keevil, Letters in Applied Microbiology 1997, (24): 203-206、"A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens", 及び、Souhaïla Bouatra, et al., PLOS One, September 2013; Volume 8 / Issue 9 / e73076, を参照されたい。これらの各々は、参照事項としてその全体が本出願に組み込まれる。

10

【0061】

ここに用いられる場合において、用語「生物膜」とは、表面に接着した、例えば病原性大腸菌等の、生物体の凝集基質のことをいう。生物膜は、生物体(複数も)により侵出する細胞外ポリマー物質(例えば多糖類を含む)を典型的に備えており、この生物体は、内部に細胞が埋め込まれる基質であり、かつ、細胞を相互に接着させかつ表面に接着させる。生物膜を支持する表面は、非生物学的表面(例えば医療機器の表面)であってもよく、または生物学的(例えば対象の組織表面)であってもよい。生物膜は、複数種の微生物を備えていてもよく、または、単一種の微生物により生成されてもよい。

【0062】

ここに使用されるように、用語「真核生物」とは、「原核生物」と区別できる生物体のことをいう。この用語は、例えば核膜により囲まれる真の核の存在等、真核生物の通常の特性を示す細胞を有する全ての生物体を含むことを意図するものであり、その中には、染色体、膜結合細胞小器官の存在、及び、真核生物内に共通して観測される他の特性が存在する。したがって、この用語は、真菌、原生動物、及び、動物(例えばヒト)としてのこの生物体を含むが、これに限定されるものではない。

20

【0063】

ここに用いられる場合において、用語「キット」とは、材料を供給するための、いずれかの送出システムのことをいう。共生微生物等の反応材料との関連で、この送出システムは、妥当な試薬の保管、輸送または送出(例えば妥当な容器内での細胞、緩衝液、培地、選択試薬等)、及び/または、1つの位置から他の位置までの、器具(例えばカテーテル、シリング、反応管または平板、培養試験管または平板)並びに/もしくは支持材(例えば培地、材料等を用いて実行するための書面指示)を実現するシステムを含むが、これに限定されるものではない。例えば、キットは、適切な反応試薬及び/または支持材を含む1つ以上の筐体(例えば箱、袋)を含んでいる。ここに用いられる場合において、用語「断片キット」とは、全キット成分の下位部分を各々含む2以上の別々の容器を備える配送システムをいう。これら容器は、共にまたは別々に、対象となる受容者に供給されてもよい。例えば、第1の容器は、特定の使用のためにゲル化剤を有する微生物の乾燥組成物を含有してもよく、第2の容器は、乾燥組成物を溶解または再懸濁するために水または緩衝液等の無菌の流体を含有する。この用語「断片キット」は、連邦食品医薬品化粧品法の第520条(e)で調整される被検体特異試薬(ASR)を含むキットを含むことを目的とするが、これに制限されない。実際、全キット成分の下位部分を各々含む2以上の別々の容器を含むいずれかの配送システムは、「断片キット」という用語に含まれる。対照的に、「併用キット」とは、単一の容器内(例えば各々望ましい成分の単一の収容箱内)での特定の使用に必要とされる反応材料の成分の全てを含む送達系のことをいう。用語「キット」とは、断片キット及び併用キットを含む。

30

【0064】

組成物の真空凍結乾燥により生成される乾燥ケーキに関し、用語「エレガント」とは、文献で用いられて、隙間なし、収縮なしで、スムーズな端部及びやわらかい整合性を有する『完全な』真空凍結乾燥製品を記載する。

40

【0065】

50

ここに用いられる場合において、用語「a」及び「a n」とは、少なくとも1を意味するが、1以上を指してもよい。

【0066】

ここに用いられる用語「細菌の障害」とは、それら自身を設け、かつそれらの環境に影響を及ぼす、細菌と他の微生物との間の拮抗的相互作用のことをいう。細菌の障害は、数種のメカニズムにより動作するものであり、例えば、拮抗物質の生成、細菌の微小環境の変化、付着部位のための拮抗、及び、必要とされた栄養物質の還元等が挙げられる。

【0067】

ここに用いられる用語「コーティング」とは、例えば医療機器またはその部分等、実質的に覆う層のことをいう。コーティングは、表面に塗布することができ、または、移植の材料内に含浸することができる。

10

【0068】

ここに用いられる場合において、用語「抗菌物質」とは、細菌の生物体及び/または菌類の生物体の成長を低下、防止または阻害する共生以外の組成物のことをいう。抗菌物質の実例としては、例えば、抗生物質及び消毒剤が含まれる。

【0069】

ここで用いられる用語「消毒剤」とは、微生物の作用を阻害する抗菌物質として定義される、これは、アルファ-テルピネオール、メチルイソチアゾロン、塩化セチルピリジニウム、クロロキシレノール、ヘキサクロロフェン、クロルヘキシジン及び他のカチオンビグアナイド、ジクロロメタン、ヨウ素及びヨードフォア、トリクロサン、タウリンアミド、ニトロフロントイン、メテナミン、アルデヒド、アゼライン酸、銀、過酸化ベンゾイル、アルコール、ならびに、カルボン酸及び塩を含むが、これらに限定されない。これらの消毒剤を、二つ以上の組み合わせで用いて、相乗効果を得ることを、当業者は認識している。消毒剤の組み合わせの一部の実例としては、クロルヘキシジン、クロルヘキシジン及びクロロキシレノール、クロルヘキシジン及びメチルイソチアゾロン、クロルヘキシジン及びアルファテルピネオール、メチルイソチアゾロン及びアルファテルピネオール；チモール及びクロロキシレノール；クロルヘキシジン及び塩化セチルピリジニウム；または、クロルヘキシジン、メチルイソチアゾロン及びチモールの混合物を含む。これらの組み合わせは、様々な生物体に対して活性の幅広い観点を提供する。

20

【0070】

ここに用いられる場合において、共生組成物に関する用語「乾燥した」とは、溶媒成分(单数)または溶媒成分(複数)を、もはや化学反応を支持しない量に除去することをいう。また、この用語は、乾燥した組成物(例えば乾燥製剤または乾燥組成物)に関する用いられる。当業者は、組成物が、真空凍結乾燥の後、いまだ除去できない含溶媒量または含水量を有しつつ「乾燥し」てもよいか、または乾燥組成物が、乾燥過程の終了の後、例えば雰囲気から吸湿的に湿気を吸収してもよいかを、理解する。用語「乾燥」とは、吸湿生体吸収のために含水量が増加するように、組成物を包含する。

30

【0071】

ここに用いられる場合において、用語「保護剤」とは、活性物質が所定の条件(例えば乾燥、凍結)に露出される際に、活性物質(例えば酵素、共生微生物)の活性または統合性を保護する組成物または化合物のことをいう。ある実施形態では、保護剤は、凍結法(すなわちそれは「凍結保護物質」である)の間、生体系(例えば共生微生物)を保護する。保護剤の実例としては、脱脂乳固形分、トレハロース、グリセリン、ベタイン、ショ糖、ブドウ糖、ラクトース、デキストラン、ポリエチレングリコール、ソルビトール、マンニトール、ポリビニルプロピレン、グルタミン酸カリウム、グルタミン酸ソーダ、Tween 20界面活性剤、Tween 80界面活性剤及びアミノ酸塩酸塩を含むが、これに限定されるものではない。

40

【0072】

ここに用いられる場合において、用語「ゲル化剤」とは、流体(例えば水または緩衝液等の液体)で溶解、懸濁または分散される際、ゼリー状の半固体(例えば潤滑剤ゲル)を

50

生成する組成物のことをいう。ゲル化剤の実例としては、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルグアガム、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボマー、アルギン酸塩、ゼラチン及びポロクサマーを含むが、これに限定されるものではない。

【0073】

ここに用いられる場合において、用語「賦形剤」とは、活性含有物の製剤に加えられる添加物（すなわち薬学的に活性でない）のことをいう。ここに記載されるゲル化及び保護剤は一般に、「賦形剤」といわれる。

【0074】

ここに用いられる場合において、組成物に関して用いられる用語「本質的に成る」とは、組成物が、引用された成分（複数も）から成るという意味と、組成物が、引用された組成物の特性を物質的に変更する他のいかなる成分も含まない（例えば他の活性含有物を含有しない）という意味とを有している。例えば、微量の不純物、または、僅少量の、組成物の特性を変更しない1つ以上の付加成分が、引用された組成物の範囲内になる。同様に、方法または一連のステップに関して使用されるものとして、この用語は、一組のステップの方法のことをいい、これは引用されたステップに限定され、ステップの特性または引用された方法の結果を物質的に変更しない僅少な偏差のみが認められる。

【発明の詳細な説明】

【0075】

本発明は、例えば細菌等の非病原性生物体で表面を処理するために有用な、方法及び材料に関する。特定の実施形態では、この方法及び材料は、対象上、例えば対象の尿路の表面上、及び／または、例えば尿路カテーテル等の医療機器の表面上に、細菌培養を設けるための使用を見出す。特定の実施形態では、培養は、生物膜を含んでいる。本発明の実施形態は、対象の尿路内に培養及び／または生物膜を設ける使用のための、例えば大腸菌等の細菌の小型コロニー変種（SCV）形態の治療製剤に関連する。

【0076】

本発明の実施形態は、この明細書内で記載され、及び、上記の発明の概要内で記載され、これは参考事項として本出願に組み込まれる。特定の実施形態に関連して本発明を記載してきたが、特許請求の範囲に記載される本発明は、この特定の実施形態に過度に限定されるべきでないことを理解すべきである。例えば、大腸菌83972に関するここでの議論は、大腸菌HU2117も包含しており、なぜなら、HU2117が、papG遺伝子内に欠失を有するよう操作される83972の変形だからである。これらの菌種の増殖特性は、同等であるように観測された。

【0077】

小型コロニー変種（SCV）は、自然発生的な細菌の部分母集団であり、これは、親の細菌により生成されるコロニーより著しく小型の固体培地上にコロニーを形成する。例えば大腸菌のSCVは、同じ固体培地上に成長する同じ菌種の通常または「大きなコロニー変種」（LCV）形態の直径の約1/10であってもよい。例えば、Proctor, et al., Nature Rev. Micro., 4: 295-305 (2006)を参照されたい。技術開発の間、大腸菌83972及び大腸菌HU2117のSCV形態が、例えばカテーテル表面上及び／または処理した対象の尿路内に治療生物膜を設ける際に、特に有用であることが、観測された。

【0078】

無症候性尿路感染症を有する対象からの非病原性大腸菌83972及び／または大腸菌HU2117の分離株は、これらの菌種の大小コロニー形態の混合物を示している。下記に更に詳細に議論するように、寒天平板上でコロニー形態を観測することにより、大小コロニー変種を容易に識別することができ、この際、マッコンキー寒天は特にこのサイズ差が明らかである。

【0079】

10

20

30

40

50

本技術の開発の間、細菌のプロス培養に典型的に用いられる標準肥沃培地（例えばイースト抽出物、トリプトン、ペプトン等、アミノ酸の完全な源で補足されるルリアベルタニ（L B）培地またはその他の培地）が、大腸菌 83972 及び大腸菌 HU2117 内での S C V 形態から L C V 形態への変異を推進することが、決定された。

【0080】

さらに、これらの大腸菌菌種の S C V の形態では、数多くのアミノ酸のための栄養要求性である一方、同じ菌種の L C V 形態ではその栄養要求性はない。したがって、S C V 菌種は、成長のために添加培地を必要とし、それらの成長に対して最小培地を選択的に用いることができる。例えば、大腸菌 83972 及び大腸菌 HU2117 の S C V は、アミノ酸システィン、メチオニン、セリン及びリシンの絶対条件を有し、かつ、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、フェニルアラニン及びトリプトファンの必須条件は低い。対照的に、L C V 形態は、栄養要求性を有しておらず、炭素源で補足される M O P S 最少培地（例えばブドウ糖またはグリセリンのいずれかの 0.2%）で、容易に成長してもよい。したがって、S C V の発生を低減するための成長条件を相対的に見出すことは容易であること、及び、S C V 形態を成長させかつ L C V 形態に反して選択する成長条件を見出すのが困難であることを、理解することができる。これにより、細胞の母集団が支配的に S C V 形態である液体培養を生産することが困難になり、かつ、本質的に完全 S C V - 形態細菌である液体培養を生産することがさらに困難なる。

10

【0081】

本発明は、大腸菌種の S C V の分離、成長及び保管のための方法の開発に関するものであり、特に非病原性菌種の大腸菌 83972、大腸菌 HU2117、及びその変種、またはそれより、これらが得られる。

20

【0082】

本発明は、液体培養内のいずれかの L C V - 形態大腸菌が数で低減され、または存在しなくなるよう、支配的に S C V の、好ましくは完全に S C V の、培養を生成する方法及び組成物に関する。したがって、本発明の態様は、例えばカーテールをコーティングするための、共生製剤を製造するため、例えば大腸菌 83972 及び大腸菌 HU2117 等の大腸菌種の S C V 形態を同定及び保持する成長条件の識別である。好ましい実施形態では、細菌は、例えば銅等の抗菌成分を用いずに液体培養で成長される（Hirsch, J. Bacteriol. 81: 448-58 (1961); 2-メチル-1、4-ナフトキノン（例えば、Colwell, J. Bacteriol. 52 (4): 417-22 (1946)）。

30

【0083】

本発明の態様は、例えば生物膜を作成する等、治療使用のための、大腸菌の S C V 形態の選択である。ここに記載される組成物及び技術方法における共生大腸菌の S C V 形態の使用は、処理した対象の尿路内及び/または尿路カーテールの表面上で、共生菌種の生物膜を生成する際に、有効であることが、決定された。したがって、本技術は大腸菌、好ましくは大腸菌 83972 または大腸菌 HU2117 の、小型コロニー変種（S C V）の分化、分離、増殖及び保管の方法、またはその改質または変種形態、ならびに、製造された細菌を用いて、処理した対象に生物膜を設ける方法を、提供する。

40

【0084】

本技術は、共生 S C V 大腸菌の有効量を対象または患者に供給する方法及び組成物を、さらに提供する。本発明をいずれかの特定の調合または投与の方法に限定しない一方、一部の好ましい実施形態では、共生微生物は、潤滑剤ゲルの m l あたりの c f u で約 10⁷ から 10⁹ までの濃度で、製造された潤滑剤ゲル混合物内に存在する。

【0085】

大腸菌種 83972 及び HU2117 の増殖特性

ここに議論される本技術の開発及び大腸菌種、すなわち大腸菌種 83972 及び HU2117 の培養の間、これらの菌種の大小コロニー変種増殖特性の観察が、以下に示される。

50

1. 更なるステップのために新たなSCVコロニーを選択することができるよう、マッコンキー寒天上での菌種のSCV及びLCV形態を備える混合培養を条痕することで、明確かつ個別に2つのコロニー形態を示した。形態の差は、LB寒天上では明らかであるものの、この培地上では不明確である。

2. 肥沃な培地（例えば、LBまたはトリプシン大豆）上での大腸菌HU2117の拡張培養は、培養転移を、コロニー形態を小型から大型へと移行させる。小型コロニー変種母集団が、試験される数個の培養条件下で、大型コロニー表現型を有する細胞を引き起こすことができるものの、特定のLCV分離株の表現型を変えてSCV微生物の母集団を生産することは、困難である。

3. マッコンキー寒天上のSCV分離株の通過は、経時的に小型コロニー表現型を保持する。 10

4. 小型コロニー変種は、MOPS最少培地上またはMOPS最小プロス内では、成長しなかった。

5. SCV接種菌が接種されるMOPS最少培地は、数日後に、LCV形態を有する細胞生長により、支配的に混濁することになり、細胞の小型 - コロニー形態から大型 - コロニー形態への変換、及び/または、SCV接種菌内でのLCVの少数派母集団の生残性及び複製の、いずれかにより、濁度の発生が生じることが示される。このことにより、これらの菌種の培養のための最小培地のみを用いて、大腸菌HU2117及び83972のLCV形態を支持培養することが示される。

6. 本技術の発達の間に、炭素源としてのグリセリンの使用（例えばブドウ糖の代わりに）が、LCV形態への変異率を低減することが判断され、それにより、液体培養の間のSCV形態保持が援助される。 20

【実施例】

【0086】

本発明の所定の好ましい実施形態及び態様を実証及びさらに例示するため、以下の実施例が提供されるが、それらの範囲を限定する解釈がなされるものではない。

【0087】

以下の実験の開示では、下記の略語を以下に適用する。（摂氏度）；cm（センチメートル）；g（グラム）；lまたはL（リットル）；m lまたはm L（ミリリットル）； μ lまたは μ L（マイクロリットル）； μ g（マイクログラム）； μ m（マイクロメーター）； μ M（マイクロモル）； μ モル（マイクロモル）；mg（ミリグラム）；mm（ミリメートル）；m M（ミリモル）；ミリモル（ミリモル）；M（モル）；モル（モル）；ng（ナノグラム）；nm（ナノメートル）；nmol（ナノモル）；N（規定濃度）；pmol（ピコモル）；bp（塩基対）；cfu（コロニー形成単位）。 30

【0088】

実施例1

大腸菌83972及びHU2117の小型コロニー変種形態の培養に対する条件の定義
大腸菌83972及びHU2117の最初の特性評価は、これら大腸菌種の培養のために良好な合成成長培地を定義することを試みることにより、開始される。菌種HU2117は、papG遺伝子の改変欠失を有する83972の改変変種である。 40

【0089】

数個の異なる培地（寒天平板及びプロス）をテストすることにより、製造に用いることができ、かつ、それは大小コロニー変種の区別を援助することができる、許容可能な培地を見出した。2つの商業的入手可能培地、すなわちEZリッチ特定培地及びMOPS最少培地を、Teknova(Holister, CA)から購入した。2つの異なる炭素源、すなわちブドウ糖及びグリセリンを、これらの2つの異なる培地との併用で用いた。また、マッコンキー、TSA及びLB寒天を含む異なる寒天上で菌種を条痕及び保持した。培地及び寒天を、以下に示すように調製した。

【0090】

MOPS定義培地（例えばEZリッチ特定培地）

10

20

30

40

50

成分 #	記載	量
1	10X MOPS 混合物	100 mL
2	0.132M K ₂ HP04	10 mL
3	10X ACGU	100 mL
4	5X 補足 EZ	200 mL
	無菌 H ₂ O *	580 mL
	20% ブドウ糖またはグリセリン	10 mL
	合計	1000 mL

10

【0091】
MOPS 最少培地

成分 #	記載	量
1	10X MOPS 混合物 (下記参照)	100 mL
2	0.132M K ₂ HP04	10 mL
	無菌 H ₂ O *	880 mL
	20% ブドウ糖またはグリセリン	10 mL
	合計	1000 mL

20

【0092】
MOPS 培地成分

#1 MOPS 改質リッチ緩衝液	10X 濃度	1X 濃度
MOPS (MW 209.3)	400mM	40mM
トリシン (MW 179.2)	40mM	4.0mM
硫酸鉄ストック	0.1mM	0.01mM
塩化アンモニウム	95mM	9.5mM
硫酸カリウム	2.76mM	0.276mM
塩化カルシウム	0.005mM	0.0005mM
塩化マグネシウム	5.25mM	0.525mM
塩化ナトリウム	500mM	50mM
モリブデン酸アンモニウム	3x10 ⁻⁸ M	3x10 ⁻⁹ M
ホウ酸	4x10 ⁻⁶ M	4x10 ⁻⁷ M
塩化コバルト	3x10 ⁻⁷ M	3x10 ⁻⁸ M
硫酸第二銅	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M
塩化マンガン	8x10 ⁻⁷ M	8x10 ⁻⁸ M
硫酸亜鉛	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M

40

【0093】

#2 リン酸カリウム二塩基溶液	100X 濃度	1X 濃度
二塩基リン酸カリウム	132mM	1.32mM

50

【0094】

#3 A C G U 溶液	10X 濃度	1X 濃度
水酸化カリウム	15mM	1.5mM
アデニン	2.0mM	0.2mM
シトシン	2.0mM	0.2mM
ウラシル	2.0mM	0.2mM
グアニン	2.0mM	0.2mM

【0095】

#4 5X 補助剤	5X 濃度	1X 濃度
L-アラニン	4.0mM	0.8mM
L-アルギニン	26mM	5.2mM
L-アスパラギン	2.0mM	0.4mM
L-アスパラギン酸、カリウム塩	2.0mM	0.4mM
L-グルタミン酸、カリウム塩	3.3mM	0.66mM
L-グルタミン	3.0mM	0.6mM
L-グリシン	4.0mM	0.8mM
L-ヒスチジン H C l H 2 O	1.0mM	0.2mM
L-イソロイシン	2.0mM	0.4mM
L-プロリン	2.0mM	0.4mM
L-セリン	50mM	10mM
L-トレオニン	2.0mM	0.4mM
L-トリプトファン	0.5mM	0.1mM
L-バリン	3.0mM	0.6mM
L-ロイシン	4.0mM	0.8mM
L-リシン	2.0mM	0.4mM
L-メチオニン	1.0mM	0.2mM
L-フェニルアラニン	2.0mM	0.4mM
L-システイン H C l	0.5mM	0.1mM
L-チロシン	1.0mM	0.2mM
チアミン	0.05mM	0.01mM
パントテン酸カルシウム	0.05mM	0.01mM
パラアミノ安息香酸	0.05mM	0.01mM
パラヒドロキシ安息香酸	0.05mM	0.01mM
ジヒドロキシ安息香酸	0.05mM	0.01mM

【0096】

20% グルコース溶液	10X 濃度	1X 濃度
ブドウ糖	20%	2.00%
20% グリセリン溶液	10X 濃度	1X 濃度
グリセリン	20%	2.00%

【0097】

D. F. Smith. 1974., Culture medium for enterobacteria; J Bacteriol 119 (3): 736-747を参照されたい。)

【0098】

マッコンキー寒天：

ペプトン (Difco) またはゲリセート (BBL) 17.0 g

プロテオーゼペプトン (Difco) またはポリペプトン (BBL) 3.0 g

ラクトース 10.0 g

NaCl 5.0 g

クリスタルバイオレット 1.0 mg

ニュートラルレッド 30.0 mg

胆汁酸塩 1.5 g

寒天 13.5 g

蒸留水を加えて 1 リットルを作製

pH 7.1 + / - 0.2 に調整

【0099】

トリプシン大豆寒天：

カゼインペプトン (酵母性) 15.0 g

大豆ペプトン (パパイン) 5.0 g

塩化ナトリウム 5.0 g

寒天 15.0 g

蒸留水を加えて 1 リットルを作製

pH を 7.3 + / - 0.2 に調整。

【0100】

ルリア - ベルターニプロス及び寒天：

トリプトン 10 g イースト抽出物 5 g

NaCl 10 g

寒天 15.0 g

蒸留水を加えて 1 リットルを作製

上記の培地のプロス形態は、寒天成分を除外する。例えば 15 psi の加圧滅菌により、121 ~ 124 で約 15 分間、すべてが滅菌される。

【0101】

i. 3 つの寒天上における大腸菌 HU2117 の大小コロニー変種の比較

本技術を開発する過程で、これらの大腸菌種の SCV の形態は、上記のように調製された改質 MOPS 最小プロスまたは寒天で成長しないことが観測された。マッコンキー寒天上、LB 寒天上及び改質 MOPS 最小寒天上の大型及び小型コロニー変種の外観が、図 1 に示される。各平板の左側では LCV 形態で条痕を形成し、各平板の右側では SCV 形態で条痕を形成した。全ての平板が、同じ期間培養された。コロニーサイズ差は LB 平板 (図 1B) 上で観測されることがある一方、条痕は、SCV 形態を見渡せる外見で十分に類似している。対照的に、マッコンキー平板 (図 1A) 上では、コロニーが有する SCV は、LCV コロニーのサイズのごく小さな割合に成長する。MOPS 最少培地平板は、SCV 形態がこの培地上では成長しないことを明確に示している。

【0102】

i i. リッチ培地の小型 ~ 大型コロニー変換率。

排他的に SCV を有する菌種のグリセリンストックを用いて、液体培地のタイプを変えて小型 ~ 大型コロニー変換率を計算することが可能性であった。

【0103】

EZ リッチ画定グリセリン培地

SCV ストックを用いて、EZ リッチ画定グリセリン培地のプロスに接種した (上記)。培養の後、培養内での各形態学的タイプの相対量を決定することができるよう、培養の

10

20

30

40

50

均等量を、（全てのコロニーを示すための）LB寒天上及び（SCVが成長することができない）MOPS最小ブドウ糖寒天平板上に、希釀し及び固定した。MOPS最小ブドウ糖板上でコロニー2つのみを成長し、プロス培養（及び原ストック）がほぼ完全にSCV分離株から構成されることが示された。

【0104】

この培養（希釀物に従った）内の大型コロニーの全数及びこの培養の大腸菌HU2117の全数を計算して、グリセリンベースの培地の細菌当たり変換率を、 1.4×10^{-9} と決定した。

【0105】

EZリッチ画定ブドウ糖培地

10

同様のストックを用いて、EZリッチ画定ブドウ糖培地を接種した。培養の後、液体培養内の各形態学的タイプの相対量を決定することができるよう、培養の均等量を、LB寒天上及びMOPS最小ブドウ糖寒天平板上に希釀し、及び固定した。33個のコロニーが、MOPS最小ブドウ糖平板上で成長し、ブドウ糖ベース培地内の細菌当たり変換率が 3.04×10^{-8} で示された。

【0106】

これらのデータでは、液体培養内の単一炭素源としてのグリセリンを用いて、より遅い変換率を生成するとともに、SCV形態の維持のために、グリセリンがブドウ糖より推奨されることを示した。

【0107】

20

特定の実施形態では、大腸菌、例えば菌種83972及びHU2117、のSCV形態を調製するための液体培地は、以下の調合（接種前）を有している。

【0108】

表1

MOPS 3-(N-モルホリノ)-プロパンスルホン酸	40 mM
トリシン	4 mM
硫酸鉄	10 μ M
塩化アンモニウム	9.5 mM
硫酸カリウム	276 μ M
塩化カルシウム一水和物	0.5 μ M
塩化マグネシウム	525 μ M
塩化ナトリウム	50 mM
モリブデン酸アンモニウム	2.92×10^{-9} M
ホウ酸	4×10^{-7} M
塩化コバルト	3.02×10^{-8} M
硫酸第二銅	9.62×10^{-9} M
塩化マンガン	8.08×10^{-8} M
硫酸亜鉛	9.74×10^{-9} M
リン酸カリウム、二塩基	1.32 mM
アラニン	0.798 mM
アルギニン H C 1	5.2 mM
アスパラギン	0.4 mM
アスパラギン酸、カリウム塩	0.4 mM
システイン一水和物 H C 1	0.1 mM
グルタミン酸、カリウム塩	0.7 mM
グルタミン	0.6 mM
グリシン	0.8 mM
ヒスチジン一水和物 H C 1	0.2 mM
イソロイシン	0.4 mM
ロイシン	0.8 mM
リシン二塩化水素化物	0.4 mM
メチオニン	0.2 mM
フェニルアラニン	0.4 mM
プロリン	0.4 mM
セリン	10.0 mM
スレオニン	0.4 mM
トリプトファン	0.1 mM
チロシン	0.2 mM
バリン	0.6 mM
チアミン H C 1	0.01 mM
パントテン酸カルシウム	0.01 mM
ρ -アミノ安息香酸	0.01 mM
ρ -ヒドロキシ安息香酸	0.01 mM
2,3-ジヒドロキシ安息香酸	0.01 mM
グリセリン	0.4 % (w/v)
水	

10

20

30

40

【0109】

i i i . S C V の保存された分離株は S C V 配座を保持する

大腸菌 H U 2 1 1 7 の S C V 形態の 2 つの異なるグリセリンストック (ストック A 及び B、図 2 及び 3 を参照) と、大腸菌 8 3 9 7 2 の L C V 形態の 2 つの異なるストック (ストック A 及び B、図 4 及び 5 を参照) とを用いて、L B 寒天及びマッコンキー寒天平板に条痕を形成した。

【0110】

37 で 24 時間培養後、条痕を形成した全ての平板上に、良好な成長を観測した。図

50

2 及び図 3 では、大腸菌 H U 2 1 1 7 で条痕を形成して得られたマッコンキー寒天平板及び L B 寒天平板を示す。マッコンキー寒天平板上(図 2)及び L B 平板上(図 3)の両方の全てのコロニーは、小型コロニー形態を示した。

【0111】

大腸菌 8 3 9 7 2 のストックで条痕を形成した平板では、ほとんど均等に L C V 誘導体を示した。マッコンキー寒天上(図 4)または L B 寒天上(図 5)のいずれかへの条痕がなされた際は、大腸菌 8 3 9 7 2 のストック A 及び B が同一であると観察された。H U 2 1 1 7 が図 2 および 3 に示される平板に条痕したため、これらの平板は同じ時間量で 3 7 に放置されたことが示され、これは、培養時間を変えても、コロニーサイズが異なる結果とはならないことを証明する。

10

【0112】

例えば大腸菌 H U 2 1 1 7 S C V 細胞等、 S C V 細胞の付加的なストックを、(例えば - 8 0 での) 保管のために調製するため、上記に表 1 で記載するように改質 E Z リッチ画定培地 1 2 5 m l を含む 1 リットルのフラスコ内に、約 5 0 個のコロニーを接種する。これら細胞を 1 6 時間成長させ、フラスコの全ての培養を、遠心により採取する。ペレットを、約 1 1 m l の改質 E Z リッチ画定培地内で再懸濁する。細胞を再懸濁する際、1 1 m l の 2 X 凍結培地(グリセリンを 5 0 % 含む同じ改質 E Z リッチ画定培地)を添加し、氷上に細胞を配置する。例えば 1 . 0 m l / バイアル($3 . 6 \times 1 0 ^ 9$ c f u / m L)の容量にバイアルに等分する前に、細胞懸濁液を、氷上で 6 0 分間冷却する。細胞をバイアルに等分した後、これらを凍結し、- 8 0 に保存する。好ましくは、- 8 0 の保管から除去したバイアルを、一回のみ使用する。

20

【0113】

i v . 大腸菌 8 3 9 7 2 の大小コロニー変種の比較

マッコンキー寒天平板 1 つ及び L B 寒天平板 1 つが、大腸菌 8 3 9 7 2 (「 C O N 4 2 - 5 」)の S C V - 形態及び大腸菌 8 3 9 7 2 (「 C O N 1 9 - 4 A 」)の L C V - 形態で、各々条痕を形成した。平板を 3 7 で 2 4 時間培養したが、これを図 6 及び 7 に示す。

30

【0114】

図 6 に示すマッコンキー寒天平板上のコロニーサイズ変種は、相互に容易に区別できる。 C O N 4 2 - 5 (左上) に条痕を形成した平板は、小型コロニー形態、すなわち大部分は微小なコロニーを示し、 L C V - 形態 C O N 1 9 - 4 A 分離株(右上)に条痕を形成した平板は、大型のコロニー形態を明確に示す。同じコロニー形態が、同じグリセリンフリーザーストックに条痕を形成した L B 寒天平板上に観測される(図 7)。

30

【0115】

v . 大小コロニー変種が同じ菌種であることの確認

上記に議論された異なる成長要求性を有する大腸菌 H U 2 1 1 7 の S C V 及び L C V 形態を特性化して、それらが遺伝的に同一であったことを確認した。大型コロニー変種を分離するため、大腸菌 H U 2 1 1 7 を、大型コロニー変種の成長を支持するのみの改質 M O P S 最少培地上と、大型 - コロニー及び小型 - コロニー変種の両方の成長を支持するマッコンキー寒天上とに、直接条痕を形成する。3 7 で 4 0 時間の成長の後、M O P S 最小寒天平板上で数個の大型コロニーを得た。大型 - コロニー変種及び小型 - コロニー変種の両方が、マッコンキー寒天上に条痕を形成した後、マッコンキー寒天上及びルリア - ベルターニ(L B)寒天上に再び条痕を形成し、3 7 で 1 8 時間培養した。マッコンキー寒天上及び L B 寒天上での大型 - コロニー変種及び小型 - コロニー変種を示す代表的な比較を、図 1 に示す。両方のコロニー変種の分析は、O 6 : H 1 の両方の変種の血清型を示し、これは菌種 H U 2 1 1 7 と野生型株 8 3 9 7 2 とに対すると同じである。

40

【0116】

v i . 菌種同一性の確認

同一性が、 P C R 増幅によりさらに確認される。8 3 9 7 2 と H U 2 1 1 7 とは、これらの菌種に優れる 1 . 6 k b の潜在プラスミドを所有し、その存在は、これらの菌種と

50

他の大腸菌菌種を区別する。さらに、H U 2 1 1 7 の p a p G 遺伝子は、その親の菌種 8 3 9 7 2 から、及び、p a p オペロンを所有する他の大腸菌菌種から、H U 2 1 1 7 を容易に識別する改変 8 0 3 b p 欠失を有している。潜在プラスミド及び p a p G 欠失に特異的な特定のプライマー対を用いた P C R は、S C V 及び L C V 分離株が大腸菌 H U 2 1 1 7 であることを確認する。

【 0 1 1 7 】

一例として、表 2 は、H U 2 1 1 7 菌種の同一性を確認するために用いることができるテストのパネルを記載する。

【 0 1 1 8 】

表 2

以下に対する試験	方法	規格（結果）
p a p G マイナス遺伝子型	P C R 及び配列決定	菌種特異的 1 5 8 4 の b p 断片の P C R 増幅 欠失する p a p G のフランギング領域は、大腸菌 8 3 9 7 2 のそれと比較されるいずれかの予想外変化を示すべきでない
種の遺伝子の確認	1 6 S の r R N A 配列の系統学的分析	系統学的に大腸菌に最も近い
種の生化学的確認	β - ゲルクロニダーゼ活性	クロモカルト T B X 寒天培地（E M D バイオサイエンス）上の青色コロニー
プラスミド I D	P C R	プラスミドに特異的な 3 個の断片の増幅
R F L P	P F G E	他の大腸菌菌種と区別可能な大腸菌 H U 2 1 1 7 に特異的な R F L P の優れたパターン
抗生素感受性	抗生素質の存在下で成長	テストされる全ての抗生素質に影響されやすい

10

20

30

40

【 0 1 1 9 】

実施例 2 S C V - 形態大腸菌 H U 2 1 1 7 を含む凍結乾燥潤滑剤ゲルの調製

この実例は、大腸菌 H U 2 1 1 7 の S C V - 形態の有効量を含む、凍結乾燥潤滑剤ゲルを生成する典型的な方法を提供する。付加的な凍結乾燥製剤及びこれらを製作し使用する方法は、例えば、2 0 0 9 年 2 月 1 2 日に公表された米国特許出願第 2 0 0 9 / 0 0 4 1 7 2 7 号に記載され、これらの各々は、参照事項としてその全体が本出願に組み込まれる。

【 0 1 2 0 】

例証としてかつ限定ではなく、ゲル化剤を含んだ組成物内で凍結乾燥される細胞内での生存度の有効量を保持するため、その開始量を選択する。例えば、ある実施形態では、生存可能 S C V 細胞の好ましい濃度は、約 $1 0 ^ 8$ c f u / m l である可能性がある。製剤のバイアル（または他の容器）で、例えば 1 0 m l の水中で懸濁または溶解する場合、バイアルの乾燥ケーキは、約 $1 0 ^ 9$ 個の生菌を最適に有している。

【 0 1 2 1 】

細胞調製

50

2リットルのフラスコ1つの細胞は、1mlのSCV HU2117種ストックが1Lの改質EZリッチ画定グリセリン培地に接種され、250RPMでの一定振盪で8時間37±1で培養され、または約2-2.3のOD₆₀₀まで培養されて増殖された。

【0122】

細胞は、例えば4で、8分間6000RPMで遠心分離により収集される。ペレット化した細胞を、例えば、0.9%の食塩水により二回、及び、pH7.0で10mMクエン酸塩緩衝液により一回、洗浄する。

【0123】

約10mlの最終容量のため、ペレット化された細胞を、2~3mlの緩衝液、例えばpH7.0、10mMクエン酸塩緩衝液で、再懸濁する。

10

【0124】

プレートカウントを用いて、再懸濁された細胞の濃度を決定してもよい。

【0125】

真空凍結乾燥

0.5mlの再懸濁した細胞を、例えば5~10%のショ糖等の賦形剤1.5ml、及び、例えば10mlの2%オートクレーブ処理ヒドロキシエチルセルロース(HEC)等の無菌の潤滑剤ゲルと、混合する。例えば、下記のように、混合物を凍結乾燥する。

【0126】

生産工程	工程記述
装填	60分間、5°C及び1気圧で培養する。
凍結	5°C/分の平均制御率で、-45°Cでシェルフに傾斜をつける。 285分間、-45°Cのターゲット設定点で、シェルフを制御する。
一次乾燥／二次乾燥	チャンバを排気し、60mTorrのターゲット設定点で制御する。 (a) 0.2°C/分の平均制御率で、-30°Cでシェルフに傾斜をつける。2850分間、-30°Cのターゲット設定点で、シェルフを制御する。 (b) 0.2°C/分の平均制御率で、-22°Cでシェルフに傾斜をつける。1080分間、-22°Cのターゲット設定点で、シェルフを制御する。 (c) 0.2°C/分の平均制御率で、-10°Cでシェルフに傾斜をつける。600分間、-10°Cのターゲット設定点で、シェルフを制御する。 (d) 60mTorrのターゲット設定点で、チャンバ圧力を制御する。0.2°C/分の制御平均率で、25°Cでシェルフに傾斜をつける。720分間、ターゲット設定点にチャンバを制御する。

20

30

40

【0127】

乾燥の後、細菌の生存度を決定する試験のため、及び／または潤滑剤ゲルとしての使用のため、例えば挿入前にカテーテルをコーティングするため、例えば約10~12mlの蒸留水内で、乾燥ケークを再懸濁してもよく、ここで、カテーテルを潤滑し、かつ、内部にカテーテルを挿入する対象を、尿路内及び／または挿入カテーテル上に大腸菌HU2117の生物膜を生成するための貢献となる方法で、接種する。

【0128】

この上記に記載する成長条件を用いて、最終生産物の大型コロニーの一部を、非常に低

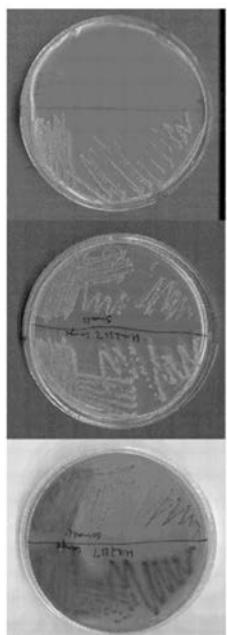
50

い量（例えば 1.0×10^8 c.f.u./ml 内に 1 個の頻度）で、保持することができる。

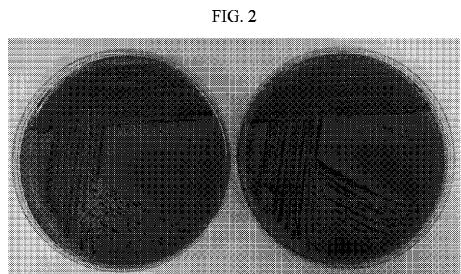
【0129】

上記明細書に記載の全ての文献及び特許は、全ての目的のために参考事項として本願に組み込まれる。記載した組成物及び本発明の方法の様々な修正変更は、本発明の範囲及び精神を逸脱しない範囲で、当業者に明らかである。特定の推奨された実施形態に関連して本発明を記載したが、特許請求の範囲に記載される本発明は、この特定の実施形態に過度に限定されるべきでないことを理解すべきである。実際、適切な分野に熟練した人々に明らかに、本発明を遂行するために記載した形式の様々な改質は、本発明の範囲内であることを意図している。

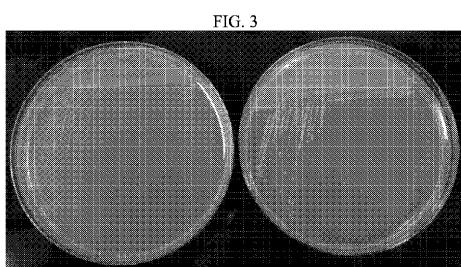
【図 1】



【図 2】

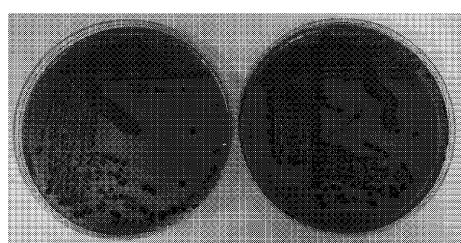


【図 3】



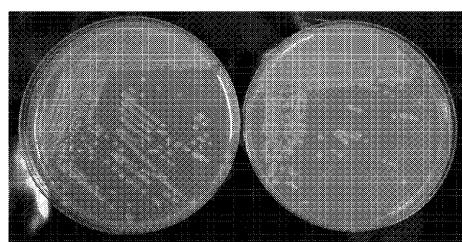
【図4】

FIG. 4



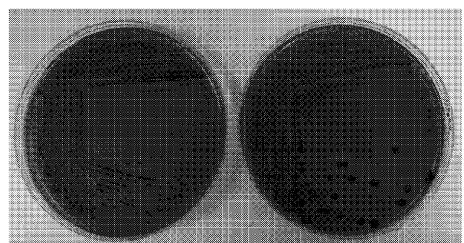
【図5】

FIG. 5



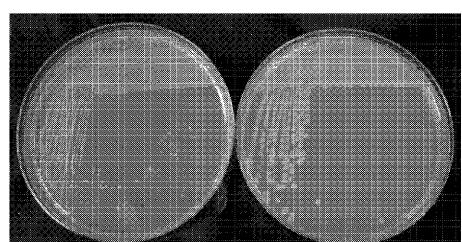
【図6】

FIG. 6



【図7】

FIG. 7



【図8】

図8A

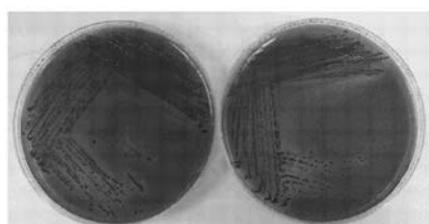
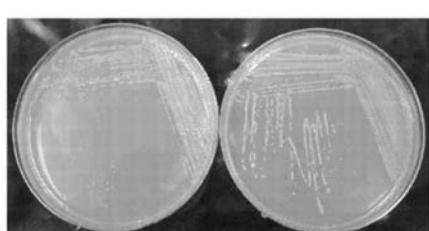


図8B



【国際調査報告】

PCT/US2015/023026 21.08.2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/23026
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 1/00, C12N 1/20, C12N 1/26 (2015.01) CPC - C12N 1/20, C12N 15/70, C12N 1/26 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) IPC(8): C12N 1/00, C12N 1/20, C12N 1/26 (2015.01) CPC: C12N 1/20, C12N 15/70, C12N 1/26		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/243, 435/252.33, 435/248		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWest, PatBase, Google Patents, Google Scholar: E.coli, Escherichia coli, bacteria, probiotic, culture, media, medium, inoculation, buffer, liquid growth, MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), Tricine, Iron Sulfate, Ammonium Chloride, Potassium Sulfate, Calcium Chloride Monohydrate, Magnesium Chloride, Sodium Chloride, Ammonium, Molybdate,		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TRAUTNER et al., PRE-INOCULATION OF URINARY CATHETERS WITH ESCHERICHIA COLI 83972 INHIBITS CATHETER COLONIZATION BY ENTEROCOCCUS FAECALIS, Journal of Urology, January 2002, Vol. 167, NO. 1, pages 375-379, Abstract, pg 2, para 3	1-15, 45
A		16
Y	US 2010/0310713 A1 (VIEBKKE et al.) 09 December 2010 (09.12.2010); para [0011], [0023], [0066], [0071]	1-15, 45
A		16
Y	US 2013/0195823 A1 (SCATIZZI et al.) 01 August 2013 (01.08.2013); para [0069]	9-10
Y	WO 2009/005704 A1 (KIZER) 08 January 2009 (08.01.2009); para [0070], [0074]	11-12
Y	US 5,536,645 A (JAY) 16 July 1996 (16.07.1996); abstract; col 2, ln 63-65	2, 3, 13, 15
A	US 2010/0279331 A1 (MORIYAMA et al.) 04 November 2010 (04.11.2010); para [0292], [0295], [0306]	16
A	US 2013/0302783 A1 (HAYASHIZAKI et al.) 14 November 2013 (14.11.2013); para [0047], [0069]	16
A	US 2013/0211310 A1 (BOMMARITO et al.) 15 August 2013 (15.08.2013); para [0115]	16
A	US 2013/0029415 A1 (NAOYA et al.) 31 January 2013 (31.01.2013); para [0123]	16
A	US 2012/0045432 A9 (YU et al.) 23 February 2012 (23.02.2012); para [0823], [1107]	16
A	US 2006/0035287 A1 (KROLL et al.) 16 February 2006 (16.02.2006); para [0020]	16
<input checked="" 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 doubt 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 11 August 2015 (11.08.2015)		Date of mailing of the international search report 21 AUG 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

PCT/US2015/023026 21.08.2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/23026
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2013/0323808 A1 (GOKARN et al.) 05 December 2013 (05.12.2013); para [0411]	16
A	US 2014/0051841 A1 (ALLEN et al.) 20 February 2014 (20.02.2014); para [0026], [0101]	16
A	US 2011/0287500 A1 (URANO et al.) 24 November 2011 (24.11.2011); para [0270]	16
A	US 2012/0115180 A1 (LAHTEENMAKI et al.) 10 May 2012 (10.05.2012); para [0042]	16
A	US 2007/0118916 A1 (PUZIO et al.) 24 May 2007 (24.05.2007); para [0003], [0006], [0506], [0563], [1095], [5965], [7824]	16
A	US 4,597,966 A (ZOLTON et al.) 01 July 1986 (01.07.1986) col 4, ln 62- col 5, ln 7	16
A	US 2013/0267680 A1 (OVAA et al.) 10 October 2013 (10.10.2013); [0129]	16
A	US 2013/0122541 A1 (LYNCH et al.) 16 May 2013 (16.05.2013); para [0640], Table 67	16
A	Proctor et al "Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections" NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY VOLUME 4 pg 295-305, APRIL 2006, abstract, pg 295 col 1, para 1	1

PCT/US2015/023026 21.08.2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/23026
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 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:</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 19, 24, 25, 40-44, 46-67 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>		
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.</p> <p>Group I, claims 1-16, 45, directed to a method of culturing probiotic bacteria.</p> <p>Group II, claims 17, 18 and 20-23, 26-30, directed to a method of preparing a medical lubricant gel comprising probiotic small colony variant (SCV) bacterial cells, or a frozen or freeze-dried composition.</p> <p>Group III, claims 31-39, directed to a method of forming a biofilm on a medical device or of administering SCV bacterial cells to a subject.</p> <p>****Continued in Supplemental Box****</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-16, 45</p>		
<p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> 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.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

PCT/US2015/023026 21.08.2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/23026

Continuation of Box No. III:

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

Group I has the special technical feature of a method of culturing probiotic bacteria, an *E. coli* SCV bacterium, in a defined liquid growth medium, that is not required by any other Groups.

Group II has the special technical feature of an aqueous fluid mixture comprising probiotic SCV bacterial cells, gelling agent and protective agent, that is not required by any other Groups.

Group III has the special technical feature of a method of forming a biofilm on a medical device or of administering SCV bacterial cells to a subject, that is not required by any other Groups.

Common technical features:

Groups I-III share the common technical feature of small colony variant (SCV) bacterium. Groups I and II further share a probiotic SCV liquid culture. Groups II and III further share the common features of a freeze-dried preparation comprising SCV bacterial cells, a pharmaceutically acceptable gelling agent, and a pharmaceutically acceptable first protective agent. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is obviated by the article entitled "PRE-INOCULATION OF URINARY CATHETERS WITH *ESCHERICHIA COLI* 83972 INHIBITS CATHETER COLONIZATION BY *ENTEROCOCCUS FAECALIS*" by Trautner et al. (hereinafter "Trautner"), in view of US 2010/0310713 A1 to Viebke et al., (hereinafter Viebke).

Trautner teaches an *E. coli* small colony variant (SCV) liquid culture (pg 2, para 3, *E. coli* 83972) bacteria were retrieved from the trypticase soy agar plates and cultured overnight in trypticase soy broth (Difco, Sparks, Maryland)).

Viebke teaches a probiotic bacterium liquid culture (para [0011], [0071]), comprising a freeze-dried preparation comprising bacterial cells (para [0011]), a pharmaceutically acceptable gelling agent (para [0066]) "Examples of polysaccharides could be 'carageenan, pectin, alginate'", and a pharmaceutically acceptable first protective agent (para [0011]) "the addition of gum Arabic to the probiotic composition provides protection for the probiotic culture". It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to have formulated the *E. coli* SCV liquid culture of Trautner according to the teachings of Viebke, and thus provide a pharmaceutic composition comprising *E. coli* SCV bacterium that is suitable to coat catheter and administer to a human subject.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I-III lack unity of invention under PCT Rule 13.

Note: continued from no. 4 above: Claims 19, 24, 25, 40-44, 46-67 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 47/38 (2006.01)	A 6 1 K 47/38	
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 L 33/00 (2006.01)	A 6 1 L 33/00	1 1 0
A 6 1 M 25/00 (2006.01)	A 6 1 M 25/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,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,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 ドーシー,ケイレブ ダブリュー.

アメリカ合衆国, 53719 ウィスコンシン州, マディソン, スイート29, サウス ローザ
ロード 505

(72)発明者 スミス, ジョシュア エー.

アメリカ合衆国, 53719 ウィスコンシン州, マディソン, スイート29, サウス ローザ
ロード 505

F ターム(参考) 4B065 AA26X AC20 BA22 BB02 BB03 BB04 BB06 BB08 BB11 BB12
BB14 BB15 BC36 BD22 BD31 BD33 BD42 CA44
4C076 AA09 BB21 CC17 DD38 DD48 DD51 DD67 EE03 EE08P EE09P
EE23P EE30P EE32P EE36P EE38 EE41 EE42P FF21 FF63 GG05
4C081 AC08 BA14 EA02
4C087 AA01 AA02 AA04 BC34 CA10 MA28 MA55 NA14 ZA82
4C167 AA02 CC26 GG16