

(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2020-503253

(P2020-503253A)

(43) 公表日 令和2年1月30日 (2020.1.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/12 (2006.01)	A 6 1 K 38/12	4 C 0 7 6
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/61 (2017.01)	A 6 1 K 47/61	
C 0 7 K 7/62 (2006.01)	C 0 7 K 7/62	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 82 頁)		
(21) 出願番号 特願2019-521049 (P2019-521049)	(71) 出願人 511292459	
(86) (22) 出願日 平成29年10月20日 (2017.10.20)	アルギファルマ エーエス	
(85) 翻訳文提出日 令和1年6月10日 (2019.6.10)	ノルウェー国 エヌー 1 3 3 7 サンドヴ	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2017/076927	ィカ インダストリヴィエン 3 3	
(87) 国際公開番号 W02018/073449	(74) 代理人 110000040	
(87) 国際公開日 平成30年4月26日 (2018.4.26)	特許業務法人池内アンドパートナーズ	
(31) 優先権主張番号 1617860.0	(72) 発明者 ファーガソン、エレイン	
(32) 優先日 平成28年10月21日 (2016.10.21)	イギリス、シーエフ 1 4 4 エックスワイ	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 英国 (GB)	カーディフ サウス ウェールズ、ヒー	
(31) 優先権主張番号 1714710.9	ス パーク、カーディフ ユニバーシティ	
(32) 優先日 平成29年9月13日 (2017.9.13)	ー、スクール オブ デンティストリー、	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 英国 (GB)	ティシュー エンジニアリング アンド	
	リパレイティブ デンティストリー	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ポリミキシナーアルギネートオリゴマー結合体

(57) 【要約】

本発明は、直接共有結合または共有結合分子リンカーを介して少なくとも1つのアルギネートオリゴマーに共有結合したポリミキシンの抗生物質またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物、水和物、ジアステレオ異性体、互変異性体、鏡像異性体もしくは活性代謝物を含むポリミキシナーアルギネートオリゴマー結合体を提供する。また、前記結合体の製造方法、前記結合体を含む医薬組成物、および細菌感染症に罹患している、罹患していると疑われる、またはその危険性がある対象における細菌感染症の治療または予防の方法におけるその使用も提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

直接共有結合または共有結合分子リンカーを介して少なくとも 1 つのアルギネートオリゴマーに共有結合したポリミキシン群の抗生物質、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物、水和物、ジアステレオ異性体、互変異性体、鏡像異性体もしくは活性代謝物を含む、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体。

【請求項 2】

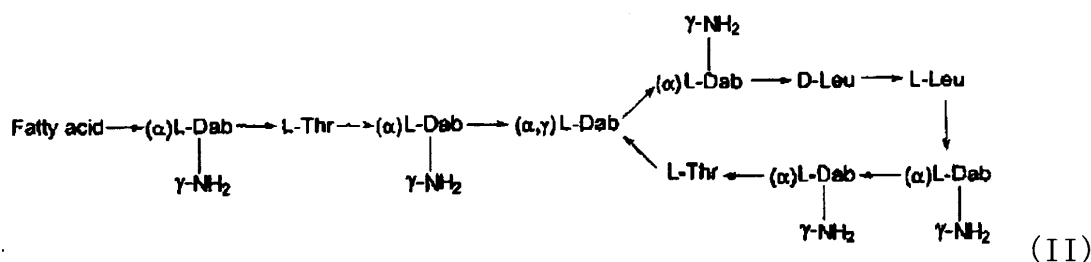
前記ポリミキシン群の抗生物質が、ポリミキシン A 1、A 2、B 1、B 1 - I、B 2、B 3、B 4、B 5、B 6、C、D 1、D 2、E 1、E 2、F、K 1、K 2、M、P 1、P 2、S および T ならびにそれらの機能的に等価な誘導体から選択される、請求項 1 に記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体。

10

【請求項 3】

前記ポリミキシン群の抗生物質が、式 I I により表される、請求項 1 または 2 に記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体。

【化 2】



20

(式中、D - L e u は D - ロイシンであり、L - L e u は L - ロイシンであり、L - T h r は L - スレオニンであり、L - D a b は γ -ジアミノ酪酸であり、また、それらのうち 0 または 1 つ以上は、天然または非遺伝子的にコードされたアミノ酸から選択され得る別のアミノ酸残基で置き換えられている。

【請求項 4】

前記天然または非遺伝子的にコードされたアミノ酸が、ロイシン、スレオニン、酸、フェニルアラニン、アルギニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、セリン、システイン、ホモリジン、オルニチン、ジアミノ酪酸 (例えば、 γ -ジアミノ酪酸)、ジアミノピメリン酸、ジアミノプロピオン酸、ホモアルギニン、トリメチルリジン、トリメチルオルニチン、4 - アミノピペリジン - 4 - カルボン酸、4 - アミノ - 1 - カルバムイミドイルピペリジン - 4 - カルボン酸および 4 - グアニジノフェニルアラニンから選択される、請求項 3 に記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体。

30

【請求項 5】

前記ポリミキシン群の抗生物質が、ポリミキシン B 1、B 1 - I、B 2、E 1 または E 2 から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体。

【請求項 6】

前記アルギネートオリゴマーの平均分子量が、35,000 ダルトン未満、好ましくは、30,000、25,000 または 20,000 ダルトン未満である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体。

40

【請求項 7】

前記アルギネートオリゴマーの重合度 (DP) または数平均重合度 (DP_n) が、
 (i) 4 ~ 100、4 ~ 75、4 ~ 50、4 ~ 35、4 ~ 30、4 ~ 25、4 ~ 22、4 ~ 20、4 ~ 18、4 ~ 16 もしくは 4 ~ 14、
 (ii) 6 ~ 50、6 ~ 35、6 ~ 30、6 ~ 25、6 ~ 22、6 ~ 20、6 ~ 18、6 ~ 16 もしくは 6 ~ 14、
 (iii) 8 ~ 50、8 ~ 35、8 ~ 30、8 ~ 25、10 ~ 25、10 ~ 22、10 ~

50

20、10～18もしくは10～15、または
 (iv) 20～100、20～90、20～80、20～75、20～70、20～65、
 20～60、20～55、20～50、20～45、20～40、20～35、20～
 30もしくは20～25、または、
 (v) 30～100、30～90、30～80、30～75、30～70、30～65、
 30～60、30～55、30～50、30～45、30～40もしくは30～35
 である、請求項1～4のいずれか1つに記載のポリミキシン-アルギネートオリゴマー結
 合体。

【請求項8】

前記アルギネートオリゴマーが、少なくとも70%のG残基、または少なくとも80%
 もしくは、少なくとも85%もしくは、少なくとも90%もしくは、少なくとも95%の
 G残基を有する、請求項1～7のいずれか1つに記載のポリミキシン-アルギネートオリ
 ゴマー結合体。

10

【請求項9】

前記G残基の少なくとも80%がGブロック中に配置されている、請求項8に記載のポ
 リミキシン-アルギネートオリゴマー結合体。

【請求項10】

前記アルギネートオリゴマーが、少なくとも70%のM残基、または少なくとも80%
 もしくは、少なくとも85%もしくは、少なくとも90%もしくは、少なくとも95%の
 M残基を有する、請求項1～7のいずれか1つに記載のポリミキシン-アルギネートオリ
 ゴマー結合体。

20

【請求項11】

前記M残基の少なくとも80%がMブロック中に配置されている、請求項10に記載の
 ポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体。

【請求項12】

前記直接共有結合が、エステル、炭酸エステル、オルトエステル、ケタール、ヘミケタ
 ール、エーテル、アセタール、ヘミアセタール(hemiacetal)、ペルオキシ、メチレン
 ジオキシ、アミド、アミン、イミン、イミド、アジド、アゾ、オキシム、スルフィド、ジ
 スルフィド、スルフィニル、スルホニル、カルボノチオイル、チオエステル、ホスフィン
 またはホスホジエステル官能基の一部である、請求項1～11のいずれか1つに記載のポ
 リミキシン-アルギネートオリゴマー結合体。

30

【請求項13】

前記直接共有結合が、エステルまたはアミドの一部である、請求項12に記載のポリミ
 キシン-アルギネートオリゴマー結合体。

【請求項14】

前記共有結合リンカーが、
 (i) アミノ酸またはペプチド、
 (ii) グルコネートもしくはマンヌロネート以外の単糖またはオリゴ糖、あるいはそれ
 らから形成されるポリマー、
 (iii) リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド、
 (iv) 直鎖、分岐もしくは環状、置換もしくは非置換のアルキル、アルケニルまたはア
 ルキニル基、
 (v) アセチル、スクシニル、アコニチル(シスまたはトランス)、グルタリル、メチル
 スクシニル、トリメリチルシステアミン(trimellityl cysteamine)、ペニシラミン、N
 - (2-メルカプトプロピオニル)グリシン、2-メルカプトプロピオン酸、ホモシステ
 イン、3-メルカプトプロピオン酸またはデアミノ-ペニシラミン基
 から選択される分子基であるかまたはそれらを含む、請求項1～11のいずれか1つに記
 載のポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体。

40

【請求項15】

前記直接共有結合、前記共有結合を含有する官能基または前記共有結合分子リンカーが

50

、

- (i) 酸不安定性であり、
 - (i i) 活性酸素種に敏感であり、および / または
 - (i i i) 細菌もしくは免疫細胞により分泌される酵素により分解される、
- 請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体。

【請求項 1 6】

前記結合体が、アルギネート上のカルボキシル基とポリミキシン上のヒドロキシル基とから形成されるエステル結合を介してポリミキシン群の抗生物質に共有結合した少なくとも 1 つのアルギネートオリゴマーからなる、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 つに記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体。

10

【請求項 1 7】

前記結合体が、アルギネート上のカルボキシル基とポリミキシン上のアミン基とから形成されるアミド結合を介してポリミキシン群の抗生物質に共有結合した少なくとも 1 つのアルギネートオリゴマーからなる、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体。

【請求項 1 8】

前記ポリミキシン群の抗生物質が、コリスチン（例えば、ポリミキシン E 1 または E 2）またはポリミキシン B（例えば、ポリミキシン B 1、B 1 - I または B 2）である、請求項 1 6 または 1 7 に記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体。

【請求項 1 9】

前記アルギネートオリゴマーが、2 ~ 1 0 0 個のモノマー残基を含有する、請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか 1 つに記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体。

20

【請求項 2 0】

前記アルギネートオリゴマーが、少なくとも 7 0 % の G 残基を有する、請求項 1 6 ~ 1 9 のいずれか 1 つに記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 つに記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体と、薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 つに記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマーの製造方法であって、前記方法が、

30

- (i a) アルギネートオリゴマーおよびポリミキシン群の抗生物質を準備し、それらの 2 つの分子基の間に直接共有結合を形成すること、または
 - (i b) アルギネートオリゴマー、ポリミキシン群の抗生物質および共有結合分子リンカーを準備し、アルギネートオリゴマーとリンカー分子の 2 つの分子基の間に直接共有結合を形成し、且つ、ポリミキシン群の抗生物質とリンカー分子の 2 つの分子基の間に直接共有結合を形成すること、または
 - (i c) アルギネートオリゴマーおよびポリミキシン群の抗生物質を準備すること（但し、一方または両方が、それに共有結合し、且つ、リンカー分子の少なくとも 1 つを介してアルギネートオリゴマーをポリミキシン群の抗生物質に共有結合させている共有結合分子リンカー分子を有する）、ならびに、任意に、
 - (i i) 反応混合物から、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の少なくとも一部を分離すること
- を含む、製造方法。

40

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の方法であって、前記方法が、

- (i) 利用可能なカルボキシル基を有するアルギネートオリゴマーの水溶液を準備することと、
- (i i) アルギネートオリゴマー中の少なくとも 1 つのカルボキシル基を活性化するのに十分な量および条件下で、前記アルギネート溶液を 1 - エチル - 3 - [3 - ジメチルアミ

50

ノプロピル]カルボジイミド塩酸塩(EDC)と接触させることと、
(iii)任意に、アミン反応性スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド(スルホ-NHS)エステルを形成するのに十分な量および条件下で、前記カルボキシル活性化アルギネートオリゴマーをスルホ-NHSと接触させることと、
(iv)アルギネートオリゴマーとポリミキシン群の抗生物質との間にアミド結合を形成するのに十分な量および条件下で、工程(ii)の前記カルボキシル活性化アルギネートオリゴマーまたは工程(iii)のアミン反応性スルホ-NHSエステルを、利用可能な一級アミン基を有するポリミキシン群の抗生物質と接触させることと、
(v)反応混合物から、ポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体の少なくとも一部を分離することと

10

を含む、方法。

【請求項24】

請求項22に記載の方法であって、前記方法が、

(i)利用可能なカルボキシル基を有するアルギネートオリゴマーの溶液、好ましくは有機(例えば、DMFおよび/またはDMSO)溶液を準備することと、
(ii)O-アシルイソ尿素中間体を形成するのに十分な量および条件下で、前記アルギネート溶液をジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)と接触させることと、
(iii)アルギネートオリゴマーとポリミキシン群の抗生物質との間にエステル結合を形成するのに十分な量および条件下で、前記O-アシルイソ尿素中間体を利用可能なヒドロキシル基を有するポリミキシン群の抗生物質および4-N,N-ジメチルアミノピリジン(DMAP)と接触させることと、
(iv)反応混合物から、ポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体の少なくとも一部を分離することと

20

を含み、

工程(ii)および(iii)は、同時に実施してもよい、方法。

【請求項25】

細菌感染症の予防の治療に使用される請求項21に記載の医薬組成物の請求項1~20のいずれか1つに記載のポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体。

【請求項26】

細菌感染症に罹患している、罹患していると疑われる、またはその危険性がある対象における細菌感染症の治療または予防の方法であって、前記方法が、請求項1~20のいずれか1つに記載のポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体または請求項21に記載の医薬組成物の有効量を前記対象に投与することを含む、方法。

30

【請求項27】

前記結合体が、対象に全身投与される、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

請求項25に記載の使用または請求項26もしくは請求項27に記載の方法のための、ポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体または医薬組成物であって、前記細菌感染症が、

(i)全身感染症または前記対象の身体内もしくは身体上の多重遺伝子座の感染症、
(ii)呼吸器の基礎疾患または症状に罹患している対象における呼吸器感染症であり、好ましくは、CF、COPD/COADまたは喘息から選択される呼吸器感染症、
(iii)植込み型医療機器または補綴医療器機に関連した医療機器関連感染症、あるいは
(iv)慢性創傷における感染症

40

である、ポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体または医薬組成物。

【請求項29】

前記感染症が、グラム陰性菌感染症である、請求項25もしくは請求項28に記載の使用または請求項26~28のいずれか1つに記載の方法のための、ポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体または医薬組成物。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、有利な特性を有する新規修飾型のポリミキシン群の抗生物質を提供する。特に、アルギネートオリゴマーをポリミキシン群の抗生物質に共有結合させることにより、それらの抗菌効力を著しく低下させることなく当該抗生物質の宿主毒性を低下させ、また、いくつかの実施形態では、抗生物質の抗菌作用を延長させさえすることが分かっている。言い換えれば、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体は、抗菌効力（非結合型ポリミキシン群の抗生物質と本質的に同じまたは類似の抗菌効力であり得る）を有するが、宿主毒性が少なく、さらにより長期間の抗菌作用を有する一群の新規化学物質である。本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体はまた、同じポリミキシン群の抗生物質の非結合型よりもバイオフィルムへの対処においてより効果的でもあり得る。したがって、本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体は、動物対象における細菌感染症に対する改善された治療法を意味する。よって、本発明は、本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体のこれらの特性を反映する医学的使用および治療方法、すなわち、細菌感染症の治療または予防における本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の使用を提供する。本発明は更に、本発明の結合体の製造方法を提供する。

10

【背景技術】

【0002】

20

ポリミキシン群の抗生物質は、細胞膜細菌、特にグラム陰性菌に結合し、それに損傷を与える、周知且つ特徴が十分に特定されている一群の環状ポリペプチド抗生物質である。ポリミキシンは、菌体内毒素のリピドA部分にも結合し、この内毒素の生物学的作用を中和し得るとされている。ポリミキシンは、一般に、非特許文献1（Hoeprich、P.D.、The Polymyxins、Medical Clinics of North America、p.1257、54(5)、Sept. 1970）に記載されており、その全体を参照により本明細書に援用する。これらの抗生物質は、当初、グラム陽性菌の菌株、すなわちパチルス属、例えば、パチルス・ポリミキサ・バル・コリスチヌス（*Bacillus polymyxa* var *colistinus*）（非特許文献2（Minor、R.W.編：パチルスポリミキシン由来の抗生物質（Antibiotics derived from *Bacillus polymyxin*.）、*Ann. N. Y. Acad. Sci.*、51:853、1949）、これは参照により本明細書に援用する）からの二次代謝産物とされていたもので、サーキュリンおよびコリスチンとして知られる物質が含まれ、例えば、ポリミキシンA1、A2、B1、B1-I、B2、B3、B4、B5、B6、C（サーキュリンA）、D1、D2、E1（コリスチンA）、E2（コリスチンB）、F、K1、K2、M、P1、P2、SおよびT（非特許文献3（Velkovら、*J. Med. Chem.*、2010、53、1898-1916）および付随する補助情報、非特許文献4（Stormら、*Ann. Rev. Biochem.*、46:723-63、1977）および非特許文献5（Srinivasa and Ramachandran、*Ind. J. Biophys.*、17:112-118、1979）、これらはそれぞれ、その全体を参照により本明細書に援用する）が含まれる。ポリミキシン構造は、非特許文献6（メルクインデックス（The Merck Index）、第15版（2013））；非特許文献7（医薬品化学の原理（Principles of Medicinal Chemistry）、第2版、1981、p.779））に開示されており、これらはいずれも、その全体を参照により本明細書に援用する。

30

40

【0003】

ポリミキシンは、一般に、カチオン性分岐環状デカペプチド、より具体的には、トリペプチド側鎖を有する七環ペプチドと呼ばれる場合もあり、これは、界面活性剤の活性によるものと考えられる抗菌効力を示す。典型的には、トリペプチドのN末端アミノ酸残基の - アミノ基に結合した疎水性脂肪酸テールが存在する。トリペプチドのN末端アミノ酸残基が除去された、トランケートされたノナペプチド型を含むそれらの誘導体が、その後、成功の程度は様々であるが、合成されている。

【0004】

機能的には、この群は、グラム陰性菌、特に、緑膿菌、大腸菌、クレブシエラ属（*Kleb*

50

siella sp.)、エンテロバクター属 (Enterobacter sp.)、サルモネラ属 (Salmonella sp.)、赤痢菌属 (Shigella sp.)、ビブリオ属 (Vibrio sp.)、パスツレラ属 (Pasteurella sp.)、ヘモフィルス属 (Hemophilus sp.) およびボルデテラ属 (Bordetella sp.) などのグラム陰性桿菌に対して、非常に効果的である。グラム陽性菌に対する効果は、さまざまであり、ほとんどの場合、限られている。しかしながら、この群は、毒性の問題 (すなわち、ポリミキシン抗生物質を投与する対象または「宿主」に対する毒性、すなわち「宿主毒性」)、特に腎毒性および神経毒性の問題を抱えている。抗生物質特性を様々な程度に保持しながら、様々な程度にこの問題を克服するポリミキシン誘導体が生成されてきた。

【 0 0 0 5 】

ポリミキシン群の抗生物質の深刻な宿主毒性の問題が意味することは、それらの使用が長年にわたって抑制されてきたということである。しかしながら、多剤耐性細菌の対処に使用できる「新しい」抗生物質 (いわゆる最後の手段として使用される抗生物質) に対する近年の需要が、それらの宿主毒性の問題にもかかわらず、ポリミキシン群の抗生物質の使用の増加をもたらした。今日、最も一般的に使用されているポリミキシン群の抗生物質は、コリスチン (ポリミキシン E 1 と E 2 の混合物) およびポリミキシン B (ポリミキシン B 1、B 1 - I、B 2、B 3 および B 6 の混合物であり、B 1 と B 2 が主である) である。スルホメチル化アミン基を有するコリスチンは、全身投与される場合、非修飾コリスチンより毒性が低いことが分かっているため、コリスチンは、全身投与が必要とされる場合、典型的にはスルホメチル化形態 (コリスチンメタンスルホネート) で使用される。しかしながら、それは抗菌剤としては効能が低い。投与すると、CMS が、部分的にスルホメチル化誘導体に加水分解されるため、抗菌活性がいくらか回復する。ノナペプチド切断型のポリミキシンもまた、毒性が低い。

【 0 0 0 6 】

他のアプローチでは、小さなデキストリン分子が、スクシニルリンカーを介してコリスチン分子に結合されており、かかる結合体は、宿主毒性が低下していることが示されている (特許文献 1 (国際公開第 2 0 1 2 / 0 3 5 3 1 0 号))。しかしながら、これらの結合体は、抗菌作用が劇的に低下しており、これはデキストリン基のアミラーゼ触媒消化により部分的に回復される場合もある (表 3 ; 実施例 1、17 ページ)。報告されている実験のいずれにおいても、完全な抗生物質活性が回復していないことは注目に値する。生物学的膜拡散の 2 コンパートメントモデルにおいて、これらの結合体は、非結合コリスチンの初期薬物動態 / 薬力学的 (PK / PD) プロファイルを示さないことがさらに観察されている (非特許文献 8 (Azzopardi E. ら、Antimicrob. Agents Chemother., 2015, vol. 59(4), 1837-1843))。非結合コリスチンを、結合型と共に投与し、デキストリン : コリスチン結合体の有効性の低下を軽減することが提案された。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 1 2 / 0 3 5 3 1 0 号

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 Hoeprich、P.D.、The Polymyxins、Medical Clinics of North America、p.1257、54(5)、Sept. 1970

【 非特許文献 2 】 Minor、R.W. 編 : パチルスポリミキシン由来の抗生物質 (Antibiotics derived from Bacillus polymyxin.)、An. N. Y Acad. Sci, 51:853, 1949

【 非特許文献 3 】 Velkov ら、J. Med. Chem.、2010、53、1898-1916 および付随する補助情報

【 非特許文献 4 】 Storm ら、Ann. Rev. Biochem. 46:723-63、1977

【 非特許文献 5 】 Srinivasa and Ramachandran, Ind. J. Biophys., 17:112-118, 1979

【 非特許文献 6 】 メルクインデックス (The Merck Index)、第 15 版 (2013)

【非特許文献 7】医薬品化学の原理 (Principles of Medicinal Chemistry)、第2版、1981、p.779

【非特許文献 8】Azzopardi E.ら、Antimicrob. Agents Chemother., 2015, vol. 59(4), 1837-1843

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、ポリミキシン群の抗生物質の宿主毒性の問題無く、ポリミキシン群の抗生物質の抗菌作用を有する抗生物質に対する継続的な需要がある。別の言い方をすると、ポリミキシン群の抗生物質の抗菌効果を損なうことなく、それら抗生物質の宿主毒性の問題を軽減するための手段を特定する必要がある。

10

【0010】

アルギネートオリゴマーは、文献に詳細に記載されている。簡単に説明すると、アルギネートは、(1-4)結合した-D-マンヌロン酸(M)および/またはそのC-5エピマー-L-グルロン酸(G)の直鎖ポリマーである。アルギネートの一次構造は、大きく異なり得る。M残基及びG残基は、M残基又はG残基が連続したホモポリマーブロック、M残基及びG残基が交互になったブロックとして構成されることがあり、これらのブロック構造の間に位置する単一のM残基又はG残基が見られる場合もある。アルギネート分子は、これらの構造の一部または全てを含むことができ、かかる構造は、ポリマー全体に渡って均一に分布していない場合もある。極端な場合、グルロン酸のホモポリマー(ポリグルコネート)またはマンヌロン酸のホモポリマー(ポリマンヌロネート)が存在する。アルギネートオリゴマーは、典型的には天然の供給源から大きな高分子量ポリマー(例えば、平均分子量が300,000~500,000ダルトンの範囲)として単離されるアルギネートポリマーから得ることができる。かかる大きなアルギネートポリマーは、例えば、化学的加水分解または酵素加水分解により、分解(degraded)、すなわち化学分解(broken down)され、より低い分子量のアルギネート構造を生成し得る(すなわち、アルギネートオリゴマー)。

20

【課題を解決するための手段】

【0011】

実施例に示されているように、ポリミキシン群の抗生物質のアルギネートオリゴマーへの共有結合により、抗菌効力(ポリミキシン群の抗生物質の抗菌効力と比較して、本質的に同じもしくは類似している、または少なくとも顕著に低下していない)を有するが、ポリミキシン群の抗生物質の非結合型と比較して、宿主毒性が低下した新規化学成分が作り出されることが見出された。ポリミキシン群の抗生物質の非結合型と比較して、ポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体の抗菌作用が延長され得ることがさらに見出された。ある特定の生理学的モデルにおいて、ポリミキシン群の抗生物質の非結合型に類似した初期PK/PDプロファイルを有するある特定のポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体を調製し得ることも見出された。

30

【0012】

したがって、本発明は、第1の態様において、直接共有結合または共有結合分子リンカーを介して、少なくとも1つのアルギネートオリゴマーに共有結合したポリミキシン群の抗生物質を含むポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体を提供する。

40

【0013】

ポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体は、式Iによっても表し得る。

$$P - (L - A)_n \quad (I)$$

(式中、P-は、ポリミキシン群の抗生物質、Lは、直接共有結合または共有結合分子リンカー、-Aは、アルギネートオリゴマー、およびnは、1~10の整数、例えば、1~9、1~8、1~7、1~6、1~5、1~4、1~3または2もしくは1である。)

【図面の簡単な説明】

【0014】

50

【図 1 A】図 1 A は、オリゴ G - A - コリスチン (M I C 中央値 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$) の様々な濃度下での V 2 緑膿菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 1 B】図 1 B は、オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 2 緑膿菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 1 C】図 1 C は、プロノバ (Pronova) アルギネート (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 2 緑膿菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 1 D】図 1 D は、オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) およびコリスチン (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度) の様々な濃度下での V 2 緑膿菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 1 E】図 1 E は、オリゴ G - E - コリスチン (M I C 中央値 $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$) の様々な濃度下での V 2 緑膿菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 1 F】図 1 F は、オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 2 緑膿菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 1 G】図 1 G は、プロノバアルギネート (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 2 緑膿菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 1 H】図 1 H は、オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) およびコリスチン (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度) の様々な濃度下での V 2 緑膿菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 1 I】図 1 I は、2.5 k の A H G - A - コリスチン (M I C 中央値 $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$) の様々な濃度下での V 2 緑膿菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 1 J】図 1 J は、2.5 k の A H G - E - コリスチン (M I C 中央値 $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$) の様々な濃度下での V 2 緑膿菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 1 K】図 1 K は、硫酸コリスチン (M I C 中央値 $0.063 \mu\text{g} / \text{mL}$) の様々な濃度下での V 2 緑膿菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 2 A】図 2 A は、オリゴ G - A - コリスチン (M I C 中央値 $0.063 \mu\text{g} / \text{mL}$) の様々な濃度下での V 3 クレブシエラ・ニューモニエの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 2 B】図 2 B は、オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 3 クレブシエラ・ニューモニエの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 2 C】図 2 C は、プロノバアルギネート (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 3 クレブシエラ・ニューモニエの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 2 D】図 2 D は、オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) およびコリスチン (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度) の様々な濃度下での V 3 クレブシエラ・ニューモニエの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 2 E】図 2 E は、オリゴ G - E - コリスチン (M I C 中央値 $0.125 \mu\text{g} / \text{mL}$) の様々な濃度下での V 3 クレブシエラ・ニューモニエの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 2 F】図 2 F は、オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 3 クレブシエラ・ニューモニエの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 2 G】図 2 G は、プロノバアルギネート (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 3 クレブシエラ・ニューモニエの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 2 H】図 2 H は、オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) およびコリスチン (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度) の様々な濃度下での V 3 クレブシエラ・ニューモニエの増殖に関するグラフ図を示す。

10

20

30

40

50

【図 2 I】図 2 I は、2.5 k の A H G - A - コリスチン (M I C 中央値 0.125 μ g / mL) の様々な濃度下での V 3 クレブシエラ・ニューモニエの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 2 J】図 2 J は、2.5 k の A H G - E - コリスチン (M I C 中央値 0.063 μ g / mL) の様々な濃度下での V 3 クレブシエラ・ニューモニエの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 2 K】図 2 K は、硫酸コリスチン (M I C 中央値 0.008 μ g / mL) の様々な濃度下での V 3 クレブシエラ・ニューモニエの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 3 A】図 3 A は、オリゴ G - A - コリスチン (M I C 中央値 0.063 μ g / mL) の様々な濃度下での V 19 アシネトバクター・バウマンニの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 3 B】図 3 B は、オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 19 アシネトバクター・バウマンニの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 3 C】図 3 C は、プロノバアルギネート (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 19 アシネトバクター・バウマンニの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 3 D】図 3 D は、オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) およびコリスチン (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度) の様々な濃度下での V 19 アシネトバクター・バウマンニの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 3 E】図 3 E は、オリゴ G - E - コリスチン (M I C 中央値 0.125 μ g / mL) の様々な濃度下での V 19 アシネトバクター・バウマンニの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 3 F】図 3 F は、オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 19 アシネトバクター・バウマンニの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 3 G】図 3 G は、プロノバアルギネート (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 19 アシネトバクター・バウマンニの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 3 H】図 3 H は、オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) およびコリスチン (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度) の様々な濃度下での V 19 アシネトバクター・バウマンニの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 3 I】図 3 I は、2.5 k の A H G - A - コリスチン (M I C 中央値 0.125 μ g / mL) の様々な濃度下での V 19 アシネトバクター・バウマンニの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 3 J】図 3 J は、2.5 k の A H G - E - コリスチン (M I C 中央値 0.125 μ g / mL) の様々な濃度下での V 19 アシネトバクター・バウマンニの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 3 K】図 3 K は、硫酸コリスチン (M I C 中央値 0.002 μ g / mL) の様々な濃度下での V 19 アシネトバクター・バウマンニの増殖に関するグラフ図を示す。

【図 4 A】図 4 A は、オリゴ G - A - コリスチン (M I C 中央値 0.063 μ g / mL) の様々な濃度下での V 7 大腸菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 4 B】図 4 B は、オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 7 大腸菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 4 C】図 4 C は、プロノバアルギネート (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) の様々な濃度下での V 7 大腸菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図 4 D】図 4 D は、オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G

10

20

30

40

50

と同等の濃度)およびコリスチン(AのオリゴG-A-コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度)の様々な濃度下でのV7大腸菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図4E】図4Eは、オリゴG-E-コリスチン(MIC中央値0.125 μg/mL)の様々な濃度下でのV7大腸菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図4F】図4Fは、オリゴG(EのオリゴG-E-コリスチン結合体におけるオリゴGと同等の濃度)の様々な濃度下でのV7大腸菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図4G】図4Gは、プロノバルギネート(EのオリゴG-E-コリスチン結合体におけるオリゴGと同等の濃度)の様々な濃度下でのV7大腸菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図4H】図4Hは、オリゴG(EのオリゴG-E-コリスチン結合体におけるオリゴGと同等の濃度)およびコリスチン(EのオリゴG-E-コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度)の様々な濃度下でのV7大腸菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図4I】図4Iは、2.5kのAHG-A-コリスチン(MIC中央値0.5 μg/mL)の様々な濃度下でのV7大腸菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図4J】図4Jは、2.5kのAHG-E-コリスチン(MIC中央値0.5 μg/mL)の様々な濃度下でのV7大腸菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図4K】図4Kは、硫酸コリスチン(MIC中央値0.063 μg/mL)の様々な濃度下でのV7大腸菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図5A】図5Aは、オリゴG-A-コリスチン、オリゴG-E-コリスチン、2.5kのAHG-A-コリスチン、2.5kのAHG-E-コリスチンおよび硫酸コリスチンの存在下における、各薬剤のそれぞれのMICでのV2緑膿菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図5B】図5Bは、オリゴG-A-コリスチン、オリゴG-E-コリスチン、2.5kのAHG-A-コリスチン、2.5kのAHG-E-コリスチンおよび硫酸コリスチンの存在下における、各薬剤のそれぞれのMICでのV3クレブシエラ・ニューモニエの増殖に関するグラフ図を示す。

【図5C】図5Cは、オリゴG-A-コリスチン、オリゴG-E-コリスチン、2.5kのAHG-A-コリスチン、2.5kのAHG-E-コリスチンおよび硫酸コリスチンの存在下における、各薬剤のそれぞれのMICでのV19アシネトバクター・バウマンニの増殖に関するグラフ図を示す。

【図5D】図5Dは、オリゴG-A-コリスチン、オリゴG-E-コリスチン、2.5kのAHG-A-コリスチン、2.5kのAHG-E-コリスチンおよび硫酸コリスチンの存在下における、各薬剤のそれぞれのMICでのV7大腸菌の増殖に関するグラフ図を示す。

【図5E】図5Eは、オリゴG-A-コリスチン、オリゴG-E-コリスチン、2.5kのAHG-A-コリスチン、2.5kのAHG-E-コリスチンおよび硫酸コリスチンの存在下における、各薬剤の存在下における、各薬剤のそれぞれのMICでの各菌株についての細菌増殖の開始の平均時間の比較に関するグラフ図を示す。

【図6】図6は、MICでのオリゴG-A-コリスチン(黒丸)、MIC×2でのオリゴG-A-コリスチン(灰色の丸)、MICでのオリゴG-E-コリスチン(三角)、MIC×2でのオリゴG-E-コリスチン(逆三角)MICでの硫酸コリスチン(菱形)または未処理のコントロール(正方形)への曝露後の実施例4の2コンパートメント膜拡散モデルにおけるアシネトバクター・バウマニ(V19)についてのインキュベーション時間に対するCFU数に関するグラフ図を示す。

【図7A】図7Aは、オリゴG(丸)、オリゴG-A-コリスチン(2バッチ;六角形および逆三角形)、オリゴG-E-コリスチン(三角)、コリスチンメタンシルホネート(CMS;正方形)および硫酸コリスチン(菱形)の漸増濃度についての細胞毒性に関するグラフ図を示す。

【図7B】図7Bは、オリゴG(白丸)、オリゴG-E-ポリミキシンB(正方形)、オリゴG-A-ポリミキシンB(黒丸)およびポリミキシンB(三角)の漸増濃度について

10

20

30

40

50

の細胞毒性に関するグラフ図を示す。

【図 8】図 8 は、ポリミキシン B（黒三角）、硫酸コリスチン、（黒丸）、オリゴ G - E - ポリミキシン B（灰色三角）、オリゴ G - E - コリスチン（灰色丸）、オリゴ G - A - コリスチン（白丸）、オリゴ G - A - ポリミキシン B（白三角）、オリゴ G の漸増濃度への暴露による、細胞生存率に応じて調整された、HK2 細胞からの腫瘍壊死因子（TNF）放出に関するグラフ図を示す。データは平均 \pm SEM（ $n = 6$ ）として表した。

【図 9 A】図 9 A は、前記薬剤の存在下で形成された緑膿菌バイオフィルムの構造および緑膿菌バイオフィルム内の細胞生存率に対する、オリゴ G - A - コリスチン（MIC 中央値 = $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）の漸増濃度の影響を示す。

【図 9 B】図 9 B は、前記薬剤の存在下で形成された緑膿菌バイオフィルムの構造および緑膿菌バイオフィルム内の細胞生存率に対する、硫酸コリスチン（MIC 中央値 = $0.063 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）の漸増濃度の影響を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明によれば、ポリミキシン群の抗生物質は、抗菌効力を示すカチオン環状デカペプチドまたはノナペプチドとして広く定義され、ここで前記ペプチドは、トリペプチド側鎖またはジペプチド側鎖を有する七環ペプチドからなる。ある特定の実施形態では、疎水性脂肪酸テールは、トリペプチドまたはジペプチドの N 末端アミノ酸残基の α -アミノ基に結合しており、これは、いくつかの実施形態では、飽和または不飽和（例えば、アルカノイル、アルケノイルまたはアルキノール）の、分岐鎖または直鎖脂肪酸であってもよく、任意に、1 つ以上のヒドロキシル基で置換されていてもよい。脂肪酸残基は、 $C_3 \sim C_{20}$ 、例えば、 $C_3 \sim 18$ 、 $C_3 \sim 16$ 、 $C_3 \sim 14$ 、 $C_3 \sim 12$ 、 $C_3 \sim 10$ 、 $C_3 \sim 8$ 、 $C_3 \sim 6$ 、 $C_6 \sim 20$ 、 $C_6 \sim 18$ 、 $C_6 \sim 16$ 、 $C_6 \sim 14$ 、 $C_6 \sim 12$ 、 $C_6 \sim 10$ 、 $C_6 \sim 8$ 、 $C_{10} \sim 20$ 、 $C_{10} \sim 18$ 、 $C_{10} \sim 16$ 、 $C_{10} \sim 14$ または $C_{10} \sim 12$ であってもよい。

【0016】

本明細書で特に検討するのは、天然のポリミキシンまたはその機能的に等価な誘導体であって、抗菌効力を保持している誘導体であり、完全合成および半合成の形態を含む。したがって、ポリミキシン群の抗生物質という用語に含まれるのは、ポリミキシン A1、A2、B1、B1-I、B2、B3、B4、B5、B6、C（サーキュリン A）、D1、D2、E1（コリスチン A）、E2（コリスチン B）、F、K1、K2、M、P1、P2、S および T であり、例えば、特に、Velkovら、J, Stormら、Srinivasa および Ramachandran、ならびにメルクインデックス、第 15 版（上記参照）に記載されている。機能的に等価な誘導体は、特に、国際公開第 2010/130007 号、国際公開第 2008/017734 号、国際公開第 2010/075416 号、国際公開第 2012/168820 号、国際公開第 2009/098357 号、国際公開第 2014/188178 号、国際公開第 2015/135976 号、国際公開第 2013/072695 号、国際公開第 2016/083531 号、国際公開第 2016/100578 号に記載されている。

【0017】

例として、ポリミキシン群の抗生物質は、式 II の抗菌分子により表し得る。

【0018】

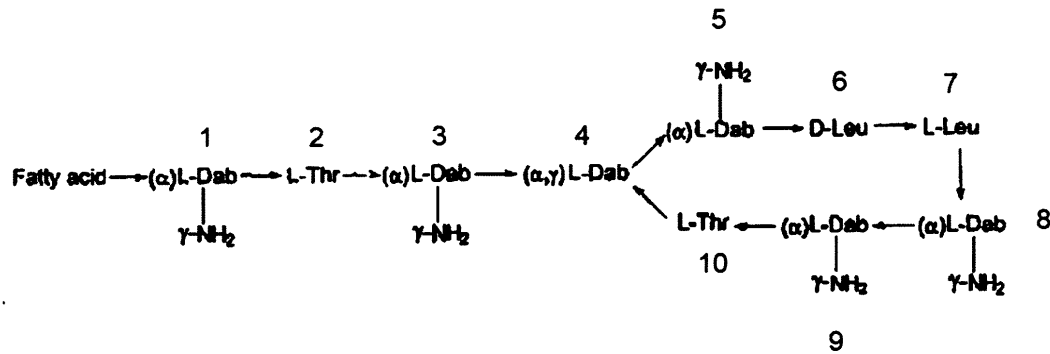
10

20

30

40

【化 1】



(II)

【0019】

(式中、脂肪酸およびアミノ酸残基 1 は、独立して任意であり、ここで D - L e u は D - ロイシンであり、L - L e u は L - ロイシンであり、L - T h r は L - スレオニンであり、L - D a b は、 γ -ジアミノ酪酸であり、また、アミノ酸 1 ~ 10 のうち 0 または 1 つ以上は、天然または非遺伝的にコードされたアミノ酸から選択され得る別のアミノ酸残基で置き換えられており、前記アミノ酸の例としては、ロイシン、スレオニン、フェニルアラニン、アルギニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、セリン、システイン、ホモリジン、オルニチン、ジアミノ酪酸（例えば、 γ -ジアミノ酪酸）、ジアミノピメリン酸、ジアミノプロピオン酸、ホモアルギニン、トリメチルリジン、トリメチルオルニチン、4 - アミノピペリジン - 4 - カルボン酸、4 - アミノ - 1 - カルバムイミドイルピペリジン - 4 - カルボン酸および 4 - グアニジノフェニルアラニンが挙げられる。置換型は、ポリミキシン E 1 および / または E 2（コリスチン）の機能的に等価な誘導体、すなわち、ポリミキシン E 1 および / または E 2 の抗菌効力を保持する（例えば、前記抗菌効力の少なくとも 70 %、80 %、90 % または 95 % 有する）誘導体であると考え得る。

【0020】

好ましくは、置換アミノ酸は、カチオン性側鎖を有するアミノ酸、すなわち、腫瘍細胞の細胞内 pH（例えば、約 pH 7.4）で正味正電荷を持つ側鎖を有するアミノ酸である。これには、遺伝的にコードされたアミノ酸のうち、リジンおよびアルギニンが含まれるであろうが、かかる正味正電荷をその側鎖に有する任意の非遺伝的にコードされたまたは修飾されたアミノ酸を使用してもよい。例えば、グアニジノ基またはアミン基または他のカチオン部分を有する側鎖を持つアミノ酸であって、例えば、プロトン化水素以外の、側鎖中の任意の水素が、ハロゲン原子（例えば、フッ素、塩素もしくは臭素）あるいは直鎖、分岐鎖の脂肪族不飽和もしくは飽和の C₁ ~ C₄ アルキルまたはアルコキシ基（例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec - ブチル、tert - ブチル、エチレン、プロピレン、ブチレン、ヒドロキシ、メトキシ、エチルオキシ、プロピルオキシ、イソプロピルオキシ、ブチルオキシ基、イソブチルオキシ、sec - ブチルオキシ、tert - ブチルオキシまたはそれらのハロゲン置換型）で置換されているアルギニンおよびリジンの誘導体などがあげられる。カチオン性側鎖を有する好適な非遺伝的にコードされたアミノ酸としては、ホモリジン、オルニチン、ジアミノ酪酸、ジアミノピメリン酸、ジアミノプロピオン酸およびホモアルギニンならびにトリメチルリジンおよびトリメチルオルニチン、4 - アミノピペリジン - 4 - カルボン酸、4 - アミノ - 1 - カルバムイミドイルピペリジン - 4 - カルボン酸および 4 - グアニジノフェニルアラニンが挙げられる。本発明に包含される式 I I の置換型は、式 I I の非置換型の抗菌効力を保持する（例えば、前記抗菌効力の少なくとも 70 %、80 %、90 % または 95 % を有する）。

【0021】

「脂肪酸」基は、上記のいずれであってもよく、好ましくは、メチルオクタン酸またはメチルヘプタン酸、例えば、6 - メチルオクタン酸または 6 - メチルヘプタン酸であって

もよい。

【0022】

アミノ酸は、アミン基、カルボン酸基、およびこれら二つの基を分離する少なくとも一つの炭素を含む分子である。この分離炭素（単数または複数）に、他の基が結合していてもよい。これらの基は、「側鎖」と称し得るが、その最も単純な形態では、この側鎖は水素（グリシン）であり得る。単一の分離炭素を有するアミノ酸は、「 α -アミノ酸」と呼ばれ、一般式 $H_2N-CH(R_1)(R_2)-COOH$ を有し、式中、 R_1 および R_2 は、置換基、すなわち側鎖である。分離炭素は、 α -炭素として知られている。アミノ基とカルボン酸基が2個以上の炭素原子で分離されている他の種類のアミノ酸が存在する。例えば、 β -アミノ酸では、アミノ基が、カルボン酸基から2個の炭素原子で分離されている炭素原子が、 γ -アミノ酸では、3個の炭素原子がアミノ基とカルボン酸基を分離している。好ましくは、本発明で使用されるポリミキシン群の抗生物質中のアミノ酸は、 α -アミノ酸、 β -アミノ酸、より好ましくは γ -アミノ酸、または δ -アミノ酸、最も好ましくは ϵ -アミノ酸である。

10

20

30

40

50

【0023】

アミノ酸は、グリシンを除いて、2つ以上の立体異性体として存在し得る。特に、グリシン以外のアミノ酸の α -炭素はキラル中心であるため、各アミノ酸の2つの鏡像異性体が生じる。これらの型は、しばしばD型およびL型と呼ばれる（例えば、D-アラニンおよびL-アラニン）。さらなるキラル中心を有するアミノ酸は、4つ以上の可能性のある立体異性体で存在することがあり、例えば、トレオニンは、2つのキラル中心を有するため、4つの立体異性体のうちの1つで存在し得る。アミノ酸の任意の立体異性体タイプが、本発明において使用されるポリミキシン群の抗生物質分子に存在し得る。本発明を説明することを目的として、「非遺伝的にコードされた」という用語がアミノ酸に適用される場合、これはL型で天然に存在するD型のアミノ酸を含まない。

【0024】

好ましい実施形態において、ポリミキシン群の抗生物質は、ポリミキシンB1、B1-I、B2、B3、B4、B5、B6、E1またはE2から選択され、より好ましくはポリミキシンB1、B1-I、B2、E1またはE2から選択され、最も好ましくは、ポリミキシンE1もしくはE2または上記のいずれかの機能的に等価な誘導体、すなわち当該ポリミキシンの抗菌効力を保持する（例えば、前記抗菌効力の少なくとも70%、80%、90%または95%有する）誘導体である。

【0025】

ある特定の実施形態では、ポリミキシン群の抗生物質中の1つ以上の遊離アミン基は、修飾により（例えば、スルホメチル化により）マスクし得る。

【0026】

上記のように、アルギネートは典型的には、平均分子量が少なくとも35,000ダルトン、すなわち約175~約190モノマー残基を有するポリマーとして生じるが、一般的には平均分子量はそれよりはるかに高い。一方、本発明に係るアルギネートオリゴマーは、2~100のモノマー残基、より典型的には3、4、5または6~100のモノマー残基を含み、また、2、3、4、5もしくは6~75、2、3、4、5もしくは6~50、2、3、4、5もしくは6~40、2、3、4、5もしくは6~35または2、3、4、5もしくは6~30残基を含んでいてもよい。したがって、本発明に従って使用するためのアルギネートオリゴマーは、典型的には、350、550、700、900もしくは1000~20,000ダルトン、350、550、700、900もしくは1000~15,000ダルトン、350、550、700、900もしくは1000~10,000ダルトン、350、550、700、900もしくは1000~8000ダルトン、350、550、700、900もしくは1000~7000ダルトン、または350、550、700、900もしくは1000~6000ダルトンの平均分子量を有するであろう。

【0027】

言い換えれば、アルギネートオリゴマーの重合度（DP）または数平均重合度（DP_n）

）は、2～100、好ましくは2～75、好ましくは2～50、より好ましくは2～40、2～35、2～30、2～28、2～25、2～22、2～20、2～18、2～17、2～15または2～12であり得る。

【0028】

他の代表的な範囲（残基の数、DPまたはDPnに関する範囲かどうかにかかわらず）としては、3、4、5、6、7、8、9、10または11のいずれか1つから、50、45、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13または12のいずれか1つまでが挙げられる。

【0029】

他の代表的な範囲（残基の数、DPまたはDPnに関する範囲かどうかにかかわらず）としては、8、9、10、11、12、13、14または15のいずれか1つから、50、45、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17または16のいずれか1つまでが挙げられる。

【0030】

他の代表的な範囲（残基の数、DPまたはDPnに関する範囲かどうかにかかわらず）としては、11、12、13、14、15、16、17または18のいずれか1つから、50、45、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20または19のいずれか1つまでが挙げられる。

【0031】

いくつかの実施形態では、より大きなサイズの結合体を作られるように、より大きなアルギネートオリゴマーを選択することが有利である場合もある。より大きな結合体は、ポリキシン群の抗生物質の感染部位および感染場所への選択的な送達を促進し得る。なぜなら、対象におけるかかる領域の血管透過性が、典型的には非感染領域の脈管構造におけるよりも高いからである。このため、より大きな結合体は、血流から非感染領域に入る可能性は低くなるが、透過性のより高い感染領域には入ることができるであろう。かかるより大きなオリゴマーの代表的なサイズ範囲は、例えば、20～100残基（または20～100のDPもしくはDPn）、または20、21、22、23、24もしくは25のいずれか1つから、100、90、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35もしくは30のいずれか1つの残基（またはこれらの範囲のいずれか1つのDPもしくはDPn）、または30、31、32、33、34もしくは35のいずれか1つから、100、90、80、75、70、65、60、55、50、45もしくは40のいずれか1つの残基（またはこれらの範囲のいずれか1つのDPもしくはDPn）であり得る。また、より小さなサイズのものであっても、これらの結果は、結合体中のアルギネートオリゴマーの数を増加させることによって達成され得る。

【0032】

アルギネートオリゴマーは、上記のように、グルコネートもしくはグルロン酸（G）および/またはマンヌロネートもしくはマンヌロン酸（M）の残基または単位を含有する（contain）（または含む（comprise））。本発明に係るアルギネートオリゴマーは、好ましくは、ウロン酸塩/ウロン酸残基のみまたは実質的にそれのみで構成されており（すなわち、本質的にそれからなる）、より具体的には、G残基および/またはM残基のみまたは実質的にそれのみで構成されている。別の表現をすると、本発明において使用されるアルギネートオリゴマーにおいて、少なくとも80%、より具体的には、少なくとも85、90、95または99%のモノマー残基が、ウロン酸塩/ウロン酸残基、または、特に、G残基および/もしくはM残基であり得る。言い換えれば、好ましくは、アルギネートオリゴマーは、他の残基または単位（例えば、他の糖残基、または、より具体的には、他のウロン酸/ウロン酸塩残基）を含まない。

【0033】

アルギネートオリゴマーは、好ましくは線状オリゴマーである。

【0034】

より具体的には、本発明に従って使用するために提案されているアルギネートオリゴマーは、少なくとも70%のG残基を含有する（すなわち、アルギネートオリゴマーのモノマー残基の少なくとも70%がG残基である）。したがって、特定の実施形態は、70～100%のG（グルロネート）残基を有する（例えば、含有する）アルギネートオリゴマーを含む。

【0035】

好ましくは、少なくとも75%または80%、特に、少なくとも85%または90%、さらに具体的には、少なくとも91、92、93、94、95、96、97、98または99%のモノマー残基がグルロネートである。一実施形態では、アルギネートオリゴマーは、オリゴグルロネート（すなわち、Gのホモオリゴマー、すなわち、100%G）であってもよい。

【0036】

さらに好ましい実施形態では、上述の本発明のアルギネートは、G残基の大部分がいわゆるGブロック中にある一次構造を有する。好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70または75%、最も好ましくは少なくとも80、85、90、92または95%のG残基がGブロック中にある。Gブロックは、少なくとも2個のG残基、好ましくは少なくとも3個の連続したG残基、より好ましくは少なくとも4個または5個の連続したG残基、最も好ましくは少なくとも7個の連続したG残基の連続配列である。

【0037】

特に、G残基の少なくとも90%が、別のG残基に（1-4）結合している。より具体的には、アルギネートのG残基の少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%が、別のG残基に（1-4）結合している。より具体的には、オリゴマー中のモノマー残基の少なくとも70%が、別のG残基に（1-4）結合したG残基、または、より好ましくは少なくとも75%、最も好ましくは少なくとも80、85、90、92、93、94、95、96、97、98、99%のオリゴマーのモノマー残基が、別のG残基に（1-4）結合したG残基である。また、2個のG残基のこの（1-4）結合は、隣接するグルロン単位に結合したグルロン単位として表すことができる。

【0038】

本発明において使用されるアルギネートオリゴマーは、当業者により一般に「高G」または「Gブロック」オリゴマーと呼ばれ、すなわち、高含有量のG残基またはGブロックを有する（例えば、モノマー残基の少なくとも70%が、Gであり、好ましくはGブロック中に配置されている）。

【0039】

本発明において使用されるアルギネートオリゴマーは、好ましくは3～35量体、より好ましくは3～28量体、特に4～25量体、例えば、5～20量体、特に6～22量体、特に8～20量体、特に10～15量体であり、例えば、分子量が、350～6400ダルトンまたは350～6000ダルトン、好ましくは550～5500ダルトン、好ましくは750～5000ダルトン、特に750～4500ダルトンまたは2000～3000ダルトンまたは900～3500ダルトンの範囲である。他の代表的なアルギネートオリゴマーとしては、上記のように、5、6、7、8、9、10、11、12または13個～50、45、40、35、28、25、22または20個の残基を有するオリゴマーが挙げられる。

【0040】

アルギネートオリゴマーは、単一の化合物であってもよいし、化合物（例えば、ある範囲の異なる重合度を有する）の混合物であってもよい。上記の如く、アルギネートオリゴマーにおけるモノマー残基は、同一であっても異なってもよく、すべてが荷電基を有する必要はないが、大部分（例えば、少なくとも60%、好ましくは少なくとも80%、

より好ましくは少なくとも90%)が荷電基を有するのが好ましい。荷電基の実質的な大部分、例えば少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%が同じ極性を有するのが好ましい。アルギネートオリゴマーにおいて、ヒドロキシル基の荷電基に対する比は、好ましくは少なくとも2:1、特に、少なくとも3:1である。

【0041】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、3~28、4~25、6~22、8~20もしくは10~15、または5~18もしくは7~15もしくは8~12、特に、10であってもよい。

【0042】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、3~24、4~23、5~22、6~21、7~20、8~19、9~18、10~17、11~16、12~15または13~14(例えば、13または14)であってもよい。

10

【0043】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、4~25、5~24、6~23、7~22、8~21、9~20、10~19、11~18、12~17、13~16、14~15(例えば、14または15)であってもよい。

【0044】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、5~26、6~25、7~24、8~23、9~22、10~21、11~20、12~19、13~18、14~17または15~16(例えば、15または16)であってもよい。

20

【0045】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、4~50、4~40、4~35、4~30、4~28、4~26、4~22、4~20、4~18、4~16または4~14であってもよい。

【0046】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、5~50、5~40、5~25、5~22、5~20、5~18、5~23、5~20、5~18、5~16または5~14であってもよい。

30

【0047】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、6~50、6~40、6~35、6~30、6~28、6~26、6~24、6~20、6~19、6~18、6~16または6~14であってもよい。

【0048】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、8~50、8~40、8~35、8~30、8~28、8~25、8~22、8~20、8~18、8~16または8~14であってもよい。

【0049】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、9~50、9~40、9~35、9~30、9~28、9~25、9~22、9~20、9~18、9~16または9~14であってもよい。

40

【0050】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、10~50、10~40、10~35、10~30、10~28、10~25、10~22、10~20、10~18、10~16または10~14であってもよい。

【0051】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、11~50、11~40、11~35、11~30、11~28、11~25、11~22、11~20、11~18、11~16または11~14であってもよい。

50

【0052】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、12~50、12~40、12~35、12~30、12~28、12~25、12~22、12~20、12~18、12~16または12~14であってもよい。

【0053】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、13~50、13~40、13~35、13~30、13~28、13~25、13~22、13~20、13~18、13~16または13~14(例えば、13または14)であってもよい。

【0054】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、14~50、14~40、14~35、14~30、14~28、14~25、14~22、14~20、14~18または14~16であってもよい。

【0055】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、15~50、15~40、15~35、15~30、15~28、15~25、15~22、15~20または15~18であってもよい。

【0056】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、18~50、18~40、18~35、18~30、18~28、18~25、18~22または18~20であってもよい。

【0057】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、20~100、20~90、20~80、20~75、20~70、20~65、20~60、20~55、20~50、20~45、20~40、20~35、20~30または20~25であってもよい。

【0058】

本発明のアルギネートオリゴマーの重合度(DP)または数平均重合度(DP_n)は、30~100、30~90、30~80、30~75、30~70、30~65、30~60、30~55、30~50、30~45、30~40または30~35であってもよい。

【0059】

好ましくは、本発明のアルギネートオリゴマーは、本明細書に開示されている範囲外の重合度を有するアルギネートオリゴマーを実質的に含まず、好ましくは本質的に含まない。これは、本発明のアルギネートオリゴマーの分子量分布、例えば、適切な範囲外のDPを有する、本発明に従って使用されるアルギネートオリゴマーの各モルのパーセンテージで表し得る。分子量分布は、10モル%以下、好ましくは9、8、7、6、5、4、3、2または1モル%以下のDPが、DP_nの適切な上限よりも3、2または1高くなっているのが好ましい。同様に、10モル%以下、好ましくは9、8、7、6、5、4、3、2または1モル%以下のDPが、DP_nの適切な下限の数値より3、2または1低いことが好ましい。

【0060】

好適なアルギネートオリゴマーは、国際公開第2007/039754号、国際公開第2007/039760号、国際公開第2008/125828号および国際公開第2009/068841号に記載されており、それらの開示の全体を、参照により本明細書に明示的に援用する。

【0061】

代表的な好適なアルギネートオリゴマーは、DP_nが5~30の範囲内、グルコネート率(F_G)が少なくとも0.80、マンヌロネート率(F_M)が0.20以下、および少なくとも95モル%のDPが25以下である。

10

20

30

40

50

【0062】

さらに好適なアルギネートオリゴマーは、数平均重合度が7～15（好ましくは8～12）の範囲内、グルコネート率（ F_G ）が少なくとも0.85（好ましくは少なくとも0.90）、マンヌロネート率（ F_M ）が0.15以下（好ましくは0.10以下）、および少なくとも95モル%の重合度が17未満（好ましくは14未満）である。

【0063】

さらに好適なアルギネートオリゴマーは、数平均重合度が5～18（特に7～15）の範囲内、グルコネート率（ F_G ）が少なくとも0.80（好ましくは少なくとも0.85、特に少なくとも0.92）、マンヌロネート率（ F_M ）が0.20以下（好ましくは0.15以下、特に0.08以下）、および少なくとも95モル%の重合度が20未満（好ましくは17未満）である。

10

【0064】

さらに好適なアルギネートオリゴマーは、数平均重合度が5～18の範囲内、グルコネート率（ F_G ）が少なくとも0.92、マンヌロネート率（ F_M ）が0.08以下、および少なくとも95モル%の重合度が20未満である。

【0065】

さらに好適なアルギネートオリゴマーは、数平均重合度が5～18（好ましくは7～15、より好ましくは8～12、特に約10）の範囲内、グルコネート率（ F_G ）が少なくとも0.80（好ましくは少なくとも0.85、より好ましくは少なくとも0.90、特に少なくとも0.92、最も特に少なくとも0.95）、マンヌロネート率（ F_M ）が0.20以下（好ましくは0.15以下、より好ましくは0.10以下、特に0.08以下、最も特に0.05以下）、および少なくとも95モル%の重合度が20未満（好ましくは17未満、より好ましくは14未満）である。

20

【0066】

さらに好適なアルギネートオリゴマーは、数平均重合度が7～15（好ましくは8～12）の範囲内、グルコネート率（ F_G ）が少なくとも0.92（好ましくは少なくとも0.95）、マンヌロネート率（ F_M ）が0.08以下（好ましくは0.05以下）、および少なくとも95モル%の重合度が17未満（好ましくは14未満）である。

【0067】

さらに好適なアルギネートオリゴマーは、数平均重合度が5～18の範囲内、グルコネート率（ F_G ）が少なくとも0.80、マンヌロネート率（ F_M ）が0.20以下、および少なくとも95モル%の重合度が20未満である。

30

【0068】

さらに好適なアルギネートオリゴマーは、数平均重合度が7～15の範囲内、グルコネート率（ F_G ）が少なくとも0.85、マンヌロネート率（ F_M ）が0.15以下、および少なくとも95モル%の重合度が17未満である。

【0069】

さらに好適なアルギネートオリゴマーは、数平均重合度が7～15の範囲内、グルコネート率（ F_G ）が少なくとも0.92、マンヌロネート率（ F_M ）が0.08以下、および少なくとも95モル%の重合度が17未満である。

40

【0070】

さらに好適なアルギネートオリゴマーは、数平均重合度が5～20の範囲内、グルコネート率（ F_G ）が少なくとも0.85、およびマンヌロネート率（ F_M ）が0.15以下である。

【0071】

さらに好適なアルギネートオリゴマーは、数平均重合度が5～20の範囲内、グルコネート率（ F_G ）が0.9～0.95、およびマンヌロネート率（ F_M ）が0.05～0.1であり、これは、90～95%のG残基を有し、平均分子量が2600Daのアルギネートオリゴマーと表し得る。さらに好適なアルギネートオリゴマーは、数平均重合度が約13（例えば、12、13または14）、グルコネート率（ F_G ）が少なくとも約0.8

50

0、0.85、0.87、0.88、0.90または0.93（例えば、0.92、0.93または0.94）、および対応するマンヌロネート率（ F_M ）が約0.20、0.15、0.13、0.12、0.10または0.07以下（例えば、0.08、0.07または0.06）である。

【0072】

さらに好適なアルギネートオリゴマーは、数平均重合度が約21（例えば、20、21または22）、グルロネート率（ F_G ）が少なくとも約0.80（例えば、0.85、0.87、0.88、0.90、0.92、0.94または0.95）、および対応するマンヌロネート率（ F_M ）が約0.20以下（例えば、0.15、0.13、0.12、0.10、0.08、0.06、0.05）である。

10

【0073】

さらに好適なアルギネートオリゴマーは、数平均重合度が約6（例えば、5、6または7）、グルロネート率（ F_G ）が少なくとも約0.80（例えば、0.85、0.87、0.88、0.90、0.92、0.94または0.95）、および対応するマンヌロネート率（ F_M ）が約0.20以下（例えば、0.15、0.13、0.12、0.10、0.08、0.06、0.05）である。

【0074】

したがって、本発明に有利な特定群のアルギネートオリゴマーは、いわゆる「高G」または「Gブロック」オリゴマーとして定義される、すなわち、G残基またはGブロックの含有量が高い（例えば、モノマー残基の少なくとも70%がGであり、好ましくはGブロック中に配置されている）アルギネートオリゴマーであることが分かるであろう。しかしながら、さらに後述する如く、特に「高M」もしくは「Mブロック」オリゴマーまたはMGブロックオリゴマーを含む他のタイプのアルギネートオリゴマーも使用してもよい。従って、単一モノマータイプの割合が高く、且つ、前記のこのタイプのモノマーが、そのモノマータイプの連続配列中に主として存在するアルギネートオリゴマーであり、特に好ましいオリゴマー、例えば、オリゴマー中のモノマー残基の少なくとも70%が、別のG残基に（1-4）結合したG残基であるか、またはより好ましくはオリゴマーのモノマー残基の少なくとも75%、最も好ましくは少なくとも80、85、90、92、93、94、95、96、97、98、99%が別のG残基に（1-4）結合したG残基であるオリゴマーを意味する。また、この2個のG残基の（1-4）結合は、隣接するグルロン単位に結合したグルロン単位として表すこともできる。

20

30

【0075】

さらなる実施形態では、アルギネートオリゴマーのモノマー残基の少なくとも50%、特に50%超が、M残基（すなわち、マンヌロネートまたはマンヌロン酸）であってもよい。言い換えれば、アルギネートオリゴマーは、少なくとも50%または50%超のマンヌロネート（またはマンヌロン酸）残基を含有する。したがって、具体的な実施形態は、50~70%のM（マンヌロネート）残基または、例えば、70~100%のM（マンヌロネート）残基を有する（例えば含有する）アルギネートオリゴマーを含む。更に具体的な実施形態は、71~85%のM残基または85~100%のM残基を含有するオリゴマーも含む。したがって、本発明のこの実施形態に従って使用するための代表的なアルギネートオリゴマーは、70%超のM残基を含有する（すなわち、アルギネートオリゴマーのモノマー残基の70%超が、M残基である）。

40

【0076】

他の実施形態では、少なくとも50%または60%、より具体的には少なくとも70%または75%、更により具体的には少なくとも80、85、90、95または99%のモノマー残基がマンヌロネートである。一実施形態では、アルギネートオリゴマーは、オリゴマンヌロネート（すなわち、Mのホモオリゴマー、すなわち、100%M）であってもよい。

【0077】

更なる実施形態では、上述の本発明のアルギネートは、M残基の大部分がいわゆるMブ

50

ロック中にある一次構造を有する。この実施形態では、好ましくは少なくとも 50 %、より好ましくは少なくとも 70 または 75 %、最も好ましくは少なくとも 80、85、90 または 95 % の M 残基が、M ブロック中にある。M ブロックは、少なくとも 2 個の M 残基、好ましくは少なくとも 3 個の連続した M 残基、より好ましくは少なくとも 4 個または 5 個の連続した M 残基、最も好ましくは少なくとも 7 個の連続した M 残基の連続配列である。

【0078】

具体的には、M 残基の少なくとも 90 % が、別の M 残基に (1 - 4) 結合している。より具体的には、アルギネートの M 残基の少なくとも 95 %、より好ましくは少なくとも 98 %、最も好ましくは少なくとも 99 % が、別の M 残基に (1 - 4) 結合している。

10

【0079】

他の好ましいオリゴマーは、オリゴマー中のモノマー残基の少なくとも 70 % が、別の M 残基に (1 - 4) 結合した M 残基であるか、またはより好ましくはオリゴマーのモノマー残基の少なくとも 75 %、最も好ましくは少なくとも 80、85、90、92、93、94、95、96、97、98、99 % が別の M 残基に (1 - 4) 結合した M 残基であるアルギネートオリゴマーである。また、この 2 個の M 残基の (1 - 4) 結合は、隣接したマンヌロン単位に結合したマンヌロン単位として表すこともできる。

【0080】

また更なる実施形態では、本発明のアルギネートオリゴマーは、M 残基と G 残基の交互配列を含む。少なくとも 3 個、好ましくは少なくとも 4 個の M 残基と G 残基の交互配列は、MG ブロックを表す。好ましくは、本発明のアルギネートオリゴマーは、MG ブロックを含む。より具体的に表すと、MG ブロックは、G 残基および M 残基からなる少なくとも 3 個の連続した残基の配列であり、連続配列中の各非末端 (内部) G 残基は、M 残基に (1 - 4) および (4 - 1) 結合しており、連続配列中の各非末端 (内部) M 残基は、G 残基に (1 - 4) および (4 - 1) 結合している。好ましくは、MG ブロックは、少なくとも 5 個または 6 個の連続した残基、より好ましくは少なくとも 7 個または 8 個の連続した残基である。

20

【0081】

更なる実施形態では、アルギネートオリゴマー中の少数ウロネート (すなわち、マンヌロネートまたはグルコネート) が、主に MG ブロック中に見られる。この実施形態では、MG ブロックアルギネートオリゴマー中の少数ウロネートモノマーの好ましくは少なくとも 50 %、より好ましくは少なくとも 70 または 75 %、最も好ましくは少なくとも 80、85、90 または 95 % が、MG ブロック中に存在する。別の実施形態では、アルギネートオリゴマーは、オリゴマー中の G 残基および M 残基の少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 99 %、例えば 100 % が、MG ブロック中に配置されるようにアレンジされている。

30

【0082】

本発明は、その最も広い範囲において、オリゴマーのモノマー残基の 1 % 以上 100 % 未満が G 残基 (すなわちグルコネートまたはグルロン酸) であり、より具体的には、以下に更に明確にするように、モノマー残基の少なくとも 30 % が G 残基である実施形態にまで及ぶ。したがって、その最も広い範囲において、アルギネートオリゴマーを含有する MG ブロックは、1 % 以上 100 % 未満のグルコネート (またはグルロン酸) 残基を含有し得るが、通常、アルギネートオリゴマーを含有する MG ブロックは、30 % 以上 (または 35、40 もしくは 45 % 以上または 50 % の G) 100 % 未満の G を含有する。したがって、具体的な実施形態は、1 ~ 30 % の G (グルコネート) 残基、30 ~ 70 % の G (グルコネート) 残基または 70 ~ 99 % の G (グルコネート) 残基を有する (例えば、含有する) アルギネートオリゴマーを含有する MG ブロックを含む。よって、本発明に従って使用するためのアルギネートオリゴマーを含有する代表的な MG ブロックは、30 % 超 70 % 未満の G 残基を含有し得る (すなわち、MG ブロックアルギネートオリゴマーのモ

40

50

ノマー残基の30%超70%未満がG残基である)。

【0083】

好ましくは、アルギネートオリゴマーを含有するMGブロックのモノマー残基の30%超、より具体的には35%超または40%超、更により具体的には45、50、55、60または65%超(ただし、いずれの場合も70%未満)がグルロネートである。また、アルギネートオリゴマーを含有するMGブロックのモノマー残基の70%未満、より好ましくは65%または60%未満、更により好ましくは55、50、45、40または35%未満(ただし、いずれの場合も30%超)がグルロネートである。これらの値の任意の組合せにより形成される任意の範囲を選択してもよい。したがって、例として、アルギネートオリゴマーを含有するMGブロックは、例えば、35%~65%、40%~60%または45%~55%のG残基を有し得る。

10

【0084】

別の実施形態では、アルギネートオリゴマーを含有するMGブロックは、ほぼ等量のG残基およびM残基(例えば、その比率は、65%のG/35%のM~35%のG/65%のM、例として、60%のG/40%のM~40%のG/60%のM、55%のG/45%のM~45%のG/55%のM、53%のG/47%のM~47%のG/53%のM、51%のG/49%のM~49%のG/51%のM、例えば、約50%のGと約50%のM)を有していてもよく、これらの残基は主に、好ましくは全体的にまたは可能な限り完全に、MGの交互パターンで配置されている(例えば、M残基およびG残基の少なくとも50%または少なくとも60、70、80、85、90もしくは95%または100%が、MGの交互配列中にある)。

20

【0085】

ある特定の実施形態では、本発明において使用されるオリゴマーの末端ウロン酸残基は、二重結合、特に、C₄とC₅原子の間に位置する二重結合を持たない。かかるオリゴマーは、飽和末端ウロン酸残基を有すると表現し得る。当業者は、過度の負担なく、飽和末端ウロン酸残基を有するオリゴマーを調製することができるであろう。これは、かかるオリゴマーを得る生成技術の使用を通して、または不飽和末端ウロン酸残基を有するオリゴマーを得るプロセスにより生成されたオリゴマーを変換する(飽和させる)ことによるものであってもよい。

【0086】

アルギネートオリゴマーは、通常、電荷を保有するため、アルギネートオリゴマーに対する対イオンは、任意の生理学的に許容できるイオン、特に、荷電薬剤物質に一般的に使用されるもの(例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、塩化物、メシレート、メグルミン等)であってもよい。アルギネートのゲル化を促進するイオン(例えば、2族の金属イオン)も、使用し得る。

30

【0087】

アルギネートオリゴマーは、適切な数のグルロネート残基およびマンヌロネート残基の重合により生成された合成物質であってもよいが、本発明において使用されるアルギネートオリゴマーは、上述したものなどのような天然源、すなわち天然アルギネート原料から、好都合に入手、生成または誘導し得る。

40

【0088】

本発明により使用可能なアルギネートオリゴマーを生成するための多糖からオリゴ糖への切断は、酵素消化および酸加水分解等の従来の多糖溶解技法を用いて行われてもよい。好都合な一実施形態では、酸加水分解を使用して本発明のアルギネートオリゴマーを調製する。他の実施形態では、酵素消化を更なる処理工程(単数または複数)と共に使用し、オリゴマー中の末端ウロン酸を飽和させる。

【0089】

その後、オリゴマーは、イオン交換樹脂を用いてクロマトグラフィにより、または分画沈殿もしくは可溶化もしくは濾過により、多糖分解生成物から分離し得る。米国特許第6,121,441号明細書および国際公開第2008/125828号(その全体を参照

50

により本明細書に明示的に援用する)には、本発明において使用されるアルギネートオリゴマーの調製に好適な方法が記載されている。更なる情報および考察は、例えば、「親水コロイドのハンドブック (Handbooks of Hydrocolloids)」(Ed. Phillips and Williams, CRC, Boca Raton, Florida, USA, 2000) (このテキストは、その全体を参照により本明細書に明示的に援用する)に見られる。

【0090】

アルギネートオリゴマーはまた、化学的に修飾してもよく、これには荷電基を付加する修飾(カルボキシル化またはカルボキシメチル化グリカン等)や、(例えば、過ヨウ素酸酸化により)フレキシビリティを変化させるよう修飾したアルギネートオリゴマーが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0091】

本発明に係る使用に好適なアルギネートオリゴマー(例えば、オリゴグルロン酸)は、ラミナリア・ハイパーボラ(*Laminaria hyperbora*)およびレッソニア・ニグレセンス(*Lessonia nigrescens*)(ただしこれらに限定されない)由来のアルギン酸の酸加水分解、中性pHでの溶解、pHを3.4に低下させアルギネートオリゴマー(オリゴグルロン酸)を沈殿させるための無機酸の添加、弱酸を用いた洗浄、中性pHでの再懸濁および凍結乾燥により、好都合に生成し得る。

【0092】

本発明のアルギネートオリゴマーを生成するためのアルギネートは、好適な細菌源(例えば、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)またはアゾトバクター・ビネランジー(*Azotobacter vinelandii*))から直接得ることもできる。

20

【0093】

G残基の大部分が単一残基としてではなくGブロック中に配置されている一次構造を有するアルギネートオリゴマーを必要とする実施形態では、藻類源が、これらの生物において産生されるアルギネートがこれらの構造を有する傾向にあることから、最も好適であると考えられる。細菌源は、異なる構造のアルギネートオリゴマーを得るのにより好適であり得る。

【0094】

シュドモナス・フルオレセンス(*Pseudomonas fluorescens*)およびアゾトバクター・ビネランジーにおけるアルギネート生合成に関与する分子装置が、クローニングされており、且つ、特徴が特定されており(国際公開第94/09124号、Ertesvag, H.ら, *Metabolic Engineering*, 1999, Vol 1, 262-269、国際公開第2004/011628号、Gimmestad, M.ら(上記参照)、Remminghorst and Rehm, *Biotechnology Letters*, 2006, Vol 28, 1701-1712、Gimmestad, M.ら, *Journal of Bacteriology*, 2006, Vol 188(15), 5551-5560)、これらの系を操作することにより、目的に合わせた一次構造を有するアルギネートが、容易に得られる。

30

【0095】

アルギネート(例えば、藻類原料)のG含量は、例えば、アゾトバクター・ビネランジー由来のマヌロナン(mannuronan)C-5エピメラーゼまたは他のエピメラーゼ酵素を用いて、エピマー化により増加させることができる。よって、例えば、*in vitro*でのエピマー化を、シュドモナスまたはアゾトバクター由来の単離エピメラーゼ、例えばシュドモナス・フルオレセンスもしくはアゾトバクター・ビネランジー由来のAlgGまたはアゾトバクター・ビネランジー由来のAlgE酵素(AlgE1~AlgE7)を用いて実施してもよい。アルギネートを産生する能力を有する他の生物(特に藻類)由来のエピメラーゼの使用も、具体的に検討されている。アゾトバクター・ビネランジーAlgEエピメラーゼを用いた低Gアルギネートの*in vitro*でのエピマー化は、Ertesvagら(上記参照)およびStrugalaら(食品産業用のゴム質と安定剤(Gums and Stabilisers for the Food Industry), 2004, 12, The Royal Society of Chemistry, 84-94)に詳細に記載されている。

40

【0096】

50

アルギネートまたはアルギネートオリゴマーを含有する G ブロックを得るために、A 1 g E 4 以外の 1 つ以上のアゾトバクター・ピネランジー A 1 g E エピメラーゼを用いるエピマー化が、これらの酵素が G ブロック構造を産生する能力を有するため、好ましい。一方、A 1 g E 4 エピメラーゼは、G ブロックを産生するのではなく、M 残基に結合した単一の G 残基を産生するように個々の M 残基を優先的にエピマー化するのであることが分かっているため、この酵素を使用し、交互に連なる M / G 配列または単一の G 残基を含有する一次構造を有するアルギネートまたはアルギネートオリゴマーを作り出すことができる。これらの酵素の異なる組合せを使用することにより、特定の一次構造を得ることができる。

【 0 0 9 7 】

これらの酵素の突然変異型または他の生物由来の相同体も、有用であるとして具体的に検討されている。国際公開第 9 4 / 0 9 1 2 4 号には、例えば、エピメラーゼの様々なドメインまたはモジュールをコードする D N A 配列が、シャッフルされているかまたは欠失させ且つ組み換えられているエピメラーゼ配列によりコードされた組換えまたは修飾マンヌロナン C - 5 エピメラーゼ酵素 (A 1 g E 酵素) が記載されている。また、例えば、A 1 g G 遺伝子または A 1 g E 遺伝子の部位特異的突然変異誘発またはランダム突然変異誘発により得られる、天然のエピメラーゼ酵素 (A 1 g G または A 1 g E) の突然変異体を使用してもよい。

【 0 0 9 8 】

異なるアプローチは、シュードモナス属 (Pseudomonas) およびアゾトバクター属 (Azotobacter) の生物を作り出すことであり、これらは、それらの突然変異体が、後のアルギネートオリゴマー産生に必要とされる構造のアルギネートまたは必要とされる構造およびサイズ (または分子量) のアルギネートオリゴマーさえも産生するように、それらのエピメラーゼ遺伝子の一部または全てにおいて突然変異させたものである。突然変異した A 1 g G 遺伝子を有する多数のシュードモナス・フルオレセンス生物の生成が、国際公開第 2 0 0 4 / 0 1 1 6 2 8 号および Gimmestad, M. ら, 2003 (上記参照) に詳細に記載されている。突然変異した A 1 g E 遺伝子を有する多数のアゾトバクター・ピネランジー生物の生成は、Gimmestad, M. ら, 2006 (上記参照) に開示されている。

【 0 0 9 9 】

更なるアプローチは、アゾトバクター属またはシュードモナス属の生物由来の内在性エピメラーゼ遺伝子を欠失または不活性化させ、その後、1 つ以上の外来性エピメラーゼ遺伝子を導入することであり、これらは、突然変異していても突然変異していなくともよく (すなわち、野生型であっても修飾されていてもよく) 、また、それらの発現は、例えば、誘導性のまたは他の「制御可能なプロモータ」の使用により制御し得る。遺伝子の適切な組合せを選択することにより、所定の一次構造を有するアルギネートを生成することができる。

【 0 1 0 0 】

また更なるアプローチは、シュードモナス属および / またはアゾトバクター属のアルギネート生合成機構の一部または全てを、非アルギネート産生生物 (例えば、大腸菌) 中に導入し、これらの遺伝子操作生物からアルギネートの産生を誘導することであろう。

【 0 1 0 1 】

これらの培養系システムを用いる場合、アルギネートまたはアルギネートオリゴマー生成物の一次構造は、培養条件により影響され得る。特定の生物により産生されるアルギネートの一次構造を操作するために、温度、モル浸透圧濃度、栄養レベル / 栄養源および大気パラメータなどの培養パラメータを調整することは、十分に当業者の能力範囲内である。

【 0 1 0 2 】

「 G 残基 / G 」および「 M 残基 / M 」またはグルロン酸もしくはマンヌロン酸またはグルコネートもしくはマンヌロネートは、グルロン酸 / グルコネートおよびマンヌロン酸 / マンヌロネート (具体的には、 - L - グルロン酸 / グルコネートおよび - D - マンヌ

10

20

30

40

50

ロン酸／マンヌロネート）と同じ意味に解釈されるものとし、さらにそれらの誘導体が含まれ、それらの誘導体は、それらの抗菌効力を著しく低下させることなく前記抗生物質の宿主毒性を低下させる能力、および任意に、抗生物質の抗菌作用を延長する能力、および任意に、前記抗生物質の初期PK／PDプロファイル（未修飾オリゴマーより実質的に低い）を維持する能力をもたらすことなく、1つ以上の利用可能な側鎖または基が修飾されている。一般的な糖修飾基としては、アセチル基、スルフェート基、アミノ基、デオキシ基、アルコール基、アルデヒド基、ケトン基、エステル基およびアンヒドロ基が挙げられるであろう。アルギネートオリゴマーはまた、化学修飾し、荷電基（例えば、カルボキシル化またはカルボキシメチル化グリカンなど）を付加してもよく、フレキシビリティを（例えば、過ヨウ素酸酸化により）変化させてもよい。当業者は、オリゴ糖の単糖サブユニットに対して行うことができる更なる化学修飾について認識しており、これらの化学修飾は、本発明において使用されるアルギネートオリゴマーに適用することができる。

10

20

30

40

50

【0103】

アルギネートオリゴマーとポリミキシン群の抗生物質との間の直接共有結合は、アルギネートオリゴマーの原子とポリミキシン群の抗生物質の原子とにより形成される共有結合である。結合に寄与する原子は、組み合わせてまたは単独で、炭素、酸素、硫黄、窒素および／またはリンであってもよい。結合は、一重、二重または三重であってもよい。ある特定の実施形態では、結合は、有機官能基の一部である。当業者は、アルギネートオリゴマーとポリミキシン群の抗生物質との間のリンカーとして作用し得る好適な有機官能基に利用可能な選択肢に完全に精通しているであろう。その非限定的な例としては、エステル、炭酸エステル、オルトエステル、ケトン、ケタール、ヘミケタール、ケテン、エーテル、アセタール、ヘミアセタール（hemiacetal）、ペルオキシ、メチレンジオキシ、カルバメート、アミド、アミン、アミノオキシド、ヒドロキサム酸、イミン、イミド、イミデート、アジド、アゾ、オキシム、カルボジイミド、カルバゾン、ヒドラゾン（hydrozone）、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、カルボノチオイル、チオアミド、チオエステル、チオエーテル、チオケトン、チオケタール、スルホネートエステル、ジチオカルバメート、セミカルバゾン、ホスフィンまたはホスホジエステル官能基が挙げられる。実施例に示されるように、アミド結合およびエステル結合の形成が、便利かつ有益であり得る。

【0104】

共有結合分子リンカーは、アルギネートオリゴマーおよびポリミキシン群の抗生物質と共有結合することができる共有結合した原子から形成される構造を有する任意の分子、典型的には有機分子またはその一部であってもよい。結合体内には、分子リンカーを介してアルギネートオリゴマーからポリミキシン群の抗生物質まで、連続した一連の共有結合した原子が存在するであろう。好ましい実施形態では、前記一連の共有結合した原子における共有結合の少なくとも1つは、上述した通りである。しかしながら、分子リンカーは、ポリミキシン群の抗生物質とアルギネートオリゴマーとの間の共有結合に寄与していない分子の部分に、非共有結合（例えば、イオン結合）をさらに含んでいてもよい。

【0105】

共有結合分子リンカーは、直鎖状、環状または分岐状であってもよい。ある特定の実施形態では、分子リンカーの分子量は、1500ダルトン以下、例えば、1250、1000、900、800、700、600、500、400、300、200または100ダルトン以下であろう。

【0106】

ある特定の実施形態では、アルギネートオリゴマーと共有結合分子リンカーとの間の少なくとも1つの直接共有結合は、上述の通りである。ある特定の実施形態では、ポリミキシン群の抗生物質と共有結合分子リンカーとの間の少なくとも1つの直接共有結合は、上述の通りである。各結合は、同じであっても異なってもよい。共有結合リンカー分子は、好ましくは、分子リンカーを介してアルギネートオリゴマーからポリミキシン群の抗生物質まで連続した一連の共有結合した原子に寄与している、その分子の一部に、少なく

とも1つの上述の共有結合を含んでいてもよい。

【0107】

共有結合分子リンカーは、例えば、15個以下のアミノ酸残基の（例えば、12、10、8、6、5、4、3または2個以下のアミノ酸残基の）アミノ酸またはペプチドであってもよいし、それを含んでいてもよい。アミノ酸は、上記アミノ酸のいずれであってもよく、ペプチドは、上記アミノ酸のいずれかを含んでいてもよい。使用し得るペプチドリナーの具体例としては、Glyおよび/またはSer残基のペプチド（例えば、(Gly)₂₋₈、(Ser)₂₋₈、(GGGGS)₁₋₃）、(EAAAK)₁₋₃；A(EAAAK)₁₋₃；Leu-Glu；(Xaa-Pro)₁₋₆（例えば、(Glu-Pro)₁₋₆、(Lys-Pro)₁₋₆、(Ala-Pro)₁₋₆；VSQTSKLTR AETVFPDV（第XIa因子/第VIIa因子感受性切断）、PLGLWA（マトリックスメタロプロテアーゼ-1感受性切断）；RVLAEA（HIV-1プロテアーゼ感受性切断）；EDVVCC SMSY（NS3プロテアーゼ感受性切断；GGIEGR GS（第Xa因子感受性切断）；TRHRQPR GWE（フューリン感受性切断）；AGNRVRR SVG（フリン感受性切断）；GFLG（カテプシンB感受性切断）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0108】

共有結合分子リンカーは、グルコネートもしくはマンノロネートまたはそれらから形成されるポリマー以外の単糖類またはオリゴ糖類（例えば、12アミノ酸残基以下（例えば、10、8、6、5、4、3または2個以下のアミノ酸残基）の糖類）であってもよいし、またはそれを含んでいてもよい。したがって、共有結合分子リンカーは、単糖類、二糖類もしくは三糖類またはその糖誘導体、例えば、アルドン酸およびウロン酸、デオキシ糖もしくはアミノ糖、硫酸化糖、ならびに糖アルコールなどであってもよい。単糖類または二糖類もしくは三糖類の単糖残基の1個以上は、ピラノース型もしくはフラノース型および/または適切な場合にはL型もしくはD型のトリオース、テトロース、ペントース、ヘキソース、ヘプトース、オクトース、ノノースもしくはデコースおよび/またはそれらの糖誘導体であってもよい。ペントースまたはヘキソース糖類/残基が好ましく、例えば、マンノース（例えば、D-マンノース）、ガラクトース（例えば、D-ガラクトース）、グルコース（例えば、D-グルコース）、フルクトース、フコース（例えば、L-フコース）、N-アセチル-グルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、ラムノース、ガラクトサミン、グルコサミン（例えば、D-グルコサミン）、ガラクトツロン酸、グルクロン酸、N-アセチルノイラミン酸、メチルD-マンノピラノシド（マンノシド）、-メチル-グルコシド、ガラクトシド、リボース、キシロース、アラビノース、サッカラート、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、グリセロールおよびこれらのモノマーの誘導体が挙げられる。二糖類は、実例として、アカルビオシン、アロラクトース、セロビオース、キトビオース、ガラクトース-アルファ-1,3-ガラクトース、デンチオビオース（dentiobiose）、イソマルト、イソマルトース、イソマルツロース、コージビオース、ラクチトール、ラクトビオン酸、ラクトース、ラクツロース、ラミナリビオース、マルクトール、マルトース、マンノビオース、メリビオース、メリビウロース、ネオヘスペリドース、ニゲロース、ロビノース、ルチノース、サンブビオース、ソホロース、スクラルファート、スクラロース、スクロース、スクロースアセテートイソブチレート、スクロースオクタアセテート、トレハロース、ツルラノース（truranose）、キシロビオースまたはこれら二糖類の誘導体が挙げられる。

20

30

40

【0109】

共有結合分子リンカーは、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、すなわち核酸（例えば、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド）であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。

【0110】

リンカーはまた、直鎖、分岐もしくは環状、置換もしくは非置換のアルキル、アルケニルまたはアルキニル（alkynyl）基（典型的には、C₂₋₈）あるいはそれらの誘導体、例

50

えば、アミノヘキサン酸、あるいは市販の様々なPEG（ポリエチレングリコール）リンカーの1つなどであってもよいし、それを含んでいてもよい。

【0111】

好適な共有結合リンカー分子のさらなる例としては、アセチル基、サクシニル基、アコニチル（シスまたはトランス）基、グルタリル基、メチルスクシニル基、トリメリチルシステアミン（trimellityl cysteamine）基、ペニシラミン基、N-（2-メルカプトプロピオニル）グリシン基、2-メルカプトプロピオン酸基、ホモシステイン基、3-メルカプトプロピオン酸基およびデアミノ-ペニシラミン基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0112】

ある特定の実施形態において、共有結合リンカー分子は、上記の複数の分子および/または基であってもよい。

【0113】

ある特定の実施形態において、直接共有結合または共有結合リンカー分子（より具体的には、リンカー分子内の共有結合、リンカー分子とアルギネートオリゴマーとの間の共有結合および/またはリンカー分子とポリミキシン群の抗生物質との間の共有結合）は、対象における標的部位または場所の典型的な条件下、または好都合には本質的に標的部位または場所に固有の条件下（例えば、細菌感染症、気道（特に、肺、より具体的には、嚢胞性線維症患者の肺を含む下気道）または創傷（特に、慢性創傷）の典型的な条件下）で溶解できるように選択される。このようにして、ポリミキシン群の抗生物質を、標的部位に対してより選択的に送達し得る。

【0114】

特定の実施形態では、通常の生理的pH（pH7.2）より低いpH、すなわち酸性pH（例えば、約3～約7、6.5、6、5.5、5、4.5、4または3.5のpH）に敏感な（で不安定な、分解する、溶解する）、共有結合、当該共有結合を含有する官能基またはリンカー分子を選択してもよい。炎症、特に感染により引き起こされる炎症の部位または場所は、典型的にはこれらの範囲のpHを有する。エステル、シス-アコニチル、ジスルフィドおよびヒドラゾンを含む官能基は、低いpHに敏感であり得、すなわち、酸不安定性と言える。

【0115】

特定の実施形態では、活性酸素種に敏感な共有結合、官能基またはリンカー分子を選択してもよい。炎症、特に感染により引き起こされる炎症の部位または場所は、典型的には高レベルの活性酸素種を有する。チオケタールおよびチオエーテルを含む官能基は、活性酸素種に敏感であり得る

さらなる特定の実施形態では、標的部位でのみ産生もしくは分泌される酵素または標的部位で過剰産生もしくは過剰分泌される酵素により溶解される共有結合、官能基またはリンカー分子を選択してもよい。これには、グリコシダーゼ、ヌクレアーゼおよびペプチダーゼなどの酵素、特に感染細菌によって分泌されるものおよび宿主の炎症細胞によって分泌されるもの、例えば、リゾチーム、アルギネートリナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼI、制限酵素、好中球エラスターゼ、カテプシン、ホスホリパーゼおよび-ラクタマーゼが挙げられる。しかしながら、アルギネートオリゴマーまたはポリミキシン群の抗生物質を分解することができる酵素によって溶解されない共有結合、官能基またはリンカー分子を選択することが有利である場合もあり、そのため、ポリミキシン群の抗生物質からのアルギネートオリゴマーの分離は、アルギネートオリゴマーまたはポリミキシン群の抗生物質の分解とは別に生じる。

【0116】

他の実施形態では、直接共有結合または共有結合リンカー分子は、対象における標的部位もしくは場所（例えば、上記の場所、または結合体、投与後にそれらの場所および部位への途中で遭遇する可能性のある場所もしくは部位および/またはその身体における分配中に結合体遭遇する可能性のある場所もしくは部位）の典型的な条件下、または好都合

10

20

30

40

50

合には本質的に標的部位もしくは場所に固有の条件下、安定性を持つように選択してもよい。例えば、アミド結合、チオエーテル結合またはGly-Glyペプチドリinkerがここでは好適であり得る。

【0117】

さらなる特定の実施形態では、ポリミキシン群の抗生物質の初期PK/PDプロファイルに類似の、好ましくは実質的にまたは本質的に同一の初期PK/PDプロファイルを有するポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体を得られる共有結合、官能基またはリンカー分子を選択し得る。本発明によれば、PK/PDモデルは、生体膜拡散の2コンパートメントモデル、例えば、Azzopardi（上記参照）および/または実施例4に記載されたものであってもよく、プロファイルは、供試活性剤の投与後12時間、例えば、10、8、6または4時間以内に決定される。エステル結合が、例えば、ここでは好適であり得る。

10

【0118】

好ましい実施形態では、ポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体は、アルギネート上のカルボキシル基およびポリミキシン上のアミン基から形成されるアミド結合を介してポリミキシン群の抗生物質に共有結合した少なくとも1つのアルギネートオリゴマーからなる。好ましくは、ポリミキシン群の抗生物質は、コリスチン（例えば、ポリミキシンE1またはE2）またはポリミキシンB（例えば、ポリミキシンB1、B1-IまたはB2）である。アルギネートオリゴマーは、好ましくは2~100個のモノマー残基を含有する。アルギネートオリゴマーはまた、少なくとも70%のG残基も有し得る。

20

【0119】

好ましい実施形態では、ポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体は、アルギネート上のカルボキシル基およびポリミキシン上のヒドロキシル基から形成されるエステル結合を介してポリミキシン群の抗生物質に共有結合した少なくとも1つのアルギネートオリゴマーからなる。好ましくは、ポリミキシン群の抗生物質は、コリスチン（例えば、ポリミキシンE1またはE2）またはポリミキシンB（例えば、ポリミキシンB1、B1-IまたはB2）である。アルギネートオリゴマーは、好ましくは2~100個のモノマー残基を含有する。アルギネートオリゴマーはまた、少なくとも70%のG残基も有し得る。

【0120】

複数のアルギネートオリゴマーがポリミキシン群の抗生物質に共有結合している多価配置が考えられる。アルギネートオリゴマーは、同一のものであっても異なるものであってもよく、同じタイプの共有結合または共有結合分子リンカーを介してポリミキシン群の抗生物質に結合されていてもよい。他の配置において、アルギネートオリゴマーは、本明細書に記載の形態で、複数のポリミキシン分子に共有結合されていてもよい。ポリミキシン分子は、同一のものであっても異なるものであってもよく、他のアルギネートオリゴマーに共有結合されていてもしていなくてもよい。

30

【0121】

本発明のポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体とは、それらの薬学的に許容される塩、溶媒和化合物または水和物、それらのジアステレオ異性体、互変異性体、鏡像異性体および活性代謝物も含む。好適な塩としては、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸、炭酸、ホウ酸、スルファミン酸および臭化水素酸などの無機酸からの酸付加塩、または酢酸、プロピオン酸、酪酸、酒石酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フマル（fumaric）酸、クエン酸、乳酸、ムチン酸、グルコン酸、安息香酸、コハク酸、シュウ酸、フェニル酢酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン（benzenesulphonic）酸、サリチル（salicylic）酸、スルファニル酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、エデト酸、ステアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸、ラウリン酸、パントテン酸、タンニン酸、アスコルビン酸、フェンジゾン（fendizoic）酸、4-4'-メチレンビス-3-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸、o-（p-ヒドロキシベンゾイル）安息香酸、4-4'-ジヒドロキシトリフェニルメタン-2-カルボン酸および吉草酸などの薬学的に許容される有機酸の塩が挙げられる。塩基塩としては、薬学的に許容されるカチオン、例えば、ナト

40

50

リウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウムおよびアルキルアンモニウムなどを用いて形成されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0122】

本発明は、さらなる態様において、本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の製造方法を提供するものであって、前記方法は、

(i a) アルギネートオリゴマーおよびポリミキシン群の抗生物質を準備し、それらの2つの分子基の間に直接共有結合を形成すること、または

(i b) アルギネートオリゴマー、ポリミキシン群の抗生物質および共有結合分子リンカーを準備し、アルギネートオリゴマーとリンカー分子の2つの分子基の間に直接共有結合を形成し、且つ、ポリミキシン群の抗生物質とリンカー分子の2つの分子基の間に直接共有結合を形成すること、または

(i c) アルギネートオリゴマーおよびポリミキシン群の抗生物質を準備すること(但し、一方または両方が、それに共有結合し、且つ、リンカー分子の少なくとも1つを介してアルギネートオリゴマーをポリミキシン群の抗生物質に共有結合させている共有結合分子リンカー分子を有する)、ならびに、任意に、

(i i) 反応混合物から、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の少なくとも一部を分離すること

を含む。

【0123】

本発明は、ある特定の実施形態において、本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の製造方法を提供するものであって、前記方法は、

(i) 利用可能なカルボキシル基を有するアルギネートオリゴマーの水溶液を準備することと、

(i i) アルギネートオリゴマー中の少なくとも1つのカルボキシル基を活性化するのに十分な量および条件下で、前記アルギネート溶液を1 - エチル - 3 - [3 - ジメチルアミノプロピル] カルボジイミド塩酸塩 (E D C) と接触させることと、

(i i i) 任意に、アミン反応性スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミド (スルホ - N H S) エステルを形成するのに十分な量および条件下で、前記カルボキシル活性化アルギネートオリゴマーをスルホ - N H S と接触させることと、

(i v) アルギネートオリゴマーとポリミキシン群の抗生物質との間にアミド結合を形成するのに十分な量および条件下で、工程 (i i) の前記カルボキシル活性化アルギネートオリゴマーまたは工程 (i i i) のアミン反応性スルホ - N H S エステルを、利用可能な一級アミン基を有するポリミキシン群の抗生物質と接触させることと、

(v) 反応混合物から、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の少なくとも一部を分離することと

を含む。

【0124】

本発明は、ある特定の実施形態において、本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の製造方法を提供するものであって、前記方法は、

(i) 利用可能なカルボキシル基を有するアルギネートオリゴマーの溶液、好ましくは有機 (例えば、D M F および / または D M S O) 溶液を準備することと、

(i i) O - アシルイソ尿素中間体を形成するのに十分な量および条件下で、前記アルギネート溶液をジシクロヘキシルカルボジイミド (D C C) と接触させることと、

(i i i) アルギネートオリゴマーとポリミキシン群の抗生物質との間にエステル結合を形成するのに十分な量および条件下で、前記O - アシルイソ尿素中間体を利用可能なヒドロキシル基を有するポリミキシン群の抗生物質および4 - N , N - ジメチルアミノピリジン (D M A P) と接触させることと、

(i v) 反応混合物から、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の少なくとも一部を分離することと

を含み、

10

20

30

40

50

工程 (i i) および (i i i) は、同時に実施してもよい。

【 0 1 2 5 】

上記の如く、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体は、非結合ポリミキシン群の抗生物質と本質的に同じまたは類似の抗菌効力を有するが、宿主毒性がより低く、潜在的により長期間の抗菌作用を有する一群の新規化学物質である。抗菌効力は、例えば、最小阻止濃度 (M I C) 値に基づき評価することができ、M I C 値 (例えば、結合体自体の質量に基づき計算した、または結合体のポリミキシン含有量に基づき計算した) が、非結合抗生物質と比較して 2 倍未満である場合、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体は、同様の抗菌効力を有すると判断し得る。例えば、結合体の M I C 値は、1 倍以下であり得る。さらに、M I C の上昇は許容でき (例えば、2 倍以上)、非結合抗生物質と比較して結合体の毒性が実質的に低い場合、依然として有益または有用な生成物が得られ得る。例えば、循環系の、ある特定の生理学的モデルにおいて、ポリミキシン群の抗生物質の非結合型に類似の初期 P K / P D プロファイルを有するある特定のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を調製し得ることも見出した。この特性の組合せにより、ポリミキシン群の抗生物質それ自体と比較しても、マスキング成分 (masking entities) を使用し宿主毒性を低下させる、先に提案されたポリミキシン修飾物と比較しても、細菌 (特にグラム陰性の) 感染症の治療において (特に全身治療において) 本発明の結合体が有利となる。特に、小さいデキストリン分子の使用が、マスキング成分として提案されており、かかる結合体の宿主毒性は著しく低い、得られた結合体の呈する抗生物質効力は、著しく低く、これはデキストリン基の除去により部分的にしか回復できない。さらに、デキストリン - ポリミキシン結合体の初期 P K / P D プロファイルは、生体膜拡散の 2 コンパートメントモデルにおける非結合ポリミキシンの対応するプロファイルに類似しておらず、これはそれらの臨床利用を複雑にし得る (Azzopardi、上記参照) 。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 6 】

一方、実施例に示されるように、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体は、非修飾抗生物質と本質的に同じ抗生物質効力を有する。本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体のさらに驚くべき特性は、それらの抗生物質効果の持続時間であり、それは非修飾型のポリミキシン群の抗生物質よりも著しく長くなり得る。さらに、実施例は、本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体が、同じポリミキシン群の非結合型よりもバイオフィームに対処する (combating) (例えば、バイオフィームを破壊、低減、制限または排除する) 際により効果的であり得ることを示している。さらに、例えば、循環系の、ある特定の生理学的モデルでは、ポリミキシン群の抗生物質の非結合型に類似した初期 P K / P D プロファイルを有するポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体をデザインすることが可能である。

【 0 1 2 7 】

したがって、本発明は、さらなる様態において、本明細書に定義しているポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体および薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。好適な賦形剤、担体または希釈剤は、下記に記載されており、具体的な医薬組成物は、下記に詳述されている。

【 0 1 2 8 】

本発明は更に、細菌感染症への対処 (combat) における、本明細書に記載のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体およびそれを含む医薬組成物の使用に関する。本明細書で使用される「対処」という用語は、療法および予防法の両方を含む (すなわち、細菌感染症の治療または予防) 。

【 0 1 2 9 】

したがって、本発明は、この態様において、療法に使用するための、特に、細菌感染症の治療または予防に使用するための、本明細書に記載の本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体およびそれらを含む医薬組成物を提供する。

【 0 1 3 0 】

具体的には、本発明は、さらなる様態において、細菌感染症に罹患している、罹患して

いると疑われる、またはその危険性がある対象における細菌感染症の治療または予防の方法を提供するものであって、前記方法は、本明細書に定義されている本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の有効量を前記対象に投与することを含む。

【0131】

本発明は更に、細菌感染症に罹患している、罹患していると疑われる、またはその危険性がある対象における細菌感染症の治療または予防において使用するための、本明細書に定義されている本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を提供する。

【0132】

ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の「有効」量、より具体的には、「薬学的有効」量とは、標的細菌感染症の測定可能な治療または予防をもたらす結合体の量である。ある特定の実施形態では、結合体の抗菌作用は、ポリミキシン群の抗生物質の非結合型のものより長い（すなわち、より長く継続または持続する）ため、必要とされる結合体は少なくともよく、例えば、結合体の有効量は、ポリミキシン群の抗生物質の非結合型のものよりも比較的少ない。

10

【0133】

特に、かかる方法および使用において、有効量のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体により、対象において引き起こされる宿主毒性は、最高でも対処可能な、好ましくは、わずかなもしくは無視できる、または感知不可のもしくは臨床的に意味のないものである。いずれにしても、宿主毒性は、対応する非結合型ポリミキシンと比較して低下する。

20

【0134】

上述の実施形態では、達成されるべき主要な生理学的成果は、感染部位（特に、感染部位または場所に存在する細菌であり、体内の複数の感染部位または場所を含んでいてもよく、全身感染症も含む）および／または感染症が発生し得る（または発生する危険性がある）部位（例えば、表面）のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体との接触である。本発明の結合体の投与およびそれに続く本発明の部位の接触からの二次的な生理学的転帰は、対応する非結合ポリミキシン抗生物質と比較して、治療を受けている対象における宿主毒性の程度が低下するまたは制限されることであり、例えば、見られる宿主毒性は、対処可能な、好ましくは、わずかなもしくは無視できる、または感知不可のもしくは臨床的に意味のないものである。

30

【0135】

別の表現をすると、本発明は、細菌感染症に罹患している、罹患していると疑われる、またはその危険性がある対象における細菌感染症の治療または予防において使用するための薬剤の製造用の本明細書に定義されている本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の使用をさらに提供する。

【0136】

「細菌感染症」（または「～により感染された」もしくは「～に感染している」など）という用語は、本明細書において、広義に使用され、対象が、問題の細菌を含むか、含有するか、または保有し得る、すなわち、細菌が単純に対象内または対象上に存在し得ることを示し、これは対象の身体内または身体上の任意の部位または場所を含み得る。対象の感染症が、臨床疾患として現れている（すなわち、感染により対象に臨床症候が現れている）必要はないが、これは当然ながら包含される。感染症に罹患していると疑われる、またはその危険性がある対象とは、細菌もしくは感染した対象に曝された対象、または感染症の臨床徴候もしくは症候を呈している対象（感染症が疑われる場合）、または一般的に（例えば、対象の臨床状態による）もしくは具体的に、問題の細菌に対してであるかどうかにかかわらず、感染しやすい対象であり得る。

40

【0137】

また、本発明のある特定の態様によれば、対象が、細菌感染症に罹患している、罹患していると疑われる、またはその危険性がある対象であると特定する先行工程、または対象が、細菌感染症に罹患している、罹患していると疑われる、またはその危険性がある対象

50

であると診断する工程があってもよい。特に、細菌感染症は、ポリミキシン群の抗生物質を用いた通常の臨床診療において、治療される、すなわち治療可能であることが知られているタイプのものであり得る。一実施形態では、細菌は、ポリミキシン群の抗生物質に反応する（すなわち感受性がある）細菌であると特定されるかまたは反応する（すなわち感受性がある）細菌であろうと思われる。ある特定の実施形態では、ポリミキシン群の抗生物質に対するその感染症（またはより具体的には感染症における細菌）の感受性を判定し得る。

【0138】

本発明によれば、上記の先行工程の代わりにまたは上記の先行工程に加えて、対象の細菌感染症の臨床指標を評価し、且つ、好ましくは、臨床指標における任意の変化を特定するために、前記治療に先立ってまたは前記治療の早い段階で行われた対応する評価と比較する、次工程があってもよい。

10

【0139】

容易に観察可能な生理学的指標に基づく細菌感染症の診断およびモニタリングは、臨床医にとって完全に日常的なことである。分子生物学的手法および微生物学的手法も、診断結果を更に確認するために、そして病原体（例えば、分類学的情報）、可能性のある毒性の徴候、および抗生物質に対するそれらの感受性に関する更なる情報を提供するために使用され得る。

【0140】

本発明によれば、上記の先行工程および／または次工程の代わりにまたは上記の先行工程および／または次工程に加えて、対象のポリミキシン毒性の臨床指標を評価し、且つ、好ましくは、臨床指標における任意の変化を特定するために、前記治療に先立ってまたは前記治療の早い段階で行われた対応する評価と比較する、次工程があってもよい。容易に観察可能な生理学的指標に基づく対象におけるポリミキシン毒性のモニタリングは、臨床医にとって完全に日常的なことである。これは、対象の全身状態またはより特異的な分子マーカー、例えば、炎症マーカー（例えば、循環または局所サイトカインレベル）の評価を含み得る。

20

【0141】

本発明は、単一のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体または異なる複数のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の混合物（多様 / 多数 ; 2 種類以上）の使用を包含する。当該混合物は、異なる複数のポリミキシン群の抗生物質と、同一のアルギネートオリゴマーとを有する結合体を含んでもよい。当該混合物は、同一のポリミキシン群の抗生物質と、異なる複数のアルギネートオリゴマーとを有する結合体を含んでもよい。当該混合物は、異なる複数のポリミキシン群の抗生物質と、異なる複数のアルギネートオリゴマーとを有する結合体を含んでもよい。

30

【0142】

本発明により標的とされる細菌感染症は、任意の細菌の属または種から選ばれる細菌を含み得る。細菌の属または種の例としては、アビオトロフィア属 (Abiotrophia)、アクロモバクター属 (Achromobacter)、アシダミノコッカス属 (Acidaminococcus)、アシドボラックス属 (Acidovorax)、アシネトバクター属 (Acinetobacter)、アクチノバチルス属 (Actinobacillus)、アクチノバクラム属 (Actinobaculum)、アクチノマジュラ属 (Actinomadura)、アクチノミセス属 (Actinomyces)、アエロコッカス属 (Aerococcus)、エロモナス属 (Aeromonas)、アフピア属 (Afipia)、アグロバクテリウム属 (Agrobacterium)、アルカリゲネス属 (Alcaligenes)、アロイオコッカス属 (Alloioiococcus)、アルテロモナス属 (Alteromonas)、アミコラータ属 (Amycolata)、アミコラトプシス属 (Amycolatopsis)、アナエロボスピリillum属 (Anaerobospirillum)、アナエロラプダス属 (Anaerorhabdus)、アラキニア属 (Arachnia)、アルカノバクテリウム属 (Arcanobacterium)、アルコバクター属 (Arcobacter)、アルスロバクター属 (Arthrobacter)、アトポビウム属 (Atopobium)、オーレオバクテリウム属 (Aureobacterium)、バクテロイデス属 (Bacteroides)、バルネアトリックス属 (Balneatrix)、バルトネラ属 (Barto

40

50

nella)、ベルゲイエラ属 (Bergeyella)、ビフィドバクテリウム属 (Bifidobacterium)、
 バイロフィラ・ブランハメラ属 (Bilophila Branhamella)、ボレリア属 (Borrelia)、
 ボルデテラ属 (Bordetella)、ブラキスピラ属 (Brachyspira)、ブレビバチルス属 (Brevibacillus)、
 ブレビバクテリウム属 (Brevibacterium)、ブレブンディモナス属 (Brevundimonas)、ブルセラ属 (Brucella)、
 バークホルデリア属 (Burkholderia)、ブテシアウクセラ属 (Buttiauxella)、ブチリビブリオ属 (Butyrivibrio)、カリマトバクテ
 リウム属 (Calymmatobacterium)、カンピロバクター属 (Campylobacter)、キャプノサイ
 トファーガ属 (Capnocytophaga)、カルジオバクテリウム属 (Cardiobacterium)、カ
 トネラ属 (Catonella)、セデセア属 (Cedecea)、セルロモナス属 (Cellulomonas)、セ
 ンティペーダ属 (Centipeda)、クラミジア属 (Chlamydia)、クラミドフィラ属 (Chlamy
 dophila)、クロモバクテリウム属 (Chromobacterium)、クイセオバクテリウム属 (Chys
 eobacterium)、クリセオモナス属 (Chryseomonas)、シトロバクター属 (Citrobacter)、
 クロストリジウム属 (Clostridium)、コリンセラ属 (Collinsella)、コマモナス属 (Comamonas)、
 コリネバクテリウム属 (Corynebacterium)、コクシエラ属 (Coxiella)、
 クリプトバクテリウム属 (Cryptobacterium)、デルフチア属 (Delftia)、デルマバクテ
 ー属 (Dermabacter)、デルマトフィルス属 (Dermatophilus)、デスルフォモナス属 (De
 sulfomonas)、デスルホビブリオ属 (Desulfovibrio)、ジアリスタ属 (Dialister)、デ
 イケロバクター属 (Dichelobacter)、ドロシコッカス属 (Dolosicoccus)、ドロシグラ
 ヌルム属 (Dolosigranulum)、エドワージエラ属 (Edwardsiella)、エッゲルセラ属 (Eg
 gerthella)、エーリキア属 (Ehrlichia)、エイケネラ属 (Eikenella)、エンペドバク
 ター属 (Empedobacter)、エンテロバクター属 (Enterobacter)、エンテロコッカス属 (Enterococcus)、
 エルウィニア属 (Erwinia)、エリシペロスリクス属 (Erysipelothrix)、エシェリキア属 (Escherichia)、
 ユーバクテリウム属 (Eubacterium)、エウイング
 ラ属 (Ewingella)、エキシグオバクテリウム属 (Exiguobacterium)、ファクラミア属 (Facklamia)、
 フィリファクター属 (Filifactor)、フラビモナス属 (Flavimonas)、フラボバクテリウム属 (Flavobacterium)、
 フランシセラ属 (Francisella)、フソバクテ
 リウム属 (Fusobacterium)、ガードネセラ属 (Gardnerella)、グロビカテラ属 (Globicatella)、
 双子菌属 (Gemella)、ゴルドナ属 (Gordona)、ヘモフィルス属 (Haemophilus)、ハフニア属 (Hafnia)、
 ヘリコバクター属 (Helicobacter)、ヘロコッカス属 (Helococcus)、ホールディマニア属 (Holdemania)、
 イグナビグラナム属 (Ignavigranum)、ジョンソネラ属 (Johnsonella)、キングセラ属 (Kingella)、
 クレブシエラ属 (Klebsiella)、コクリア属 (Kocuria)、コセラ属 (Koserella)、クルチア属 (Kurthia)、
 キトコッカス属 (Kytococcus)、ラクトバチルス属 (Lactobacillus)、ラクトコッカス属 (Lactococcus)、
 ロートロピア属 (Lautropia)、レクレルシア属 (Leclercia)、レジオネラ属 (Legionella)、レミノセラ属 (Leminorella)、
 レプトスピラ属 (Leptospira)、レプトトリキア属 (Leptotrichia)、リユーコノストック属 (Leuconostoc)、リス
 テリア属 (Listeria)、リストネラ属 (Listonella)、メガスフェラ属 (Megasphaera)、
 メチロバクテリウム属 (Methylobacterium)、ミクロバクテリウム属 (Microbacterium)、
 ミクロコッカス属 (Micrococcus)、ミツオケラ属 (Mitsuokella)、モビルンカス属 (Mobiluncus)、
 モエレセラ属 (Moellerella)、モラクセラ属 (Moraxella)、モルガネラ属 (Morganella)、
 マイコバクテリウム属 (Mycobacterium)、マイコプラズマ属 (Mycoplasma)、ミロイデス属 (Myroides)、
 ナイセリア属 (Neisseria)、ノカルジア属 (Nocardia)、ノカルジオブシス属 (Nocardiosis)、
 オクロバクテリウム属 (Ochrobactrum)、オエスコビア属 (Oeskovia)、オリゲラ属 (Oligella)、オリエンティア属 (Orientia)、
 パエニバチルス属 (Paenibacillus)、パントエア属 (Pantoea)、パラクラミジア属 (Parachlamydia)、
 パスツレラ属 (Pasteurella)、ペディオコッカス属 (Pediococcus)、ペプトコッカス属 (Peptococcus)、
 ペプトストレプトコッカス属 (Peptostreptococcus)、フォトバクテリウム属 (Photobacterium)、
 フォトラブダス属 (Photorhabdus)、プレジオモナス属 (Plesiomonas)、ポルフィリモナス属 (Porphyrimonas)、
 プレボテラ属 (Prevotella)、プロピオニバクテリウム属 (Propionibacterium)、プロテウス属 (Proteus)

(*Proteus*)、プロビデンシア属 (*Providencia*)、シュードモナス属、シュードノカルディア属 (*Pseudonocardia*)、シュードラミバクター属 (*Pseudoramibacter*)、サイクロバクター属 (*Psychrobacter*)、ラーネラ属 (*Rahnella*)、ラルストニア属 (*Ralstonia*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、リケッチア (*Rickettsia*) ロシャリメア (*Rochalimaea*) ロゼオモナス属 (*Roseomonas*)、ロチア属 (*Rothia*)、ルミノコッカス属 (*Ruminococcus*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、セレノモナス属 (*Selenomonas*)、セルブリナ属 (*Serpulina*)、セラチア属 (*Serratia*)、シュウェネラ属 (*Shewenella*)、赤痢菌属 (*Shigella*)、シムカニア属 (*Simkania*)、スラッキア属 (*Slackia*)、スフィンゴバクテリウム属 (*Sphingobacterium*)、スフィンゴモナス属 (*Sphingomonas*)、スピリillum属 (*Spirillum*)、ブドウ球菌属 (*Staphylococcus*)、ステノトロホモナス属 (*Stenotrophomonas*)、ストマトコッカス属 (*Stomatococcus*)、ストレプトバチルス属 (*Streptobacillus*)、連鎖球菌属 (*Streptococcus*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*)、サクシニビブリオ属 (*Succinivibrio*)、ステレラ属 (*Sutterella*)、ストネラ属 (*Suttonella*)、テイタメラ属 (*Tatumella*)、ティシエレラ属 (*Tissierella*)、トラバルシエラ属 (*Trabulsiella*)、トレポネーマ属 (*Treponema*)、トロフェリマ属 (*Tropheryma*)、ツアカムレラ属 (*Tsakamurella*)、ツリセラ属 (*Turicella*)、ウレアプラズマ属 (*Ureaplasma*)、バゴコッカス属 (*Vagococcus*)、ベイロネラ属 (*Veillonella*)、ビブリオ属 (*Vibrio*)、ウィークセラ属 (*Weeksellia*)、ウォリネラ属 (*Wolinella*)、ザントモナス属 (*Xanthomonas*)、ゼノラブダス属 (*Xenorhabdus*)、エルシニア属 (*Yersinia*) およびヨケネラ属 (*Yokenella*) ; 例えば、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、腺疫菌 (*Staphylococcus equi*)、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・アガラクチア (*Streptococcus agalactiae*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、リステリア・イバノビイ (*Listeria ivanovii*)、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、ノカルジア・アステロイデス (*Nocardia asteroides*)、イスラエル放線菌 (*Actinomyces israelii*)、アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) および腸球菌種 (*Enterococcus species*) などのグラム陽性細菌、ならびに、緑膿菌、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、アクチノバチルス・ブルロニューモニエ (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、ヘモリチカ菌 (*Pasteurella haemolytica*)、パスツレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、チフス菌 (*Salmonella typhi*)、ウシ流産菌 (*Brucella abortus*)、コクシエラ菌 (*Coxiella burnetii*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhea*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、軟性下疳菌 (*Haemophilus ducreyi*)、ペスト菌 (*Yersinia pestis*)、エルシニア・エンテロリチカ (*Yersinia enterocolitica*)、エシェリキア・ヒラエ (*Escherichia hirae*)、セパシア菌 (*Burkholderia cepacia*)、鼻疽菌 (*Burkholderia mallei*)、類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、野兔病菌 (*Francisella tularensis*)、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*)、フソバスクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*)、コウドリア・ルミナンチウム (*Cowdria ruminantium*)、モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*)、エンテロバクター・クロアカ (*Enterobacter cloacae*)、霊菌 (*Serratia marcescens*)、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、腸炎菌 (*Salmonella enteritidis*)、チフス菌およびアシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)、アシネトバクター・ルオフィ (*Acinetobacter lwoffii*)、プロビデンシア・スチュアルティイ (*Providencia stuartii*)、プロビデンシア・レットゲリ (*Providencia rettgeri*)、プロビデンシア・アルカリファシエンス (*Providencia alcalifaciens*) およびクレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) などのグラム陰性菌、ならびにクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、オウム病クラミジア (*Chlamydia psittaci*) などのグラム非応答性細菌 (Gram

non-responsive bacteria)、ならびに、結核菌 (*M. tuberculosis*)、ウシ型結核菌 (*M. bovis*)、マイコバクテリウム・チフィムリウム (*M. typhimurium*)、ウシ型結核菌株 BCG (*M. bovis* strain BCG)、BCG 亜株 (BCG substrains)、マイコバクテリウム・アビウム (*M. avium*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*M. intracellulare*)、マイコバクテリウム・アフリカヌム (*M. africanum*)、カンサシ菌 (*M. kansasii*)、マイコバクテリウム・マリヌム (*M. marinum*)、マイコバクテリウム・ウルセランス (*M. ulcerans*)、マイコバクテリウム・アビウム亜種パラ結核症 (*M. avium* subspecies *paratuberculosis*) などのマイコバクテリア (mycobacteria) が挙げられるが、これらに限定されない、

好ましくは、本発明によって標的とされる細菌感染症は、以下の属から選択される細菌を含む：アクロモバクター属、アシネトバクター属、アクチノバチルス属、エロモナス属、アグロバクテリウム属、アルカリゲネス属、アルテロモナス属、バクテロイデス属、バルトネラ属、ボレリア属、ボルデテラ属、ブルセラ属、バークホルデルシア属、カンピロバクター属、カルジオバクテリウム属、クラミジア属、クラミドフィラ属、クロモバクテリウム属、クイセオバクテリウム属、クリセオモナス属、シトロバクター属、クロストリジウム属、コマモナス属、コリネバクテリウム属、コクシエラ属、クリプトバクテリウム属、エドワージエラ属、エイケネラ属、エンテロバクター属、エンテロコッカス属、エルウィニア属、キングセラ属、クレブシエラ属、ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、レジオネラ属、レプトスピラ属、レプトトリキア属、リューコノストック属、リステリア属、リストネラ属、モビルンカス属、モラクセラ属、モルガネラ属、マイコバクテリウム属、マイコプラズマ属、ナイセリア属、ノカルジア属、ノカルジオブシス属、パントエア属、パラクラミジア属、パスツレラ属、ペプトコッカス属、ペプトストレプトコッカス属、プレボテラ属、プロピオニバクテリウム属、プロテウス属、プロビデンシア属、シュードモナス属、ラルストニア属、リケッチア属、サルモネラ属、シュウェネラ属、赤痢菌属、スフィンゴバクテリウム属、スフィンゴモナス属、ブドウ球菌属、ステノトロホモナス属、ストレプトバチルス属、連鎖球菌属、ストレプトミセス属、トレボネム属 (*Treponem*) およびエルシニア属

したがって、本発明は、グラム陽性菌もしくはグラム陰性菌、または実際にはグラム不定菌に対して使用してもよい。グラム陰性菌、例えば、上記で特定したものが重要である。グラム陰性菌の中でも、腸内細菌およびグラム陰性菌の非発酵細菌が、特に注目に値する。

【0143】

腸内細菌としては、アリシェワネラ属 (*Alishewanella*)、アルテロコッカス属 (*Alterococcus*)、アクアモナス属 (*Aquamonas*)、アラニコラ属 (*Aranicola*)、アゾチビルガ属 (*Azotivirga*)、ブレネリア属 (*Brenneria*)、ブドビシア属 (*Budvicia*)、プティアウクセラ属、セデセア属、シトロバクター属、クロノバクター属 (*Cronobacter*)、ディケヤ属 (*Dickeya*)、エドワージエラ属、エンテロバクター属、エルウィニア属、エシェリキア属、エウイングセラ属、グリモンテラ属 (*Grimontella*)、ハフニア属、クレブシエラ属、クライベラ属 (*Kluyvera*)、レクレルシア属、レミノレラ属、モエレセラ属、モルガネラ属、オベサムバクテリウム属 (*Obesumbacterium*)、パントエア属、ペクトバクテリウム属 (*Pectobacterium*)、フロモバクター属 (*Phlomobacter*)、フォトラブダス属、プレジオモナス属、プラジア属 (*Pragia*)、プロテウス属、プロビデンシア属、ラーネラ属、ラオウルテラ属 (*Raoultella*)、サルモネラ属、サムソニア属 (*Samsonia*)、セラチア属、赤痢菌属、ソダリス属 (*Sodalis*)、テイタメラ属、トラバルシエラ属、ウィグルスウォーチア属 (*Wigglesworthia*)、ゼノラブダス属、エルシニア属、ヨケネラ属の細菌が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい腸内細菌の属としては、エシェリキア属、クレブシエラ属、サルモネラ属、赤痢菌属、エルシニア属およびプロビデンシア属が挙げられる。

【0144】

非発酵グラム陰性菌としては、シュードモナス属、アシネトバクター属、ステノトロホ

モナス属およびバークホルデリア属、アクロモバクター属、アルガリゲネス属 (Algaligenes)、ボルデテラ属、ブレブディモナス属、コマモナス属、エリザベトキングア属 (Elizabethkingia) (以前はクリセオバクテリウム属)、メチロバクテリウム属、モラクセラ属、オクロバクテリウム属、オリゲラ属、サイクロバクター属、ラルストニア属、ロゼオモナス属、シュワネラ属、スフィンゴバクテリウム属、例えば、緑膿菌、アシネトバクター・バウマンニ、ステノトロホモナス・マルトフィリア (Stenotrophomonas maltophilia) およびバークホルデリア種 (Burkholderia spp.) の細菌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0145】

好ましくは、細菌は、シュードモナス属、アシネトバクター属、ステノトロホモナス属、バークホルデリア属、エシェリキア属、クレブシエラ属、プロビデンシア属、連鎖球菌属、ブドウ球菌属、例えば、緑膿菌、アシネトバクター・バウマンニ、ステノトロホモナス・マルトフィリア、バークホルデリア種、大腸菌、クレブシエラ・ニューモニエおよびセパシア菌、鼻疽菌、類鼻疽菌、アシネトバクター・ルオフィ、プロビデンシア・スチュアルティイ、プロビデンシア・レットゲリ、プロビデンシア・アルカリファシエンス、クレブシエラ・オキシトカ、シュードモナス・アンギリセプチカ (Pseudomonas anguilliseptica)、シュードモナス・オリジハビタンス (Pseudomonas oryzihabitans)、シュードモナス・プレコグロッシシダ (Pseudomonas plecoglossicida)、シュードモナス・ルテオラ (Pseudomonas luteola) および M R S A から選択し得る。

【0146】

ある特定の態様において、感染症は、院内感染症、患者の気道における感染症、例えば、嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患、鬱血性閉塞性気道疾患 / 鬱血性閉塞性気道肺炎 (C O A D / C O A P)、肺炎、気腫、気管支炎または副鼻腔炎を患っている患者における感染症；創傷、特に、慢性創傷（火傷を含む）における感染症、植込み型医療機器または補綴医療器機に関連した医療機器関連感染症、例えば、人工弁心内膜炎、あるいはライン、カテーテル、人工関節、代替組織 (tissue replacements) または気管内チューブもしくは気管切開チューブの感染症である。かかる感染症を一般的に引き起こす種類の細菌の例としては、緑膿菌、アシネトバクター・バウマンニ、ステノトロホモナス・マルトフィリア、バークホルデリア種（例えば、セパシア菌）、大腸菌、クレブシエラ・ニューモニエ、黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (M R S A)、クロストリジウム・ディフィシル (Clostridium difficile)、結核菌 (Mycobacterium tuberculosis)、エンテロコッカス属およびバンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin-Resistant Enterococcus)、並びにプロビデンシア・スチュアルティイが挙げられる。本発明において、その他の重要な感染症としては、バルトネラ菌（例えば、バルトネラ・ヘンセラ菌 (Bartonella hensela)）、マイコバクテリア（例えば、マイコバクテリウム・アビウムコンプレックス (Mycobacterium avium Complex) (MAC)、カンサシ菌、マイコバクテリウム・マリヌム、マイコバクテリウム・ウルセランス、マイコバクテリウム・ゼノピ (M. xenopi)）、ヘモフィルスインフルエンザb型菌 (Haemophilus influenzae type b) (Hib) またはレジオネラ属（例えば、レジオネラ・ニューモフィラ；レジオネラ病 (Legionnaire's disease)）、ハンセン病（らい菌 (M. leprae)）、ヒト顆粒球アナプラズマ症 (human granulocytic anaplasmosis) (アナプラズマ・ファゴサイトフィルム (Anaplasma phagocytophilum))、ブルセラ症 (brucellosis) (ブルセラ・メリテンシス (Brucella melitensis))、髄膜炎菌性疾患 (meningococcal disease) (髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis)) および炭疽 (anthrax) (炭疽菌) による感染症が挙げられる。

【0147】

細菌は多剤耐性であってもよく、例えば、少なくとも3個または少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の抗生物質群の抗生物質に対する耐性を有する細菌、例えば、アミノグリコシド系抗生物質（例えば、アミカシン (amikacin)、ゲンタマイシン (gentamicin)、カナマイシン (kanamycin)、カブレオマイシン (capreomycin)、ネオマイシン (neomycin)、ネチルマイシン (netilmicin)、ストレプトマイシン (streptomycin)

)、トブラマイシン (tobramycin)) ; ラクタム系抗生物質 (例えば、カルバセフェム系抗生物質 (carbecephems) (例えば、ロラカルベフ (loracarbef)) ; 第一世代セファロsporin系抗生物質 (cephalosporins) (例えば、セファドロキシル (cefadroxil) 、セファゾリン (cefazolin) 、セファレキシン (cephalexin)) ; 第二世代セファロsporin系抗生物質 (例えば、セファクロル (cefaclor) 、セファマンドール (cefamandole) 、セファレキシン、セフォキシチン (cefoxitin) 、セフプロジル (cefprozil) 、セフロキシム (cefuroxime)) ; 第三世代セファロsporin系抗生物質 (例えば、セフィキシム (cefixime) 、セフジニル (cefdinir) 、セフジトレン (cefditoren) 、セフォペラゾン (cefoperazone) 、セフォタキシム (cefotaxime) 、セフポドキシム (cefpodoxime) 、セフトジジム (ceftazidime) 、セフトチブテン (ceftibuten) 、セフトチゾキシム (ceftizoxime) 、セフトリアキソン (ceftriaxone)) ; 第四世代セファロsporin系抗生物質 (例えば、セフェピム (cefepime)) ; モノバクタム系抗生物質 (例えば、アズトレオナム (aztreonam)) ; マクロライド系抗生物質 (macrolides) (例えば、アジスロマイシン (azithromycin) 、クラリスロマイシン (clarithromycin) 、ジリスロマイシン (dirithromycin) 、エリスロマイシン (erythromycin) 、トロレアンドマイシン (troleandomycin)) ; モノバクタム系抗生物質 (monobactams) (例えば、アズトレオナム)) ; ペニシリン系抗生物質 (例えば、アモキシシリン (amoxicillin) 、アンピシリン (ampicillin) 、カルベニシリン (carbenicillin) 、クロキサシリン (cloxacillin) 、ジクロキサシリン (dicloxacillin) 、ナフシリン (nafcillin) 、オキサシリン (oxacillin) 、ペニシリン G、ペニシリン V、ピペラシリン (piperacillin) 、チカルシリン (ticarcillin)) ; ポリペプチド系抗生物質 (例えば、バシトラシン (bacitracin) 、コリスチン (colistin)) およびポリミキシン B (polymyxin B) 、しかし、ある特定の実施形態では、使用されるポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体のポリミキシンではない) ; キノロン系抗生物質 (例えば、シプロフロキサシン (ciprofloxacin) 、エノキサシン (enoxacin) 、ガチフロキサシン (gatifloxacin) 、レボフロキサシン (levofloxacin) 、ロメフロキサシン (lomefloxacin) 、モキシフロキサシン (moxifloxacin) 、ノルフロキサシン (norfloxacin) 、オフロキサシン (ofloxacin) 、トロバフロキサシン (trovafloxacin)) ; スルホンアミド系抗生物質 (例えば、マフェニド (mafenide) 、スルファセタミド (sulfacetamide) 、スルファメチゾール (sulfamethizole) 、スルファサラジン (sulfasalazine) 、スルフイソキサゾール (sulfisoxazole) 、トリメトプリム・スルファメトキサゾール合剤 (trimethoprim-sulfamethoxazole)) ; テトラサイクリン系抗生物質 (例えば、デメクロサイクリン (demeclocycline) 、ドキシサイクリン (doxycycline) 、ミノサイクリン (minocycline) 、オキシテトラサイクリン (oxytetracycline) 、テトラサイクリン (tetracycline)) ; グリシルサイクリン系抗生物質 (glycylcyclines) (例えば、チゲサイクリン (tigecycline)) ; カルバペネム系抗生物質 (carbapenems) (例えば、イミペネム (imipenem) 、メロペネム (meropenem) 、エルタペネム (ertapenem) 、ドリペネム (doripenem) 、パニペネム・ベタミブロン合剤 (panipenem/betamipron) 、ピアペネム (biapenem) 、P Z - 6 0 1) ; および他の抗生物質としては、クロラムフェニコール (chloramphenicol) ; クリンダマイシン (clindamycin) 、エタンブトール (ethambutol) ; ホスホマイシン (fosfomycin) ; イソニアジド (isoniazid) ; リネゾリド (linezolid) ; メトロニダゾール (metronidazole) ; ニトロフラントイン (nitrofurantoin) ; ピラジナミド (pyrazinamide) ; キヌプリスチン・ダルホプリスチン合剤 (quinupristin/dalfopristin) ; スペクチノマイシン (spectinomycin) ; ホスホマイシン (fosfomycin) およびバンコマイシン (vancomycin) が挙げられる。

【 0 1 4 8 】

抗生物質に対する感受性、すなわち感度、(逆に言えば耐性および耐容性)は、任意の好都合な方法で(例えば希釈感受性試験および/またはディスク拡散試験により)測定することができる。好ましくは、抗生物質に対する菌種の感受性は、当該微生物に対する当該抗生物質の最小阻止濃度 (MIC) (Jorgensenら、臨床微生物学マニュアル(Manual of Clinical Microbiology), 7th ed. Washington, D.C: American Society for Microbiol

ogy, 1999; 1526-43)、すなわち、当該菌種の増殖を完全に阻止する抗生物質の濃度で表される。

【0149】

当業者は、耐性をもたらすのに十分な耐容性／感受性における差異の程度は、供試抗生物質および菌種ならびに採用される試験に応じて変化することを理解するであろう。多くの規制機関（例えば、欧州抗菌薬感受性試験法検討委員会（the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)））は、特定の抗菌薬および微生物についていわゆる「ブレイクポイント」を設定しており、これは、感受性試験の結果の解釈に使用し、分離菌を、供試抗菌剤に対して感受性がある、中程度または耐性があると定義する識別可能な抗菌薬濃度である。当業者は、かかる情報を利用して、本発明により治療される細菌感染症が、これらの定義の下で供試抗生物質に対して耐性があるかどうかを確かめることができる。

10

【0150】

実施例に示されるように、本発明のポリミキシン・アルギネートオリゴマー結合体は、同じポリミキシン群の抗生物質の非結合型よりもバイオフィームに対処する（例えば、バイオフィームを破壊、低減、制限または排除する）際により効果的であり得る。よって、ある特定の実施形態では、標的感染症は、バイオフィーム中の細菌である。しかしながら、他の実施形態では、細菌は、バイオフィーム中には存在しない（例えば、浮遊状態で（planktonically）増殖する）。別の言い方をすると、細菌は、バイオフィームの増殖様式である場合もあるし、そうではない場合もあり、また、バイオフィーム以外の増殖様式である場合もあるし、そうではない場合もある。

20

【0151】

「バイオフィーム」とは、底質もしくは界面にまたは互いに付着しており（いくつかの運動性細胞も存在し得る）、且つ、細胞外ポリマー（より具体的には、微生物が産生した細胞外ポリマー）のマトリックス中に包埋されている固着細胞が優勢であることを特徴とする微生物の群集を意味し、このコロニーの微生物が、増殖速度および遺伝子転写に関して（例えば、それら微生物と同等の「バイオフィーム以外の(non-biofilm)」もの、すなわち自由浮遊性の(free-floating)もの、つまり浮遊性の(planktonic)ものと比較して）変化した表現型を示すことを特徴とする。「バイオフィーム中に」とは、本発明の方法によって標的とされる細菌が、バイオフィームのポリマーマトリックス内に（完全にまたは部分的に）あるか、ポリマーマトリックス上にあるか、またはポリマーマトリックスと結合していることを意味する。別の見方をすると、「バイオフィーム中に存在しない」細菌とは、分離している（例えば、浮遊性である(planktonic)）か、または複数の生物の集合体中にある場合、その集合体は組織化されていない、および／またはバイオフィームに特有のマトリックスのない生物である。いずれの場合にも、個々の細菌は、そのバイオフィームに住む対応物において観察される変化した表現型を示さない。

30

【0152】

ある特定の実施形態では、細菌感染症は、アシネトバクター属の細菌を含まない。ある特定の実施形態では、本発明に従って治療または予防される細菌感染症は、多剤耐性の細菌を含まない。

40

【0153】

本発明は、特定の実施形態では、呼吸器感染症またはそれに関連する症状（例えば、嚢胞性線維症、肺炎、COPD、COAD、COAP、気管支炎、副鼻腔炎、慢性創傷（火傷を含む）における感染症、植込み型医療機器または補綴医療器機に関連した医療器機関連感染症、菌血症、敗血症、敗血症性ショックまたはセブシスの治療または予防を提供し得る。

【0154】

好ましい一実施形態では、細菌感染症は、特にCF、COPD／COADまたは喘息を含む、呼吸器の基礎疾患または症状に罹患している対象における呼吸器感染症である。

【0155】

50

「治療」は、本発明による対象における細菌感染症／症状の治療に関して使用される場合、本明細書では広義に使用され、任意の治療効果、すなわち、感染症に関するまたは症状に対する任意の有益な効果を含む。したがって、感染症の根絶もしくは排除、または対象もしくは感染症の治療だけでなく、対象の感染症もしくは症状の改善も含まれる。よって、例えば、感染症もしくは症状の任意の症候または徴候、あるいは感染症／症状の臨床的に認められている任意の指標（例えば、創傷サイズの縮小または治療時間の加速）の改善が含まれる。したがって、治療には、（例えば、既存のまたは診断された感染症／症状の）根治療法と緩和療法の両方、すなわち、対症治療が含まれる。

【0156】

本明細書で使用される「予防」とは、任意の予防的（prophylactic/preventative）効果を指す。したがって、「予防」は、感染症／症状もしくは感染症／症状の発症、または感染症／症状の1つ以上の症候もしくは徴候を（例えば、予防的治療前の感染症／症状または症候もしくは徴候と比較して）遅延、制限、軽減または予防することを含む。よって、予防は、感染症／症状またはその症候もしくは徴候の発現または進行の完全な予防と、感染症／症状またはその症候もしくは徴候の発症または進行のあらゆる遅延あるいは感染症／症状またはその症候もしくは徴候の進行または悪化の軽減または制限とのいずれをも明示的に包含する。

【0157】

対象は、任意のヒト対象またはヒト以外の動物対象であり得るが、より具体的には、ヒトまたはヒト以外の脊椎動物（例えば、ヒト以外の哺乳類、鳥類、両生類、魚類または爬虫類）であってもよい。好ましい一実施形態では、対象は、哺乳動物対象である。動物は、家畜もしくは飼育動物、または実験動物または動物園もしくは自然動物保護公園の動物を含む商業的に価値のある動物であってもよい。したがって、代表的な動物としては、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、モルモット、ハムスター、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギおよびウシが挙げられる。このように、本発明の獣医学的使用が包含される。対象は、患者とみなされる場合もある。好ましくは、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、反芻哺乳動物ではない。

【0158】

「対象における」という用語は、本明細書では広義に使用され、対象内の部位もしくは場所または対象上の部位もしくは場所（例えば、体外表面）を含み、特に医療機器（例えば、植込み型または「留置型」医療機器）の感染を含み得る。「患者における」という用語は、これと一貫して解釈されるものとする。

【0159】

したがって、感染の場所は、口腔内の表面（例えば、歯、歯肉、歯肉溝、歯周ポケット）、生殖管（例えば、子宮頸部、子宮、卵管）、腹膜、中耳、前立腺、尿路、血管内膜、眼、すなわち、眼組織（例えば、結膜、角膜組織、涙管、涙腺、まぶた）、気道、肺組織（例えば、気管支および肺胞）、心臓弁、消化管、皮膚、頭皮、爪および創傷の内部、特に慢性創傷および外科的創傷（これらは、局所的創傷または内部創傷であってもよい）の内部であり得る。他の表面としては、器官、特に移植を受けているもの、例えば、心臓、肺、腎臓、肝臓、心臓弁、脾臓、腸、角膜組織、動脈および静脈移植片ならびに皮膚の外面が挙げられる。

【0160】

したがって、感染症は、体液（例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液、消化管内容物、精液、痰およびその他の肺分泌物）や組織（例えば、副腎、肝臓、腎臓、脾臓、下垂体、甲状腺、免疫、卵巣、精巣、前立腺、子宮内膜、眼、乳房、脂肪、上皮、内皮、神経、筋肉、肺、表皮、骨の組織）にも存在し得る。

【0161】

感染症はさらに、任意の「留置型」医療用もしくは外科用の器具（equipment）または機器（devices）において見られる場合もある。これには、カテーテル（例えば、中心静脈カテーテルおよび尿道カテーテルなど）を含めたあらゆる種類のライン、人工器官、例

10

20

30

40

50

えば、心臓弁、人工関節、入れ歯、歯冠、デンタルキャップおよび軟組織インプラント（例えば、乳房インプラント、臀部インプラントおよびリップインプラント）が含まれ得る。任意の種類の植込み型医療機器（例えば、ステント、子宮内避妊器具、ペースメーカー、挿管チューブ（例えば、気管内チューブまたは気管切開チューブ）、プロテーゼまたは人工器官、ラインまたはカテーテル）が含まれる。「留置型」医療機器には、その任意の部分が身体内に収容されている機器が含まれてもよく、すなわちこの機器は、全体的にまたは部分的に留置されていてもよい。

【0162】

感染症は、急性または慢性のもの（例えば、少なくとも5日間または少なくとも10日間、特に少なくとも20日間、さらには、少なくとも30日間、さらには、少なくとも40日間持続している感染症）であってもよい。

10

【0163】

細菌感染症は、どのような対象においても起こり得るが、対象によっては、他の対象よりも（that others）感染症に罹患しやすい。細菌感染症に罹患しやすい対象としては、上皮および/または内皮バリアが弱っているかまたは損なわれている対象、微生物感染に対する分泌による防御が、抑止、破壊、弱体化または害されている対象、ならびに易感染性の対象、免疫不全の対象または免疫抑制されている対象（すなわち、疾病もしくは臨床的介入もしくは他の治療のいずれに起因するかにかかわらず、または理由は何であれ、免疫系の何らかの部分が正常に機能していないか、その機能が標準以下である対象、言い換えれば、免疫応答の何らかの部分または免疫活性が、低下または損なわれている対象）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0164】

細菌感染症に罹患しやすい対象の代表例としては、予め確立された感染症（例えば、細菌、ウイルス、真菌または原虫などの寄生虫による）に罹患した対象、特にHIVに罹患した対象、菌血症、セプシスに罹患した対象および敗血症性ショックに罹患した対象；免疫不全を有する対象、例えば、化学療法および/または放射線療法のための準備をしている、化学療法および/または放射線療法を受けているまたは化学療法および/または放射線療法から回復中である対象、臓器（例えば、骨髄、肝臓、肺、心臓、心臓弁、腎臓など）移植を受けた対象（自家移植、同種移植および異種移植の患者を含む）；AIDSに罹患した対象；健康管理機関、例えば病院に入院している対象、特に、集中治療室または救急救命治療室（すなわち、患者に対し生命維持システムまたは臓器維持システムを提供することに関連する部署）にいる対象；人工呼吸器を装着している対象；外傷を患っている対象；火傷を負っている対象、急性創傷および/または慢性創傷を有する対象；新生児である対象；高齢である対象；がん（本明細書においては広義に定義され、あらゆる腫瘍性症状を含む；悪性または非悪性のもの）に罹患している対象、特に免疫系のがん（例えば、白血病、リンパ腫および他の血液がん）に罹患している対象；関節リウマチ、I型糖尿病、クローン病等の自己免疫性症状を患っている対象、特に、これらの疾病に対する免疫抑制治療を受けている対象；上皮または内皮分泌（例えば、粘液、涙、唾液）および/または分泌物排出が減少しているまたは抑止されている対象（例えば、粘膜組織上の纖毛の機能が低下している対象および/または過粘稠の粘液を有する患者（例えば、喫煙者、およびCOPD、COAD、COAP、気管支炎、嚢胞性線維症、気腫、肺がん、喘息、肺炎または副鼻腔炎に罹患した対象））、並びに医療機器を装着した対象が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0165】

本発明のポリミキシン-アルギネートオリゴマー結合体は、例えば、非経口（例えば、静脈内、脊髄内、筋肉内、皮下）、局所、経腸（例えば、経口、口腔内、舌下、直腸）経路または吸入（経鼻吸入を含む）により、標的感染症の細菌および/または本発明を有する部位もしくは感染の危険性がある部位に有効量を送達するために、任意の好都合な形態でまたは任意の好都合な手段により対象に投与し得る。投与により、全身的に分布または局所的に分布させることができ、これは、標的感染症の細菌および/または感染している

50

部位もしくは感染の危険性がある部位への送達が行われるが、本質的に患者の他の場所への送達が行われないことを意味する。当業者は、任意の特定の標的感染症および／または感染している部位もしくは感染の危険性がある部位に適するように適切な投与手段を選択することができるであろう。

【0166】

本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の宿主毒性が比較的低いことにより、これらの成分 (entities) は、対象における全身使用、すなわち全身感染症を治療するための全身投与および局所感染症 (例えば、肺や創傷における感染症) を治療するための全身投与に適したものとなる。これに対して、ポリミキシン群の抗生物質の使用は、これらの抗生物質の付随する宿主毒性のため、一般的には、局所治療または少なくとも厳密に局所化した治療に限定されている。ポリミキシン群の抗生物質の全身使用は、多剤耐性細菌による生命を脅かす感染症の最も重症で深刻な症例に限られている。というのも、これらの状況では、感染症がもたらす対象の生命に対する差し迫った危険が、宿主毒性が引き起こす問題を上回るためである。ある特定のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体 (例えば、エステル結合リンカーを有するもの) が、ある特定の生理学的モデル (例えば、ポリミキシン群の抗生物質の非結合型に類似した、循環系を模倣するもの) において初期 PK / PD プロファイルを有し得るという知見は、かかるポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体が全身使用に特に適していることを示し得る。

10

【0167】

したがって、本発明のある特定の実施形態では、細菌感染症に罹患している、罹患していると疑われる、またはその危険性がある対象における細菌感染症の治療または予防の方法であって、前記対象に本明細書に定義されている本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の有効量を全身投与することを含む方法を提供する。ある特定の実施形態では、前記細菌感染症は、全身性細菌感染症、例えば、対象における多重遺伝子座に關与する感染症またはセプシス (敗血症 (septicaemia)) である。

20

【0168】

当業者は、当技術分野において公知であり且つ文献に広く記載されている従来の方法のいずれかに従って、本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を、これらの投与経路および体内分布に適合した医薬組成物に製剤化することができるであろう。

【0169】

より具体的には、本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体は、場合により他の活性剤と共に、1種以上の従来の担体、希釈剤および／または賦形剤と混合し、錠剤、丸剤、顆粒剤 (例えば、自由な形態のものまたはカプセルに封入されたもの)、粉末剤 (例えば、乾燥吸入粉末剤を含む吸入粉末剤)、トローチ剤、サシェ剤、カシェ剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤、溶剤、シロップ剤、エアロゾル剤 (固体としてまたは液体媒体中)、スプレー剤 (例えば、点鼻薬)、ネブライザー用の組成物、軟膏剤、クリーム剤、膏薬 (salves)、軟ゼラチンカプセル剤および硬ゼラチンカプセル剤、坐剤、ペッサリー、無菌注射溶液剤、無菌包装粉剤などの従来の生薬製剤を製造し得る。腸溶性固体組成物または腸溶性液体組成物、例えば、腸溶性錠剤および腸溶性顆粒剤 (腸溶性カプセルまたは非腸溶性カプセルで提供されてもよい、すなわちコーティングは腸溶コーティングであってもなくてもよい)、無菌吸入用組成物および無菌注射用組成物が、特に注目に値する。

30

40

【0170】

好適な担体、賦形剤および希釈剤の例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシア・ゴム、リン酸カルシウム、不活性アルギネートポリマー、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水シロップ、水、水／エタノール、水／グリコール、水／ポリエチレン、高張塩水、グリコール、プロピレングリコール、メチルセルロース、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム、鉱油もしくはハードファットなどの脂肪物質またはそれら

50

の好適な混合物が挙げられる。注目すべき賦形剤および希釈剤は、マンニトールおよび高張塩水（生理食塩水）である。

【0171】

組成物は、滑剤、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤、甘味剤、着香剤等を更に含んでもよい。

【0172】

非経口的に投与可能な形態（例えば、静脈内送達に好適な溶液）は、無菌であるべきであり、且つ、生理学的に許容できない薬剤を含まないべきであり、また、投与時の刺激または他の悪影響を最小限にするために低浸透圧であるべきであることから、溶液は、好ましくは、等張性またはわずかに高張性（例えば、高張塩水（生理食塩水））であるべきである。好適なビヒクルとしては、非経口溶液、例えば、滅菌注射用蒸留水、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液、乳酸加リンゲル注射液、並びにRemington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., Easton: Mack Publishing Co., pp. 1405-1412 and 1461-1487 (1975)およびThe National Formulary XIV, 14th ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975)（その全体を参照により本明細書に明示的に援用する）に記載されているような他の溶液を投与するために習慣的に使用されている水性ビヒクルが含まれる。溶液には、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体と混合可能であり、且つ、製品の製造、保管または使用を妨げない非経口溶液、賦形剤および他の添加物用に従来から使用されている保存料、抗菌剤、緩衝液および抗酸化剤が含まれ得る。

10

20

【0173】

ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の単純な滅菌溶液またはポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を含む単純な滅菌液体組成物が、外科的処置中の使用および肺への（例えば、ネブライザーによる）または副鼻腔への（例えば、鼻内噴霧装置による）送達に特に便利であり得る。

【0174】

ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の固体または液体製剤には、胃および/または上部消化管の他の部分での分解は防ぐが、下部消化管（例えば、小腸）において分解させる腸溶コーティングを施してもよい。かかるコーティングは、脂肪酸、ワックス、シェラック、プラスチックおよび植物繊維を含むポリマーから日常的に調製されている。その具体例としては、アクリル酸メチル - メタクリル酸共重合体、メタクリル酸メチル - メタクリル酸共重合体、セルロースアセテートサクシネート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート（ヒプロメロースアセテートサクシネート）、ポリビニルアセテートフタレート（PVAP）、セルロースアセテートトリメリートおよびアルギン酸ナトリウムポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。腸溶性錠剤および腸溶性顆粒剤（これらは、腸溶性カプセルまたは非腸溶性カプセルで提供され得る）は特に注目に値する。腸溶性顆粒剤は、国際公開第1989008448号およびAl-Khedairy, E.B.H, 2006, Iraqi J.Pharm.Sci., Vol.15 (1) 49（それらの内容を参照により本明細書に援用する）の教示に従って調製してもよいが、当業者は、使用し得るさらなる他の技法を知っているであろう。

30

40

【0175】

局所投与を目的として、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を、クリーム剤、軟膏剤、ゲル剤、膏薬、経皮吸収型貼付剤などに配合することができる。好適であると考えられるさらなる局所システムは、*in situ* 薬物送達システムであり、例えば、固体、半固体、非晶質または液晶ゲルマトリックスが、*in situ* で形成され、且つ、アルギネートオリゴマー（本明細書に記載の任意のアルギネートオリゴマーであり得る）を含み得るゲルなどである。かかるマトリックスは、このマトリックスからのポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の放出を制御するように好都合に設計することができる。例えば、選択した期間にわたり放出を遅延および/または持続させることができる。かかるシステムは、生体組織または流体、例えば、粘膜表面などとの接触に際してのみ、

50

ゲルを形成してもよい。典型的には、ゲルは、生体接着性および／または粘膜付着性である。プレゲル組成物を保持できるまたは保持するように適合させることができる任意の身体部位への送達は、かかる送達技法により標的とすることができる。かかるシステムは、国際公開第2005/023176号に記載されており、その全体を参照により本明細書に明示的に援用する。

【0176】

本発明の組成物におけるポリミキシン・アルギネートオリゴマー結合体の相対含量は、必要とされる投与量および従う投与計画に応じて変化し得るが、治療対象の体格、対象の特定の病気の性質、標的治療領域の場所や特性など、さまざまな可変要素を考慮して、標的治療部位、すなわち、標的感染症の細菌および／もしくは感染症に罹患している部位または感染の危険性がある部位で、有効量を達成するのに十分な量であろう。当業者であれば、ポリミキシン・アルギネートオリゴマー結合体の量は、複数回の投与計画に従う場合は減らすことができ、また、その量を増加させ、投与回数または適用回数を最小限にすることができることを知っているであろう。

10

【0177】

本発明のポリミキシン・アルギネートオリゴマー結合体の注射による（例えば、静脈注射、脊髄内注射、筋肉内注射または皮下注射による）送達用の代表的な水溶液は、無菌のものであり、ポリミキシン・アルギネートオリゴマー結合体を、6～25%、例えば、6～20%、6～15%、6～10%、8～25%、8～20%、8～15%、9～25%、9～20%、9～15%、10～15%、10～20%、10～25%、15～20%または15～25%（w/v）含有していてもよく、残りは、水と薬学的に許容される賦形剤および／または他の活性剤（使用される場合）から成っていてもよい。

20

【0178】

鼻または副鼻腔への投与に、滅菌水性製剤および／または油性液体製剤（例えば、乳剤）を使用してもよく、例えば、鼻内噴霧装置（例えば、噴霧剤非含有または噴霧剤使用）により投与してもよい。代表的な製剤は、ポリミキシン・アルギネートオリゴマー結合体を1～25%、1～20%（例えば、1～15%、1～10%、1～9%、1～8%、1～7%または1～6%）、5～25%、5～20%、5～15%、5～10%、5～9%、5～8%、5～7%、5～6%、8～25%、8～20%、8～15%、8～10%、9～25%、9～20%または9～15%（w/vまたはw/w）含有していてもよく、残りは、薬学的に許容される賦形剤（例えば、水）および／または他の活性剤（使用される場合）から成っていてもよい。

30

【0179】

本発明のポリミキシン・アルギネートオリゴマー結合体を上気道に投与するために使用される代表的な吸入可能な溶液は、典型的には無菌のものであり、ポリミキシン・アルギネートオリゴマー結合体を、6～25%、例えば、6～20%、6～15%、6～10%、8～25%、8～20%、8～15%、9～25%、9～20%、9～15%、10～15%、10～20%、10～25%、15～20%または15～25%（w/v）含有していてもよく、残りは、薬学的に許容される賦形剤（例えば、水）および／または他の活性剤（使用される場合）から成っていてもよい。

40

【0180】

本発明のポリミキシン・アルギネートオリゴマー結合体を下気道に投与するために使用される代表的な吸入粉末剤は、ポリミキシン・アルギネートオリゴマー結合体を、最高90%まで、例えば、最高85%、80%、75%または70%まで、例えば、50～90%、55～90%、60～90%、65～90%、70～90%、75～90%、80～90%、85～90%、50～85%、55～85%、60～85%、65～85%、70～85%、75～85%、80～85%、50～80%、55～80%、60～80%、65～80%、70～80%、75～80%、50～70%、55～70%、60～70%または65～70%（w/vまたはw/w）含有していてもよく、残りは、薬学的に許容される賦形剤および／または他の活性剤（同一の組成物中に使用される場合）から成

50

っていてもよい。

【0181】

他の実施形態では、徐放、遅延または持続放出製剤を、例えば、鼻または副鼻腔への送達に使用してもよい。代表的な製剤は、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を含有する粉末剤または前記粉末剤の懸濁液であってもよく、前記粉末剤は、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を、最高90%まで、例えば、最高85%、80%、75%または70%まで、例えば、50~90%、55~90%、60~90%、65~90%、70~90%、75~90%、80~90%、85~90%、50~85%、55~85%、60~85%、65~85%、70~85%、75~85%、80~85%、50~80%、55~80%、60~80%、65~80%、70~80%、75~80%、50~70%、55~70%、60~70%または65~70% (w/vまたはw/w) 含有していてもよく、残りは、薬学的に許容される賦形剤および/または他の活性剤 (使用される場合) から成っていてもよい。この粉末剤は、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の放出を制御するコーティングを含んでいてもよい。

10

【0182】

本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を、女性の下部生殖器系の皮膚、子宮頸部またはその他の部分に投与するために使用し得る、代表的な局所製剤 (例えば、クリーム剤、軟膏剤または膏薬) は、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を、1~25%、1~20%、1~15%、1~10%、1~9%、1~8%、1~7%、1~6%、5~25%、5~20%、5~15%、5~10%、5~9%、5~8%、5~7%、5~6%、8~25%、8~20%、8~15%、8~10%、9~25%、9~20%または9~15% (w/v) 含有していてもよく、残りは、薬学的に許容される賦形剤および/または他の活性剤 (使用される場合) から成っていてもよい。局所製剤を女性の生殖器系に適用するために設計された送達装置は公知であり、好都合である場合、上記製剤を送達するために使用してもよい。

20

【0183】

本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を、下部消化管に投与するために使用される代表的な錠剤は、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を最高99%まで、最高95%、90%、85%または80%まで、例えば、50~95%、55~95%、60~95%、65~95%、70~95%、75~95%、80~95%、85~95%、90~95%、50~90%、50~90%、55~90%、60~90%、65~90%、70~90%、75~90%、80~90%、85~90%、50~90%、55~85%、60~80%または65~75% (w/vまたはw/w) 含有していてもよく、残りは、薬学的に許容される賦形剤および/または他の活性剤 (使用される場合) から成っていてもよい。この錠剤は、多層錠であってもよい。

30

【0184】

腸溶性錠剤も、本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を下部消化管に投与する際に効果的であり得る。代表的な腸溶性錠剤は、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を、最高95%まで、例えば、最高90%、85%または80%まで、例えば、55~90%、60~90%、65~90%、70~90%、75~90%、80~90%、85~90%、55~85%、60~85%、65~85%、70~85%、75~85%、80~85%、50~80%、55~80%、60~80%、65~80%、70~80%または75~80% (w/vまたはw/w) 含有していてもよく、残りは、薬学的に許容される賦形剤 (腸溶コーティング (例えば、脂肪酸、ワックス、シェラック、プラスチックおよび植物繊維を含むポリマー) を含む) および/または他の活性剤 (使用される場合) から成っていてもよい。この錠剤は、多層錠 (例えば、上述のもの) であってもよい。

40

【0185】

腸溶性顆粒剤も、本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を下部消化管に投与する際に効果的であり得る。かかる顆粒剤は、カプセルで提供されてもよく、この

50

カプセルは、それ自体が腸溶コーティングを有していても有していなくてもよい。代表的な腸溶性顆粒剤は、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を、最高 95 % まで、例えば、最高 90 %、85 % または 80 % まで、例えば、55 ~ 90 %、60 ~ 90 %、65 ~ 90 %、70 ~ 90 %、75 ~ 90 %、80 ~ 90 %、85 ~ 90 %、55 ~ 85 %、60 ~ 85 %、65 ~ 85 %、70 ~ 85 %、75 ~ 85 %、80 ~ 85 %、50 ~ 80 %、55 ~ 80 %、60 ~ 80 %、65 ~ 80 %、70 ~ 80 % または 75 ~ 80 % (w/v または w/w) 含有していてもよく、残りは、薬学的に許容される賦形剤 (腸溶コーティング (例えば、脂肪酸、ワックス、シェラック、プラスチックおよび植物繊維を含むポリマー) を含む) および / または他の活性剤 (使用される場合) から成っていてもよい。

10

【0186】

本発明のポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を女性生殖器官の下部に投与するために、ペッサリーを使用してもよい。代表的な製剤は、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を 1 ~ 25 %、1 ~ 20 %、例えば、1 ~ 15 %、1 ~ 10 %、1 ~ 9 %、1 ~ 8 %、1 ~ 7 %、1 ~ 6 %、5 ~ 25 %、5 ~ 20 %、5 ~ 15 %、5 ~ 10 %、5 ~ 9 %、5 ~ 8 %、5 ~ 7 %、5 ~ 6 %、8 ~ 25 %、8 ~ 20 %、8 ~ 15 %、8 ~ 10 %、9 ~ 25 %、9 ~ 20 % または 9 ~ 15 % (w/v または w/w) 含有していてもよく、残りは、薬学的に許容される賦形剤 (個体賦形剤を含む) および / または他の活性剤 (使用される場合) から成っていてもよい。直腸坐剤も同様に製剤化し得る。

20

【0187】

ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体は、1 日量として 0.1 g ~ 10 g、例えば、0.5 g ~ 5 g、0.8 g ~ 3 g、1 g ~ 2 g、例えば、約 2 g 使用してもよく、これは、1 日に 1 回以上 (例えば、1 日 2 回) および 1 種以上の投薬形態または投与回数 (例えば、2 錠を 1 日 2 回) 投与してもよい。

【0188】

本明細書において定義されているポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体は、1 つ以上のさらなる治療活性剤と併用または組み合わせて用いてもよく、治療活性剤は、他の抗微生物剤 (例えば、抗菌剤、抗生物質製剤、抗真菌剤および抗ウイルス剤)、免疫賦活剤、コルチコステロイド、非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs)、気管支拡張剤、粘液粘度低下剤 (すなわち、粘液の粘度を低下させる薬剤であり、その用語は、「粘液溶解剤」という用語と同じ意味で用いられる) または CFT R モジュレーター (「CFT R モディファイヤー」としても知られる) を含んでいてもよい。

30

【0189】

更なる薬剤、例えば、抗生物質は、アルギネートオリゴマーまたは他の任意の結合部分に非結合であってもよい。

【0190】

ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体およびさらなる治療活性剤は、例えば、単一の医薬製剤もしくは組成物で共にまたは個別に投与 (すなわち、個別投与、逐次投与または同時投与) してもよい。したがって、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体と、さらなる治療活性剤を、例えば、医薬キットにおいてまたは複合 (配合) 製品として、組み合わせてもよい。

40

【0191】

したがって、本発明のさらなる態様は、対象における細菌感染症を治療または予防する際に個別、逐次または同時に使用するための複合 (combined) 製剤として更なる治療活性剤 (例えば、上述のもの) と共に、本明細書において定義されているポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を含む製品 (例えば、医薬配合物 (pharmaceutical combination) またはキット) を提供する。

【0192】

より一般的には、本発明のこの態様は、さらなる治療活性剤 (例えば、上述のもの) と共に、本明細書において定義されているポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を

50

含むキットも提供する。

【0193】

本明細書において定義されているポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体ならびに抗生物質、抗真菌剤、CFTRモジュレーターおよび/または粘液粘度低下剤を含む化合物 (Combinations) が特に好ましい。かかる医薬製品および医薬組成物は、好ましくは、本発明の医療方法における使用に適応している。

【0194】

前記さらなる治療活性剤は、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の前に、それと同時にまたはその後都合よく適用してもよい。好都合なことに、さらなる治療活性剤は、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体と実質的に同時にまたはその後適用される。他の実施形態では、さらなる治療活性剤は、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の前に都合よく適用または投与されてもよい。さらなる治療活性剤はまた、使用される薬剤に適切な時点で繰り返し与える (例えば、投与するまたは送達する) こともできる。当業者は、好適な投与計画を立てることができる。長期間治療では、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体は、繰り返し使用することもできる。ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体は、さらなる治療活性剤と同じ頻度でまたはより高い頻度でもしくはより低い頻度で適用することができる。必要とされる頻度は、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体が投与される患者の体内もしくは体表面上における部位または場所、また、治療を受けている特定の患者が示す臨床症状の全体的な性質により決まり得る。

【0195】

したがって、ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体およびさらなる治療活性剤は、共にまたは個別に、すなわち、同一のもしくは異なる製剤または医薬組成物に製剤化してもよく、また、同一のまたは異なる経路による投与用に提供し得る。本発明の医療方法において使用するためのかかる医薬製品および医薬組成物を製造するために、本明細書において定義しているポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体を使用することも考えられる。

【0196】

本明細書で定義しているポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体と併用または組み合わせ使用し得る代表的な抗生物質としては、アミノグリコシド系抗生物質 (例えば、アミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン) ; ラクタム系抗生物質 (例えば、カルベセフェム系抗生物質 (例えば、ロラカルベフ) ; 第一世代セファロスポリン系抗生物質 (例えば、セファドロキシル、セファゾリン、セファレキシン) ; 第二世代セファロスポリン系抗生物質 (例えば、セファクロル、セファマンドール、セファレキシン、セフォキシチン、セフprozil、セフロキシム) ; 第三世代セファロスポリン系抗生物質 (例えば、セフィキシム、セフジニル、セフジトレン、セフォペラゾン、セフォタキシム、セフボドキシム、セフトジジム、セフチブテン、セフチゾキシム、セフトリアキソン) ; 第四世代セファロスポリン系抗生物質 (例えば、セフェピム) ; モノバクタム系抗生物質 (例えば、アズトレオナム) ; マクロライド系抗生物質 (例えば、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、トロレアンドマイシン) ; モノバクタム系抗生物質 (例えば、アズトレオナム) ; ペニシリン系抗生物質 (例えば、アモキシシリン、アンピシリン、カルベニシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリン G、ペニシリン V、ピペラシリン、チカルシリン) ; ポリペプチド系抗生物質 (例えば、バシトラシン、コリスチン、ポリミキシン B であるが、ある特定の実施形態では、使用されるポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体のポリミキシンではない) ; キノロン系抗生物質 (例えば、シプロフロキサシン、エノキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、モキシフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、トロパフロキサシン) ; スルホンアミド系抗生物質 (例えば、マフェニド、スルファセタミド、スルファメチゾール、スルファサラジン、スルフィソキサゾール

、トリメトプリム・スルファメトキサゾール合剤)；テトラサイクリン系抗生物質(例えば、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン)；グリシルサイクリン系抗生物質(例えば、チゲサイクリン)；カルバペネム系抗生物質(例えば、イミペネム、メロペネム、エルタペネム、ドリペネム、パニペネム・ベタミブロン合剤、ピアペネム、PZ-601)が挙げられるが、これらに限定されず；他の抗生物質は、クロラムフェニコール；クリンダマイシン、エタンブトール；ホスホマイシン；イソニアジド；リネゾリド；メトロニダゾール；ニトロフラントイン；ピラジナミド；キヌプリスチン・ダルホプリスチン合剤；リファンピン；スペクチノマイシン；およびバンコマイシンを含む。

【0197】

代表的な抗真菌剤としては、ポリエン系抗真菌剤(例えば、ナタマイシン(natamycin)、リモシジン(rimocidin)、フィリピン(filipin)、ナイスタチン(nystatin)、アムホテリシンB(amphotericin B)、カンジシン(candicin)；イミダゾール系抗真菌剤(例えば、ミコナゾール(miconazole)、ケトコナゾール(ketoconazole)、クロトリマゾール(clotrimazole)、エコナゾール(econazole)、ビホナゾール(bifonazole)、ブトコナゾール(butoconazole)、フェンチコナゾール(fenticonazole)、イソコナゾール(isoconazole)、オキシコナゾール(oxiconazole)、セルタコナゾール(sertaconazole)、スルコナゾール(sulconazole)、チオコナゾール(tioconazole)；トリアゾール系抗真菌剤(例えば、フルコナゾール(fluconazole)、イトラコナゾール(itraconazole)、イサブコナゾール(isavuconazole)、ラブコナゾール(ravuconazole)、ボサコナゾール(posaconazole)、ボリコナゾール(voriconazole)、テルコナゾール(terconazole)；アリルアミン系抗真菌剤(例えば、テルビナフィン(terbinafine)、アモロルフィン(amorolfine)、ナフチフィン(naftifine)、ブテナフィン(butenafine)；およびエキノキャンディン系抗真菌剤(例えば、アニデュラファンギン(anidulafungin)、カスポファンギン(caspofungin)、ミカファンギン(micafungin))が挙げられるが、これらに限定されない。

【0198】

代表的な抗ウイルス剤としては、アバカビル(abacavir)、アシクロビル(acyclovir)、アデフォビル(adeфовir)、アマンタジン(amantadine)、アンブレナビル(amprenavir)、アルビドール(arbidol)、アタザナビル(atazanavir)、アトリプラ(atrilpla)、ボセブレビル(boceprevir)、シドフォビル(cidofovир)、コンビビル(combivir)、ダルナビル(darunavir)、デラビルジン(delavirdine)、ジダノシン(didanosine)、ドコサノール(docosanol)、エドクスジン(edoxudine)、エファビレンツ(efavirenz)、エムトリシタビン(emtricitabine)、エンフビルチド(enfuvirtide)、エンテカビル(entecavir)、ファムシクロビル(famciclovir)、ホミビルセン(fomivirsen)、ホスアンブレナビル(fosamprenavir)、ホスカルネット(foscarnet)、ホスホネット(fosfonet)、ガンシクロビル(ganciclovir)、イバシタビン(ibacitabine)、イムノビル(imunovir)、イドクスウリジン(idoxuridine)、イミキモド(imiquimod)、インジナビル(indinavir)、イノシン(inosine)、III型インターフェロン(interferon type III)、II型インターフェロン(interferon type II)、I型インターフェロン(interferon type I)、ラミブジン(lamivudine)、ロピナビル(lopinavir)、ロビリド(loviride)、マラビロク(maraviroc)、モロキシジン(moroxydine)、ネルフィナビル(nelfinavir)、ネビラピン(nevirapine)、ネキサビル(nexavir)、オセルタミビル(oseltamivir)、ペンシクロビル(penciclovir)、ペラミビル(peramivir)、プレコナリル(pleconaril)、ポドフィロトキシン(podophyllotoxin)、ラルテグラビル(raltegravir)、リバビリン(ribavirin)、リマンタジン(rimantadine)、リトナビル(ritonavir)、サキナビル(saquinavir)、スタブジン(stavudine)、テノホビル(tenofovир)、テノホビルジソプロキシル(tenofovир disoproxil)、チブラナビル(tipranavir)、トリフルリジン(trifluridine)、トリジビル(trizivir)、トロマンタジン(tromantadine)、ツルバダ(truvada)、バラシクロビル(valaciclovir)、バルガ

10

20

30

40

50

ンシクロビル (valganciclovir)、ビクリビロック (vicriviroc)、ビダラビン (vidarabine)、ピラミジン (viramidine)、ザルシタビン (zalcitabine)、ザナミビル (zanamivir) およびジドブジン (zidovudine) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0199】

代表的な免疫賦活剤としては、サイトカイン、例えば、TNF、IL-1、IL-6、IL-8、並びに、例えば、米国特許第5,169,840号、国際公開第91/11205号および国際公開第03/045402号（これらの全体を参照により本明細書に明示的に援用する）に記載されている高M含量アルギネートなどの免疫賦活性アルギネートが挙げられるが、これらに限定されず、免疫賦活性を有する任意のアルギネートを含む。

【0200】

好適なコルチコステロイドの代表例としては、プレドニゾン (prednisone)、フルニソリド (flunisolide)、トリアムシノロン (triamcinolone)、フルチカゾン (fluticasone)、ブデソニド (budesonide)、モメタゾン (mometasone)、ベクロメタゾン (beclomethasone)、アムシノニド (amcinonide)、ブデソニド (budesonide)、デソニド (desonide)、フルオシノニド (fluocinonide)、フルオシノロン (fluocinolone)、ハルシノニド (halcinonide)、ヒドロコルチゾン (hydrocortisone)、コルチゾン (cortisone)、チキソコルトール (tixocortol)、プレドニゾロン (prednisolone)、メチルプレドニゾロン (methylprednisolone)、プレドニゾン、ベタメタゾン (betamethasone)、デキサメタゾン (dexamethasone)、フルオコルトロン (fluocortolone)、アクロメタゾン (aclometasone)、プレドニカルベート (prednicarbate)、クロベタゾン (clobetasone)、クロベタゾール (clobetasol) およびフルプレドニデン (fluprednidene) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0201】

代表的なNSAIDsとしては、サリチル酸系非ステロイド性抗炎症薬（例えば、アスピリン（アセチルサリチル酸）、コリンマグネシウムトリサリチル酸塩 (choline magnesium trisalicylate)、ジフルニサル (diflunisal)、サルサレート (salsalate)、プロピオン酸誘導体系非ステロイド性抗炎症薬（例えば、イブプロフェン (ibuprofen)、デクスイブプロフェン (dexibuprofen)、デクスケットプロフェン (dexketoprofen)、フェノプロフェン (fenoprofen)、フルルビプロフェン (flurbiprofen)、ケトプロフェン (ketoprofen)、ロキソプロフェン (loxoprofen)、ナプロキセン (naproxen)、オキサプロジン (oxaprozin)、酢酸誘導体系非ステロイド性抗炎症薬（例えば、アセクロフェナク (aceclofenac)、ジクロフェナク (diclofenac)、エトドラク (etodolac)、インドメタシン (indomethacin)、ケトロラク (ketorolac)、ナブメトン (nabumetone)、トルメチン (tolmetin)、スリンダク (sulindac)、エノール酸誘導体系非ステロイド性抗炎症薬（例えば、ドロキシカム (droxicam)、イソキシカム (isoxicam)、ロルノキシカム (lornoxicam)、メロキシカム (meloxicam)、ピロキシカム (piroxicam)、テノキシカム (tenoxicam)、アントラニル酸誘導体系非ステロイド性抗炎症薬（例えば、フルフェナム酸 (flufenamic acid)、メクロフェナム酸 (meclofenamic acid)、メフェナム酸 (mefenamic acid)、トルフェナム酸 (tolfenamic acid)）および選択的シクロオキシゲナーゼ-2阻害薬（コキシブ (Coxibs)；例えば、セレコキシブ (celecoxib)、エトリコキシブ (etoricoxib)、ルミラコキシブ (lumiracoxib)、パレコキシブ (parecoxib)、ロフェコキシブ (rofecoxib)、バルデコキシブ (valdecoxib)）が挙げられるが、これらに限定されない。プロピオン酸誘導体系非ステロイド性抗炎症薬（例えば、イブプロフェン、デクスイブプロフェン、デクスケットプロフェン、フェノプロフェン、フルルビプロフェン、ケトプロフェン、ロキソプロフェン、ナプロキセン、オキサプロジン）が好ましく、イブプロフェンが最も好ましい。

【0202】

好適な気管支拡張剤の代表例としては、 β_2 アゴニスト気管支拡張剤（例えば、短時間作用型 β_2 アゴニスト気管支拡張剤（例えば、ピルブテロール (pirbuterol)、エピネフリン (epinephrine)、サルブタモール (salbutamol)、レボサルブタモール (levosalbu

10

20

30

40

50

tamol)、クレンブテロール(clenbuterol)、テルブタリン(terbutaline)、プロカテロール(procaterol)、メタプロテレノール(metaproterenol)、フェノテロール(fenoterol)、ビットルテロールメシレート(bitolterol mesylate)、リトドリン(ritodrine)、イソプレナリン(isoprenaline))；長時間作用型 2 アゴニスト気管支拡張剤(例えば、サルメテロール(salmeterol)、ホルモテロール(formoterol)、バンブテロール(bambuterol)、クレンブテロール(clenbuterol))；および超長時間作用型 2 アゴニスト気管支拡張剤(例えば、インダカテロール(indacaterol))、抗コリン作用薬気管支拡張剤(例えば、イプラトロピウム(ipratropium)、オキシトロピウム(oxitropium)、チオトロピウム(tiotropium))およびテオフィリン(theophylline)が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0203】

本明細書で使用される用語「粘液溶解剤」および「粘液粘度低下剤」は、粘液の固有粘度を低下させる薬剤および下層上皮への粘液の付着を低減させる薬剤、特に、粘液の成分内または成分間の分子間相互作用を直接的または間接的に阻害する薬剤、粘液の水和反応に作用する薬剤および粘膜上皮のイオン微小環境(特に、二価カチオン(例えば、カルシウム)の濃度)を調節する薬剤を包含することを意図している。好適な粘液粘度低下剤の代表例としては、核酸切断酵素(例えば、デオキシリボヌクレアーゼIまたはドルナーゼアルファなどのデオキシリボヌクレアーゼ)、高張食塩水、ゲルゾリン、チオール還元剤、アセチルシステイン、非荷電低分子量多糖類(例えば、デキストラン、マンニトール)、アルギニン(または、他の一酸化窒素前駆体若しくは合成促進剤)、プリン受容体の P₂Y₂ サブタイプのアゴニスト(例えば、デヌホソル(denufosol))またはアニオン性ポリアミノ酸(例えば、ポリASPまたはポリGLU)が挙げられるが、これらに限定されない。注目に値する具体的な粘液溶解薬は、アンブロキシール(Ambroxol)、ブロムヘキシン(bromhexine)、カルボシステイン(carbocysteine)、ドミオドール(domiodol)、エブラジノン(eprazinone)、エルドステイン(erdosteine)、レトステイン(letosteine)、メスナ(mesna)、ネルテネキシン(nelitenexine)、ソブレロール(sobrerol)、ステプロニン(stepronin)、チオプロニン(tiopronin)である。デオキシリボヌクレアーゼIおよび高張食塩水が好ましい。

20

【0204】

CFTRモジュレーターは、CFTR機能不全を、少なくとも部分的に改善することのできる小分子である。本CFTRモジュレーターは、3つの主なグループに分類される：CFTR増強剤、CFTR修正剤(correctors)およびリードスルー薬(Derichs, N., Eur. Respir. Rev., 2013, 22(127), 58-65; Petit, R.S. and Fellner, C., Pharmacy and Therapeutics, 2014, 39(7), 500-511; これらの内容を参照により本明細書に援用する)。CFTR増強剤は、上皮細胞表面に存在するCFTRイオンチャネルの活性を高めるCFTRモジュレーターである。CFTR修正剤は、上皮細胞表面に送達されるまたは保持されるCFTRタンパク質の量を増加させるCFTRモジュレーターである。リードスルー薬(「未成熟終止コドンサプレッサー(premature stop codon suppressors)」(PSCサプレッサー)または「中途終止コドンサプレッサー(premature termination codon suppressors)」(PTCサプレッサー; これら用語は、本明細書において同じ意味で使用される)としても知られている)は、細胞の翻訳機構に、CFTRmRNA内の任意の中途終止コドンを通過させることにより、産生される実質的に全長且つ機能的なCFTRの量を増加させるCFTRモジュレーターである。

30

40

【0205】

好適なCFTR増強剤の代表例としては、バーテックス・ファーマシューティカルズ(Vertex Pharmaceuticals(登録商標))のアイバカフトール(ivacaftor)(VX-770; N-(2,4-ジ-tert-ブチル-5-ヒドロキシフェニル)-1,4-ジヒドロ-4-オキソキノリン-3-カルボキサミド)およびVRT-532(4-メチル-2-(5-フェニル-1H-ピラゾール-3-イル)-フェノール)が挙げられるが、これらに限定されない。

50

【 0 2 0 6 】

好適な C F T R 修正剤の代表例としては、バーテックス・ファーマシューティカルズ (Vertex Pharmaceuticals (登録商標)) のプロトタイプのルマカフトール (Prototypical lumacaftor) (V X - 8 0 9) および V X - 6 6 1 並びに N 6 0 2 2 (3 - [1 - (4 - カルバモイル - 2 - メチルフェニル) - 5 - (4 - イミダゾール - 1 - イルフェニル) ピロール - 2 - イル] プロパン酸) が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 2 0 7 】

好適なリードスルー薬の代表例としては、P T C セラピューティクス (PTC Therapeutics) 社のアタルレン (ataluren) (P T C 1 2 4) およびゲンタマイシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 2 0 8 】

以下の非限定的な実施例を用いて、本発明を更に説明する。実施例において：

図 1 は、A：オリゴ G - A - コリスチン (M I C 中央値 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$)；B：オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度)；C：プロノバ (Pronova) アルギネート (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度)；D：オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) および コリスチン (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度)；E：オリゴ G - E - コリスチン (M I C 中央値 $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$)；F：オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度)；G：プロノバアルギネート (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度)；H：オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) および コリスチン (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度)；I：2.5 k の A H G - A - コリスチン (M I C 中央値 $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$)；J：2.5 k の A H G - E - コリスチン (M I C 中央値 $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$)；および K：硫酸コリスチン (M I C 中央値 $0.063 \mu\text{g} / \text{mL}$) の様々な濃度下での V 2 緑膿菌の増殖に関するグラフ図を示す。

図 2 は、A：オリゴ G - A - コリスチン (M I C 中央値 $0.063 \mu\text{g} / \text{mL}$)；B：オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度)；C：プロノバアルギネート (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度)；D：オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) および コリスチン (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度)；E：オリゴ G - E - コリスチン (M I C 中央値 $0.125 \mu\text{g} / \text{mL}$)；F：オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度)；G：プロノバアルギネート (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度)；H：オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) および コリスチン (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度)；I：2.5 k の A H G - A - コリスチン (M I C 中央値 $0.125 \mu\text{g} / \text{mL}$)；J：2.5 k の A H G - E - コリスチン (M I C 中央値 $0.063 \mu\text{g} / \text{mL}$)；および K：硫酸コリスチン (M I C 中央値 $0.008 \mu\text{g} / \text{mL}$) の様々な濃度下での V 3 クレブシエラ・ニューモニエの増殖に関するグラフ図を示す。

図 3 は、A：オリゴ G - A - コリスチン (M I C 中央値 $0.063 \mu\text{g} / \text{mL}$)；B：オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度)；C：プロノバアルギネート (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度)；D：オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) および コリスチン (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度)；E：オリゴ G - E - コリスチン (M I C 中央値 $0.125 \mu\text{g} / \text{mL}$)；F：オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度)；G：プロノバアルギネート (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度)；H：オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) および コリスチン (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度)。

10

20

30

40

50

等の濃度) ; I : 2 . 5 k の A H G - A - コリスチン (M I C 中央値 0 . 1 2 5 μ g / m L) ; J : 2 . 5 k の A H G - E - コリスチン (M I C 中央値 0 . 1 2 5 μ g / m L) ; および K : 硫酸コリスチン (M I C 中央値 0 . 0 0 2 μ g / m L) の様々な濃度下での V 1 9 アシネトバクター・パウマンニの増殖に関するグラフ図を示す。

図 4 は、A : オリゴ G - A - コリスチン (M I C 中央値 0 . 0 6 3 μ g / m L) ; B : オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) ; C : プロノバアルギネート (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) ; D : オリゴ G (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) およびコリスチン (A のオリゴ G - A - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度) ; E : オリゴ G - E - コリスチン (M I C 中央値 0 . 1 2 5 μ g / m L) ; F : オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) ; G : プロノバアルギネート (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) ; H : オリゴ G (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるオリゴ G と同等の濃度) およびコリスチン (E のオリゴ G - E - コリスチン結合体におけるコリスチンと同等の濃度) ; I : 2 . 5 k の A H G - A - コリスチン (M I C 中央値 0 . 5 μ g / m L) ; J : 2 . 5 k の A H G - E - コリスチン (M I C 中央値 0 . 5 μ g / m L) ; および K : 硫酸コリスチン (M I C 中央値 0 . 0 6 3 μ g / m L) の様々な濃度下での V 7 大腸菌の増殖に関するグラフ図を示す。

図 5 は、オリゴ G - A - コリスチン、オリゴ G - E - コリスチン、2 . 5 k の A H G - A - コリスチン、2 . 5 k の A H G - E - コリスチンおよび硫酸コリスチンの存在下における、各薬剤のそれぞれの M I C での A : V 2 緑膿菌、B : V 3 クレブシエラ・ニューモニエ、C : V 1 9 アシネトバクター・パウマンニおよび D : V 7 大腸菌の増殖 ; ならびに E : 各薬剤の存在下における、各薬剤のそれぞれの M I C での各菌株についての細菌増殖の開始の平均時間の比較に関するグラフ図を示す。

図 6 は、M I C でのオリゴ G - A - コリスチン (黒丸)、M I C \times 2 でのオリゴ G - A - コリスチン (灰色の丸)、M I C でのオリゴ G - E - コリスチン (三角)、M I C \times 2 でのオリゴ G - E - コリスチン (逆三角) M I C での硫酸コリスチン (菱形) または未処理のコントロール (正方形) への曝露後の実施例 4 の 2 コンパートメント膜拡散モデルにおけるアシネトバクター・パウマンニ (V 1 9) についてのインキュベーション時間に対する C F U 数に関するグラフ図を示す。

図 7 は、A : オリゴ G (丸)、オリゴ G - A - コリスチン (2 バッチ ; 六角形および逆三角形)、オリゴ G - E - コリスチン (三角)、コリスチンメタンスルホネート (C M S ; 正方形) および硫酸コリスチン (菱形) ; および B : オリゴ G (白丸)、オリゴ G - E - ポリミキシン B (正方形)、オリゴ G - A - ポリミキシン B (黒丸) およびポリミキシン B (三角) の漸増濃度についての細胞毒性に関するグラフ図を示す。

図 8 は、ポリミキシン B (黒三角)、硫酸コリスチン、(黒丸)、オリゴ G - E - ポリミキシン B (灰色三角)、オリゴ G - E - コリスチン (灰色丸)、オリゴ G - A - コリスチン (白丸)、オリゴ G - A - ポリミキシン B (白三角)、オリゴ G の漸増濃度への暴露による、細胞生存率に応じて調整された、H K 2 細胞からの腫瘍壊死因子 (T N F) 放出に関するグラフ図を示す。データは平均 \pm S E M (n = 6) として表した。

図 9 は、前記薬剤の存在下で形成された緑膿菌バイオフィルムの構造および緑膿菌バイオフィルム内の細胞生存率に対する、A : オリゴ G - A - コリスチン (M I C 中央値 = 1 μ g / m L) および B : 硫酸コリスチン (M I C 中央値 = 0 . 0 6 3 μ g / m L) の漸増濃度の影響を示す。

【 0 2 0 9 】

[実施例]

[実施例 1]

ポリミキシン - アルギネートオリゴマー結合体の調製

酸加水分解によるアルギネートオリゴマーの調製

6 0 % 超のグルコネートモノマー (PRONOVA UP MVG) を含有するナトリウムアルギネー

ト (Sodium alginate) を、 dH_2O (10 mg/mL) に溶解し、その溶液を 0.01 M の HCl に調整した後、最高 24 時間まで 80°C の水浴中に置いた。加水分解を終了させるため、酸加水分解物を冷却し、 10 M の NaOH を添加することにより pH を $\text{pH} 7$ に上げた。溶液を凍結乾燥させ、最少量の dH_2O に再懸濁させた。

【0210】

許容される数平均重合度ならびに分子量分布を有する酸加水分解 G フラグメント (AHG) を得るために、溶液を透析により一度濾過し、低分子量オリゴマーおよび塩を除去した。典型的には、以下の反応時間および透析膜カットオフを用いて所望の分子量を有する AHG を生成した。

【0211】

【表 1】

所望分子量 (g/mol)	およその反応時間 (時:分)	透析膜カットオフ (g/mol)
2,500	21:00	1,000
7,500	9:45	2,000
15,000	5:30	8,000

【0212】

最終生成物を凍結乾燥させ、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) およびゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により特性を明らかにした。GPC システムは、直列の 2 つの TSK G5000PW_{xL} および G3000PW_{xL} カラム (Polymer Laboratories、英国) から成り、移動相はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) ($\text{pH} 7.4$)、流速は 1 mL/分 であった。分子量および多分散性は、プルラン標準物質に対して相対的に算出した。アルギネート標準物質は市販されていないことから、プルランの使用を余儀なくされた。GPC は、さまざまな高分子構造によって異なる流体力学的体積に従って分離するため、これらの校正標準ではアルギネートに関する正確な分子量が得られない。アルギネートは、プルランよりも膨張するため、プルランを用いた GPC によると、アルギネートの分子量は 6 倍過大評価されることになる。このため、プルラン校正により算出された見かけの分子量に換算係数 (6 で割る) を適用し、プルラン分子量標準の異なる高分子構造に対して調整した (Andersen T. ら, 2012, 組織工学における生体材料としてのアルギネート (Alginates as biomaterials in tissue engineering). Carbohydrate Chemistry: Chemical and Biological Approaches, Vol. 37, 232-233)。

【0213】

GPC 用サンプルを、PBS (3 mg/mL) 中に調製し、その溶出液を示差屈折計 (Optilab t-Rex (Wyatt、英国)) を用いてモニターした。Polymer Laboratories (英国) 製の PL Caliber Instrument ソフトウェア、バージョン 7.0.4 をデータ分析に使用した。

【0214】

$2,500 \sim 26,000\text{ g/mol}$ (多分散性 $2.5 \sim 3.5$) の分子量を有する酸加水分解 G フラグメント (AHG) を生成した。これらの研究において使用した AHG の典型的な特徴を、以下の表に要約する。

【0215】

【表 2】

名称	見かけの分子量 (g/mol)*	PDI	DP _n
オリゴG	15,600 [2,600]	1.8	13
‘2.5k’	15,000 [2,500]	1.4	13
‘6k’	36,207 [6,035]	4.0	30
‘7.5k’	42,000 [7,000]	2.6	35
‘9k’	52,000 [8,670]	3.0	45
‘13.5k’	81,543 [13,590]	2.9	68
‘15k’	72,000 [12,000]	3.5	60
‘16k’	93,500 [15,580]	3.6	81
‘20k’	119,362 [19,894]	3.1	100
‘26k’	152,500 [25,420]	3.5	132
PRONOVA UP MVG ⁺	651,000 [108,500]	2.5	565

*プルラン分子量標準と比較。[]内の値は、換算係数を適用し、プルラン分子量標準の異なる高分子構造に対して調整した後の推定される実際の分子量を示している。

⁺空隙容量における溶出液であるため、分子量は、過小評価されている可能性がある。

【0216】

結合用のオリゴG CF-5/20を、先に説明したようにして生成した(Khanら、2012、抗菌薬と化学療法(Antimicrobial Agents and Chemotherapy)56(10), 5134-5141)。オリゴGは、少なくとも85%のG残基を有する5~20量体のアルギネートオリゴマーである。

【0217】

エステル結合(‘E’)

簡単に説明すると、2,500 g/molのAHGをコリスチンに結合させるために、アルギネートオリゴマー(200 mg、0.08 mmol)を、10 mLの丸底フラスコにおいて、攪拌しながら無水DMF(4 mL)(またはバッチ3以降では無水DMSO)に溶解した。これに、DCC(16.5 mg、0.08 mmol)、DMAP(1.6 mg、0.01 mmol)および硫酸コリスチン(37.5 mg、0.03 mmol)を添加し、攪拌しながら室温で一晩反応を進行させた。反応を停止させるために、その混合液を過剰のクロロホルム(最高20 mLまで)に注いだ後、生じた沈殿物を濾過により採取し、蒸留水(dH₂O、2 mL)に再溶解し、FPLCにより精製した(下記参照)。

【0218】

本明細書において挙げている他のエステル結合した結合体(ester-linked conjugates)も同様に調製した。

【0219】

アミド結合(‘A’)

簡単に説明すると、2,500 g/molのAHGをコリスチンに結合させるために、アルギネートオリゴマー(200 mg、0.08 mmol)を、10 mLの丸底フラスコにおいて、攪拌しながらdH₂O(2 mL)に溶解した。これに、EDC(19.9 mg、0.1 mmol)およびスルホ-NHS(22.6 mg、0.1 mmol)を添加し、その混合液を15分間攪拌したままにした。続いて、硫酸コリスチン(37.5 mg、0.03 mmol)を添加し、反応混合液を室温で2時間攪拌したままにし、FPLCによる精製まで-20℃で保存した(下記参照)。

【0220】

本明細書において挙げている他のアミド結合した結合体(amide-linked conjugates)も同様に調製した。

10

【0221】

FPLCによる結合体の精製

UV検出器を備えたプレパックHiLoad Superdex 75 16/600 PGカラムを使用して、高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)(AKTA FPLC; Amersham Pharmacia Biotech、英国)により、反応混合液から結合体を精製し、ユニコーン4.0ソフトウェア(Amersham Pharmacia Biotech、英国)を使用してデータ分析した。移動相として、0.5 mL/分のPBS(pH 7.4)を使用して、反応混合液のサンプル(2 mL)を2 µLループに注入した。画分(5 mL)を採取し、脱イオン水(8回水交換)に対して透析し、結合体を含有する画分をプールする前にタンパク質含有量を測定した(BCAアッセイ)。最終結合体を凍結乾燥させ、-20℃で保存した。

20

【0222】

[実施例 2]

アルギネートオリゴマー - 抗生物質結合体の特徴

純度、分子量および薬物含有量

アルギネートオリゴマー - 抗生物質結合体は、FPLCおよびGPCにより特徴を明らかにし、純度を評価し、分子量を概算し、結合体の総薬物含有量は、校正剤として遊離薬物を使用し、BCAアッセイにより求めた。

【0223】

プレパックSuperdex 75 10/300 GLカラムを用いて、最終的な結合体の特徴を明らかにするために、精製用の上記FPLCシステムを再度使用した。サンプル(200 µL)をPBS(pH 7.4)に溶解し、0.5 mL/分で100 mLループに注入した。上記GPCシステムが、最終的な結合体の特徴を明らかにするために再度使用されるものとし、同じ換算係数を適用した。

30

【0224】

アミド結合した結合体については、ニンヒドリンアッセイを使用し、アミド結合を介してアルギネートオリゴマーに結合するために、コリスチンのアミン基がいくつ使用されたかを求めた。最初に、酢酸リチウム二水和物(40.81 g)を60 mLのdH₂Oに溶解することにより4 M酢酸リチウム緩衝液を調製した。pH 5.2に達するまで十分な酢酸(氷)を添加した。dH₂Oを用いて容量を100 mLの最終容量にした。次に、ニンヒドリン(0.2 g)およびヒドリンダンチン(0.03 g)を、7.5 mLのDMSOおよび2.5 mLの酢酸リチウム緩衝液に溶解した。緩衝ニンヒドリン試薬(86 µL)を、等量のサンプル/標準溶液(1.5 mLエッペンドルフ)に添加し、100℃の水浴中で15分間加熱した。続いて、この混合液を室温まで冷却し、130 µLの50%(v/v)エタノールを添加した。この溶液を混合してから、最終溶液200 µLを96ウェルプレートのウェルに添加した。分光光度分析は570 nmで行った。アッセイの校正は、エタノールアミン(0~0.1158 mM)を用いて成された。

40

【0225】

アルギネートオリゴマーおよびアルギネートオリゴマー - 抗生物質結合体の安定性

アルギネートオリゴマーの分解速度を比較するために、溶液(3 mg/mL)を、細菌性アルギネートリアーゼ(0、1~1000 U/mL)を含むpH 7のPBS中で調製し

50

、37℃で48時間までインキュベートした。アルギネートオリゴマー-抗生物質結合体溶液を、i) pH 5のPBS、ii) pH 7のPBSまたはiii) 細菌性アルギネートリアーゼ(1 U/mL)を含有するpH 7のPBSのいずれかにおいて調製し(3 mg/mL)、37℃で48時間までインキュベートした。様々な時点でサンプル(300 mL)を採取し、直ちに液体窒素中で急速冷凍し反応を停止させた後、経時的な分子量の変化を測定するGPCおよび経時的な遊離コリスチンの変化を測定するFPLC(結合体のみ)による分析まで-20℃で保存した。

【0226】

結果

これらのアルギネートオリゴマーを使用し、(ブルラン分子量標準に対して)24,000~120,000 g/molの分子量で、約50の典型的な反応収率で、結合体のライブラリーを作製した。含まれる薬物の装填量は1~11重量%%(3~6 AHG:1薬物分子に相当)であった。

10

【0227】

【表 3】

バッチ 1

結合体	初期薬物 比率 (重量%)	薬物装填量 (重量%) (収率%)	モル比 (1 抗生物質 : × AHG)	分子量 (g/mol)	PDI	遊離 薬物 (%)
オリゴG-アミド-コリスチン	18.0	10.8 (60%)	4.65	24,000	1.7	1.2
オリゴG-エステル-コリスチン	18.0	10.6 (59%)	4.75	25,000	1.8	0.5
6 k AHG-アミド-コリスチン*	7.8	4.0 (51%)	5.63	44,000	2.8	5.9
6 k AHG-エステル-コリスチン*	7.8	1.2 (15%)	19.32	42,750	2.7	6.4
9 k AHG-アミド-コリスチン*	5.4	2.9 (54%)	5.24	55,250	2.8	9.0
9 k AHG-エステル-コリスチン	5.4	6.0 (111%)	2.45	56,250	3.2	4.0
13.5 k AHG-エステル-コリスチン*	3.5	0.8 (23%)	12.93	82,750	3.1	1.2
16 k AHG-アミド-コリスチン*	3.0	2.7 (67%)	3.17	109,500	3.4	2.7
16 k AHG-エステル-コリスチン	3.0	5.0 (167%)	1.67	111,000	-	2.3
オリゴG-アミド-ポリミキシンB	17.8	9.7 (54%)	5.16	22,500	1.7	0.9
オリゴG-エステル-ポリミキシンB*	17.8	2.0 (11%)	27.17	20,000	2.1	4.1
6 k AHG-アミド-ポリミキシンB*	7.7	1.6 (21%)	14.21	39,000	3.4	0.7
6 k AHG-エステル-ポリミキシンB*	7.7	3.0 (39%)	7.47	42,500	3.0	9.9
9 k AHG-アミド-ポリミキシンB	5.4	2.4 (54%)	6.26	55,500	2.6	3.1
9 k AHG-エステル-ポリミキシンB*	5.4	0.8 (15%)	19.10	60,250	3.3	1.3
13.5 k AHG-エステル-ポリミキシンB *	3.4	0.7 (21%)	14.56	84,750	3.3	6.6
16 k AHG-アミド-ポリミキシンB	3.0	2.3 (77%)	3.68	119,000	3.1	1.0

*サイズ排除クロマトグラフィーの代わりにイオン交換により精製

10

20

30

40

50

【 0 2 2 8 】

【 表 4 】

バッチ 2

結合体	薬物装填量 (重量%)	結合NH ₂ /分子*
オリゴG-A-コリスチン	13.5	1.53
オリゴG-E-コリスチン	7.5	-
2.5k AHG-A-コリスチン	6	1.72
2.5k AHG-E-コリスチン	3.6	-
7.5k AHG-A-コリスチン	2.4	2.41
7.5k AHG-E-コリスチン	0.8	-
15k AHG-A-コリスチン	3.2	2.68
15k AHG-E-コリスチン	0.9	-
オリゴG-A-ポリミキシンB	19.6	2.56
オリゴG-E-ポリミキシンB	2.3	-
2.5k AHG-A-ポリミキシンB	3.8	1.56
2.5k AHG-E-ポリミキシンB	0.6	-
7.5k AHG-A-ポリミキシンB	1.2	1.83
15k AHG-A-ポリミキシンB	0.8	0.95

*通常、1コリスチンあたり5遊離NH₂、1ポリミキシンBあたり5遊離NH₂

【 0 2 2 9 】

10

20

30

【表 5】

バッチ 3

結合体	薬物装填量 (重量%)	分子量 (g/mol)	P D I	結合NH ₂ / 分子*
オリゴG-A-コリスチン	10.0	26,250	1.9	3.51
オリゴG-E-コリスチン (DMF)*	7.3	28,750	1.9	-
オリゴG-E-コリスチン (DMSO)*	10.9	26,000	1.8	-
2.5k AHG-A- コリスチン	6.0	36,000	2.2	2.44
2.5k AHG-E- コリスチン	7.6	37,750	2.2	-

* 結合体は、無水DMFおよび無水DMSO中で試験した。薬物装填量および収率は、DMSOにおいてより高かったが、結合体の抗菌活性は同等であったため、その後、エステル結合体は無水DMSO中で合成した。

【0230】

【表 6】

バッチ 4

結合体	M _n * (g/mol)	M _w * (g/mol)	P D I	遊離薬物 (%)	薬物装填量 (重量%)
硫酸コリスチン	10,250	11,500	1.1		
オリゴG-A- コリスチン	9,750	25,500	2.6	5.7	8.7
ポリミキシンB	9,500	10,500	1.1		
オリゴG-A- ポリミキシンB	8,750	23,250	2.7	1.6	8.0
オリゴG	7,000	16,750	2.4		

【0231】

【表 7】

バッチ 5

結合体	薬物装填量 (重量%)
オリゴ G - A - コリスチン (1)	12.9
オリゴ G - A - コリスチン (2)	8.4
オリゴ G - E - コリスチン	13.5
オリゴ G - A - ポリミキシン B	8.3
オリゴ G - E - ポリミキシン B	9.7

10

【0232】

【表 8】

バッチ 6

化合物	M_w (g/mol) (M_w/M_n)	タンパク質 含有量 (重量%)	結合 NH_2 /分子	遊離 タンパク質 (%)
オリゴ G - A - コリスチン	25500 (2.6)	8.7	2.8	5.7
オリゴ G - A - コリスチン	22500 (2.3)	8.8	2.7	0.7
オリゴ G - E - コリスチン	14500 (2.3)	12.9	3.0	2.1
オリゴ G - A - ポリミキシン B	23000 (2.7)	8.0	2.0	1.6
オリゴ G - A - ポリミキシン B	23500 (2.2)	6.1	1.9	2.1
オリゴ G - E - ポリミキシン B	15500 (2.1)	7.0	3.2	2.1

20

30

40

【0233】

様々な濃度の A 1 g L と共にオリゴ G をインキュベートすることにより、濃度依存的に分子量が減少した（データは示さず）。pH 5 または pH 7 のいずれかで PBS 中においてインキュベートしたオリゴ G - コリスチン、16 k の AHG - コリスチンおよびオリゴ G - ポリミキシン B のエステル結合体およびアミド結合体のいずれも、分子量の有意な減少は示さなかった（データは示さず）。結合体は、pH 5 と比較して、pH 7 では安定性がわずかに低かった。逆に、A 1 g L は、1 U / mL でこれらの結合体からの薬物放出（

50

遊離薬物%の増加)を効果的に引き起こす(データ示さず)。アミド結合した結合体およびエステル結合した結合体からの薬物放出にはほとんど差がなかった(エステル結合体により迅速な放出およびより多くの総放出量を示した16kのAHG-コリスチン結合体を除く)。

【0234】

細菌感染症および炎症の部位では、(細菌感染症における)反応性酸素生成物(ROS)、エステラーゼおよびアルギネートリアーゼの活性、ひいては薬物の放出が並行して増加するにつれてpHが低下することが予想される。

【0235】

[実施例3]

抗菌活性

細菌分離株および細菌株:

感受性試験に使用される菌株には、培養保存菌株および臨床分離株の双方が含まれる(表1)。以下に示す範囲で、それらの公知の関連遺伝子型および原産地は、Khanら(上記参照)に記載されている。

【0236】

【表 9】

表 1 : この研究に使用した細菌分離株

コード	分離株	概要
V1	緑膿菌 R22	VIM-2、中国。Khan ら（上記参照）
V2	緑膿菌 (301)	MDR-PSA 分離株、ピペラシリン、セフトジジム、イミペネムおよびゲンタマイシンに耐性があると明示されている多剤耐性分離株。原産地；ポーランド。Khan ら（上記参照）
NH57388A	緑膿菌	安定した粘液嚢胞性線維症分離菌
V3	クレブシエラ・ニューモニエ	Khan ら（上記参照）
V4	アシネトバクター・バウマンニ MDR ACB	MDR、リビア。Khan ら（上記参照）
V5	大腸菌	Khan ら（上記参照）
V6	クレブシエラ・ニューモニエ IR25	NDM-1、インド。Khan ら（上記参照）
V7	大腸菌	Khan ら（上記参照）
V11	大腸菌	拡張スペクトル β -ラクタマーゼ耐性 (ESBL ^R)、ウェールズ
V19	アシネトバクター・バウマンニ	Khan ら（上記参照）
V33	セパシア菌 (ATCC 25416)	Khan ら（上記参照）
E68	黄色ブドウ球菌 NCTC 6571	黄色ブドウ球菌コントロール Khan ら（上記参照）
E75	黄色ブドウ球菌 NCTC 12493	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) コントロール NCTC 株

10

20

30

40

抗菌活性の測定

MICは、標準ガイドライン（CLSI 2012）に従ってブロス微量希釈法を用いて求めた。供試生物をミュラーヒントン（Mueller Hinton）カチオン調整（MH）ブロス（100 μ L、 $1 \sim 5 \times 10^4$ CFU/mL）に懸濁させ、供試化合物の連続2倍希釈液で96ウェルマイクロタイタープレートにおいてインキュベートした。MICは、16～20時間後、目に見える増殖をもたらすことのなかった供試化合物の最低濃度とした。特に明記しない限り、結果は3回の実験の中央値を示す。

【0238】

アルギネートオリゴマーの分解が抗菌活性に必要であるかどうかを調べるため、アルギネートリアーゼ（1、10および50 U/mL）の存在下、MICアッセイを行った。その際、マイクロタイタープレートのセットアップ中に、アルギネートリアーゼをMHブロスに添加した。さらに、アルギネートオリゴマー-コリスチン結合体（3 mg/mL）を、細菌性アルギネートリアーゼ（1 U/mL）を含有するpH7のPBS中、37℃で24時間インキュベートした後、上記のようにマイクロタイタープレートを準備した。

10

【0239】

最後に、オリゴG-コリスチン結合体（アミド結合およびエステル結合された）および硫酸コリスチンについて先に求めたMIC値の平均値を用いて、細菌増殖曲線を使用して、インビトロでそれらの薬物動態プロファイルと比較した。比較するために、i) オリゴG、ii) プロノバ（高分子量アルギネート）およびiii) オリゴGとコリスチン（いずれも、対応する結合体中に存在する量に相当する濃度）の存在下での細菌増殖を測定した。無菌96ウェルマイクロタイタープレートを、前述のようにMICアッセイ用にセットアップした（範囲：MIC \times 16～MIC / 16、0）。次に、プレートをパラフィルムで覆い、37℃、5% CO₂のマイクロタイタープレートリーダーに入れ、600 nmでの吸光度を48時間1時間毎に測定した。実験は3回行い、結果は平均値（n = 3）として表した。

20

【0240】

結果

アルギネート画分のいずれも、またオリゴGも、抗菌活性を示さなかったが、非結合ポリミキシン群の抗生物質は、高い抗菌活性を示した。アルギネートオリゴマー結合コリスチンおよびポリミキシンの抗菌活性は保持され、場合によっては増強される。これは、MIC値が実際には悪化するスクシニル基を介して結合された前述のコリスチン-デキストリン結合体とは好対照である。

30

【0241】

抗菌活性は、エステル結合を介して抗生物質に結合した低分子量アルギネートオリゴマー（オリゴGを含む）を含む結合体において最高であった。結合体は、抗菌活性における再現性のあるバッチ変動性を示した。

【0242】

【表 10】

バッチ 2

適切な細菌に対して試験した各化合物のMIC値 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ($n = 3$ 、中央値)

結合体	薬物装填量 (重量%)	V2	V3	V5	V19	E68	E75
オリゴG-A- コリスチン	13.5	2	0.25	0.0005	0.25	-	-
オリゴG-E- コリスチン	7.5	1	0.25	0.00003	0.125	-	-
2.5k AHG-A- コリスチン	6	1	0.25	0.00006	0.5	-	-
2.5k AHG-E- コリスチン	3.6	2	0.25	0.001	0.5	-	-
7.5k AHG-A- コリスチン	2.4	32	4	0.25	8	-	-
7.5k AHG-E-コ リスチン	0.8	4	0.5	0.004	2	-	-
15k AHG-A- コリスチン	3.2	16	2	0.125	4	-	-
15k AHG-E- コリスチン	0.9	8	1	0.002	2	-	-
硫酸コリスチン	-	0.25	<0.125	0.00002	<0.0625	-	-
オリゴG-A- ポリミキシン B	19.6	4	<0.125	0.004	2	-	-
オリゴG-E- ポリミキシン B	2.3	0.25	<0.125	0.00002	0.25	-	-
2.5k AHG-A- ポリミキシン B	3.8	1	1	0.00003	0.5	-	-
2.5k AHG-E- ポリミキシン B	0.6	2	2	0.002	1	-	-
7.5k AHG-A- ポリミキシン B	1.2	64	32	2	4	-	-
15k AHG-A- ポリミキシン B	0.8	4	2	0.031	1	-	-
ポリミキシン B	-	0.25	<0.125	<0.000008	<0.0625	-	-

10

20

30

40

【表 1 1】

バッチ 3

適切な細菌に対して試験した各化合物のMIC値 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ($n = 3$ 、中央値)

結合体	薬物装填量 (重量%)	V2	V3	V5	V19
オリゴG-A-コリスチン	10.0	1	0.063	0.00002	0.063
オリゴG-E-コリスチン (DMF)*	7.3	0.5	0.125	0.00003	0.125
オリゴG-E-コリスチン (DMSO)*	10.9	0.5	0.125	0.000008	0.125
2.5k AHG-A-コリスチン	6.0	0.5	0.125	0.00002	0.125
2.5k AHG-E-コリスチン	7.6	0.5	0.063	0.0001	0.125

10

20

【0 2 4 4】

【表 1 2】

バッチ 4

適切な細菌に対して試験した各化合物のMIC値 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ($n = 3$ 、中央値)

結合体	薬物 装填量 (重量%)	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V19
オリゴG-A-コリスチン	8.7	1	1	0.25	1	<0.016	1	0.5	0.5
硫酸コリスチン		0.25	0.25	<0.063	0.5	<0.016	0.0625	0.125	<0.016
オリゴG-A-ポリミキシンB	8.0	4	4	1	2	<0.125	4	2	2
ポリミキシンB		0.25	0.5	0.125	0.125	<0.016	0.125	0.063	0.031

30

40

【0 2 4 5】

【表 1 3】

バッチ 6

適切な細菌に対して試験した各化合物のMIC値 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ($n=3$ 、中央値)

結合体	V1	V2	NH57- 388A	V3	V6	V4	V19	V5	V7	V11
オリゴG-A- コリスチン	2	1	0.5	0.125	1	1	0.125	0.008	1	0.063
オリゴG-E- コリスチン	1	0.5	0.25	0.125	-	-	0.125	0.008	0.25	0.031
硫酸コリスチン	0.5	0.5	0.25	0.125	0.063	0.5	0.25	<0.008	0.25	0.031
オリゴG-A- ポリミキシン B	4	2	1	0.5	4	2	0.5	0.063	2	0.25
オリゴG-E- ポリミキシン B	-	0.5	0.25	0.25	-	-	0.5	0.016	0.5	0.063
ポリミキシン B	0.25	0.5	0.25	0.125	0.125	0.125	0.125	<0.004	0.5	0.063

10

20

【0 2 4 6】

結合体の抗菌活性を 1 g/L の存在下または 1 g/L を用いたブレインキュベーション後 (バッチ 3) に評価した場合、アミド結合した結合体またはエステル結合した結合体のいずれについても有意な変化は観察されなかった (データ示さず)。これらの結果は、オリゴGの分解が抗生物質活性に必要ではないこと、またはアルギネートオリゴマーが、細菌酵素または培養ブロスに含有されるものによって分解されることを示唆している。

30

【0 2 4 7】

細菌増殖曲線 (図 1 ~ 図 5) は、アルギネートオリゴマー - コリスチン結合体 (バッチ 2) が濃度依存的に細菌増殖を遅延させ、未処理細菌と比較して再増殖速度を低下させたことを示した。一方、硫酸コリスチン単独では、より急速な細菌の再増殖が見られた。全体として、全てのバッチにわたって先に求めたMIC値の中央値で、オリゴG - コリスチン結合体は典型的には、細菌の再増殖の阻害が最も長かったことを示した一方で、硫酸コリスチンは、細菌再増殖の阻害が最も短かった (実に、V3およびV19に対する無抗生物質コントロールと同等であった) ことを示した。オリゴG - コリスチン結合体は、2倍以上のMICで最高48時間まで細菌の再増殖を阻害した一方で、硫酸コリスチンは、8倍以上のMICで最高48時間まで細菌の再増殖を阻害する (すなわち、オリゴG - コリスチン結合体と同様の長時間にわたって増殖を阻害するためには、より高い当量濃度のコリスチンが必要であった)。オリゴG - コリスチン結合体と2.5kのアルギネートオリゴマー - コリスチン結合体との間では、細菌の再増殖が始まるまでの時間に差はなく、アミド結合した結合体とエステル結合した結合体の間にも差はなかった。全体として、これは、コリスチンの抗菌作用を延長させる、結合体からのコリスチン放出が、より安定しており且つ制御されていることを示唆し得る。

40

【0 2 4 8】

50

対応する結合体中のオリゴGおよびコリスチンと同等の濃度のオリゴG + コリスチンの組み合わせは、濃度依存的な増殖阻害を示した。典型的には、オリゴGに共有結合したコリスチンは、同等の濃度の非結合コリスチン + オリゴGと同等の活性を示した。オリゴG - コリスチン結合体（アミド結合およびエステル結合した）中のオリゴGと同等の濃度のオリゴGまたはプロノバは、細菌増殖の減少に有意な効果を及ぼさなかった。

【0249】

[実施例 4]

オリゴG - ポリミキシン結合体の薬物動態 / 薬力学的モデリング

インビトロでの非結合コリスチンと比較して、オリゴG - コリスチン結合体（バッチ 6）のPK / PDプロファイルを調べるために研究を行った。これは、従来の小分子薬剤のナノサイズ構造への組み込みが、元の薬剤から実質的に変更されているPK / PD特性と関連しているナノスケール薬物送達システムにおいて特に重要である。Azzopardi（上記参照）に既に記載されているモデル系を使用した。

【0250】

無限シンク条件（infinite sink conditions）下（総容量20 ml；内部コンパートメント容量5 ml）でAzzopardiの2コンパートメント静的透析バッグモデル（Azzopardi two-compartment static dialysis bag model）を使用して、オリゴG - コリスチン結合体のアンマスキングをシミュレーションした。透析膜（10,000 g/mol分画分子量 [MWCO]）を、蒸留水（dH₂O）に15～30分間予浸し、透析クリップで固定し、注入口から吊り下げて、滅菌医療グレードポリウレタン膜（Tegaderm）で密封された25 ml滅菌ビーカーにおいて、内部コンパートメント（IC）を外部コンパートメント（OC）から分離した。

【0251】

クラス2層流キャビネットにおいて無菌条件下でモデル系を調製し、周囲空気中37に設定された振盪インキュベーターに移し、70 rpmで48時間、一定の軌道撹拌を行った。0時間の時点で、ミューラーヒントンブロス（ 5×10^5 CFU/ml）中のアシネトバクター・バウマンニ（*Acinetobacter baumannii*）（V19）をOCに移し、事前に求めたMICでまたは当該MICの2倍で、ICにPBS中の供試薬剤（バッチ6）を充填した（実施例3；バッチ6 - コリスチンMIC：0.25 µg/ml；オリゴG - E - コリスチンMIC：0.125 µg/ml；オリゴG - A - コリスチンMIC：0.125 µg/ml）。サンプルは、様々な時点でOCから採取し、ミスラ法を用いて細菌コロニー数（CFU/ml）により特徴を明らかにした。

【0252】

結果

図6に結果を示す。PK / PDモデルは、硫酸コリスチンが、先に求めたMIC（0.25 µg/ml）で、またオリゴG - エステル - コリスチン結合体が、2倍のMIC（0.25 µg/ml）で、4時間後、生菌数を減少させ（約1/2）、全体として初期PK / PDプロファイルは本質的に同じであることを示した。オリゴG - アミド - コリスチン結合体では、MICおよび2倍のMICで、有意な活性は見られなかった。これらの結果は、透析膜を通過して拡散し、非結合コリスチンと同様の時間経過および程度で、外膜コンパートメント内で活性を発揮する能力をエステル結合した結合体は有するが、アミド結合した結合体は有さないことを実証している。より安定したアミド結合した結合体で観察された活性の欠如は、これらがIC内に保持されているのに対して、より不安定なエステル結合した結合体は急速に分解することにより、マスクされていないコリスチンをICから外に拡散させ、OCの細菌にその抗菌作用を及ぼすことを示唆している。

【0253】

[実施例 5]

インビトロ細胞毒性の測定：MTTアッセイ

MTTアッセイを用いて、ヒト腎臓（HK-2）細胞株における細胞生存率を評価した（72時間のインキュベーション）。HK-2細胞を、L - グルタミン、EGFおよびB

PEを含有する0.1 mL / ウェルの培地 (K - SFM) において、滅菌96ウェルマイクロタイタープレート (1 × 10⁵ 細胞 / mL) に播種した。それらは、24時間付着させた。次に培地を除去し、新鮮な培地に溶解した一連の濃度の供試化合物 (0.2 μmフィルター滅菌済み) を細胞に添加した。さらに67時間インキュベートした後、MTT、3 - (4, 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2, 5 - ジフェニルテトラゾリウムブロマイド (PBS中5 mg / mL溶液20 μL) を各ウェルに加え、さらに5時間、細胞をインキュベートした。その後、培地を除去し、析出したホルマザン結晶を30分かけて光学グレードのDMSO (100 μL) を加えて可溶化した。マイクロタイタープレートリーダーを用いて、540 nmで吸光度を測定した。細胞生存率は、未処理のコントロール細胞の生存率のパーセントとして表した。IC₅₀値は、平均値として表した (n = 18)。

10

【0254】

結果

オリゴG結合は、コリスチンおよびポリミキシンBの毒性を著しく減少させた (図7)。以下にまとめたIC₅₀値は、抗生物質 (ポリミキシンB、硫酸コリスチンまたはコリスチンメタンスルホネート (CMS))、すなわち、HK2細胞増殖を半分まで阻害するのに必要とされる結合体内の抗生物質の濃度を表す。オリゴGは、コントロールとして含まれている。

【0255】

【表 1 4】

	バッチ 5			バッチ 4		
薬剤	薬物装填量 (重量%)	IC ₅₀ (mg/mL)	倍数 変化	薬物装填量 (重量%)	IC ₅₀ (mg/mL)	倍数 変化
オリゴ G		> 50			>10	
硫酸コリスチン		0.01098			0.025	
C M S		0.01397				
オリゴ G - A - コリスチン (1)	12.9	0.6017	55	8.7	0.22	9
オリゴ G - A - コリスチン (2)	8.4	0.04393	4			
オリゴ G - E - コリスチン	13.5	0.05687	5			
ポリミキシン B		0.01263			0.012	
オリゴ G - A - ポリミキシン B	8.3	0.03886	3	8.0	0.35	29
オリゴ G - E - ポリミキシン B	9.7	0.03175	2.5			

【 0 2 5 6 】

[実施例 6]

インビトロ細胞毒性の測定：HK 2 細胞からの TNF 放出

ポリミキシン細胞毒性に關与するモデル炎症性サイトカインとして、ポリミキシンおよびオリゴ G - ポリミキシン結合体に応答した HK 2 細胞からの TNF 放出を ELISA により測定した。HK - 2 細胞を、L - グルタミン、EGF および BPE を含有する 0.1 mL / ウェルの培地 (K - SFM) において、滅菌 96 ウェルマイクロタイタープレート (1 × 10⁵ 細胞 / mL) に播種した。それらは、24 時間付着させた。次に培地を除去し、新鮮な培地に溶解した一連の濃度の供試化合物 (0.2 μm フィルター滅菌済み) を細胞に添加した。72 時間のインキュベーション後、マイクロタイタープレートを遠心分離し (1500 rpm、3 分)、上清を新しい 96 ウェルマイクロタイタープレートに移した。

【 0 2 5 7 】

TNF の ELISA アッセイは、製造業者の説明書 (Thermo Scientific、ESS0001) に従って実施した。簡単に説明すると、100 μL のコーティング抗体 (PBS において 1 : 100 希釈) を 96 ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに添加した。プレートをプラスチックシールで覆い、室温 (22 ~ 25) で一晩インキュベートした。コー

ディング抗体溶液を吸引し、 $300\text{ }\mu\text{L}$ のブロッキング緩衝液（PBS中4%BSA、5%スクロース）を各ウェルに添加した後、室温（ $22\sim 25$ ）で1時間インキュベートし、吸引した。バイアルラベルに従って標準物質を試薬希釈剤（PBS中4%BSA、 $\text{pH}7.4$ ）で再構成し、1:2に希釈して最高標準濃度（ 1000 pg/mL ）に調製した。96ウェルプレートの列AおよびBにわたって二連で（in duplicate）連続2倍希釈を行った（0、 $3.9\sim 1000\text{ pg/mL}$ ）。HK-2細胞の上清（試薬希釈液において1:1に希釈、 $100\text{ }\mu\text{L}$ ）を96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに添加し、室温（ $22\sim 25$ ）で一晩インキュベートした。溶液を吸引し、洗浄緩衝液（PBS中0.05%Tween-20、 $\text{pH}7.4$ ） $300\text{ }\mu\text{L}$ /ウェルを用いてプレートを3回洗浄した。次に、 $100\text{ }\mu\text{L}$ の検出抗体（試薬希釈液において1:100希釈）を各ウェルに添加した。室温（ $22\sim 25$ ）で1時間、プレートをインキュベートし、洗浄緩衝液 $300\text{ }\mu\text{L}$ /ウェルを用いて3回洗浄した。次に、 $100\text{ }\mu\text{L}$ のストレプトアビジン-HRP（試薬希釈剤において1:400希釈）を各ウェルに添加し、室温（ $22\sim 25$ ）で30分間インキュベートした後、洗浄緩衝液 $300\text{ }\mu\text{L}$ /ウェルを用いて3回洗浄した。基質溶液（ $100\text{ }\mu\text{L}$ ）を96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに添加し、室温（ $22\sim 25$ ）で20分間、暗所でインキュベートした。各ウェルに $100\text{ }\mu\text{L}$ の停止液を添加することにより反応を停止させた。吸光度は、 $450\text{ nm}-550\text{ nm}$ で測定した。

10

【0258】

検量線は、縦（Y）軸に、各標準濃度について得られた平均吸光度を、横（X）軸に、対応するヒトTNF濃度（ pg/mL ）をプロットすることにより作成した。各サンプルにおけるヒトTNF量は、検量線を用いて吸光値（Y軸）からヒトTNF濃度（X軸）に内挿することにより求めた。検量線から得られた内挿値に希釈係数（ $\times 2$ ）を掛け、各薬物濃度について細胞生存率に調整し（MTTアッセイ結果）、サンプル中のヒトTNFの pg/mL を算出した。

20

【0259】

結果

図8に結果を示す。図から分かるように、ポリミキシンBおよびコリスチンは、オリゴG-E-ポリミキシンB（コリスチンと同様の効果を示したが、ポリミキシンBよりも少なかった）を除き、TNF放出が非常に低いかまたは検出不可能であった結合体と比較して、より大きなTNF放出を誘導した。全体として、オリゴG結合は、ポリミキシン群の抗生物質による炎症性サイトカインの放出を著しく減少させた。

30

【0260】

[実施例7]

バイオフィーム発生阻害

方法

これらの実験では、オリゴG-コリスチンコン結合体が、非結合型コリスチンよりも効果的にバイオフィームの発生を阻害できるかどうかを調べた。最初に、供試化合物の原液を、MHブロス中 1 mg/mL で調製し、これを使用して、Greiner製のガラス底光学96ウェルプレート（1ウェルあたり $90\text{ }\mu\text{L}$ ）のウェル全てにおいて、MHブロス中、二重希釈により一連の濃度（2倍MIC $\sim 1/8\text{ MIC}$ ）の抗生物質を調製した。無菌性コントロール（ $100\text{ }\mu\text{L}$ のMHブロス）および増殖コントロール（ $90\text{ }\mu\text{L}$ のMHブロス+ $10\text{ }\mu\text{L}$ の供試細菌性病原体）も調製した。細菌培養液を、TSブロス（TSB）中で一晩増殖させ、MHブロスにおいて希釈し、 OD_{625} を0.5にした後、 $10\text{ }\mu\text{L}$ をウェルに添加した。プレートをパラフィルムで包み、ロッカー（ 20 rpm ）上で37で24時間インキュベートした。24時間のインキュベーションの後、上清をすべてのウェルから慎重に除去し、 $3\text{ }\mu\text{L}$ の生/死染色液（Live/dead BacLight細菌生存率キット； 1 mL のPBS中に $1\text{ }\mu\text{L}$ の成分AおよびBを混合することにより調製）を添加した。プレートをホイルで包み、15分間暗所に保存した。最後に、 $47\text{ }\mu\text{L}$ のPBSを全ての供試ウェルに添加した。プレートをパラフィルムで包み、共焦点レーザー走査顕微鏡法（CL

40

50

S M) により分析するまで暗所に保存した (n = 2)。

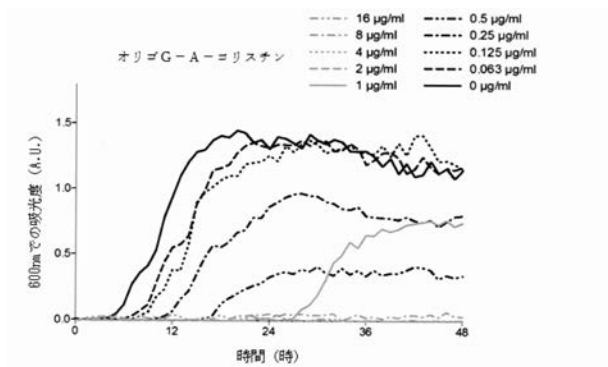
【 0 2 6 1 】

結果

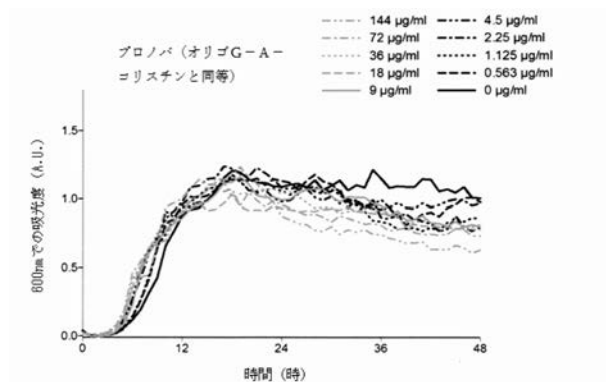
オリゴG - コリスチン結合体 (パッチ 5、オリゴG - A - コリスチン (1)) は、緑膿菌 (*P. aeruginosa*) バイオフィルムの形成を著しく阻害し、2 倍の MIC (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で細菌死を引き起こした (図 9)。MIC (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) でさえ、オリゴG - コリスチン結合体は、死細胞の存在とともに、バクテリアの凝集と無秩序なバイオフィルム構造を引き起こした。一方、硫酸コリスチンは、緑膿菌バイオフィルムに対してわずかな影響しか示さず、最高濃度ではバイオフィルムの厚さが非常にわずかに変化した、細胞死はほとんどなかった。これらの結果は、オリゴG - コリスチン結合体が、発生するバイオフィルムを破壊し、常在細菌を殺菌する上で、コリスチンよりも有意に効果的であることを示している。したがって、オリゴG - コリスチン結合体は、バイオフィルム感染症の対処に有用な抗菌剤と見なすことができる。

10

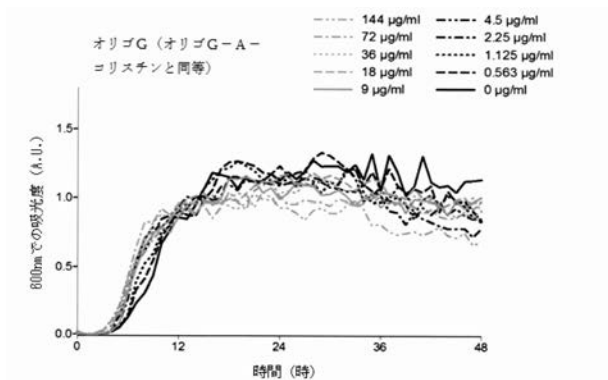
【 図 1 A 】



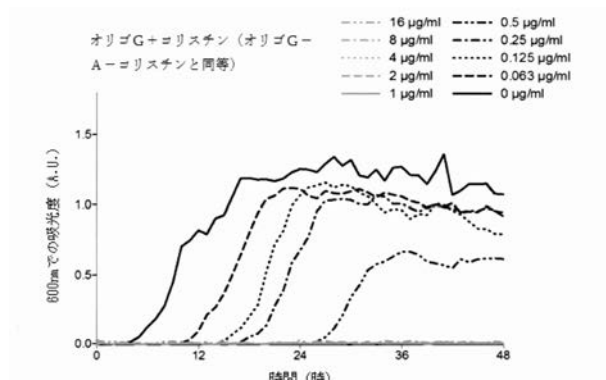
【 図 1 C 】



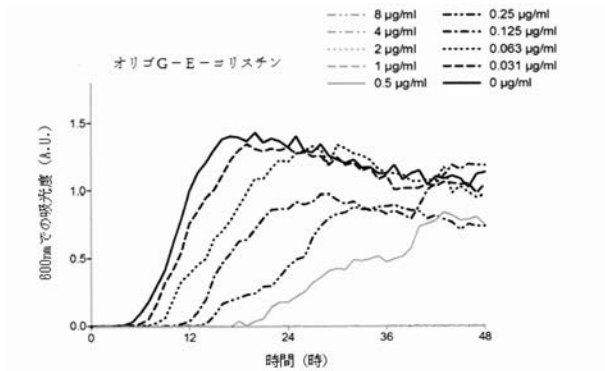
【 図 1 B 】



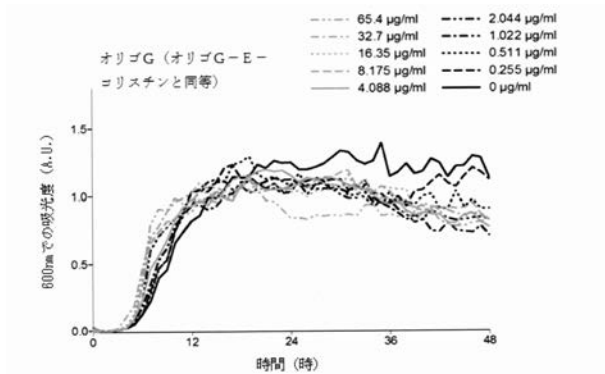
【 図 1 D 】



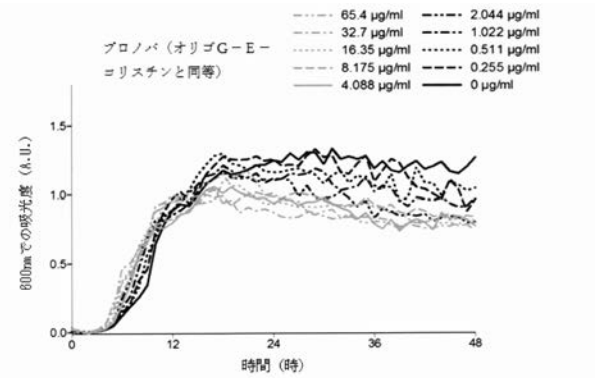
【図 1 E】



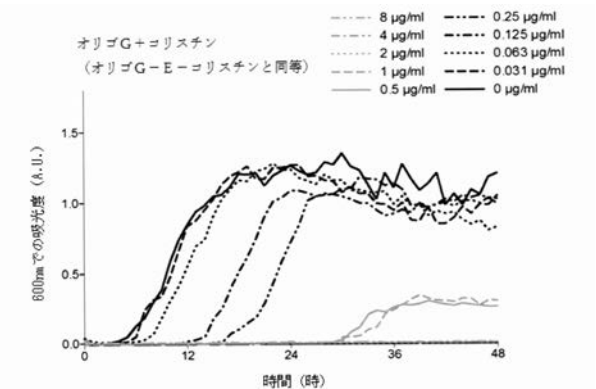
【図 1 F】



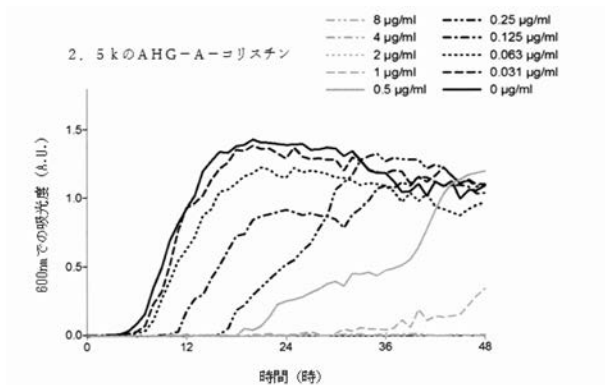
【図 1 G】



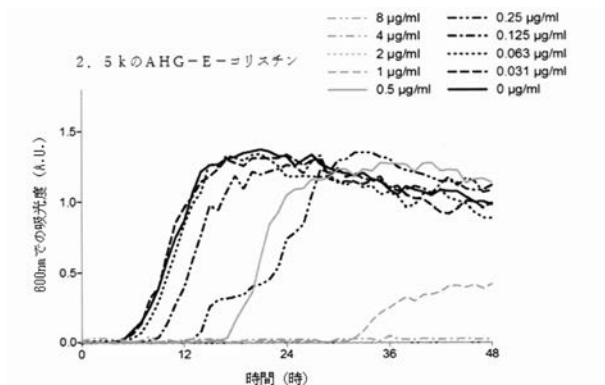
【図 1 H】



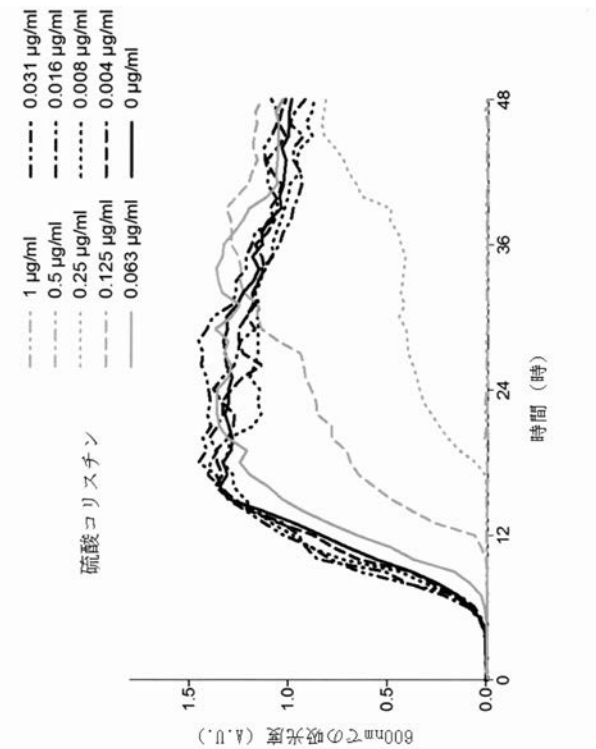
【図 1 I】



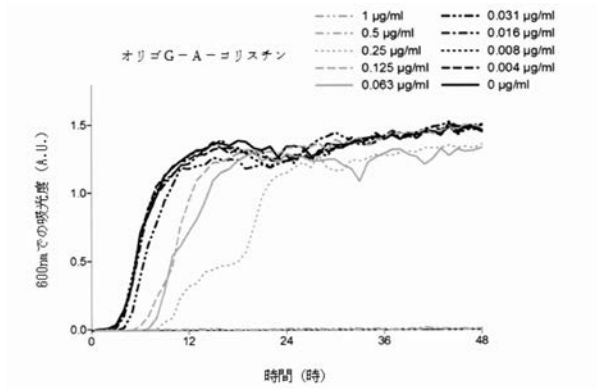
【図 1 J】



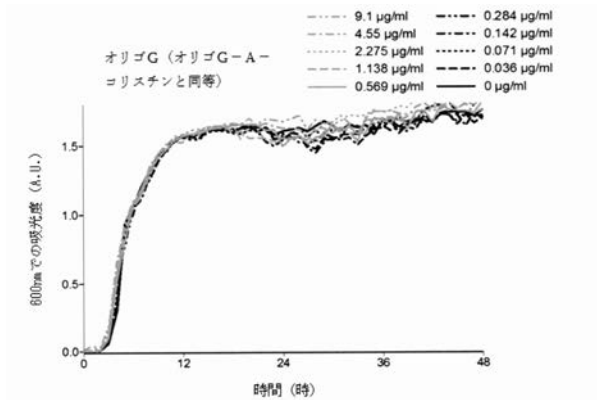
【図 1 K】



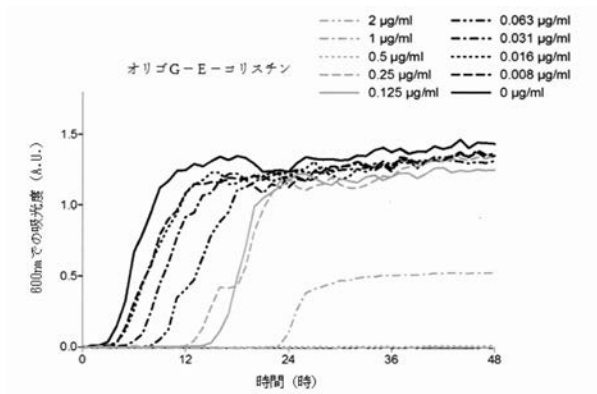
【図 2 A】



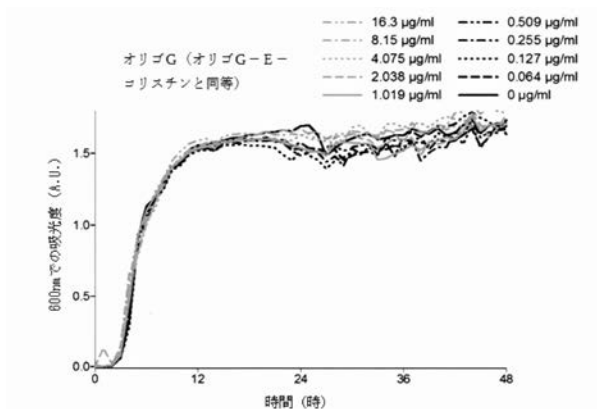
【図 2 B】



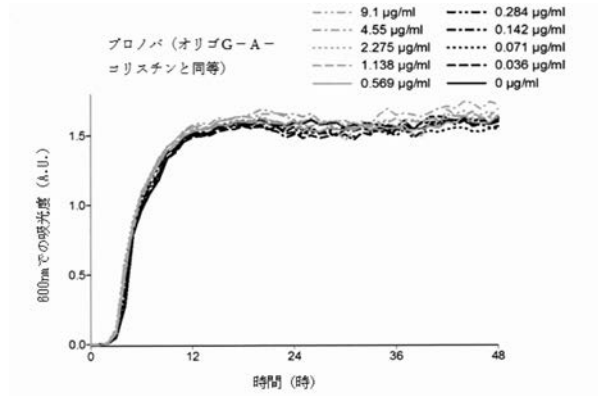
【図 2 E】



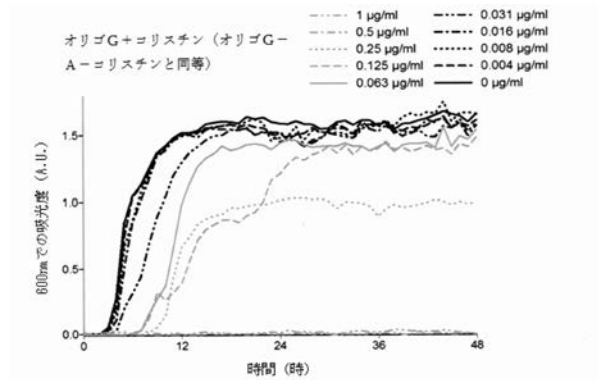
【図 2 F】



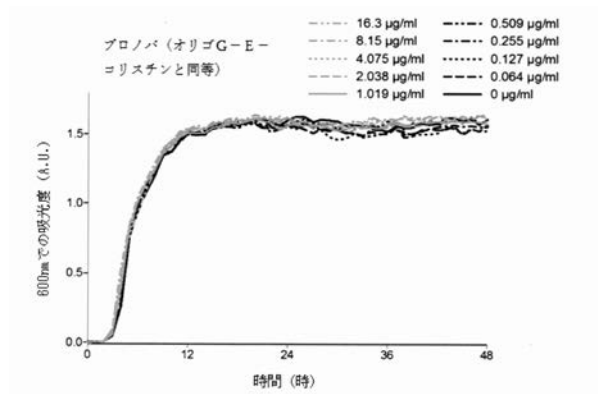
【図 2 C】



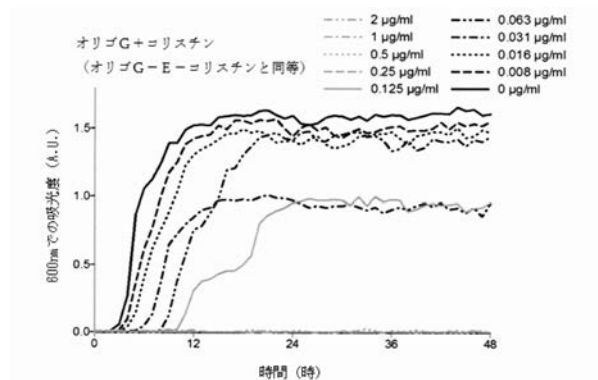
【図 2 D】



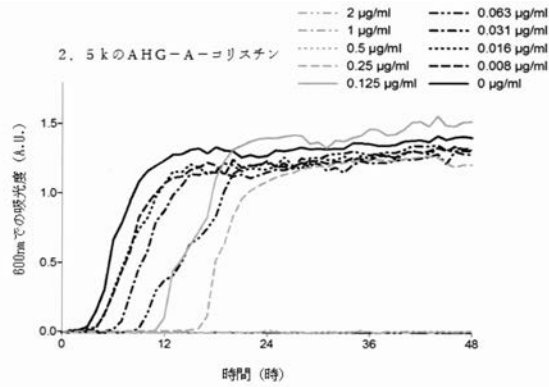
【図 2 G】



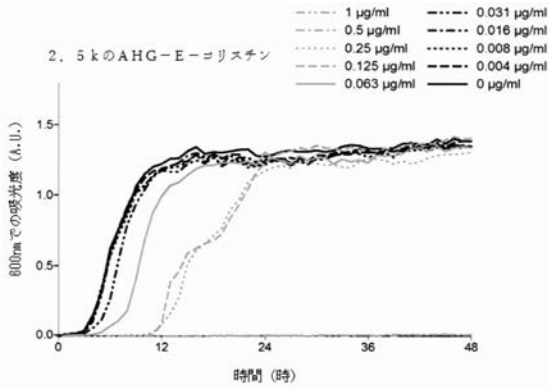
【図 2 H】



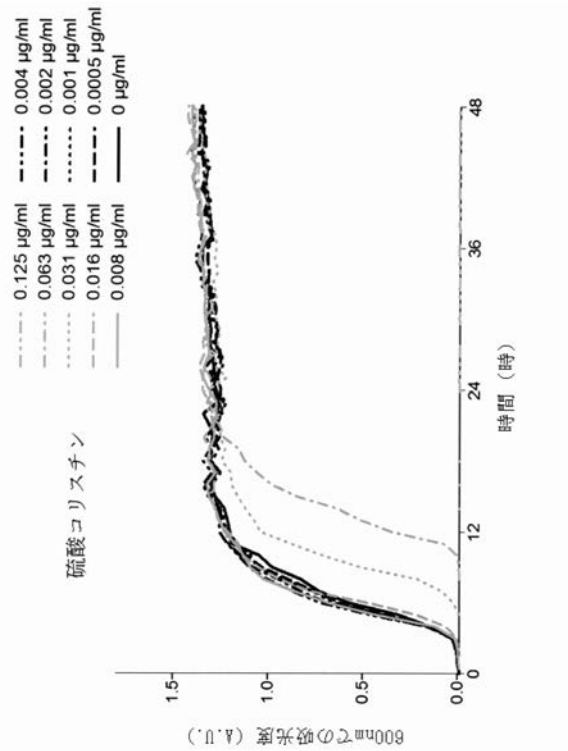
【図 2 I】



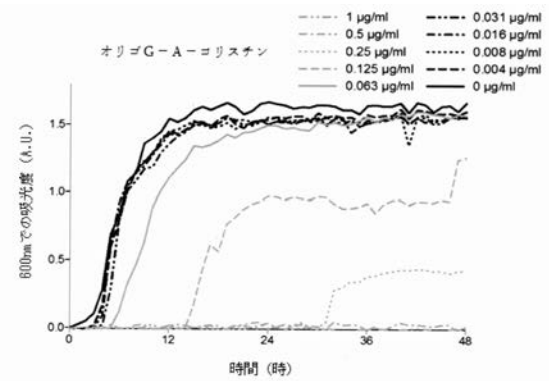
【図 2 J】



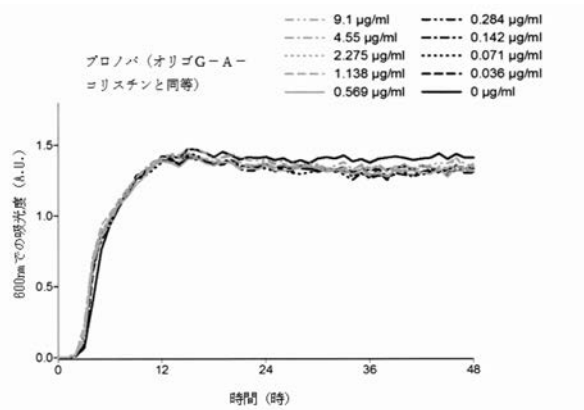
【図 2 K】



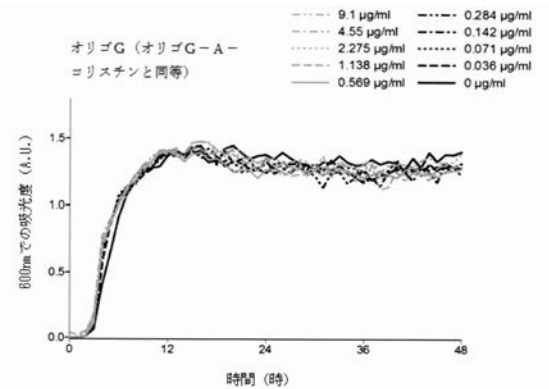
【図 3 A】



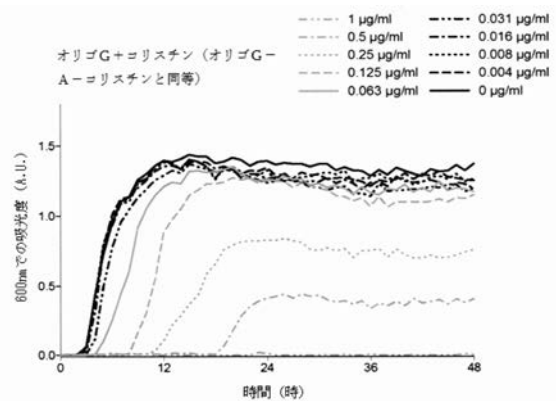
【図 3 C】



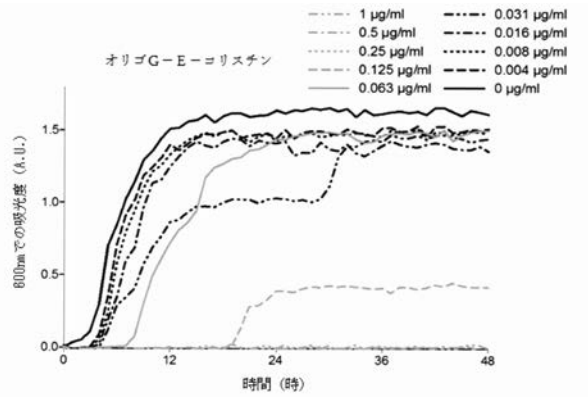
【図 3 B】



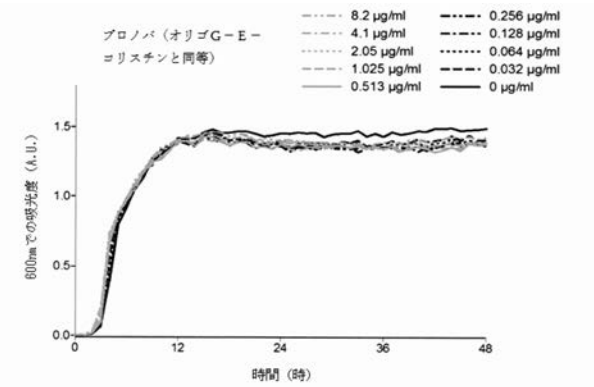
【図 3 D】



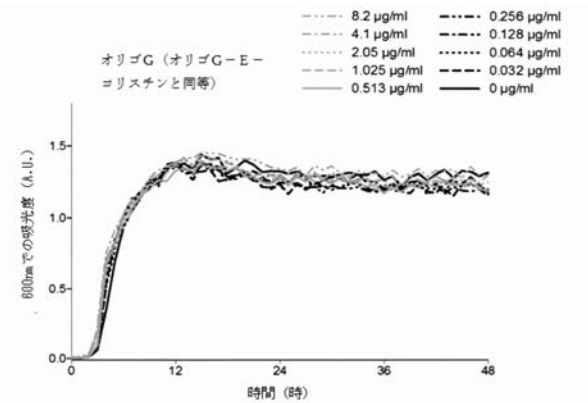
【図 3 E】



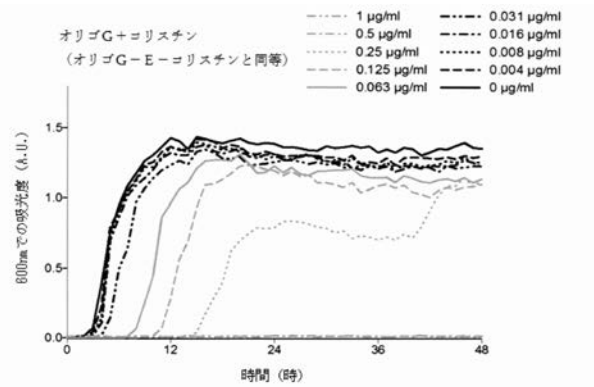
【図 3 G】



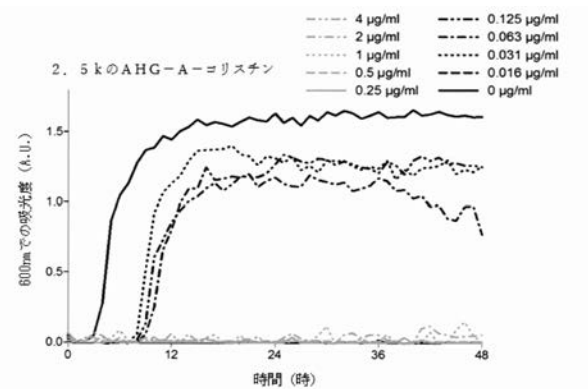
【図 3 F】



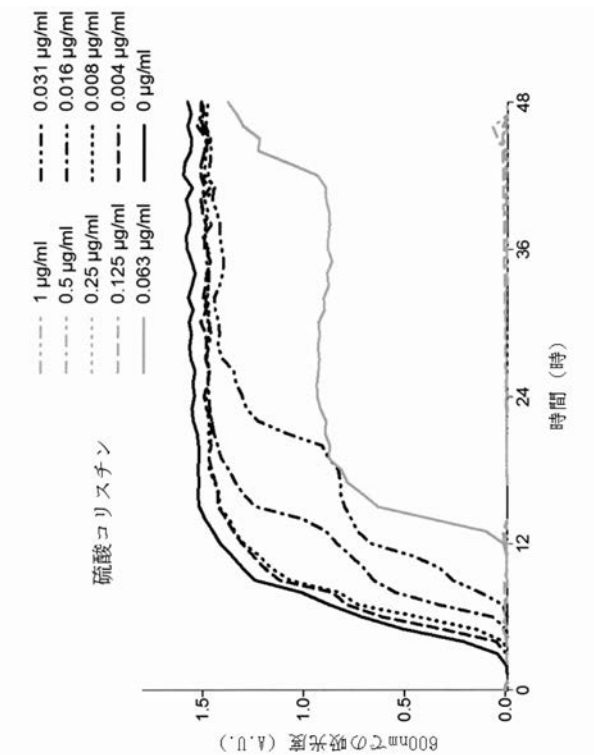
【図 3 H】



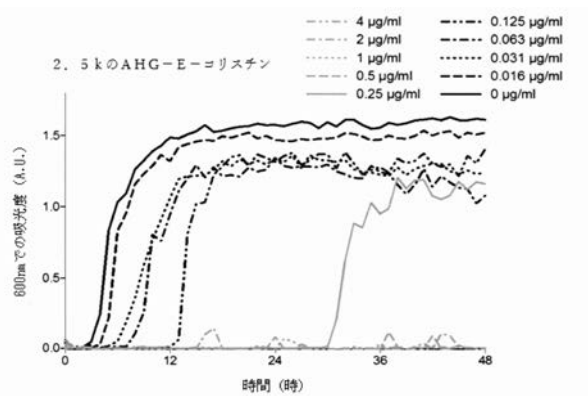
【図 3 I】



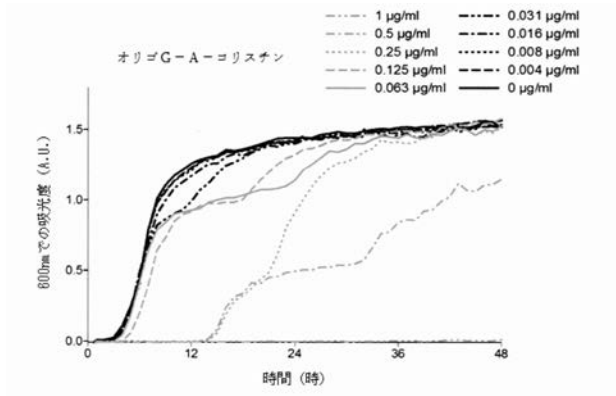
【図 3 K】



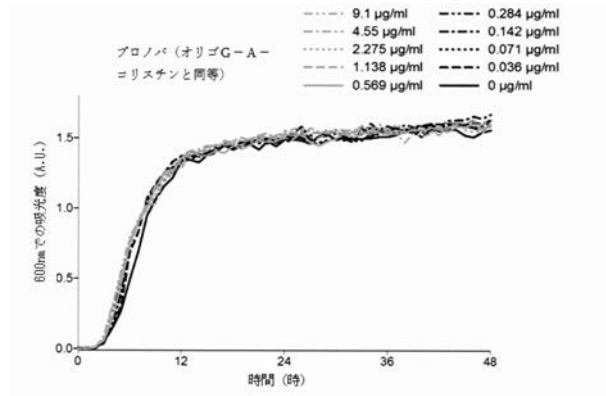
【図 3 J】



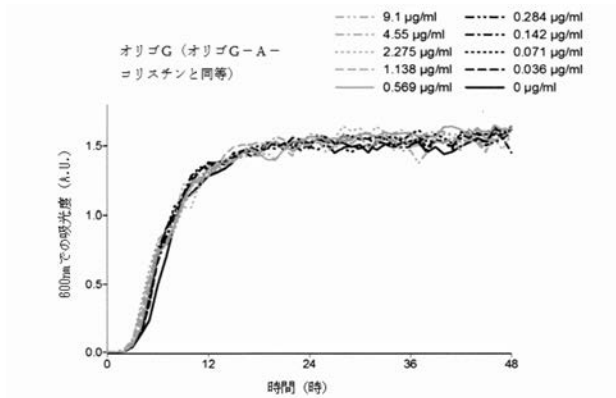
【図 4 A】



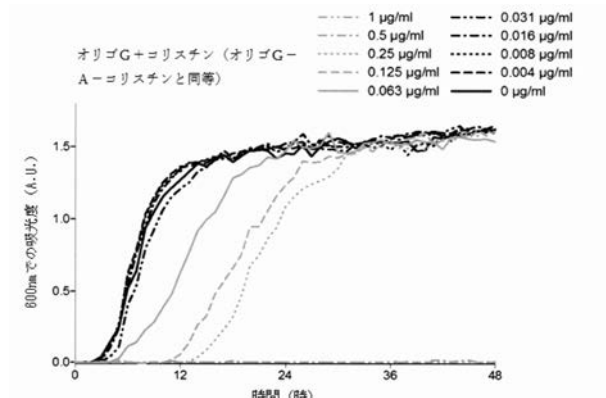
【図 4 C】



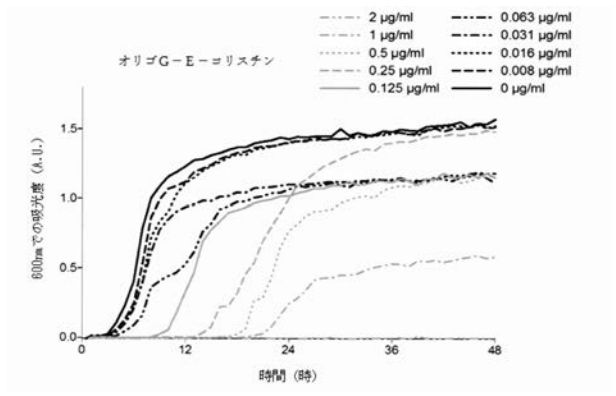
【図 4 B】



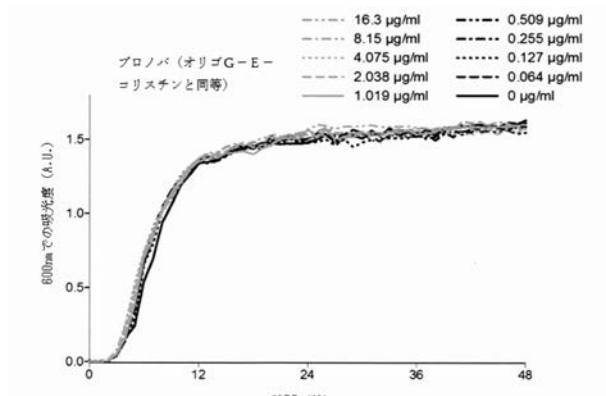
【図 4 D】



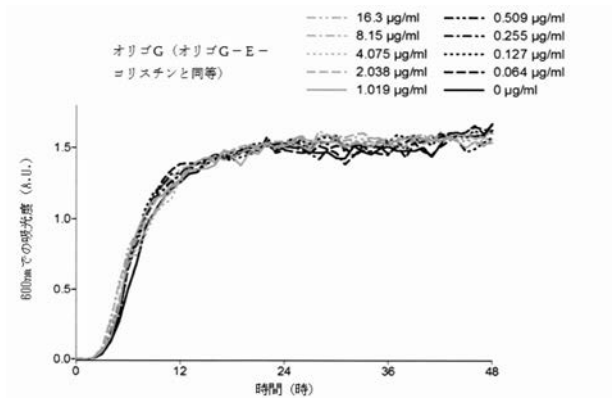
【図 4 E】



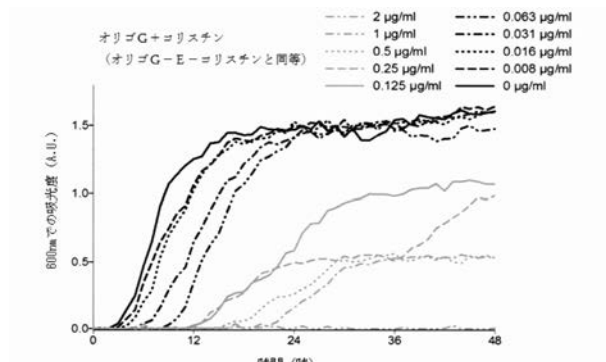
【図 4 G】



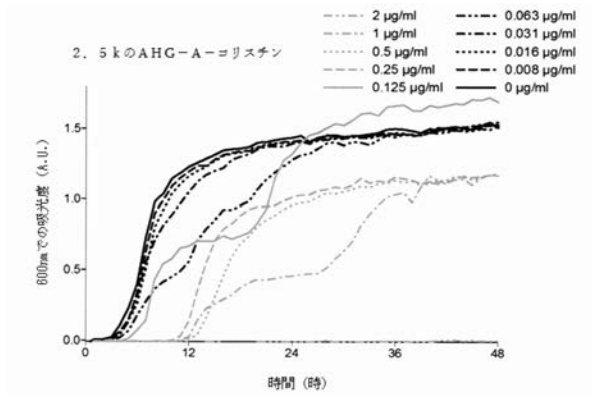
【図 4 F】



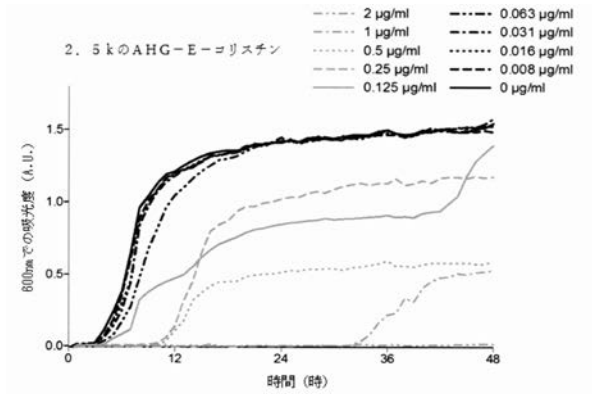
【図 4 H】



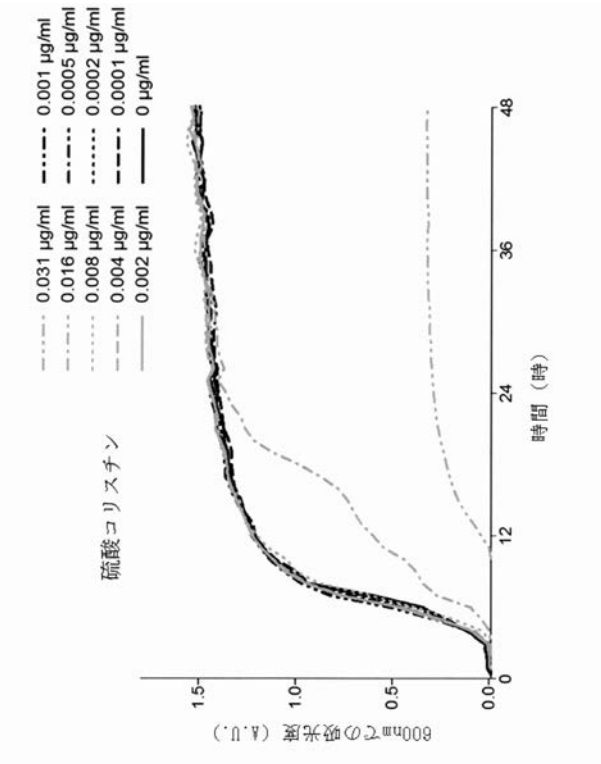
【図 4 I】



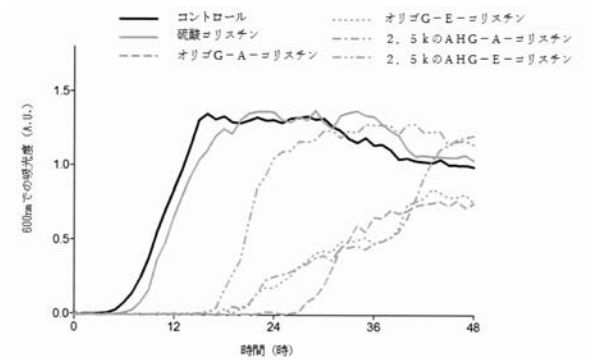
【図 4 J】



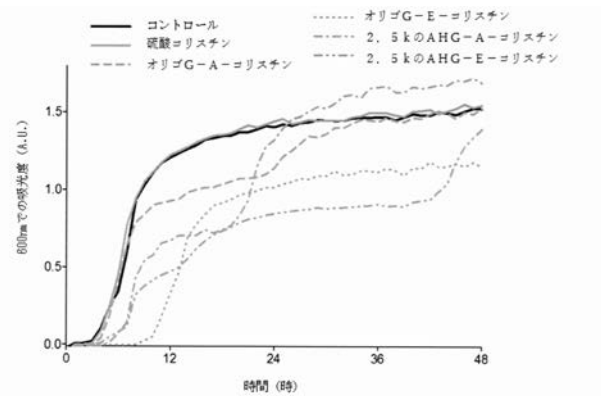
【図 4 K】



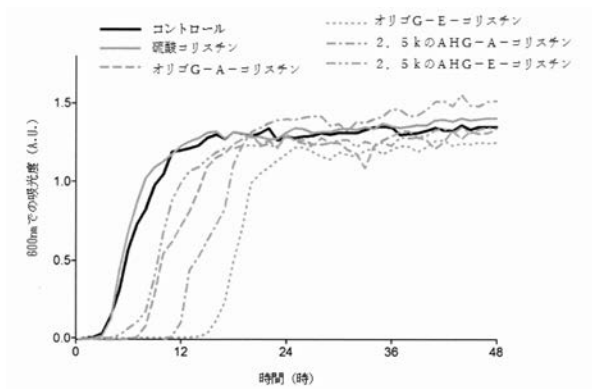
【図 5 A】



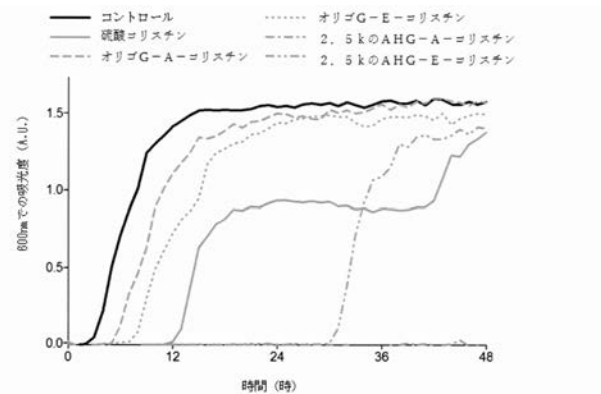
【図 5 C】



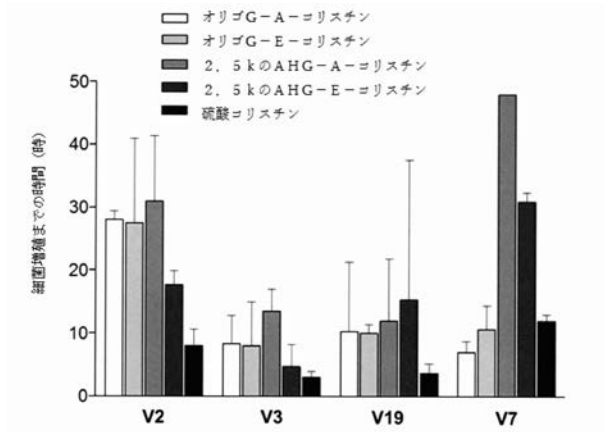
【図 5 B】



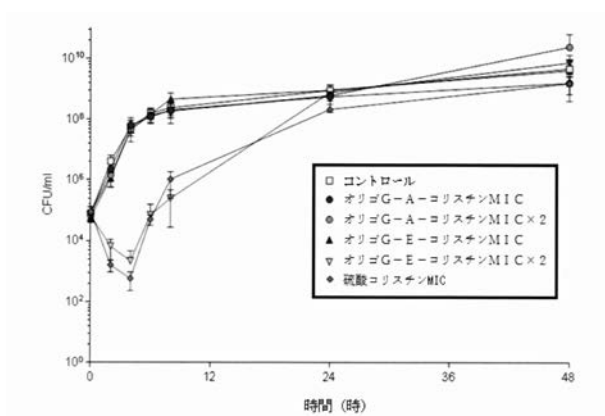
【図 5 D】



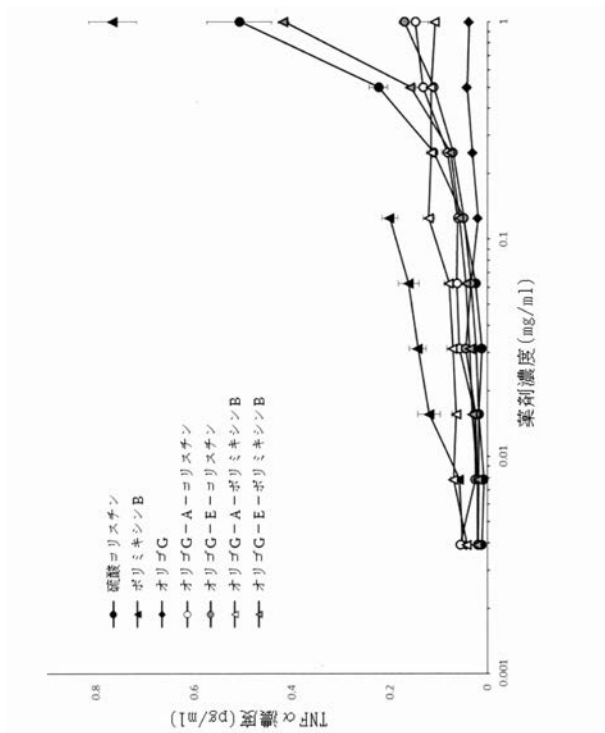
【図 5 E】



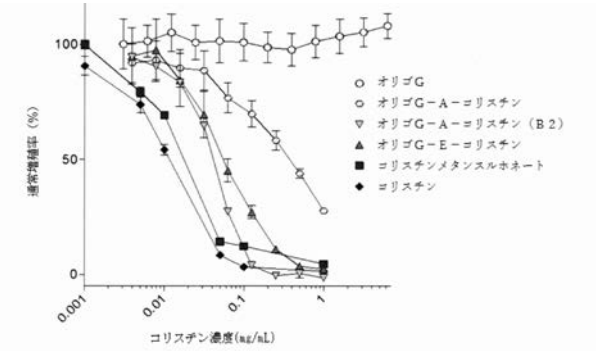
【図 6】



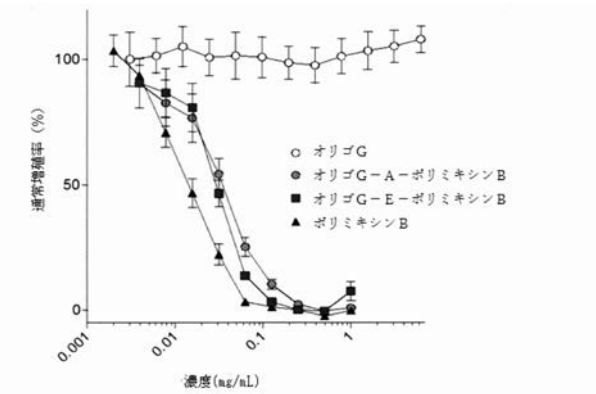
【図 8】



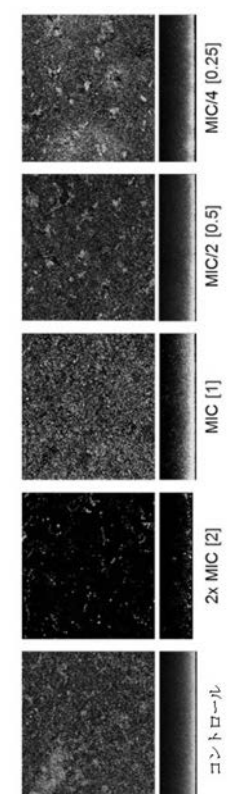
【図 7 A】



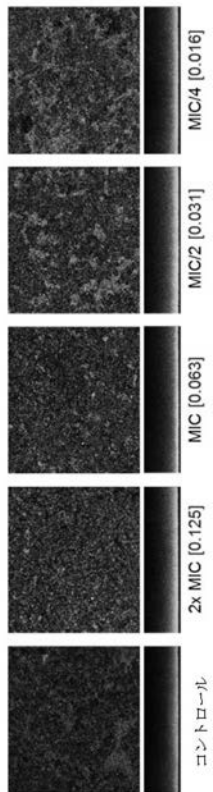
【図 7 B】



【図 9 A】



【図 9 B】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/076927

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/12 A61K47/36 A61P31/00
ADD.

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)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 428 486 A1 (SANDOZ LTD [CH]; SANDOZ AG [DE]; SANDOZ AG [AT]) 22 May 1991 (1991-05-22) examples 1,2 -----	1-29
Y	US 5 177 059 A (HANDLEY DEAN A [US] ET AL) 5 January 1993 (1993-01-05) examples 1,2 -----	1-29
Y	US 6 011 008 A (DOMB ABRAHAM J [IL] ET AL) 4 January 2000 (2000-01-04) example IV -----	1-29
Y	GB 2 270 920 A (UNIV KEELE [GB]) 30 March 1994 (1994-03-30) claims 1,13,16 -----	1-29
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* 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

7 December 2017

Date of mailing of the international search report

13/12/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bochelen, Damien

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/076927

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB 976 301 A (CALMIC LTD) 25 November 1964 (1964-11-25) examples 1,2 -----	1-29
A	SEVERINO ET AL.: "Sodium alginate-cross-linked polymyxin B sulphate- loaded solid lipid nanoparticles: Antibiotic resistance tests and HaCat and NIH/3T3 cell viability studies", COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES, vol. 129, 2015, pages 191-197, XP29158163, page 192 -----	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/076927

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0428486	A1	22-05-1991	AT 111746 T 15-10-1994
			AU 639952 B2 12-08-1993
			CA 2029997 A1 16-05-1991
			CY 2052 B1 30-04-1998
			DE 69012747 D1 27-10-1994
			DE 69012747 T2 16-03-1995
			DK 0428486 T3 09-01-1995
			EP 0428486 A1 22-05-1991
			ES 2063326 T3 01-01-1995
			HK 49696 A 29-03-1996
			HU 210901 A9 28-09-1995
			IE 904105 A1 22-05-1991
			IL 96326 A 31-07-1995
			JP H082917 B2 17-01-1996
			JP H03220198 A 27-09-1991
			KR 184858 B1 01-05-1999
			NZ 236050 A 28-04-1993
			ZA 9009187 B 29-07-1992
US 5177059	A	05-01-1993	NONE
US 6011008	A	04-01-2000	NONE
GB 2270920	A	30-03-1994	CA 2145502 A1 14-04-1994
			DE 69333929 T2 10-08-2006
			EP 0662002 A1 12-07-1995
			EP 0947202 A2 06-10-1999
			GB 2270920 A 30-03-1994
			JP H08502053 A 05-03-1996
			US 5622718 A 22-04-1997
			WO 9407536 A2 14-04-1994
GB 976301	A	25-11-1964	NONE

フロントページの続き

(81)指定国・地域 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, RO, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72)発明者 トーマス、デヴィッド、ウィリアム

イギリス、シーエフ 1 4 4 エックスワイ カーディフ サウス ウェールズ、ヒース パーク、
カーディフ ユニバーシティー、スクール オブ デンティストリー、ティッシュ エンジニアリ
ング アンド リパレイティブ デンティストリー

(72)発明者 デッセン、アルネ

ノルウェー、3 4 4 0 ロイケン、アルスタハウグ テラセ 2 0

(72)発明者 ライ、フィリップ

ノルウェー、1 3 5 9 エイクスマルカ、カルデラヴェイエン 1 1

F ターム(参考) 4C076 AA94 AA95 CC32 EE36 EE59 FF31 FF63 GG50

4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 BA25 BA42 DA43 MA05 NA03 NA05

NA12 NA13 ZA591 ZA592 ZB351 ZB352

4H045 AA10 AA30 BA56 CA11 EA29