

**Fig. 5B**

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

シアリルラクトースおよびフコシルオリゴ糖から実質的になるプレバイオティクス組成物であって、

前記シアリルラクトースが、3'-シアリルラクトース(3'-SL)、6'-シアリルラクトース(6'-SL)、またはこれらの混合物であり、ならびに

前記フコシルオリゴ糖が、1,2-フコシル、1,3-フコシル、および/または1,4-フコシル残基を含む、プレバイオティクス組成物。

## 【請求項 2】

前記シアリルラクトースが、3'-SLおよび6'-SLの混合物である、請求項 1 に記載のプレバイオティクス組成物。

10

## 【請求項 3】

前記フコシルオリゴ糖が、中性フコシルオリゴ糖(fucosylated neutral oligosaccharide)を含む、請求項 1 または 2 に記載のプレバイオティクス組成物。

## 【請求項 4】

前記フコシルオリゴ糖が、2'-フコシルラクトース(2-FL)、3-フコシルラクトース(3-FL)、ラクトジフコテトラオース(LDFT)、またはそれらの混合物である、請求項 1 または 2 に記載のプレバイオティクス組成物。

## 【請求項 5】

前記フコシルオリゴ糖が、2'-FLおよび3-FL；2'-FLおよびLDFT；3-FLおよびLDFT；または2'-FL、3-FL、およびLDFTの組み合わせである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のプレバイオティクス組成物。

20

## 【請求項 6】

3'-SL、6'-SL、2'-FL、3-FL、およびLDFTの混合物から実質的になる、請求項 1 に記載のプレバイオティクス組成物。

## 【請求項 7】

プロバイオティクスをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のプレバイオティクス組成物。

## 【請求項 8】

前記プロバイオティクスが、ビフィズス菌(bifidobacteria)、ビフィズス菌、ラクトバチルス(lactobacilli)、バクテロイデス・フラギリス(Bacteriodes fragilis)、バクテロイデス・テタイオタオミクロン(Bacteriodes thetaiotaomicron)、エンテロコッカス・フェカーリス(Enterococcus faecalis)、表皮ブドウ球菌(Staphylococcus epidermidis)、エンテロバクター・アエロゲネス(Enterobacter aerogenes)、エンテロバクター・クロアカエ(Enterobacter cloacae)、またはそれらの組み合わせの個体群である、請求項 7 に記載のプレバイオティクス組成物。

30

## 【請求項 9】

前記ビフィズス菌の個体群が、ビフィドバクテリウム・ロングム(B. longum)、ビフィドバクテリウム・インファンティス(B. infantis)、またはそれらの混合物である、請求項 8 に記載のプレバイオティクス組成物。

40

## 【請求項 10】

前記ビフィズス菌の個体群が、ビフィドバクテリウム・ロングム(B. longum) JCM7007、JCM7009、JCM7010、JCM7011、JCM1210、JCM1260、JCM1272、JCM11347、ATCC15708、ビフィドバクテリウム・インファンティス(B. infantis) ATCC15697、またはそれらの混合物である、請求項 9 に記載のプレバイオティクス組成物。

## 【請求項 11】

50

3'-SLおよび6'-SLが4:1~1:2の比で含まれる、請求項1~10のいずれか1項に記載のプレバイオティクス組成物。

【請求項12】

ビフィズス菌の個体群を、ビフィズス菌の増殖を増加させるのに有効な量のシアリルラクトースおよびフコシルオリゴ糖を含むプレバイオティクス組成物と接触させることを含む、ビフィズス菌の増殖を増加させる方法。

【請求項13】

前記シアリルラクトースが、3'-シアリルラクトース(3'-SL)、6'-シアリルラクトース(6'-SL)、またはそれらの混合物である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記フコシルオリゴ糖が、1,2-フコシル, 1,3-フコシル, および/または1,4-フコシル残基を含む、請求項11または12に記載の方法。

【請求項15】

前記フコシルオリゴ糖が、中性フコシルオリゴ糖を含む、請求項12~14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

前記フコシルオリゴ糖が、2-フコシルラクトース(2-FL)、3-フコシルラクトース(3-FL)、ラクトジフコテトラオース(lactodifucotetraose)(LDFT)、またはそれらの混合物である、請求項12~15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記接触させる工程がインビトロで行われる、請求項12~16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

前記接触させる工程が、前記プレバイオティクス組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、請求項12~16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

前記プレバイオティクス組成物が、前記対象に経口投与されるものである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記対象がヒトである、請求項18または19に記載の方法。

【請求項21】

前記対象が幼児である、請求項18~20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記幼児が新生児である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記対象が、腸内における有用微生物の不足、または病原菌の存在もしくは過多に関連した疾患を有している疑いのある、前記疾患の危険性のある、または前記疾患で苦しんでいる対象である、請求項18~22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

前記対象が、過敏性腸症候群または炎症性大腸炎を有している疑いのある、前記疾患の危険性のある、または前記疾患で苦しんでいる対象である、請求項18~23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

前記プレバイオティクス組成物が、前記ビフィズス菌の微環境のpH減少に有効な量で前記対象に投与されるものである、請求項18~24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

前記プレバイオティクス組成物が、病原菌の増殖速度の減少に有効な量で前記対象に投与されるものである、請求項18~25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

10

20

30

40

50

前記ビフィズス菌の個体群が、ビフィドバクテリウム・ロングム、ビフィドバクテリウム・インファンティス、またはそれらの混合物を含む、請求項 12 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記病原菌が、大腸菌またはウェルシュ菌である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記プレバイオティクス組成物が、プロバイオティクスをさらに含む、請求項 12 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記プロバイオティクスが、ビフィズス菌、ビフィズス菌、ラクトバチルス、バクテロイデス・フラギリス、バクテロイデス・テタイオタオミクロン、エンテロコッカス・フェカーリス、表皮ブドウ球菌、エンテロバクター・アエロゲネス、エンテロバクター・クロアカエ、またはそれらの組み合わせの個体群である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記ビフィズス菌の個体群が、ビフィドバクテリウム・ロングム、ビフィドバクテリウム・インファンティス、またはそれらの混合物である、請求項 30 に記載のプレバイオティクス組成物。

【請求項 32】

前記ビフィズス菌の個体群が、ビフィドバクテリウム・ロングム JCM7007、JCM7009、JCM7010、JCM7011、JCM1210、JCM1260、JCM1272、JCM11347、ATCC15708、ビフィドバクテリウム・インファンティス ATCC15697、またはそれらの混合物である、請求項 31 に記載のプレバイオティクス組成物。

【請求項 33】

3'-SL および 6'-SL が 4:1 ~ 1:2 の比で含まれる、請求項 12 ~ 32 のいずれか 1 項に記載のプレバイオティクス組成物。

【請求項 34】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の前記プレバイオティクス組成物を含む組成物である、消化器疾患を治療するために用いられる医薬組成物。

【請求項 35】

前記消化器疾患が、有用微生物の不足または病原微生物の過多に関連したものである、請求項 34 に記載の医薬組成物。

【請求項 36】

前記消化器疾患が、過敏性腸症候群または炎症性大腸炎である、請求項 34 または 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記消化器疾患を治療するために使用する薬剤を製造するための請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のプレバイオティクス組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本 PCT 出願は、2012 年 4 月 13 日に出願された、米国特許出願第 61/623,868 号の優先権を主張するものであり、その全体の内容が本明細書に参照により組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

哺乳類動物の消化管は一般的に微生物によりコロニーが作られ、これらは微生物叢と称され、有用微生物および病原微生物のどちらも含む。細菌は、哺乳類動物の腸内微生物叢

10

20

30

40

50

群 (gut microbiota community) の大半を占める。たとえば、ヒト糞便の乾燥質量の 60% までは細菌で構成される。ヒト消化管は何百もの異なる種の微生物により作られ、一般的には数種が腸内微生物叢個体群 (intestinal microbiota populations) に寄与していると考えられている。

#### 【0003】

腸内微生物叢と宿主生物との間の関係は単に共存 (co-existence) であるだけでなく、むしろ共生関係 (symbiotic relationship) である。すなわち、腸内微生物叢の有用微生物 (たとえばビフィズス菌) が、たとえば消化されていないまたは消化されないエネルギー基質を発酵させたり、宿主免疫システムを調節したり、病原菌の成長を抑制したり、宿主により摂取されうる栄養物を生産したり (たとえばビオチンやビタミン K) などの宿主に有益な代謝機能を実施する。たとえば、有用微生物の不足、または病原微生物の過多などの腸内微生物叢の不均衡は、宿主の疾患につながる。

#### 【発明の概要】

#### 【0004】

##### 発明の要約

本開示はシアリルラクトースおよび / またはフコシルオリゴ糖のある組み合わせが、予想外に高いプレバイオティクス効果を示した発見に基づいている。たとえば、これらの組み合わせは、発酵の間、たとえばビフィズス菌、特に消化管内で発見された多数の特定のビフィズス菌株などの腸内の有用な細菌 (intestinal beneficial bacteria) の成長を促進させ、pH を減少させた。

#### 【0005】

したがって、本明細書では、シアリル化オリゴ糖 (sialylated oligosaccharide) (たとえば、シアリルラクトース) およびフコシルオリゴ糖の組み合わせを含むプレバイオティクス組成物、ならびにビフィズス菌のような有益な細菌の成長を促進し、および / または病原微生物の成長を抑制する際のそれらの使用について述べる。

#### 【0006】

ひとつの態様では、本発明は、少なくともひとつのシアリルラクトースおよび少なくともひとつのフコシルオリゴ糖から実質的になるプレバイオティクス組成物を提供する。シアリルラクトースは 3' - シアリルラクトース (3' - SL)、6' - シアリルラクトース (6' - SL)、またはそれらの混合物 (たとえば、4:1 ~ 1:2 の比) でありうる、およびフコシルオリゴ糖は 1, 2 - フコシル、1, 3 - フコシル、および / または 1, 4 - フコシル残基 (residue) を含むうる。いくつかの形態では、フコシルオリゴ糖は中性フコシルオリゴ糖 (fucosylated neutral oligosaccharide) である。フコシルオリゴ糖の例としては、これに制限されないが、2 - フコシルラクトース (2 - FL)、3 - フコシルラクトース (3 - FL)、ラクトジフコテトラオース (lactodifucotetraose) (LDF T)、またはそれらの混合物 (たとえば、2' - FL および 3 - FL の混合物; 2' - FL および LDF T の混合物; 3 - FL および LDF T の混合物; または 2' - FL、3 - FL、および LDF T の混合物; などの混合物) が挙げられる。ある例では、組成物は 3' - SL、6' - SL、2' - FL、3 - FL、および LDF T の混合物から実質的になる。

#### 【0007】

好ましくは、上記プレバイオティクス組成物のいずれかは、さらにプロバイオティクスを含み、プロバイオティクスとしては、ビフィズス菌、ラクトバチルス、バクテロイデス・フラギリス、バクテロイデス・テタイオタオミクロン、エンテロコッカス・フェカーリス (それらのプロバイオティクス株)、表皮ブドウ球菌、エンテロバクター・アエロゲネス、エンテロバクター・クロアカエ、または同様の機能を有する関連の細菌の個体群でありうる。いくつかの形態においては、ビフィズス菌の個体群はビフィドバクテリウム・ロングム (B. longum) (たとえば、ビフィドバクテリウム・ロングム (B. longum) JCM 7007、JCM 7009、JCM 7010、JCM 7011、J

10

20

30

40

50

CM1210、JCM1260、JCM1272、JCM11347、またはATCC15708)、ビフィドバクテリウム・インファンティス(B. infantis)(たとえば、ビフィドバクテリウム・インファンティス(ATCC15697)、またはそれらの混合物でありうる。

【0008】

他の態様では、本発明は、シアリルラクトースおよびフコシルオリゴ糖を含むプレバイオティクス組成物(たとえば、上記のもの)とともに、有用な細菌個体群(たとえば、ビフィズス菌個体群)の増殖を増加させるのに有効な量で、有用な細菌、たとえば、ビフィズス菌の増殖を増加させる方法を提供する。シアリルラクトースは、3'-シアリルラクトース(3'-SL)、6'-シアリルラクトース(6'-SL)、またはそれらの混合物でありうる。フコシルオリゴ糖は、1,2-フコシル、1,3-フコシル、および/または1,4-フコシル残基を含みうる。あるいくつかの形態においては、フコシルオリゴ糖は、中性フコシルオリゴ糖である。フコシルオリゴ糖の例としては、これに制限されないが、2-フコシルラクトース(2-FL)、3-フコシルラクトース(3-FL)、ラクトジフコテトラオース(LDFT)、またはそれらの混合物(たとえば、上記のもの)が挙げられる。

10

【0009】

本発明の方法はインビトロまたはインビボのどちらかにおいて実施されうる。たとえば、接触させる段階は、本発明のプレバイオティクス組成物のいずれかを、治療を必要とする対象に投与することにより実施されうる。ある形態においては、プレバイオティクス組成物は対象に経口投与される。

20

【0010】

本発明のプレバイオティクス組成物による治療を必要とする対象は、ヒト(たとえば、新生児のようなヒト幼児)でありうる。ある形態においては、対象(たとえば、ヒト)は、腸内における有用微生物の不足、または病原菌の存在もしくは過剰に関連した疾患を有している疑いのある、前記疾患の危険性のある、または前記疾患で苦しんでいる。

【0011】

必要であれば、プレバイオティクス組成物は、前述のように、有用な細菌(たとえば、ビフィドバクテリウム・ロングム、ビフィドバクテリウム・インファンティス、またはそれらの混合物のようなビフィズス菌個体群)の微環境におけるpH減少に有効な量で、対象に投与されうる。または、プレバイオティクス組成物は、病原菌(たとえば、大腸菌またはウェルシュ菌)の増殖速度の減少に有効な量で、対象に投与されうる。本発明の方法に用いられるプレバイオティクス組成物は、プロバイオティクス(たとえば、ビフィドバクテリウム・ロングム、ビフィドバクテリウム・インファンティス、またはそれらの混合物のようなビフィズス菌)をさらに含みうる。いくつかの形態においては、ビフィズス菌の個体群は、ビフィドバクテリウム・ロングム JCM7007、JCM7009、JCM7010、JCM7011、JCM1210、JCM1260、JCM1272、JCM11347、ATCC15708、ビフィドバクテリウム・インファンティス ATCC15697、またはそれらの混合物である。

30

【0012】

また、本発明の範囲には、(i)腸内における有用微生物の不足、または病原菌の存在もしくは過剰に関連した疾患の治療のために、または過敏性腸症候群または炎症性大腸炎を治療するために、対象の有用微生物の成長を促進させるために用いる医薬組成物、および(ii)上記の疾患を治療するための薬剤を製造するための医薬組成物の使用が含まれる。医薬組成物は、本発明のプレバイオティクス組成物および製剤上許容されるキャリアを含みうる。いくつかの例では、プレバイオティクス組成物は、本明細書で述べるように、シアリル化オリゴ糖(たとえば、シアリルラクトース)およびフコシル化オリゴ糖の組み合わせ、ならびに1以上のプロバイオティクスを含む。

40

【0013】

以下に述べる詳細な説明は、ある例示であって、本発明の範囲の限定をするものではな

50

い。本発明の他の特徴および利点は、以下の図面、発明を実施するための形態、および特許請求の範囲から明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1A】図1は、母乳オリゴ糖（H M O S）またはフルクト - オリゴ糖（F O S）の存在下または非存在下での発酵培地での（A）p Hおよび（B）乳酸塩濃度の変動を表す図である。

【図1B】図1は、母乳オリゴ糖（H M O S）またはフルクト - オリゴ糖（F O S）の存在下または非存在下での発酵培地での（A）p Hおよび（B）乳酸塩濃度の変動を表す図である。

【図2A】図2は、H M O SおよびF O S存在下での糞試料中の微生物叢分布を表す図である。q P C Rでの同定により、H M O S存在下または非存在下での発酵培養（f e r m e n t a t i o n c u l t u r e）における異なる細菌種の数に補っている。A：ビフィズス菌。

【図2B】図2は、H M O SおよびF O S存在下での糞試料中の微生物叢分布を表す図である。q P C Rでの同定により、H M O S存在下または非存在下での発酵培養（f e r m e n t a t i o n c u l t u r e）における異なる細菌種の数に補っている。B：ウェルシュ菌。

【図2C】図2は、H M O SおよびF O S存在下での糞試料中の微生物叢分布を表す図である。q P C Rでの同定により、H M O S存在下または非存在下での発酵培養（f e r m e n t a t i o n c u l t u r e）における異なる細菌種の数に補っている。B：ウェルシュ菌。

【図3A】図3は、L C - M Sを使用した同定による、異なる供与者の糞便の微生物叢の母乳オリゴ糖消費分析結果を表す図である。

【図3B】図3は、L C - M Sを使用した同定による、異なる供与者の糞便の微生物叢の母乳オリゴ糖消費分析結果を表す図である。

【図4A】図4は、フコシルオリゴ糖2' - F L、3 - F L、L D F T、H M O Sおよびフルクトオリゴ糖ポジティブコントロール、F O Sを用いた異なる細菌の成長増加（A）およびp H減少（B）の比率を表す棒グラフである。

【図4B】図4は、フコシルオリゴ糖2' - F L、3 - F L、L D F T、H M O Sおよびフルクトオリゴ糖ポジティブコントロール、F O Sを用いた異なる細菌の成長増加（A）およびp H減少（B）の比率を表す棒グラフである。

【図5A】図5は、フコシルオリゴ糖2' - F L、3 - F L、および/またはL D F T；シアリルラクトース3' - S Lおよび/または6' - S L；それらの組み合わせ；H M O S；ならびにF O Sで示されるように、異なる細菌の成長増加（A）およびp H減少（B）の比率を表す棒グラフである。

【図5B】図5は、フコシルオリゴ糖2' - F L、3 - F L、および/またはL D F T；シアリルラクトース3' - S Lおよび/または6' - S L；それらの組み合わせ；H M O S；ならびにF O Sで示されるように、異なる細菌の成長増加（A）およびp H減少（B）の比率を表す棒グラフである。

【図6A】図6は、フコシルオリゴ糖2' - F L、3 - F L、および/またはL D F T；シアリルラクトース3' - S Lおよび/または6' - S L；それらの組み合わせ；H M O S；ならびにF O Sで示されるように、異なる細菌の成長増加（A）およびp H減少（B）の比率を表す棒グラフである。

【図6B】図6は、フコシルオリゴ糖2' - F L、3 - F L、および/またはL D F T；シアリルラクトース3' - S Lおよび/または6' - S L；それらの組み合わせ；H M O S；ならびにF O Sで示されるように、異なる細菌の成長増加（A）およびp H減少（B）の比率を表す棒グラフである。

【図7】図7は、例示としてシアリルラクトースおよびフコシルオリゴ糖の構造を示したグラフである。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0015】

## 発明の詳細な説明

動物では消化しにくい食事療法のグリカン (Dietary glycan) は有用な細菌により利用され、それにより腸の微生物叢のコロニー形成、特に、健康に重要である有用な細菌のコロニー形成を促進する。腸のコロニー形成とは、宿主生物の消化管の中で、生きた微生物の個体群の設立および維持 (establishment or maintenance) である。これはたとえば、腸の小区分のみ (たとえば、小腸の、大腸の、もしくは胃の)、部分的なコロニー形成だけでなく消化管全体のコロニー形成でありうる。哺乳類において、腸のコロニー形成は、生まれたときに始まり、母乳を与えるということは、ビフィズス菌のような有用な細菌中で、代表的な微生物叢の豊富さと関連している。これは母乳のある成分がプレバイオティクス効果を有することを示している。

10

## 【0016】

有用な細菌または有用微生物叢は微生物であり (たとえば、細菌、菌類、原生動物 (protozoa))、またプロバイオティクスとしても知られており、宿主生物の腸内でコロニー形成される際に宿主生物に有益な効果を与える。たとえば、それらは宿主生物にとって消化されない食品成分を代謝し、非病原性的方法 (non-pathogenic manner) で宿主の免疫システムを調節し、病原菌の成長を抑制し、および / または宿主によって摂取されうる栄養物を生産する (たとえば、ビオチンおよびビタミン K)。有用な細菌としては、特に制限されないが、ビフィズス菌、ラクトバチルス、バクテロイデス・フラギリス、バクテロイデス・テタイオタオミクロン、エンテロコッカス・フェカーリス (エンテロコッカス・フェカーリスのプロバイオティクス株)、表皮ブドウ球菌 (スタフィロコッカス・エピデルミデス、Staphylococcus epidermidis)、エンテロバクター・アエロゲネス、およびエンテロバクター・クロアカエを含む。

20

## 【0017】

病原菌とは、対象に疾患または症状を引き起こしうるおよび / または引き起こすあらゆる細菌を意味する。いくつかの形態においては、この用語は、対象の腸にコロニー形成をする病原菌を含む。いくつかの形態においては、この用語は、対象の腸内に存在または過多にある場合に病原性である物質を含む。病原菌の例としては、これに制限されないが、大腸菌 (Escherichia coli)、ウェルシュ菌 (クロストリジウム・パーフリンジェンス、Clostridium perfringens)、リステリア・モノサイトゲネス (Listeria monocytogenes)、リステリア・イノキュア (Listeria innocua)、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)、エンテロコッカス・フェカーリス (Enterococcus faecalis) (エンテロコッカス・フェカーリスの有毒株 (virulent strains))、およびエンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) を含む。

30

## 【0018】

本発明は、少なくとも部分的に、母乳オリゴ糖 (HMOs)、特に本発明のフコシルオリゴ糖およびシアリルラクトースが、幼児の腸に所望の細菌がコロニー形成するためのエネルギー源および栄養物として作用するプレバイオティクスとして機能しうる発見に基づいている。プレバイオティクスとは、たとえば、オリゴ糖、対象 (たとえば、ヒトのような哺乳類) に消化されないもの、ならびに消化器官内で 1 以上の有用な細菌 (たとえば、ビフィズス菌) の成長または活動を刺激するもの、および / または消化器官内で 1 以上の病原菌の成長および活動を抑制するもののような食品成分である。プレバイオティクスは、選択的に、対象の消化管内で 1 または限られた数の細菌の成長および / または活動を刺激しうる。

40

## 【0019】

したがって、本発明は、シアリル化オリゴ糖 (たとえば、シアリルラクトース) およびフコシルオリゴ糖の組み合わせを含むプレバイオティクス組成物、ならびに有用な細菌の成長 / 活動を促進ならびに / または病原菌の成長および / もしくは活動を抑制するための組成物の使用に関するものである。

50



## 【0020】

## プレバイオティクス組成物

本発明のプレバイオティクス組成物は、プレバイオティクス活動を有するオリゴ糖の組み合わせ（たとえば、シアリル化オリゴ糖およびフコシルオリゴ糖のようにミルクから発見されたもの）を含む。そのため、それらの組成物は、たとえばヒト新生児のようなヒトでありうる対象において、1以上の有用な腸細菌（たとえば、ビフィズス菌、これは下記実施例で開示された特定の株を含む）を促進するのに、および1以上の病原菌の成長を抑制するのに有益である（インビボまたはインビトロのどちらかにおいて）。

## 【0021】

いくつかの形態においては、本発明のプレバイオティクス組成物は、少なくともひとつのシアリル化オリゴ糖（たとえば、シアリルラクトース）および少なくともひとつのフコシル糖から実質的になる。このようなプレバイオティクス組成物は、たとえば、特定のオリゴ糖のような特定の活性成分だけでなく、組成物の基本的小および新規な特性に物質的に影響を与えない他の薬剤も含む。特定の活性成分は、組成物中の主要なプレバイオティクス剤でありうる。いくつかの例において、特定の活性成分（たとえば、特定のオリゴ糖プレバイオティクス）は、それぞれの組成物の重量に対して、少なくとも約25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%を構成する。他の例では、特定のオリゴ糖プレバイオティクスは、組成物の全糖含有重量に対して、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、または95%を構成する。ひとつの例では、特定のオリゴ糖は、組成物中において、たったひとつのプレバイオティクスである。

## 【0022】

オリゴ糖は、2以上の単糖モノマーを含む高分子である。オリゴ糖は、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上の単糖モノマーを含みうる。

## 【0023】

シアリル化オリゴ糖は、1以上のシアリル酸部分を含むオリゴ糖分子である。シアリル化オリゴ糖の例としては、3'-SLおよび6'-SLを含む。図7を参照。プレバイオティクス組成物は、3'-シアリルラクトース（3'-SL）、6'-シアリルラクトース（6'-SL）、またはその両方を含みうる。本発明のプレバイオティクス組成物は、3'-SLおよび6'-SLの混合物を含み、3'-SLと6'-SLとの比率（たとえば、重量/重量、体積/体積、モル/モル）は、10:1-1:10の範囲内でありうる、たとえば、5:1-1:5、4:1-1:2、または2:1-1:2である。いくつかの例において、3'-SLおよび6'-SLの比率は、約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8、約1:9、約1:10、約1:10、約1:20、約1:30、約1:40、約1:50、約1:60、約1:70、約1:80、約1:90、約1:100、約2:1、約3:1、約4:1、約5:1、約6:1、約7:1、約8:1、約9:1、約10:1、約20:1、約30:1、約40:1、約50:1、約60:1、約70:1、約80:1、約90:1、または約100:1である。他の例においては、3'-SLおよび6'-SLの比は、1000:1-1:1000の範囲内であり、たとえば、100:1-10:1、10:1-1:1、10:1-5:1、1:100-1:10、1:10-1:1、1:10-1:5である。

## 【0024】

フコシルオリゴ糖は、1以上のフコースモノマーを含むオリゴ糖分子であり、それらは1,2-、1,3-、または1,4-結合でありうる。いくつかの例において、本発明のプレバイオティクス組成物中に含まれるフコシルオリゴ糖は、中性オリゴ糖であり、生理的pHで酸または塩基部分を含まない。このようなフコシルオリゴ糖としては、これに制限されないが、2'-フコシルラクトース（2'-FL）、3'-フコシルラクトース（3'-FL）、およびラクトジフコテトラオース（LDFT）が挙げられる。図7を参照。本発明のプレバイオティクス組成物は、2'-FL、3'-FL、LDFT、またはそれらのあらゆる組み合わせを含む。ひとつの例としては、組成物は3'-SL、6'-SL

、2'-FL、3-FL、およびLDFTを含む。

【0025】

いくつかの形態において、プレバイオティクス組成物は、100:1-1:100の範囲、たとえば、20:1-1:20、10:1-1:10、5:1-1:5、4:1-1:2、または2:1-1:2で、シアリル化オリゴ糖およびフコシルオリゴ糖を含む。

【0026】

本発明のプレバイオティクス組成物は、1以上のプレバイオティクスオリゴ糖（たとえば、3'-SLもしくは6'-SLのようなシアリル化オリゴ糖；または2'-FL、3-FL、もしくはLDFTのようなフコシルオリゴ糖）を含み、それらは、全組成物（たとえば、乾燥物の重量に対する、または液体組成の場合は溶媒の体積に対する、固体成分の重量）の約0.2-98%（たとえば、少なくとも0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、50%、75%、または80%）を構成する。

【0027】

必要な場合は、本発明のプレバイオティクス組成物は、プロバイオティクス（たとえば、ビフィズス菌（*bifidobacteria*）、またラクトバチルス・ビフィズス（*lactobacillus bifidus*）とも称される）、たとえば、生きた微生物の個体群をさらに含み、それらは十分な量を投与した場合、宿主の健康に有益なものをもたらす。プロバイオティクス・ビフィズス菌は、当業者に公知のものであり、本発明の態様によれば、用いられるビフィズス菌の例としては、これに制限されないが、ビフィドバクテリウム・ロングム（*B. longum*）およびビフィドバクテリウム・インファンティス（*B. infantis*）を含む（たとえば、

【0028】

【化1】

Schell et al., *The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract*. Proc Natl Acad Sci U S A 2002, 99 (22):14422-7; Fukuda et al., *Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate*. Nature 2011, 469, 543-547; and Whorwell et al., *Efficacy of an encapsulated probiotic Bifidobacterium infantis 35624 in women with irritable bowel syndrome*. American Journal of Gastroenterology 2006, Jul;101(7):1581-90

【0029】

を参照。これらの全内容は参照により本発明に組み込まれる）。いくつかの態様によれば、用いられるビフィズス菌株の例としては、これに制限されないが、ビフィドバクテリウム・ロングム（*B. longum*）株JCM7007、JCM7009、JCM7010、JCM7011、JCM1210、JCM1260、JCM1272、JCM11347、およびATCC15708、ならびにビフィドバクテリウム・インファンティス（*B. infantis*）株ATCC15697などが挙げられる。本発明の態様によれば、用いられる追加のプロバイオティクスとしては、これに制限されないが、バチルス・コアグランス（*Bacillus coagulans*）、ラクトバチルス・アシドフィルス（*Lactobacillus acidophilus*）、ラクトバチルス・パラカゼイ（*Lactobacillus paracasei*）、ラクトバチルス・ジョンソニイ（*Lactobacillus johnsonii*）、ラクトバチルス・プランタム（*Lactobacillus plantarum*）、ラクトバチルス・ロイテリ（*Lactobacillus reuteri*）、サッカロミセス・ブラウディ（*Saccharomyces boulardii*）、ラクトバチルス・ラムノサス（*Lactobacillus rhamnosus*）、およびラクトバチルス・プランタム（*Lactobacillus plantarum*）が挙げられる。

【0030】

いくつかの形態では、組成物は、たとえば、本明細書で述べられるプロバイオティクス細菌のひとつの種類または株のように、ひとつのプロバイオティクスのみを含む。他の形態においては、組成物は、たとえば、本明細書で述べられるまたは当業者に公知の2以上のプロバイオティクス株または種類のように、多数のプロバイオティクスを含む。

## 【0031】

いくつかの形態においては、プロバイオティクスは、生きた微生物の形態で組成物に含まれる。いくつかの形態においては、プロバイオティクスは、活発に成長しているおよび／または分裂している微生物の形態で組成物に含まれる。いくつかの形態においては、プロバイオティクスは、孢子や芽胞のような休眠の形態（dormant form）で組成物に含まれる。

## 【0032】

有用な細菌の成長を促進するためのプレバイオティクス組成物の使用方法

あらゆる本発明の組成物のプレバイオティクス活動が提供され、このような組成物は、インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、1以上の有用な細菌の成長および／または活動を促進するために用いられうる。このような組成物はまた、インビトロまたはインビボにおいて、1以上の病原菌の成長および／または活動を抑制するために用いられうる。

10

## 【0033】

いくつかの形態において、本発明の方法は、有用微生物叢の増殖を増加させるために、本発明のプレバイオティクス組成物の有効量を、有用微生物叢（たとえば、ビフィズス菌の個体群）に接触させることを含む。接触させる工程は、たとえば培養皿のようなインビトロで実施されうる。または、この工程は、たとえば治療を必要とする対象に投与するように、インビボで実施されうる。

## 【0034】

20

本明細書中、微生物叢または微生物との関連（たとえば、ビフィズス菌のような有益な腸の微生物との関連）で用いられる「～の増殖を増加させる」との語は、それぞれの微生物叢または微生物の細胞増殖および／または細胞生存の速度を増加させることを意味する。たとえば、微生物の増殖が増加させるプレバイオティクス組成物は、微生物の個体群と接触させた際に、組成物の非存在下での速度と比較して、少なくとも20%、40%、60%、80%、1倍、2倍、5倍、10倍、50倍、100倍、または200倍で、微生物間の細胞分裂速度および／または生存率の増加を伴う組成物であってよい。

## 【0035】

同様に、本明細書中、たとえば、腸の病原性細菌のような病原微生物との関連で用いられる「～の増殖を減少させる」または「～の成長を抑制する」との語は、それぞれの微生物の細胞増殖速度および／または細胞生存の速度を減少させることを意味する。たとえば、有用微生物の増殖を増加させるプレバイオティクス組成物は、組成物の非存在下での速度と比較して、少なくとも20%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%の程度に、病原微生物の増殖を減少させる組成物であってよい。組成物自体が、病原微生物への直接的な抗増殖効果に作用してもよい。または、抗増殖効果は組成物の二次的影響であってよい。二次的影響の例としては、有益な腸微生物叢による組成物の摂取および代謝が、病原微生物の成長および増殖には好ましくない腸微環境に変化するといったことが挙げられる。たとえば、いくつかの実施形態において、有益な腸微生物叢による（たとえば、ビフィズス菌による）本発明のプレバイオティクス組成物の摂取および代謝が、微生物叢の微環境のpHを、ある病原菌の増殖および／または生存に好ましくない酸性pHの方へ変動させる結果となる。

30

40

## 【0036】

ひとつの例として、プレバイオティクス組成物は、それを必要とする対象に対して、対象の腸内の有用微生物の増殖を増加させるのに有効な量の少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約1倍、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、または少なくとも約5倍の量で投与される。組成物の量は、たとえばビフィズス菌、ラクトバチルス、バクテロイデス・フラギリス、バクテロイデス・テタイオタオミクロン、エンテロコッカス・フェカーリス（エンテロコッカス・フェカーリスのプロバイオティクス株）、表皮ブドウ球菌、エンテロバクター・アエロゲネス、またはエンテロバクター・クロアカエの個体群のような1以上の有用な細菌の成長および／または活動を促進さ

50

せるのに有効でありうる。いくつかの形態において、ビフィズス菌の個体群は、ビフィドバクテリウム・ロングム(B. longum)(たとえば、ビフィドバクテリウム・ロングム B. longum JCM7007、JCM7009、JCM7010、JCM7011、JCM1210、JCM1260、JCM1272、JCM11347、または ATCC15708)、ビフィドバクテリウム・インファンティス(B. infantis)(たとえば、ビフィドバクテリウム・インファンティス(B. infantis) ATCC15697)、またはそれらの混合物である。

【0037】

または、プレバイオティクス組成物は、病原菌(たとえば、大腸菌またはウェルシュ菌)の増殖速度を減少させるのに有効な量を対象に投与しうる。いくつかの実施形態において、プレバイオティクス組成物は、病原菌の増殖速度を少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の程度に減少させるのに有効な量を対象に投与する。

10

【0038】

本発明の方法は、対象の有用微生物の増殖を、たとえば検便により、モニターすることをさらに含む。対象の腸の中の微生物叢をモニターする方法および特定の有用微生物の増殖を評価する方法は当業者には公知であり、非制限的な例としては、

【0039】

20

【化2】

Moro et al, *Dosage-related bifidogenic effects of Galacto- and fructooligosaccharides in formula fed term infants*. Journal of pediatric Gastroenterology and Nutrition34:291-295 2002, and Campbell et al., *Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats*. J. Nutr 127:130-136 1997

【0040】

に記載されており、これらの全体の内容は、参照により本発明に組み込まれる。本発明のいくつかの態様によれば、対象の微生物叢に対するプレバイオティクス組成物の効果をモニターするさらに好適な方法は、当業者には公知または明らかであり、本発明はこの点において限定されない。

30

【0041】

さらに他の例としては、本発明のプレバイオティクス組成物は、ビフィズス菌の微環境のpHを低下させるのに有効な量を対象に投与される。微環境は、たとえば対象の腸またはその部分のように、小さいまたは相対的に小さい生育地または環境でありうる。微環境は、少なくとも部分的に、たとえば、物的障壁により周囲の環境から分離されうる。いくつかの形態において、微環境は、細菌性細胞または細胞集団、およびそのすぐ周辺を包含し、それらは、細菌性細胞もしくは細胞の存在、または細胞の代謝により、すぐに影響を与えうる。

【0042】

40

たとえば、対象の腸の基質(intestinal substrate)内における有用な腸の微生物、病原菌の増殖速度、および微環境のpHを測定する方法は当業者には公知である。このような方法は、一般的には、腸の微生物叢、またはプレバイオティクス組成物の制限が開始され、腸の微生物叢をモニターする前の対象の腸の生育環境、もしくはプレバイオティクス組成物の投与の間および/もしくは後の対象の腸の生育環境を評価することを含む。いくつかのこのような方法は本明細書に開示されており、さらなる方法は当業者には明らかであろう。いくつかの例示的な開示は、非制限的な方法としては、たとえば、

【0043】

## 【化 3】

Moro et al, Dosage-related bifidogenic effects of Galacto- and fructooligosaccharides in formula fed term infants. *Journal of pediatric Gastroenterology and Nutrition*34:291-295 2002, and Campbell et al., Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J. Nutr* 127:130-136 1997

## 【0044】

を参照；これらの全体の内容は、参照により本発明に組み込まれる。本発明はこの点において制限されないことは明らかであろう。

## 【0045】

他の例において、プレバイオティクス組成物は、対象の腸における有用微生物の（たとえば、ビフィズス菌の）個体数（abundance）が、対象の投与の開始時の有用微生物の個体数と比較して、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、または少なくとも1000倍増加するのに有効な量で対象に投与される。このような治療は、所望の結果に達するまでの適当な期間の間持続しうる。治療の前に、対象は、彼または彼女の腸において、有用微生物が検出可能レベルではない。対象は、対象の腸に有用微生物がコロニー形成するための十分な量と時間で、好ましくは少なくともひとつのプロバイオティクスを含むプレバイオティクス組成物を投与されうる。

## 【0046】

さらに他の例としては、プレバイオティクス組成物は、対象の腸内の病原性微生物（たとえば、ウェルシュ菌のような腸内病原菌）の個体数が、投与の開始時の病原性微生物の個体数と比較して、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、または少なくとも1000倍減少させるのに有効な量および期間で、対象に投与される。対象は、治療後、病原性微生物の個体数が検出不可能なレベルになるような組成物の有効な量と適当な期間で治療されうる。

## 【0047】

本発明の治療を必要とする対象は、腸内における有用微生物の不足、または病原菌の存在もしくは過多に関連した疾患を有している疑いのある、前記疾患の危険性のある、または前記疾患で苦しんでいる対象でありうる。このような対象は、対象の腸内の有用微生物の不足、または病原菌の存在もしくは過多を示す臨床症状を示していてもよい。または、対象は、対象の腸内の有用微生物の不足、または病原菌の存在もしくは過多に関連した疾患にかかる危険性を有していてもよい。たとえば、いくつかの実施形態において、対象は、そのような疾患の履歴を有する対象である。有用微生物の不足、または病原菌の存在もしくは過多、および/または腸内の微生物叢における有用な細菌は、治療が必要かどうかを決定するために、候補対象を調べることができる。

## 【0048】

対象は、過敏性腸症候群または炎症性大腸炎のような消化性疾患を有している疑いのある、前記疾患の危険性のある、または前記疾患で苦しんでいる対象でありうる。

## 【0049】

本明細書中、「対象」との語は、たとえば、霊長類、ヒト以外の霊長類、ヒト、犬、猫、羊、ヤギ、畜牛、馬、豚、マウス、ラット、モルモット、家畜、野生動物、または実験動物などの哺乳類を意味する。いくつかの例において、対象は、新生児のような幼児である。他の例において、対象は若者または成人である。他の開発段階、たとえば、出生前または周産期段階は、またいくつかの形態に含まれる。

## 【0050】

疾患を有している疑いのある、または疾患の危険性のある対象とは、平均危険水準である疑いのある平均値（average level of suspicion for average risk level）と比較して、疾患の存在を疑う上昇値（elevated level）、または疾患にかかっている危険性の上

10

20

30

40

50

昇値を有する対象を意味する。たとえば、特定の疾患の臨床症状が現れている対象は、たとえ他覚的な臨床診断がなかったとしても疾患の存在を疑う上昇値 (elevated level of suspicion) を有する。他の例において、対象は、たとえば、対象の遺伝子構造のために、または環境の病原体にさらされるために、またはダイエットもしくは他の行動習慣などの行動リスク因子の存在のために、特定の疾患にかかりやすくなっているかもしれない。

#### 【0051】

本発明の方法はプレバイオティクス組成物の投与を開始する前の対象の腸内の微生物叢を評価することをさらに含む。その代わりとして、またはさらに加えて、当該方法は、プレバイオティクス組成物の投与している間および/またはその後において、対象の腸内の微生物叢をモニターすることを含む。投与が開始された後1週間、2週間、3週間または約1カ月のようなだいたいの適当な期間の後に対象を調べて、たとえばビフィズス菌のような有用微生物の増殖が増加しない場合、プレバイオティクス組成物の用量は増加される。たとえば、有用微生物の増殖が増加するなどの対象の腸内の微生物叢に有用な変化がみられる場合、プレバイオティクス組成物の用量を減少させたり、投与を段階的に減らしたりしてもよい。

#### 【0052】

いくつかの形態において、本発明のプレバイオティクス組成物は、過敏性腸症候群もしくは炎症性大腸炎のような対象の疾患または不調、または対象の腸内の病原微生物の存在もしくは過多に関連した疾患（たとえば、下痢、胃腸感染症、壊死性腸炎、クローン病または憩室炎）を治療するために対象に投与される。本明細書中、「治療する」との語は、本明細書で述べる疾患、疾患の兆候、または疾患になる傾向を、治療、治癒、軽減、緩和、変更、救済、改善、改良、または影響を目的として、本明細書で述べる疾患、疾患の兆候、または疾患になる傾向のいずれかを有する対象への1以上の活性薬剤を含む組成物の適用または投与を意味する。

#### 【0053】

たとえば、いくつかの形態において、本発明のプレバイオティクス組成物は、過敏性腸症候群または炎症性大腸炎の少なくともひとつの臨床的に表れている兆候が存在している対象、および腸内でウェルシュ菌のような病原菌が過多となっている対象を治療する。いくつかの形態において、検便は、プレバイオティクス組成物を用いる治療の開始時に実施され、次の検便は治療の1週間後および4週間後に実施され、病原菌の細胞数は、試験開始時に観測されたものと比較され、治療スケジュールの効果をモニターする。1週間後にウェルシュ菌の菌数の顕著な減少がみられない場合、プレバイオティクス組成物の用量が増加される。

#### 【0054】

本発明の方法は、たとえば、抗生物質による治療のような他の治療を受けたことのあるまたは受けている対象にも適用しうる。いくつかの形態において、プレバイオティクス組成物の投与は、抗生物質による治療スケジュールが終了した後すぐに開始される。他の形態においては、プレバイオティクス組成物の投与は、抗生物質による治療スケジュールが終了した後、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約1週間、約2週間、約3週間、または約1カ月で開始される。いくつかの形態において、プレバイオティクス組成物は、抗生物質による治療と同時に対象に投与される。いくつかの形態では、投与は、抗生物質による治療の終了後も継続される。

#### 【0055】

いくつかの形態において、本発明で提供されるプレバイオティクス組成物を必要とする対象または腸の微生物叢のコロニー形成の段階である対象に投与される方法が提供される。たとえば生きたビフィズス菌個体群などのプロバイオティクスを含むプレバイオティクス組成物は、新生児を含むそのような対象、および経口での抗生物質の治療のような対象の微生物叢の不均衡が作られる、またはほとんどすべての対象の微生物叢が全滅させられる治療を受けている対象に投与されるのが特に好ましい。

#### 【0056】

#### 調製、投与の経路、および用量

本発明のプレバイオティクス組成物は当業者に公知の適当ないずれかの形態で調製され、投与されてよい。腸の投与においては、本発明のプレバイオティクス組成物は、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、溶液、デポジトリ（depositories）、ゲルおよび注射のような固体、半固体、ゲル、または液体の形態の製剤に調製されてもよい。経口投与に適した組成物は、それぞれが所定量の活性薬剤を含むカプセル、錠剤、トローチ剤のような不連続単位であってよい。他の組成物としては、シロップ、エリキシル剤、ゲル、またはエマルションのような水溶液または非水溶液の懸濁液を含む。

#### 【0057】

いくつかの形態において、本発明の組成物は、たとえば、粉末、粉末化飲料、液体、カプセル、またはピルの形態で経口的に、経腸経路を経由して対象に投与される。いくつかの形態においては、プレバイオティクス組成物は対象者に単回投与され、他の形態においては一定期間において複数回投与される。たとえば、いくつかの形態において、本発明のプレバイオティクス組成物は、1日に1、2、3、4、または5回（dose）投与され、好ましくは1日に1投薬である。いくつかの形態において、投与は約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約1カ月、約5週間、約6週間、約2カ月、約3カ月、約4カ月、約5カ月、約6カ月、または約1年の期間、継続される。いくつかの形態において、投与は、対象の臨床症状が軽減するまで継続される。いくつかの形態において、投与は、対象の腸内微生物叢内に、たとえばビフィズス菌のような有用微生物が検出されるまで、または対象の腸内微生物叢の有用微生物の細胞数の増加が見られるまで継続される。

10

20

#### 【0058】

いくつかの形態において、本発明のプレバイオティクス組成物の異なる成分は、たとえば、経口などの同じ経路で投与され、他の形態においては、プレバイオティクス組成物の異なる成分は異なる経路で投与されてもよいことは理解されるであろう。たとえば、いくつかの形態において、プレバイオティクスオリゴ糖は、ひとつの経腸を経路して投与され、一方ではプロバイオティクスは異なる経腸経路で投与されてもよい。いくつかの形態において、本発明で提供される組成物は、粉末、顆粒、ペレット、ピルの形態または結晶形態の1以上の成分を含む固体状態の組成物として調製される。いくつかの形態において、このような固体状態の組成物は、2以上の固体形態のオリゴ糖の混合物を含む。経口投与に適した組成物は、それぞれが所定量の活性薬剤を含むカプセル、錠剤、トローチ剤のような不連続単位であってよい。他の組成物としては、シロップ、エリキシル剤、ゲル、またはエマルションのような水溶液または非水溶液の懸濁液を含む。

30

40

#### 【0059】

経口投与としては、薬剤は、公知の製剤上許容されるキャリアと組み合わせて容易に調製されうる。このようなキャリアは、本発明の薬剤において、治療される対象による経口摂取のための錠剤、ピル、ドラジェ、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとしての調製を可能にする。経口用途の医薬品（Pharmaceutical preparation）は、固体賦形剤として得ることができ、必要であれば錠剤またはドラジェの核を得るために、任意で、最終混合物をすりつぶしたり、適当な助剤を添加した後に顆粒混合物を加工したりする。好適な賦形剤としては、特に、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む糖類などの充填剤；たとえば、トウモロコシでんぷん、小麦でんぷん、米でんぷん、じゃがいもでんぷん、ゼラチン、トラガカント・ゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および/またはポリビニルピロリジン（PVP）などのセルロース調製物などが挙げられる。所望であれば、崩壊剤を添加してもよく、架橋ポリビニルピロリジン、寒天、もしくはアルギン酸またはそれらの塩（たとえばアルギン酸ナトリウム）などが挙げられる。任意により、経口組成は、内部の酸条件を中和するために生理食塩水または緩衝剤中で調製されてもよく、またはいずれのキャリアを用いずに投与されてもよい。

#### 【0060】

ドラジェの核は、好適なコーティングとともに提供される。この目的において、濃縮さ

50

れた糖類溶液が用いられてもよく、任意により、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリジン、カーボポールゲル、ポリエチレングリコール、および／または二酸化チタン、ラッカー溶液、および好適な有機溶媒または溶媒混合物を含んでいてもよい。染料または顔料が、識別のため、または活性化化合物投薬 (dose) の異なる組み合わせを特徴づけるために、錠剤またはドラジェコーティングに添加されてもよい。

#### 【0061】

経口で用いられうる医薬品は、ゼラチンから作られる押し込み型のカプセル (push fit capsule) を含み、ゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤で作られた密封されたソフトカプセルもまた含まれる。押し込み型カプセルは、ラクトースのような充填剤、でんぷんのようなバインダー、および／またはタルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ならびに任意により安定化剤との混合物での活性成分を含む。ソフトカプセルにおいては、活性化化合物は、脂肪酸油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの適当な液体に溶解または懸濁されていてもよい。さらに、安定化剤が添加されてもよい。経口投与のために調製されたマイクロスフィアが用いられてもよい。このようなマイクロスフィアは、当業者によく知られている。経口投与のためのすべての組成物は、そのような投与に適した用量にすべきである。

10

#### 【0062】

いくつかの形態において、たとえば、2以上のプレバイオティクスオリゴ糖またはプレバイオティクスオリゴ糖およびプロバイオティクスなどの2以上の成分を含む本発明のプレバイオティクス組成物は、たとえばすべてのオリゴ糖および／またはプロバイオティクスの混合物、たとえば固体、液体、粉末、ゲルの形態または本明細書で述べる他の形態として、すべての成分の組み合わせ、または混合物として調製されてよい。いくつかの形態において、2以上のプレバイオティクスオリゴ糖を含むプレバイオティクス組成物は、個々の薬剤もしくは化合物として別々に、またはサブコンビネーションおよびさらに追加化合物の混合物として別々に、調製および／または投与されてもよい。本発明の組成物のプレバイオティクス剤は、同時に、同時期に (contemporaneously)、または治療の間に投与されてもよいことは明らかであろう。したがって、いくつかの形態においては、2以上のプレバイオティクスオリゴ糖を組み合わせた本発明の製剤は、本明細書で述べられる治療において、同時、単独 (separate)、または逐次 (sequential) 用途として提供されてもよい。

20

30

#### 【0063】

いくつかの形態において、たとえば、本発明のプレバイオティクスオリゴ糖および／またはプロバイオティクスの一定比率は、たとえば、すべてのオリゴ糖およびプロバイオティクスを含む固体または液体組成物中において、もしあるならば特定比率で投与され、または個々のオリゴ糖および／またはプロバイオティクスを組み合わせることによってある比率へとなる。比率は、たとえば特定のプレバイオティクスもしくはプロバイオティクス剤、またはそれらの混合物の重量、体積、および／または生物活性を基準とすることができる。

#### 【0064】

本発明のいくつかの態様は、本明細書で述べられるプレバイオティクスおよび／またはプロバイオティクス剤を含む医薬組成物を提供する。本発明のいくつかの態様によれば、医薬組成物は、固体形態、または製剤上許容されるキャリアに溶解もしくは分散された形態のいずれかで、本明細書で述べられるプレバイオティクスおよび／またはプロバイオティクス剤の有効量を含む。好ましくは、医薬組成物は殺菌され、またはプロバイオティクスが含まれる場合、病原性微生物または炎症原因薬剤のない分離されたプロバイオティクスの個体群を含む。「製薬上または薬理的に許容される」との語は、たとえば必要に応じてヒトなどの動物に投与された場合、不都合な、反対のまたは他の有害反応を一般的に生じない分子そのものおよび組成を意味する。さらに、動物 (たとえば、ヒト) 投与において、製剤は、FDA 生物学的基準 (FDA Office of Biological Standards) から要求される無菌状態、発熱性、一般的安全性および純度基準を満たす必要があることは理解され

40

50



るであろう。

【0065】

この点において「製剤上許容される塩」との語は、本発明の薬剤の相対的に非毒性の、無機または有機酸付加塩を意味する。これらの塩は製造工程で投薬賦形剤 (administration vehicle) または投薬形態の系内で、または別々に、本発明の精製されたプレバイオティクス剤と適当な有機または無機酸とを反応させ、続いて精製により生成した塩を分離して調製されうる。代表的な塩としては、臭素、塩素、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、ホスホン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、トシレート、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチレート (naphthylate)、メシレート (mesylate)、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、およびラウリルスルホン酸塩等が挙げられる。Berge et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照。

10

【0066】

他の場合において、本発明の薬剤は、1以上の酸性機能基を含んでもよく、したがって、製剤上許容される塩を製剤上許容される塩基と形成することができる。これらの例における「製剤上許容される塩」とは、相対的に非毒性の、本発明の薬剤の無機および/または有機塩基付加塩を意味する。これらの塩は、同様に、製造工程で投薬賦形剤または投薬形態の系内で、または別々に、遊離酸形態である精製された化合物 (たとえば、製剤上許容される金属カチオンの水酸化物、カルボン酸塩もしくは重炭酸塩) と適当な塩基 (たとえば、アンモニア、または製剤上許容される有機第1級、第2級もしくは第3級アミン) とを反応させて調製されうる。たとえば、と、との反応が例示される。代表的なアルカリまたはアルカリ土類塩としては、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、およびアルミニウム塩等が挙げられる。塩基付加塩の形成に用いられる代表的な有機アミンとしては、エチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジン等が挙げられる。Berge et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照。

20

【0067】

プレバイオティクス組成物が液体形態の場合の実施形態において、キャリアは、これに制限されないが、たとえば、水、エタノール、ポリオール (たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど)、脂質 (たとえば、トリグリセライド、植物油、リポソーム) およびそれらの組み合わせなどを含む溶媒または分散媒体でありうる。たとえば、レシチンのようなコーティングを用いることで; 液体ポリオールまたは脂質のようなキャリア内での分散により要求される粒子サイズを維持することにより; ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤を用いることにより; またはこれらの組み合わせなどにより、適正な流動性が維持されうる。多くの場合、糖類、塩化ナトリウムまたはこれらの組み合わせなどの等張剤を含むことが望ましい。いくつかの形態においては、本発明の製剤は、製剤上許容される液体溶液中に投与され、これらは、通常、製剤上許容される濃度で、塩、緩衝剤、防腐剤、相溶性キャリア、アジュバント、および任意により他の治療成分を含んでいてもよい。

30

40

【0068】

本明細書で用いられるように、「製剤上許容されるキャリア」とは、あらゆるすべての溶媒、分散媒体、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、防腐剤 (たとえば、抗菌剤、抗真菌剤)、等張剤、吸収遅延剤、塩、保存料、薬剤、薬剤安定化剤、ゲル、バインダー、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、甘味剤、香味剤、染料、そのような材料およびこれらの組み合わせを含み、当業者には公知である (たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences (1990)を参照、これらは参照により本発明に組み込まれる)。標準のキャリアが活性成分と相溶性がない範囲を除外して、治療的または医薬的組成物の使用が期待される。組成物は固体、液体またはエアロゾル形態のどの形態で投与されるか、および滅菌が必要かどうかによって異なる種類のキャリアを含ん

50

でいてもよい。

【 0 0 6 9 】

ある形態において、医薬組成物は、たとえば、プレバイオティクスおよび／またはプロバイオティクス化合物、またはそのような化合物の混合物を少なくとも約 0 . 1 % 含んでいてもよい。他の形態においては、プレバイオティクスおよび／またはプロバイオティクス化合物、またはそのような化合物の混合物は、組成物の重量／重量または重量／体積換算で、約 2 % から約 7 5 % の間、約 2 5 % から約 6 0 % の間で、または組成物の 9 9 % まですべて含んでいてもよく、たとえばこの中から導き出せるあらゆる範囲において含んでいてもよい。

【 0 0 7 0 】

本発明のプレバイオティクス剤は、種々の方法で誘導体化されてもよい。本明細書で用いられ提供される薬剤の「誘導体」とは、塩（たとえば、製剤上許容される塩）、錯体、生体内での加水分解エステルのようなエステル、遊離の酸または塩基、化合物の多様な形態、溶媒和物（たとえば水和物）、プロドラッグ、カップリング剤（coupling partner）および保護基を含む。「プロドラッグ」とは、たとえば、胃の環境を通過することなどにより、生体内で生物活性化合物に変換される化合物を意味する。

【 0 0 7 1 】

いくつかの形態において、プレバイオティクス組成物は、1 以上の成分の抑制酸化のために抗酸化剤を含んでいてもよい。さらに、望ましくない微生物の活動が、抗菌剤および抗真菌剤のような防腐剤により制御または抑制されうる。防腐剤としては、たとえば、これに制限されないが、パラベン（たとえば、メチルパラベン、プロピルパラベン）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルまたはこれらの組み合わせなどが挙げられる。

【 0 0 7 2 】

製剤上許容されるキャリアは、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定化剤、溶解剤および当業者には公知の他の物質を含む。特にペプチドの製剤上許容されるキャリアとしての例は、米国特許第 5 , 2 1 1 , 6 5 7 号に記載されている。このような製剤は、通常、塩、緩衝剤、防腐剤、相溶性キャリア、および任意により他の治療剤を含んでいてもよい。薬物に用いられる場合、塩は製剤上許容されるものである必要があるが、製剤上許容されない塩を、それらの製剤上許容される塩を調製するために好ましく用いられてもよく、本発明の範囲から除外されない。このような薬理学的および製剤上許容される塩は、これに制限されないが、以下の酸から調製されるものを含む。塩酸（hydrochloric）、塩化臭素酸（hydrobromic）、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸など。また、製剤上許容される塩は、ナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩のようなアルカリまたはアルカリ土類塩として調製されうる。

【 0 0 7 3 】

本発明で用いられる治療製剤は、所望の程度の純度を有する薬剤と任意の製剤上許容されるキャリア、賦形剤または安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）とを混合したものを凍結乾燥組成物または水溶液の形態で保存して調製してもよい。許容されるキャリア、賦形剤、または安定化剤は、適用される用量および濃度で受容者に非毒性であり、リン酸、クエン酸および他の有機酸；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンザルコニウムクロライド、ベンセトニウムクロライド；フェノール、ブチルもしくはベンチルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンのようなアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3 - プロパノール；および m - クレゾール）；低分子量（約 1 0 残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン酸、アルギニン酸、もしくはリシンのようなアミノ酸；グルコース、マンノース、ま

10

20

30

40

50

たはデキストリンを含む単糖類、二糖類および他の糖質；EDTAのようなキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールのような糖類；ナトリウムのような塩形成対イオン；金属錯体（たとえば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに／またはTWEEN（登録商標）、PLURONICS（登録商標）もしくはポリエチレングリコール（PEG）のような非イオン性界面活性剤を含む。

#### 【0074】

プレバイオティクスオリゴ糖、プロバイオティクス、および本発明の組成物の用量は、特定の臨床状況に依存するであろう。実際の用量に影響する因子としては、たとえば臨床シナリオ、たとえば、対象において診断された疾患の種類および疾患の段階、年齢、体重、性別および対象の全般的な健康状態などが挙げられる。一般的なガイドラインでは、本発明のプレバイオティクス組成物は、0.1 - 1000 mg（活性成分の全量）/ kg（対象の体重）/ 日の範囲内で投与されてもよい。いくつかの形態において、プレバイオティクス組成物は、5 - 20 mg / kg / dayの範囲内であってもよい。いくつかの形態において、プレバイオティクス組成物は、約5 mg / kg / dayの用量で投与されてもよい。いくつかの形態において、プレバイオティクス組成物は、約10 mg / kg / dayの用量で投与されてもよい。いくつかの形態において、プレバイオティクス組成物は、約20 mg / kg / dayの用量で投与されてもよい。

10

#### 【0075】

投与されるプレバイオティクス組成物の絶対量は、併用治療、投薬の回数、治療スケジュールの長さ、ならびに年齢、身体状態、健康、サイズおよび体重を含む個々の患者のパラメーターを含むさまざまな因子に依存するであろう。これらは当業者には公知の因子であり、単なる日常の実験で適当な用量または用量範囲を決定し、評価され用いられる因子である。いくつかの形態において、医学的判断に聞くとこよれば、用いられた最大の投薬が、すなわち最も高い安全性、非毒性の投薬であるのが好ましい。いくつかの形態において、対象の重大な副反応に関連しないもっとも量のある投薬（the highest dose）を用いることが好ましい。いくつかの形態において、たとえば、腸内の微環境の酸性化、腸内の病原微生物の個体数の減少、腸内の有益な微生物叢の個体数の増加、および／または腸内の病原微生物の存在に関連した兆候の軽減などの所望の臨床結果を提供する最少の投薬を使うことが好ましい。

20

#### 【0076】

本発明のプレバイオティクス組成物の多数回の投薬はまた、いくつかの形態において期待される。いくつかの例では、本発明のプレバイオティクス組成物は他の薬剤、たとえば、腸内の病原微生物の成長を抑制する薬剤とともに投与される。いくつかのこのような形態においては、プレバイオティクス組成物もしくは他の薬剤のどちらかの副治療用量（sub-therapeutic dosage）、または両者の副治療用量としては、腸内における病原菌の存在もしくは過多に関連した疾患もしくは不調を有している、またはその疾患もしくは不調にかかる危険性のある対象の治療において用いられる。本明細書中、「副治療用量」とは、他の薬剤または薬剤の非存在下で投与された場合、対象に治療結果をもたらすであろう用量未満の用量を意味する。よって、薬剤の副治療用量は、本発明の薬剤の投与がない状態で、対象の所望の治療効果をもたらさないものである。臨床用途における多数の薬剤の治療用量は製薬分野では公知であり、追加の治療用量は、過度の実験なしで当業者により決定されうる。治療用量は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., 1990のような参考文献；ならびに疾患および不調の治療のためのガイダンスとして医療専門家により信頼される他の多くの医学参考文献に広く記載されている。

30

40

#### 【0077】

いくつかの形態において、本発明で提供するプレバイオティクス組成物は、たとえば、対象の腸内の病原菌の存在または過多により、腸内の微生物叢の不均衡に関連した症状を経験している、またはその兆候の経験の疑いのある対象に投与される。いくつかの形態において、活性なプレバイオティクスおよび／もしくはプロバイオティクス剤、または本発

50

明で提供される組成物は、対象の経験している少なくともひとつの臨床症状を抑制、減少、または軽減するのに十分な量で投与される。

【0078】

持続放出の方法としては、本明細書に述べる方法が適用されてもよい。いくつかのこのような方法は組成物からの薬剤の持続放出に影響するポリマーを用いる。非生分解性および生分解性ポリマーのどちらも本発明のプロバイオティクス組成物を対象に届けるために用いることができる。このようなポリマーは天然または合成ポリマーであってよい。ポリマーは、一般的には数時間のオーダーで、放出を希望するその時間 (time over) の期間に基づいて選択される。いくつかの形態において、ポリマーは、腸内でゆっくりと崩壊されるのに用いられ、よって、その時間でプロバイオティクス組成物を放出する。ポリマーは、任意に、水中で自重の約90%まで吸収できるハイドロゲルの形態であり、さらに任意で多価イオンまたは他のポリマーと架橋される。生分解性デリバリーシステムを形成するために用いることのできる合成ポリマーの例としては、以下のものを含む；ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキサイド、ポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリ-ビニルハライド、ポリビニルピロリジン、ポリグリコライド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびそれらの共重合体、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、アクリル酸およびメタクリル酸エステルの重合体、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、ヒドロキシ-プロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、セルロースアセテート、セルロースプロピオネート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシエチルセルロース、セルローストリアセテート、セルロース硫酸ナトリウム塩、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート)、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキサイド)、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリビニルアセテート、ポリビニルクロライド、ポリスチレンおよびポリビニルピロリジン。非生分解性ポリマーの例としては、エチレンビニルアセテート、ポリ(メタ)アクリル酸、ポリアミド、それらの共重合体および混合物を含む。生分解性ポリマーの例としては、乳酸およびグリコール酸の重合体、ポリ無水物、ポリ(オルト)エステル、ポリウレタン、ポリ(ブチル酸)、ポリ(吉草酸)、およびポリ(ラクチド-コカプロラクトン)のような合成ポリマー、ならびにアルギン酸およびデキストランおよびセルロース、コラーゲン、それらの化学誘導体(たとえば、アルキル、アルキレン、ヒドロキシ化、酸化および当業者が通常なしえるその他の修飾等の化学基の置換、付加)を含他の多糖類、アルブミンおよび他の親水性タンパク質、ゼインおよび他のプロタミンおよび疎水性タンパク質、それらの共重合体および混合物などの天然ポリマーを含む。一般的には、これらの材料は生体内での酵素加水分解もしくは水への露出、または表面もしくは体積崩壊のどちらかで分解する。

【0079】

疾患または症状の治療のためにプロバイオティクス組成物を対象に投与する数種の方法は本明細書に開示されている。本発明のこのようなそれぞれの態様においては、本発明は、特に、疾患または症状を治療または抑制するために用いられるプロバイオティクス組成物を含み、疾患または症状を治療または抑制するための薬剤を製造するための化合物の使用もまた本発明に含まれることは理解されるであろう。

【0080】

投与の経路、頻度、用量および期間は、対象に確認される症状に依存して変動してもよい。たとえば、本発明の薬剤および組成物の単回投与が対象の重大な症状を減少させ、抑

10

20

30

40

50

制し、または軽減するのに十分であってもよい。それに対して、慢性炎症性大腸炎のような慢性疾患または症状を経験している対象にはある期間にわたっての複数回の投薬が示されてもよい。

#### 【0081】

いくつかの形態において、投与は、たとえば、ある腸内pH、または有益な微生物叢の菌数もしくは存在、または腸内の病原性微生物の消失もしくは数の減少、または臨床症状の軽減もしくは反転(reversal)などの所望の終点に達するまで継続されてよい。他の形態においては、たとえば、予防薬形態において、プレバイオティクス組成物は、特定の時間で投与されてもよく、投与は特定の終点に達せずに終えてもよい。

#### 【0082】

当業者であれば、さらなる労力がなくとも、本明細書に基づき、本発明をその完全な程度まで作製し使用することが可能であると理解される。よって、後述の特定の実施形態は、単なる例示として解釈され、どんなものであれ、あらゆる方法で本開示の残りの部分を制限するものではない。本明細書に記載されたすべての刊行物は、その目的とした参照により、または本明細書に参照された事項により本発明に組み込まれる。

#### 【実施例】

#### 【0083】

材料および方法

インビトロ(in vitro)発酵

糞便の細菌を、Hughesの方法(Hughes SA, S.P., Gibson GR, McCleary BV, Rastall RA, 2008))に従って糖質フリー(carbohydrate-free)の基礎培地で培養した。この培地には1Lあたり以下のものが含まれる:ヘプトン 2g、発酵エキス 2g、NaCl 0.1g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.01g、CaCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 0.01g、NaHCO<sub>3</sub> 2g、ヘミン(haemin)(Sigma-Aldridge) 0.005g、L-システインHCl 0.5g、胆汁塩 0.5g、Tween 80 2mL、ビタミンK 10μL、および4mLの0.025%(w/v)のレザズリン溶液。嫌気性培養法は、プチルゴム隔膜(septa)で密封され、O<sub>2</sub>フリーのCO<sub>2</sub>を用いて嫌氣的に維持されたHungate培養チューブを用いたBryant(Bryant, M.P., 1972)のものであった。

#### 【0084】

新鮮な糞便のサンプルは、その以前の6カ月に抗生物質またはプレ/プロバイオティクスを受けておらず、最近において消化器疾患の履歴のない10人の健康な乳児から集めた。新鮮に得られたヒトの糞便は60秒間ブレンダー内で、滅菌された嫌気性のリン酸緩衝生理食塩溶液中(生理食塩溶液に対して1:10の糞便)で均一化され、二層の滅菌チーズクロスを通して濾過した。1%糞便スラリー中でテストグリカン5g/Lの最終濃度とするために、グリカンを9mL培地中で1時間部分的に溶解させ、続いて10%糞便スラリー1mLを添加した。すべてのチューブは37℃で培養した。48時間後、培養液を分析のために除去した。この時間は、HMOS処理およびネガティブコントロール個体群が、最大の静止期(stationary phase)になる数時間の時間として決定された。すべての実験は3重で実施された。サンプルは分析終了まで-20℃で保存した。

#### 【0085】

糖質フリーの基礎培地ZMB1を、Zhang等の中性オリゴ糖の存在下での細菌株の成長の研究(Zhang G, M.D., Block DE, 2009)に従って準備した。細菌株(表1)は、Japan Collection of Microorganisms(理研バイオリソースセンター、日本)、American Type Culture Collection(Manassas, VA)から入手した。ビフィズス菌およびウェルシュ菌の成長のために強化クロストリジア培地(RCM)が用いられた。大腸菌の成長のためにLBが用いられた。2日間の培養がウェルシュ菌には必要であるのに対して、すべての細菌の種培養を終夜で培養し、600nmでの吸光度(o

10

20

30

40

50

optical density) が 0.5 に達した。すべての細菌が嫌気性チャンバー (DG250 Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific Limited, West Yorkshire, UK) を用いて、37 の嫌気性条件で成長した。2'-FL (2 g/L) (Glycosyn, Inc. USA)、3-FL (2 g/L) (Glycosyn, Inc. USA)、LDFT (1 g/L) (Glycosyn, Inc. USA)、およびそれらの組み合わせまたはHMOSは、単一炭素源として用いられた。すべてのテスト材料は上記の10% (v/v) の細菌培養物との植菌の前に、1時間培地中に溶解させた。処理として、上記テスト材料を含むZMB1を細菌培養物とともに植菌した。コントロールの処理として、基質を含まないZMB1を細菌培養物とともに植菌した。ポジティブコントロールの処理として、FOS (2 g/L) を含むZMB1を細菌培養物とともに植菌した。すべてのチューブは37 で培養された。培養液を48時間で除去した。成長はマイクロタイタープレート中で、吸光度 (OD - 600 nm) により測定された。

10

#### 【0086】

pHおよび乳酸濃度 (lactate level) の決定

細菌発酵の48時間後の培地pHをpHメーター (Corning, pH meter 240, USA) を用いて記録した。培地の乳酸濃度は乳酸分析キット (kit no. K607 - 100; BioVision Inc., CA, USA) を用いて決定した。すべての実験は3重で実施された。

20

#### 【0087】

リアルタイムPCRによる細菌個体群の分析

発酵培地の一部 (2 mL) を12,000 × gで30分間遠心分離した。その後Zhu等 (Zhu, W.Y., Williams, B.A., et al. 2003) の方法に従ってDNAを培地から抽出した。リアルタイムPCRは発酵培養の終了時に存在する細菌DNAを決定するために用いられた。この目的のために、Collado等 (Collado, M.C., S. Delgado, A. Maldonado, and J. M. Rodriguez. 2009) に従って一連のgenus-specific プライマー対 (genus-specific primer pairs) が用いられた (表1)。

30

#### 【0088】

【表 1】

表1 本研究で用いられたオリゴヌクレオチドプライマー

目的とする 細菌種	プライマー	配列 (5'-3')	アニール温度(° C)	参考文献
ビフィス菌	g-Bifid-F	CTCCTGGAACGGGTGG (SEQ ID NO :1)	50	(Matsuki, et al., 2002)
	g-Bifid-R	GGTGTTCCTCCCGATATCTACA (SEQ ID NO:2)		
ウェルシュ菌	Clp-F	ATGCAAGTCGAGCGA(G/T)G (SEQ ID NO:3)	55	(Rinttilä, et al., 2004)
	Clp-R	TATGCGGTATTAATCT(C/T)CCTTT (SEQ ID NO :4)		
大腸菌	UidA784F	GTGTGATATCTACCCGCTTCG (SEQ ID NO :5)	56	(Frahm, et al., 2003)
	UidA866R	AGAACGCTTTGTGGTTAATCAGGA (SEQ ID NO :6)		

10

20

## 【0089】

PCR増幅および検出はCollado等(Collado, M. C., S. D. elgado, A. Maldonado, and J. M. Rodriguez. 2009)の方法に従ってリアルタイムPCR検出システム(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて実施された。それぞれの反応混合物(25 µL)は、iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories)、0.25 µMのそれぞれの特定プライマー1 µLおよびテンプレートDNA 1 µLから構成された。それぞれのサイクルの最終工程で蛍光生成物が検出された。増幅後、目的としたPCR生成物を非目的物であるPCR生成物から識別するために溶解曲線分析(melting curve analysis)を行った。基準曲線は、2~9 Log<sub>10</sub>コロニー形成単位(CFU)間における、それぞれの以下の代表種から選択された純粋培養から抽出された細菌DNAの80倍希釈である：ビフィドバクテリウム・インファンティス(*Bifidobacterium infantis*) S12 ATCC 15697、ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*) ATCC 13124、大腸菌(*Escherichia coli*) H10407 ATCC 35401。

30

## 【0090】

それぞれのオリゴ糖消費量の決定

40

サンプルを凍結融解し、4 で4000 × g、15分間遠心分離した。上澄み液(0.5 mL)を0.25 mLの新鮮な水素化ホウ素ナトリウムの水溶液(0.5 M)で処理した。激しく攪拌した後、還元混合物を4 で終夜、そのままの状態にしておき、その後0.25 mLの酢酸(0.5 M)で処理した。血清用ピペット(5 × 0.5 cm)中に、低い部分から順に、ガラスウール、砂、処理された0.6 g(3 meq)のAG50W-X8カチオン交換樹脂(BioRad)、0.9 g(3 meq)のAG1-X8アニオン交換樹脂(アセテート型、BioRad, Hercules CA)、セライトを詰めた。AG50W-X8カチオン交換樹脂(水素型、BioRad, Hercules CA)は1 Mのピリジンで、1 h × 3回処理して、ピリジン型とした。上記カラムは0.5 mLの水で活性化された後、還元されたサンプル(1 mL)をカラムに適用した。サン

50

ルチューブを水 ( 0 . 5 m L ) で洗浄し、樹脂カラムをさらに 1 8 m L の水で洗浄した。溶出液は中性オリゴ糖であり、凍結乾燥前に、エタノールとドライアイスとで凍結した。サンプル中の中性オリゴ糖を、多孔質グラファイトカラム ( 3 μ m , 1 0 0 × 2 . 1 m m , H y p e r c a r b , T h e r m o S c i e n t i f i c , W a l t h a m , M A ) が備えられたトリプル四重極マススペクトル ( 6 4 6 0 ) を用いて、2 5 でアジレント H P L C ( 1 2 0 0 シリーズ ) で分析した。方法は G l y c o S e p a r a t i o n s ( M o s c o w , R u s s i a ) からの認証済みのオリゴ糖によりバリデーションされたものである ( N e w b u r g , D . S . 2 0 0 1 ) 。

#### 【 0 0 9 1 】

##### 統計分析

データは標準偏差 ( m e a n ± S E M ) で表されている。集団間の統計的に重要な相違は、o n e - w a y A N O V A により決定した。相違が見られた場合、一対比較のためにスチューデントの t 検定を用いた ; P 0 . 0 5 は有意差とみなす。

#### 【 0 0 9 2 】

##### 結果

##### 発酵培養における pH および乳酸の変化

母乳グルカンは、この固有のグルカンを用いるために細菌を選択することにより、コロニー形成に直接作用し、乳酸および短鎖脂肪酸へ発酵した場合、多数の病原体微生物によるコロニー形成を抑制する間に腸内を酸性化することおよびいくつかの細菌の成長を刺激することで、非直接的に作用する。糞便の微生物叢により H M O S が発酵されている場合、発酵培養における pH および乳酸が検出され決定される。図 1 は、H M O S を与えられた集団が、与えられなかったコントロールおよび F O S を与えられたポジティブコントロールよりも顕著に低い pH であることを示す図である ( P < 0 . 0 5 ) 。そして H M O S を与えられた集団の乳酸濃度はコントロールよりも顕著に高い ( P < 0 . 0 5 ) 。

#### 【 0 0 9 3 】

##### 細菌個体群の変化

H M O S の存在が腸内微生物叢の分布を変化させるかどうかを決定するために、微生物の相対量を H M O S および F O S の存在下で調べた。供与糞便サンプルにおける細菌種の相対量は H M O S および F O S の存在下でのリアルタイム P C R により明らかにされた。図 2 は、H M O S が大腸菌およびウェルシュ菌の菌数を減少させているのに対してビフィズス菌の菌数を増加させることを示した。

#### 【 0 0 9 4 】

##### それぞれのオリゴ糖の消費

糞便の細菌種により消費された特定の H M O S 構造を決定するために、発酵後に糞便培養物の上澄み液を回収し、残っている H M O S を精製し、還元し、前述した N e w b u r g ( N e w b u r g , D . S . 2 0 0 1 ) による L C - M A S S により分析した。主な中性オリゴ糖 ( 2 ' - F L , 3 - F L および L D F T を含む ) をモニターした。図 3 。すべての供与糞便微生物叢における 2 ' - F L および L D F T の平均消費量は 9 0 % 以上であったのに対して、3 - F L においては消費量が約 5 3 % であった。これらのデータは、2 ' - F L および L D F T が糞便細菌による代謝を受けることを示している。これに対して、3 - F L は少ない菌数で存在する微生物による異化が見られているため、これらの微生物による異化に対する耐性がより強いように思われる。

#### 【 0 0 9 5 】

##### 異なる細菌株の成長における H M O S およびオリゴ糖の組み合わせによる効果

この研究 ( 下記表 2 参照 ) で用いられた異なるビフィズス菌は、図 4 および図 5 で示された濃度における初期の炭素源 ( p r i m a r y c a r b o n s o u r c e ) として、2 ' - F L , 3 - F L , L D F T 、これらの組み合わせ、3 ' - F L , 6 ' - F L , 3 ' - F L および 6 ' - F L の組み合わせ、ならびにすべてのこれらのフコシルオリゴ糖およびシリアルラクトースの組み合わせを利用することができた。

#### 【 0 0 9 6 】



図4は、すべてのフコシルオリゴ糖、2'-FL、3'-FL、LDF T、およびHMOSが顕著にビフィズス菌spの成長を増加させ、培養におけるpHを低下させることができたことを示している。大腸菌およびウェルシュ菌においては、その成長の増加およびpHの減少について顕著な変化は見られない。その結果、3つの個々のフコシルオリゴ糖の組み合わせは、成長の増加およびpHの低下において累積的な効果を有している。そして、効果は全HMOSと等価である。これらのデータは中性オリゴ糖がこれらのプレバイオティクス微生物による炭素源として用いることができ、病原菌微生物の成長を抑制できることを示している。

【0097】

【表2】

10

表2 本研究で用いられた細菌株

種類	起源
ビフィドバクテリウム・ロングム(Bifidobacterium longum)JCM 7007	ヒト乳児の糞便
ビフィドバクテリウム・ロングム(Bifidobacterium longum)JCM 7009	ヒト乳児の糞便
ビフィドバクテリウム・ロングム(Bifidobacterium longum)JCM 7010	ヒト乳児の糞便
ビフィドバクテリウム・ロングム(Bifidobacterium longum)JCM 7011	ヒト乳児の糞便
ビフィドバクテリウム・ロングム(Bifidobacterium longum)JCM 1210	ヒト乳児の糞便
ビフィドバクテリウム・ロングム(Bifidobacterium longum)JCM 1260	ヒト乳児の糞便
ビフィドバクテリウム・ロングム(Bifidobacterium longum)JCM 1272	ヒト乳児の糞便
ビフィドバクテリウム・ロングム(Bifidobacterium longum)JCM 11347	ヒト乳児の糞便
ビフィドバクテリウム・ロングム(Bifidobacterium longum)ATCC 15708	ヒト乳児の糞便
ビフィドバクテリウム・インファンティス(Bifidobacterium infantis)ATCC 15697	ヒト乳児の糞便
ウェルシュ菌(Clostridium perfringens)ATCC13124	n/a
大腸菌(Escherichia coli)W3110	ヒト糞便

20

30

40

50

【0098】

要するに、中性フコシルオリゴ糖の組み合わせはビフィズス菌の成長を促進し、細菌の微環境のpHを低下させる活動がその個々のひとつよりも大きいことを示している。図4に示されるように、3つのテストされたフコシルオリゴ糖は、成長を促進させる活動、および/またはあるビフィズス菌株のpHを低下させる活動が、母乳からの全オリゴ糖のプレバイオティクス効果と比べて、重量ベースで等しいまたは大きい。これらのオリゴ糖は大腸菌およびウェルシュ菌を刺激せず、ヒトと共生しない。

【0099】

シアリルオリゴ糖は、他の純粋なオリゴ糖と組み合わせて、同様の活動が見られた。3'-SLおよび6'-SLのようなシアリルラクトースは、単独で、いくつかのビフィズス菌株に対してプレバイオティクス効果を示した。驚いたことに、これらの2つのシアリルラクトースとフコシルオリゴ糖との組み合わせ(2'-FL、3'-FL、およびLDF T)は、成長促進およびpH減少における活動のレベルが、全天然HMOS混合物に対して、等しいか大きい。pH減少の活動は、特に、シアリルラクトースを含む混合物において公表されている；それは天然HMOS混合物に対して大きく上回っている。図5。

## 【 0 1 0 0 】

病原菌のパネルおよび微生物叢の他の居住者 ( d e n i z e n ) における個々のオリゴ糖およびそれらの混合物の効果も調べられた。図 6。F O S ( 5 g / L ) がポジティブコントロールとして用いられた。このようにして得られた結果は、いくつかのテストされた細菌株はこれらのオリゴ糖を利用せず、いくつかは F O S を用いて、多くは H M O S およびオリゴ糖の混合物を用いていることが示されている。図 6。この結果は、ある細菌株に対する混合物の効果が、同じ株に対する H M O S の効果よりも高いことを示している。

## 【 0 1 0 1 】

結局、上記研究は、インビトロ発酵を通して、H M O S、フコシルオリゴ糖 ( 2 ' - F L、3 - F L、L D F T、またはそれらの混合物)、シアリルラクトース ( 3 ' - S L、6 ' - S L、またはそれらの混合物)、ならびにフコシルオリゴ糖およびシアリルラクトースの組み合わせを与えられたビフィズス菌の菌数は、コントロールにおける菌数よりも顕著に高くなった。同時に、すべてのテストされたオリゴ糖の組み合わせおよび H M O S は、ビフィズス菌の 1 0 の培養すべてにおいて、顕著に成長を刺激し、p H を低下させた。これらの結果は、H M O S のプレバイオティクス、ビフィズス効果 ( b i f i d o g e n i c e f f e c t ) が構造特定の、異なる個々のミルクの H M O S の組成に依存して変化し、または授乳の経過を通して変化することを示している。母乳で育った幼児のビフィズス菌により増加したコロニー形成は、共生の嫌気性生物に有利に作用し、腸内病原菌によるコロニー形成を抑制することによって、幼児を疾患から保護して、続いて長期間の安定な微生物の生態系の形成を強化するかもしれない。

10

20

## 【 0 1 0 2 】

参考文献

## 【 0 1 0 3 】

## 【化 4 - 1】

Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:979-984.

Bryant MP. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am J Clin Nutr*, 25:1324-1328.

Bullock NR, Booth JC, Gibson GR. 2004. Comparative composition of bacteria in the human intestinal microflora during remission and active ulcerative colitis. *Curr Issues Intest Microbiol*, 5:59-64.

Collado MC, S. Delgado, A. Maldonado, and J. M. Rodríguez. 2009. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol*, 48:523-528.

Frahm E, and U. Obst. 2003. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J Microbiol Methods*, 52:123-131.

German JB, Freeman SL, Lebrilla CB, Mills DA. 2008. Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*, 62:205-218; discussion 218-222.

Greenstein RJ. 2003. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect Dis*, 3:507-514.

Gyorgy P, R. F. Norris, and C. S. Rose. 1954. Bifidus factor. I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Arch Biochem Biophys*, 48:193-201.

Hamosh M, Goldman AS. 1986. Human lactation 2, Maternal and Environmental Factors. *New York (NY): Plenum Press*.

Heavey PM, Rowland IR. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Gastrointestinal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 18:323-336.

Heijnen AM, Brink EJ, Lemmens AG, Beynen AC. 1993. Ileal pH and apparent absorption of magnesium in rats fed on diets containing either lactose or lactulose. *Br J Nutr*, 70:747-756.

Huang P, Farkas T, Marionneau S, Zhong W, Ruvoen-Clouet N, Morrow AL, Altaye M, Pickering LK, Newburg DS, LePendou J, et al. 2003. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J Infect Dis*, 188:19-31.

Hughes SA SP, Gibson GR, McCleary BV, Rastall RA. 2008. In vitro fermentation of oat and barley derived beta-glucans by human faecal microbiota. *FEMS Microbiol Ecol*, 64:482-493.

Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:11070-11075.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444:1022-1023.

LoCascio RG, Desai P, Sela DA, Weimer B, Mills DA. 2010. Broad conservation of milk utilization genes in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* as revealed by comparative genomic hybridization. *Applied and environmental microbiology*, 76:7373-7381.

## 【 0 1 0 4】

## 【化 4 - 2】

LoCascio RG, Ninonuevo MR, Freeman SL, Sela DA, Grimm R, Lebrilla CB, Mills DA, German JB. 2007. Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain glycans secreted in early human lactation. *J Agric Food Chem*, 55:8914-8919.

Macfarlane GT, Macfarlane S. 1997. Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 222:3-9.

Marcobal A, Barboza M, Froehlich JW, Block DE, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. 2010. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58:5334-5340.

Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, Jiang X, Le Pendu J. 2002. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*, 122:1967-1977.

Matsuki T, K. Watanabe, J. Fujimoto, Y. Miyamoto, T. Takada, K. Matsumoto, H. Oyaizu, and R. Tanaka. 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*, 68:5445-5451.

Morrow AL, Meinzen-Derr J, Huang P, Schibler KR, Cahill T, Keddache M, Kallapur SG, Newburg DS, Tabangin M, Warner BB, *et al.* 2011. Fucosyltransferase 2 non-secretor and low secretor status predicts severe outcomes in premature infants. *The Journal of pediatrics*, 158:745-751.

Nanthakumar NN, Dai D, Meng D, Chaudry N, Newburg DS, Walker WA. 2005. Regulation of intestinal ontogeny: effect of glucocorticoids and luminal microbes on galactosyltransferase and trehalase induction in mice. *Glycobiology*, 15:221-232.

Newburg DS. 1996. Oligosaccharides and glycoconjugates in human milk: their role in host defense. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1:271-283.

Newburg DS. 1997. Do the binding properties of oligosaccharides in milk protect human infants from gastrointestinal bacteria? *The Journal of nutrition*, 127:980S-984S.

Newburg DS. 2000. Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J Pediatr Gastr Nutr*, 30 Suppl 2:S8-17.

Newburg DS. 2001. Bioactive components of human milk Kluwer Academic / Plenum Publishers:Waltham.

Newburg DS, Pickering LK, McCluer RH, Cleary TG. 1990a. Fucosylated oligosaccharides of human milk protect suckling mice from heat-stabile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 162:1075-1080.

Newburg DS, Pickering LK, McCluer RH, Cleary TG. 1990b. Fucosylated oligosaccharides of human milk protect suckling mice from heat-stabile enterotoxin of *Escherichia coli*. *The Journal of infectious diseases*, 162:1075-1080.

Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, Meinzen-Derr J, Guerrero Mde L, Morrow AL. 2004. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology*, 14:253-263.

Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. 2005. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annual review of nutrition*, 25:37-58.

## 【 0 1 0 5】

## 【化 4 - 3】

Ohta A, Ohtsuki M, Uehara M, Hosono A, Hirayama M, Adachi T, Hara H. 1998. Dietary fructooligosaccharides prevent postgastrectomy anemia and osteopenia in rats. *The Journal of nutrition*, 128:485-490.

Rinttilä T, A. Kassinen, E. Malinen, L. Krogus, and A. Palva. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol*, 97:1166-1177.

Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B, Newburg DS. 2003. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *The Journal of biological chemistry*, 278:14112-14120.

Videla S, Vilaseca J, Guarner F, Salas A, Treserra F, Crespo E, Antolin M, Malagelada JR. 1994. Role of intestinal microflora in chronic inflammation and ulceration of the rat colon. *Gut*, 35:1090-1097.

Ward RE, M. Ninonuevo, D. A. Mills, C. B. Lebrilla, and J. Bruce German. 2006. In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl Environ Microbiol*, 72:4497-4499.

Ward RE, Ninonuevo M, Mills DA, Lebrilla CB, German JB. 2006. In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Applied and environmental microbiology*, 72:4497-4499.

Yolken RH, Peterson JA, Vonderfecht SL, Fouts ET, Midthun K, Newburg DS. 1992. Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *The Journal of clinical investigation*, 90:1984-1991.

Zhang G MD, Block DE. 2009. Development of chemically defined media supporting high-cell-density growth of lactococci, enterococci, and streptococci. *Appl Environ Microbiol.*, 75:1080-1087.

Zhu WY, Williams BA, Konstantinov SR, Tamminga S, De Vos WM, Akkermans AD. 2003. Analysis of 16S rDNA reveals bacterial shift during in vitro fermentation of fermentable carbohydrate using piglet faeces as inoculum. *Anaerobe*, 9:175-180.

## 【 0 1 0 6 】

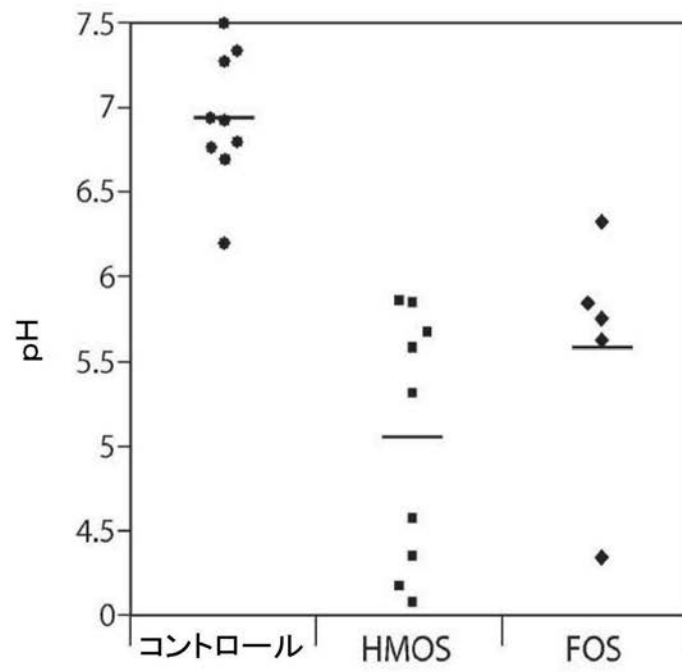
## 他の形態

本明細書に開示されたすべての特徴はあらゆる組み合わせを組み合わせてもよい。本明細書に開示されたそれぞれの特徴は、それに代わる同様の、等価な、または類似の目的で行われる代替の特徴に置き換えられてもよい。よって、特に断らない限り、開示されたそれぞれの特徴は包括的な一連の等価または類似の特徴の単なる例示である。

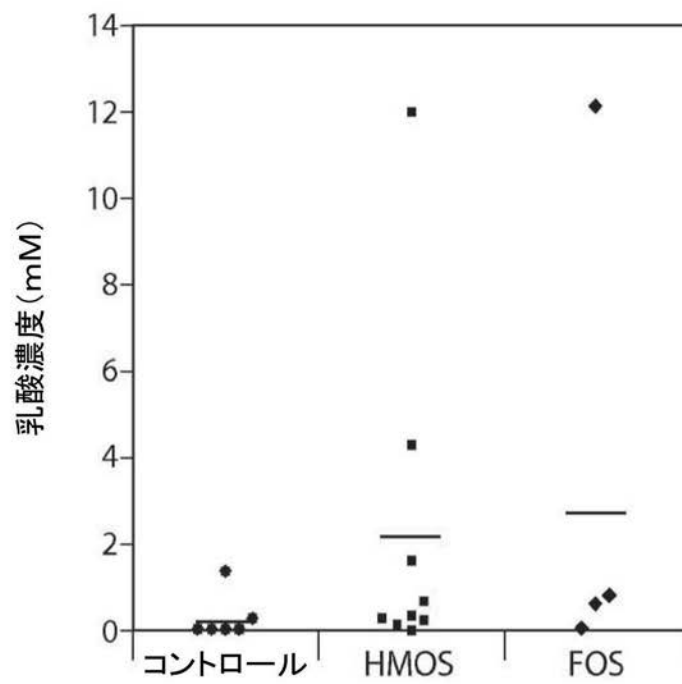
## 【 0 1 0 7 】

上記明細書から、当業者は容易に本発明の本質的な特性を確認することができ、その精神および範囲から離れることなく、本発明にさまざまな変化および修飾を適用し、さまざまな用法および状態とすることができる。したがって、他の形態もまた請求の範囲である。

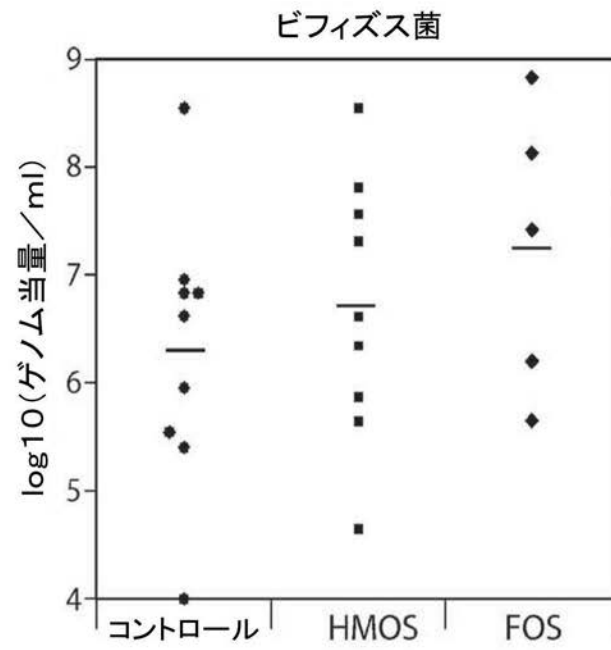
【図 1 A】



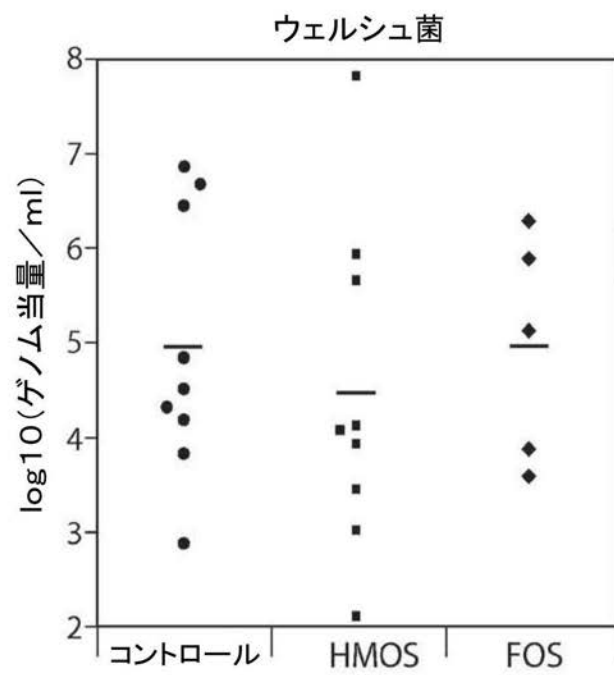
【図 1 B】



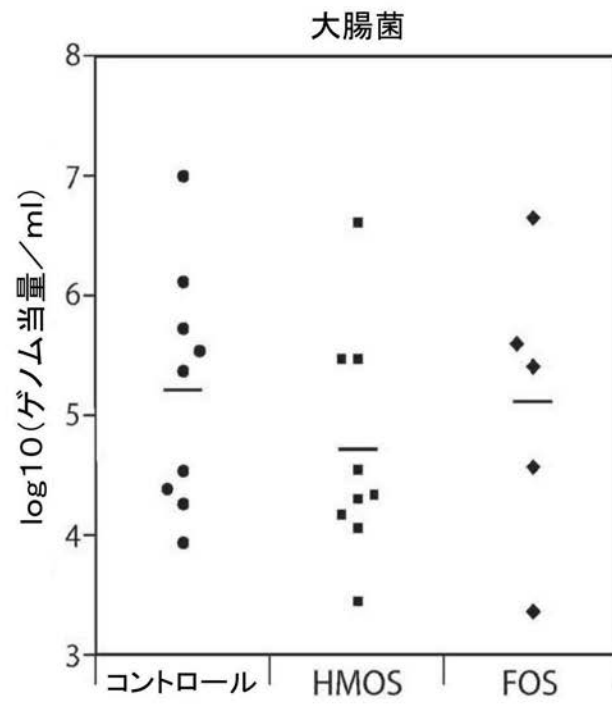
【図 2 A】



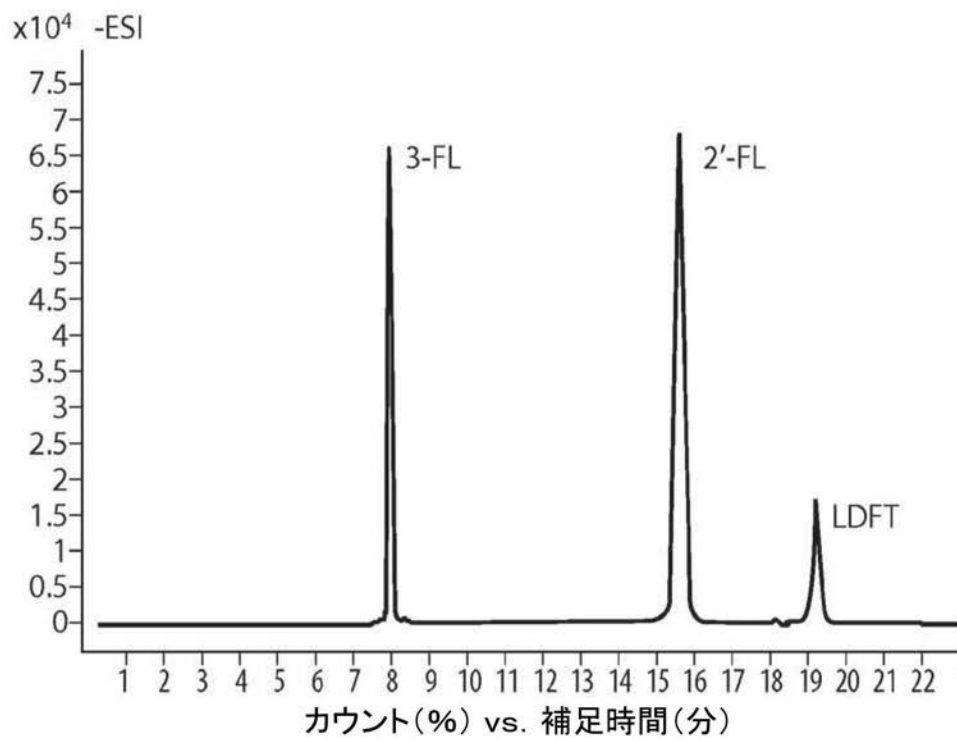
【図 2 B】



【 図 2 C 】

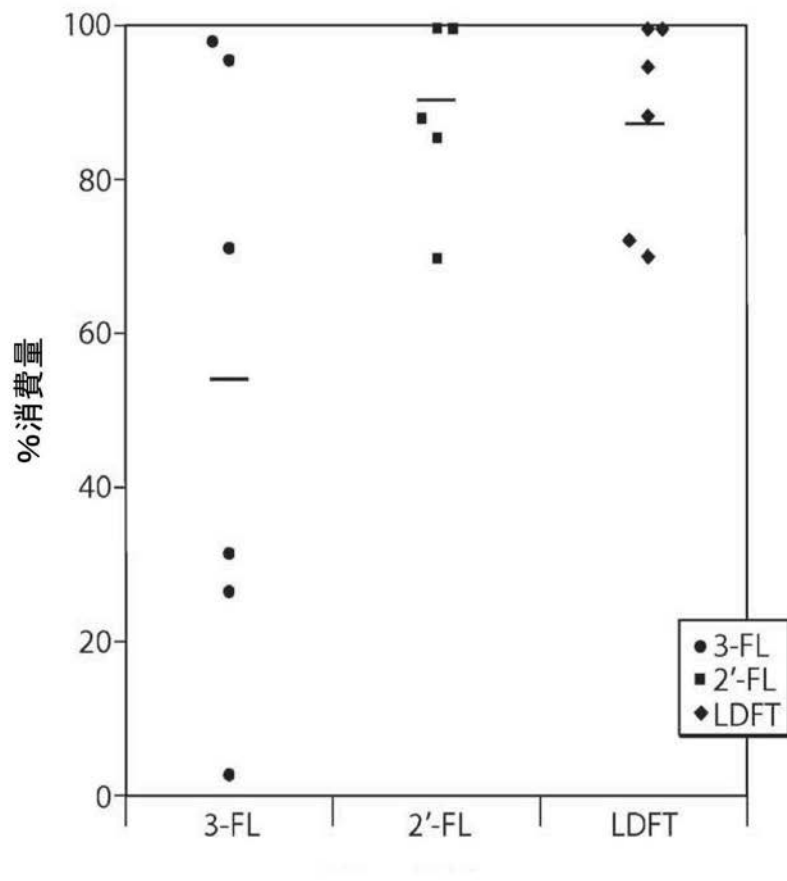


【 図 3 A 】

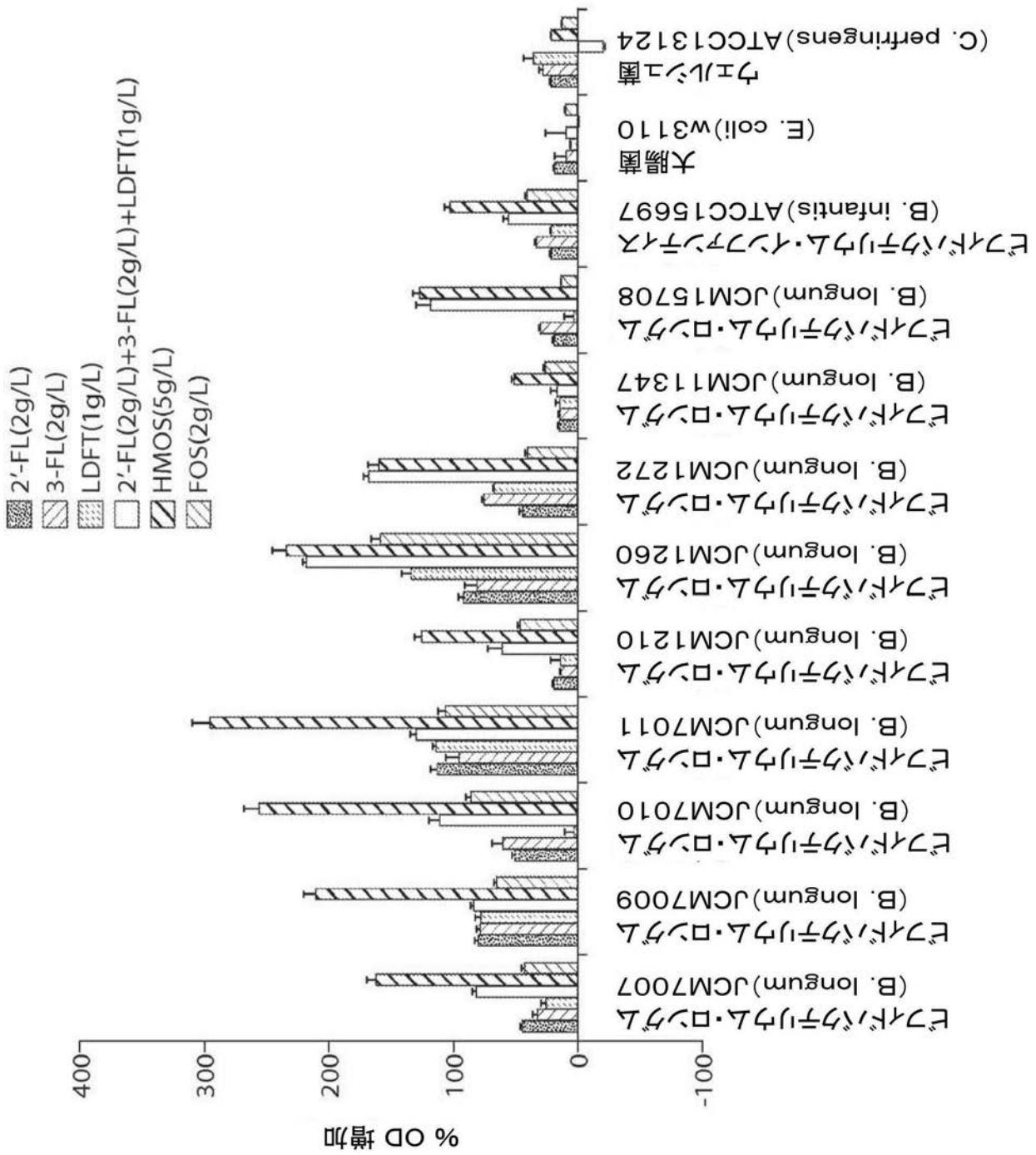




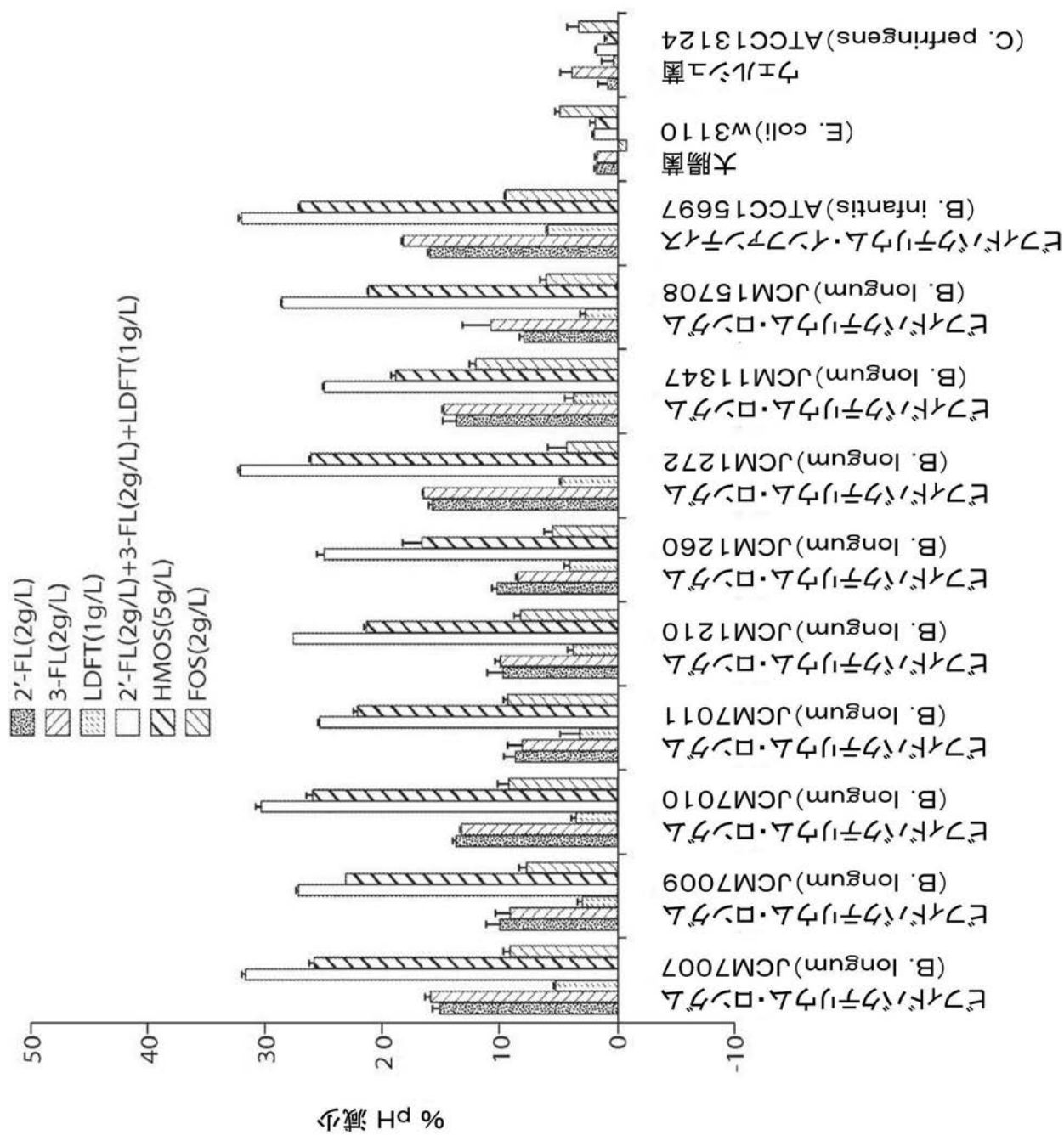
【図 3 B】



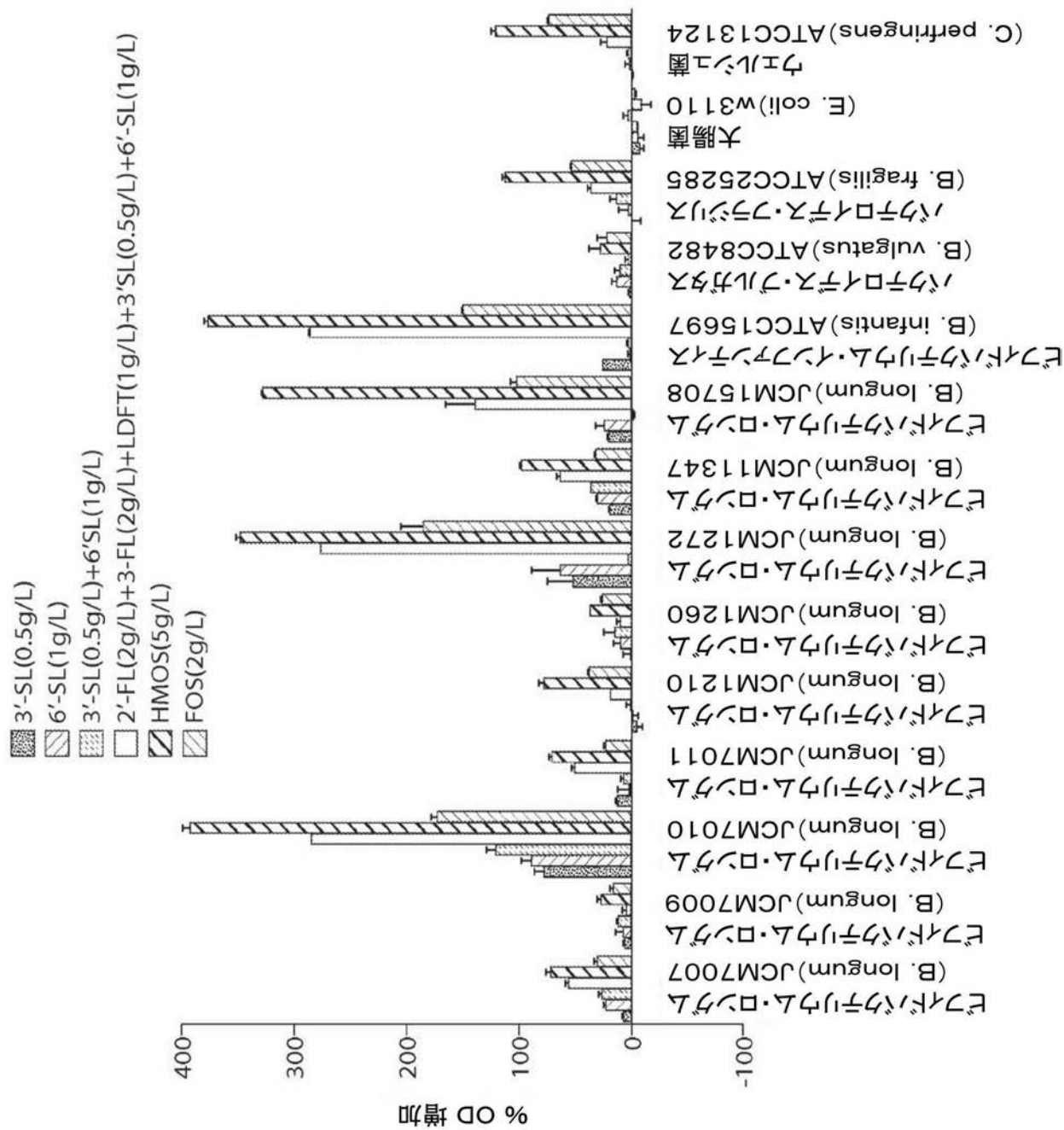
【図 4 A】



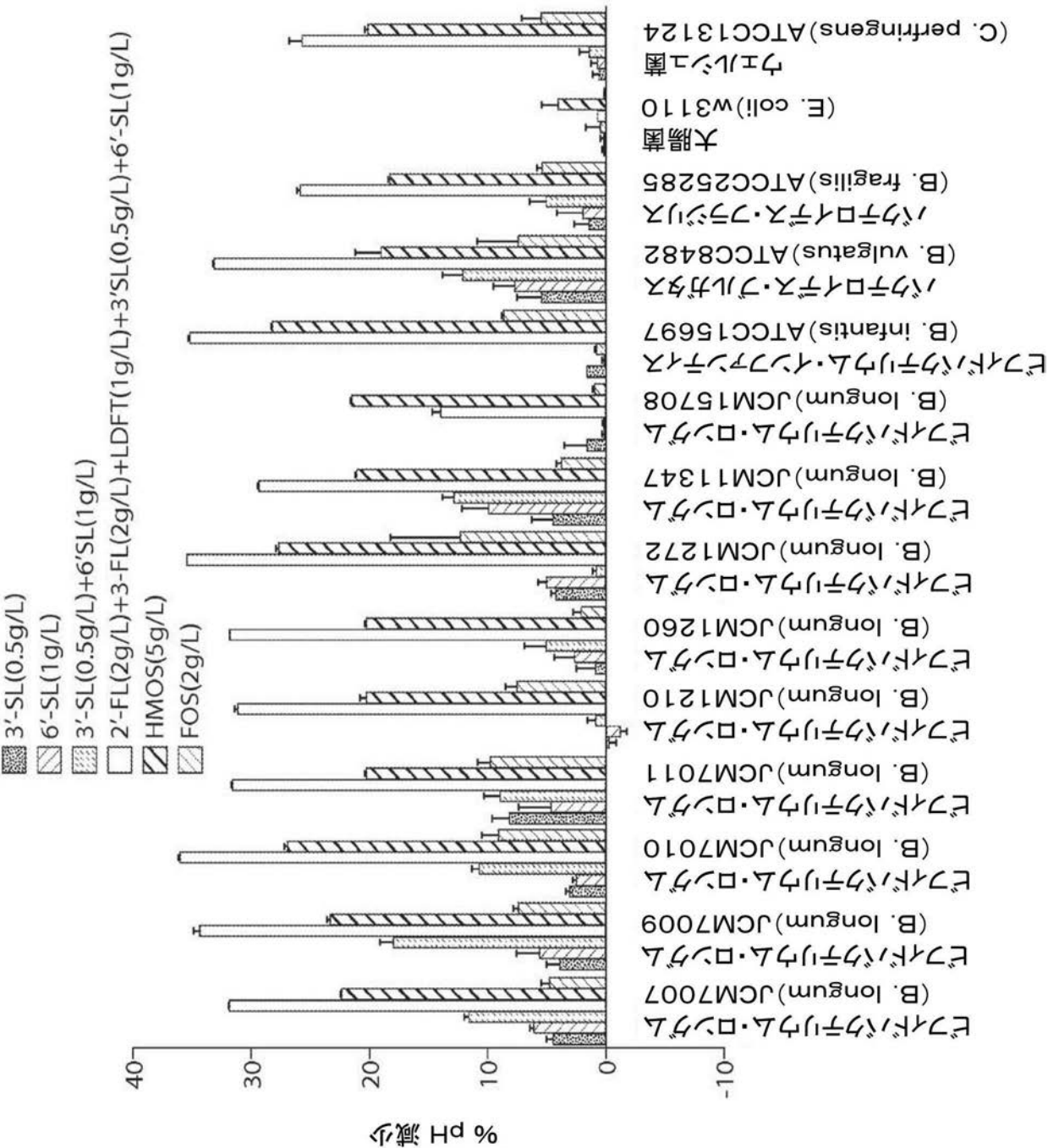
【図 4 B】



【図 5 A】



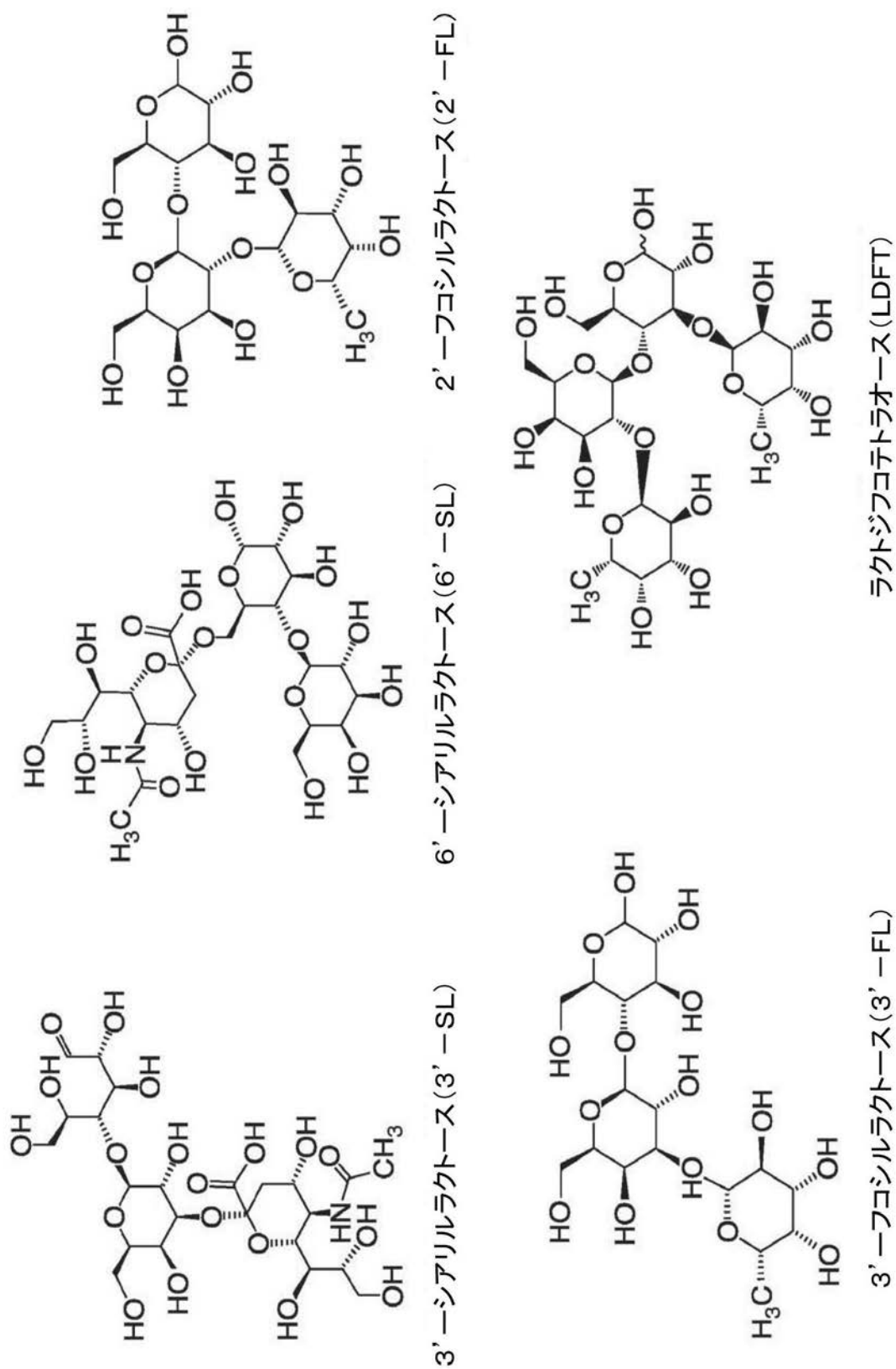
【 図 5 B 】





[illegible]

【 図 7 】





## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/030764						
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 31/702 (2013.01) USPC - 514/27 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 31/7016, 31/702, 31/7048 (2013.01) USPC - 514/25, 27, 53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 31/7016, 31/702, 31/7048 (2013.01) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patbase, Orbit, Google Scholar								
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2011/136647 A1 (STAHL) 03 November 2011 (03.11.2011) entire document</td> <td>1-4, 6, 12, 13</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2011/136647 A1 (STAHL) 03 November 2011 (03.11.2011) entire document	1-4, 6, 12, 13
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	WO 2011/136647 A1 (STAHL) 03 November 2011 (03.11.2011) entire document	1-4, 6, 12, 13						
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>								
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family								
Date of the actual completion of the international search 03 June 2013		Date of mailing of the international search report <b>25 JUN 2013</b>						
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774						

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/030764

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☒ Claims Nos.: 5, 7-11, 14-37  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

## フロントページの続き

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

(72)発明者 ユ , チョテン

アメリカ合衆国 , 0 2 1 3 5 マサチューセッツ州 , ボストン , コモンウェルス シーティー 1  
2

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA01 MA01 MA04 MA52 NA14 ZA66 ZA69 ZB11  
ZC21