

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6134739号
(P6134739)

(45) 発行日 平成29年5月24日 (2017. 5. 24)

(24) 登録日 平成29年4月28日 (2017. 4. 28)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 36/185 (2006. 01)

A 6 1 K 36/185

A 6 1 K 31/4164 (2006. 01)

A 6 1 K 31/4164

A 6 1 K 31/7048 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7048

A 6 1 K 47/34 (2017. 01)

A 6 1 K 47/34

A 6 1 K 9/20 (2006. 01)

A 6 1 K 9/20

請求項の数 22 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-553530 (P2014-553530)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月23日 (2013. 1. 23)
 (65) 公表番号 特表2015-505540 (P2015-505540A)
 (43) 公表日 平成27年2月23日 (2015. 2. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/022743
 (87) 国際公開番号 W02013/112582
 (87) 国際公開日 平成25年8月1日 (2013. 8. 1)
 審査請求日 平成27年11月4日 (2015. 11. 4)
 (31) 優先権主張番号 61/589, 601
 (32) 優先日 平成24年1月23日 (2012. 1. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 514024343
 サンタリス ファーマシューティカルズ
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 テキサス 78258,
 サン アントニオ, トスカニー スト
 ーン 18618, スイート 100
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バックダン油およびクロストリジウム感染症に関連するその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バックダン油の治療有効量を含む、対象の消化管におけるクロストリジウム感染症を治療または予防するための組成物であって、前記対象がクロストリジウム感染症に罹患している、またはクロストリジウム感染症を発症するリスクがある、組成物。

【請求項 2】

クロストリジウム感染症が C. パーフリンジェンス感染症、C. ディフィシル感染症、C. テタニ感染症または C. ボツリナム感染症である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

さらに、クロストリジウム感染症に罹患したまたはクロストリジウム感染症を発症するリスクがある対象が選択されることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

バックダン油が、サンタラム・アルBUMもしくはサンタラム・スピカタムまたはその組み合わせに由来する、請求項 1 ～ 3 のうちいずれかに記載の組成物。

【請求項 5】

バックダン油の治療有効量が、対象のクロストリジウム感染症を選択的に抑制する、請求項 1 ～ 4 のうちいずれかに記載の組成物。

【請求項 6】

バックダン油の治療有効量を含む、対象のクロストリジウム感染症の再発を低減するための組成物であって、前記対象は、クロストリジウム感染症を再発するリスクがある、組

10

20

成物。

【請求項 7】

前記感染症が対象の消化管で生じる、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

クロストリジウム感染症が C. ディフィシル感染症である、請求項 6 または 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記対象がバンコマイシン、メトロニダゾールまたはフィダキソマイシンで治療を受けていた、請求項 6 ～ 8 のうちいずれかに記載の組成物。

【請求項 10】

ビャクダン油の治療有効量を含む組成物が、バンコマイシン、メトロニダゾールまたはフィダキソマイシンによる治療と同時に、または治療の後に投与されることを特徴とする、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

ビャクダン油の治療有効量を含む組成物が、バンコマイシン、メトロニダゾールまたはフィダキソマイシンによる治療の後に投与されることを特徴とする、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

ビャクダン油がサンタラム・アルBUMもしくはサンタラム・スピカタムまたはその組み合わせに由来する、請求項 1 ～ 11 のうちいずれかに記載の組成物。

【請求項 13】

前記組成物が約 0.03% ～ 約 100% のビャクダン油 (w/w) を含む、請求項 1 ～ 12 のうちいずれかに記載の組成物。

【請求項 14】

前記組成物が約 0.03% ～ 約 1% のビャクダン油 (w/w) を含む、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記組成物が約 0.03% ～ 約 0.5% のビャクダン油 (w/w) を含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

ビャクダン油の治療有効量を含む前記組成物が、さらに医薬担体を含む、請求項 1 ～ 15 のうちいずれかに記載の組成物。

【請求項 17】

前記医薬担体が高分子量ポリエチレングリコールである、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記組成物が錠剤、カプセル、液体、または坐剤として投与されることを特徴とする、請求項 1 ～ 17 のうちいずれかに記載の組成物。

【請求項 19】

ビャクダン油の治療有効量を含む、対象のクロストリジウム保菌状態を低減するための組成物であって、前記対象はクロストリジウムの保菌者または保菌者になるリスクがある、組成物。

【請求項 20】

クロストリジウム芽胞個体群にビャクダン油の有効量を接触させることを特徴とする、クロストリジウム芽胞の感染力を低減させる組成物。

【請求項 21】

前記個体群は *in vitro* 個体群である、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記個体群は *in vivo* 個体群である、請求項 20 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本出願は、2012年1月23日に出願された米国特許出願第61／589,601号の利益を主張し、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0002】

本明細書では、クロストリジウム感染症を治療するビャクダン油の治療に有効な組成物を使用する方法を提供する。より具体的には、本明細書では対象のクロストリジウム感染症を治療または予防する方法を提供する。方法は、対象にビャクダン油の治療有効量を含む組成物を投与することを含み、対象は、クロストリジウム感染症に罹患している、または

10

【0003】

さらに、対象でのクロストリジウム感染症の再発を低減させる方法を提供する。方法は、対象にビャクダン油の治療有効量を含む組成物を投与することを含み、対象はクロストリジウム感染症を再発するリスクがある。

本発明は、例えば、以下の項目も提供する。

(項目1)

対象にビャクダン油の治療有効量を含む組成物を投与することを含み、前記対象のクロストリジウム感染症を治療または予防する方法であって、前記対象がクロストリジウム感染症に罹患している、またはクロストリジウム感染症を発症するリスクがある、方法。

20

(項目2)

前記感染症が対象の消化管で生じる、項目1に記載の方法。

(項目3)

クロストリジウム感染症がC. パーフリンジェンス感染症、C. ディフィシル感染症、C. テタニ感染症またはC. ボツリナム感染症である、項目1または2に記載の方法。

(項目4)

さらに、クロストリジウム感染症に罹患したまたはクロストリジウム感染症を発症するリスクがある対象を選択することを含み、項目1～3に記載の方法。

(項目5)

ビャクダン油が、サンタラム・アルBUMもしくはサンタラム・スピカタムまたはその組み合わせに由来する、項目1～4のうちいずれかに記載の方法。

30

(項目6)

ビャクダン油の治療有効量が、対象のクロストリジウム感染症を選択的に抑制する、項目1～5のうちいずれかに記載の方法。

(項目7)

対象にビャクダン油の治療有効量を含む組成物を投与することを含み、対象のクロストリジウム感染症の再発を低減する方法であって、前記対象は、クロストリジウム感染症を再発するリスクがある、方法。

(項目8)

前記感染症が対象の消化管で生じる、項目7に記載の方法。

40

(項目9)

クロストリジウム感染症がC. ディフィシル感染症である、項目7または8に記載の方法。

(項目10)

前記対象がバンコマイシン、メトロニダゾールまたはフィダキソマイシンで治療を受けていた、項目7～9のうちいずれかに記載の方法。

(項目11)

ビャクダン油の治療有効量を含む組成物が、バンコマイシン、メトロニダゾールまたはフィダキソマイシンによる治療と同時に、または治療の後に投与される、項目10に記載の方法。

50

(項目 1 2)

バックダン油の治療有効量を含む組成物が、バンコマイシン、メトロニダゾールまたはフィダキソマイシンによる治療の後に投与される、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

バックダン油がサンタラム・アルBUMもしくはサンタラム・スピカタムまたはその組み合わせに由来する、項目 1 ～ 1 2 のうちいずれかに記載の方法。

(項目 1 4)

前記組成物が約 0. 0 3 % ～ 約 1 0 0 % のバックダン油 (w/w) を含む、項目 1 ～ 1 3 のうちいずれかに記載の方法。

(項目 1 5)

前記組成物が約 0. 0 3 % ～ 約 1 % のバックダン油 (w/w) を含む、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記組成物が約 0. 0 3 % ～ 約 0. 5 % のバックダン油 (w/w) を含む、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

バックダン油の治療有効量を含む前記組成物が、さらに医薬担体を含む、項目 1 ～ 1 6 のうちいずれかに記載の方法。

(項目 1 8)

前記医薬担体が高分子量ポリエチレングリコールである、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記組成物が錠剤、カプセル、液体、または坐剤として投与される、項目 1 ～ 1 8 のうちいずれかに記載の方法。

(項目 2 0)

対象にバックダン油の治療有効量を含む組成物を投与することを含む、対象のクロストリジウム保菌状態を低減する方法であって、前記対象はクロストリジウムの保菌者または保菌者になるリスクがある、方法。

(項目 2 1)

クロストリジウム芽胞個体群にバックダン油の有効量を接触させることを含む、クロストリジウム芽胞の感染力を低減させる方法。

(項目 2 2)

前記個体群は *i n v i t r o* 個体群である、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記個体群は *i n v i v o* 個体群である、項目 2 1 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】【0 0 0 4】

【図 1】図 1 は、他の油と比較した場合のバックダン油のクロストリジウム・ディフィシル (C. ディフィシル) 抑制活性を示す。明灰色のウェルは、細菌増殖を示唆する。暗灰色のウェルは、細菌増殖がないことを示唆する。図 1 は、西オーストラリアのバックダン油および東インドのバックダン油が C. ディフィシルの有効な抑制因子であることを示している。

【発明を実施するための形態】【0 0 0 5】

本方法では、バックダン (S a n t a l u m) 属のいずれのメンバーに由来する油も使用し得る。例えば、これに限定されないが、東インドのバックダン (サンタラム・アルBUM (S a n t a l u m a l b u m)) または西オーストラリアのバックダン (サンタラム・スピカタム (S a n t a l u m s p i c a t u m)) が、本明細書に記載の方法で利用し得る。この属の他の数種も芳香性の木であり、インド、オーストラリア、インドネシア、および太平洋諸島一帯に認められる。例えば、サンタナム・エリプティカム (S a n t a l u m e l l i p t i c u m)、S. フレシネチティアナム (S. f r e y c i

10

20

30

40

50

netianum)、およびS. パニクラトゥム (S. paniculatum)、すなわちハワイのビャクダン、もまた使用され得る。

【0006】

例として、サンタラム・スピカタム (西オーストラリアのビャクダン) が使用され得る。本明細書に記載の方法および組成物で利用され得るオーストラリアで生産された他の種としては、これに限定されないが、S. アクミナタム (S. acuminatum)、S. ランセオラツム (S. lanceolatum)、S. ムッラヤナム (S. murrayanum)、S. オプトゥシフォリウム (S. obtusifolium) およびS. アルバムが挙げられる。本明細書に記載の組成物は、1以上のビャクダン油を含み得る。油は、ビャクダン属の1以上のメンバーに由来し得る。本明細書に記載の組成物では、ビャクダン油は、ビャクダン心材油 (heartwood oil)、ビャクダン堅果油 (nut oil)、または両方の組み合わせであり得る。

10

【0007】

S. スピカタムおよびS. アルバム種の構成成分は異なる。水蒸気蒸留されたオーストラリアおよびインドのビャクダン心材油の構成成分の比較を表1に記載する。構成成分およびその割合は、抽出方法により変化し得る。

【0008】

【表1】

表1:一般的なビャクダン心材油プロファイル

化合物	S. スピカタム %	S. アルバム %
E ネロリドール	2.1%	0.1%
α -サンタレン	不検出	0.5%
シス- α -(トランス)ベルガモテン	不検出	0.7%
エピ- β -サンタレン	不検出	1.1%
β -サンタレン	不検出	0.3%
γ -クルクメン	不検出	0.2%
デンドロラシン	1.2%	0.2%
α -サンタロール	17.2%	48.7%
β -ビサボロール	2.3%	0.5%
エピ- α -ビサボロール	8%	不検出
Z- α -トランス-ベルガモトール	4.2%	2.4%
エピ- β -サンタロール	1.2%	5%
シス- β -サンタロール	11.4%	20.4%
E, E, フェルネソール	6.5%	不検出
シス-ヌシフェロール	13.5%	0.6%
Z- β -クルクメン-12-オール	7.9%	0.2%
シスランセオール	2.9%	1.5%

20

30

40

【0009】

ビャクダン心材油は、水蒸気蒸留 (steam distillation)、超臨界二酸化炭素抽出、溶媒抽出、直接蒸留 (hydro-distillation) およびその組み合わせにより調製され得る。ビャクダン心材油はまた、再蒸留され得る。表1に示したビャクダン心材油の活性成分の1以上を合成し、その後、個々の活性成分を組み合わせることも可能である。

【0010】

本明細書で用いられる場合、ビャクダン心材油は、油の国際標準化機構 (ISO) 基準

50

に準拠し、したがって S. スピカタムに由来する場合、20～45%のサンタロールを、および S. アルバムに由来する場合 57～79%のサンタロールを含むバックダン心材油であり得る。しかし、S. スピカタムに由来する 20～45%のサンタロールおよび S. アルバムに由来する 57～79%のサンタロールは、その精油に対し、その油に他の溶媒、賦形剤、および活性成分と組み合わせる前に決定されるものである。バックダン心材油の有効な調製物は、調製に使用するそのバックダン心材油のサンタロールより低濃度（または高濃度）であってよく、また、有効濃度は、処方前は ISO 基準外のバックダン心材油に由来してもよいことが理解されるべきである。サンタロールは、 α -サンタロール（以下に示す）、 β -サンタロール（以下に示す）、またはその他の活性異性体またはその誘導体（エステル等）であり得る。

10

【0011】

本明細書で用いられる場合、バックダン心材油は、S. スピカタムに由来する場合は少なくとも約 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%のサンタロール、または本明細書に記載のパーセントの間のいずれのパーセントをも含み得る。バックダン心材油は、S. アルバムに由来する場合は、少なくとも 45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%のサンタロール、または本明細書に記載のパーセントの間のいずれのパーセントを含み得る。上述のように、油は、栽培された樹木から、または樹木細胞の細胞培養物から抽出され得る。

20

【0012】

本明細書に記載の方法および組成物では、バックダン心材油は、表 1 に列挙された量の ± 約 20%、より好ましくは ± 約 10%、5%、2%、1% または本明細書に記載のパーセントの間のいずれのパーセントでその成分を含み得る。

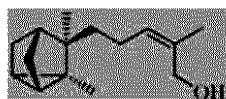
【0013】

バックダン心材油の活性は、表 1 に記載の 1 以上の構成成分が別個にまたは共に活性化することによることも理解されるべきである。したがって、活性成分濃度を増加させ、不活性成分濃度を減少させる処方物が本明細書に記載される。活性成分の合成型またはその誘導体を、バックダン心材油の天然の構成成分と併せてまたはその代わりに処方してもよい。活性成分の精製型もしくは合成型、またはその誘導体を含む組成物はまた、本明細書に記載の方法で利用され得る。例えば、 α -サンタロール（以下に示す）または β -サンタロール（以下に示す）を含む組成物は、クロストリジウム感染症の治療またはその再発を予防もしくは緩和するために利用され得る。

30

【0014】

【化 1】



α -サンタロール

β -サンタロール

40

【0015】

本明細書に記載の方法および組成物では、バックダン堅果油はバックダン属のいずれのメンバーの堅果にも由来し得る。例えば、これに限定されないが、東インドのバックダン（サンタラム・アルバム）または西オーストラリアのバックダン（サンタラム・スピカタム）堅果油が、本明細書に記載の方法および組成物に利用され得る。サンタナム・エリプティカム、S. フレシネチティアナム、および S. パニクラトゥム、すなわちハワイのバックダンに由来する堅果油もまた、使用され得る。バックダン堅果油の一般的な分析値は以下のとおりである：

【0016】

【表 1 A】

脂肪酸	%濃度
パルミチン酸(C16.0)	3.5%
ステアリン酸(C18.0)	1.6%
オレイン酸(C18.1 c-9)	50.7%
リノール酸(C18.2 c-9 12)	1.1%
リノレン酸(C18.3 c-9、12、15)	4.6%
ゴンド酸(C20.1 c-11)	3%
キシメニン酸	35.8%

10

【0017】

本明細書に記載の組成物で使用するビャクダン油の治療有効量は、例えば、約0.2% (w/w) より高い濃度から最大約100% (w/w) であり得る。例えば、治療有効量は、約0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4.0%、4.1%、4.2%、4.3%、4.4%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%、5.0%、5.1%、5.2%、5.3%、5.4%、5.5%、5.6%、5.7%、5.8%、5.9%、6.0%、6.1%、6.2%、6.3%、6.4%、6.5%、6.6%、6.7%、6.8%、6.9%、7.0%、7.1%、7.2%、7.3%、7.4%、7.5%、7.6%、7.7%、7.8%、7.9%、8.0%、8.1%、8.2%、8.3%、8.4%、8.5%、8.6%、8.7%、8.8%、8.9%、9.0%、9.1%、9.2%、9.3%、9.4%、9.5%、9.6%、9.7%、9.8%、9.9%、10.0%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%または本明細書に記載のパーセントの間のいずれのパーセント (w/w) であり得る。

20

30

【0018】

上述のように、本明細書に記載の組成物は、ビャクダン心材油、ビャクダン堅果油または両方の組み合わせを含み得る。したがって、ビャクダン油は、ビャクダン心材油のみを含み得、その場合、ビャクダン心材油の濃度は約0.2%～約100% (w/w) である。例えば、ビャクダン心材油の濃度は、約0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4.0%、4.1%、4.2%、4.3%、4.4%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%、5.0%、5.1%、5.2%、5.3%、5.4%、5.5%、5.6%、5.7%、5.8%、5.9%、6.0%、6.1%、6.2%、6.3%、6.4%、6.5%、6.6%、6.7%、6.8%、6.9%、7.0%、7.1%、7.2%、7.3%、7.4%、7.5%、7.6%、7.7%、7.8%、7.9%、8.0%、8.1%、8.2%、8.3%、8.4%、8.5%、8.6%、8.7%、8.8%、8.9%、9.0%、9.1%、9.2%、9.3%、9.4%、9.5%、9.6%、9.7%、9.8%、9.9%、10.0%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%または本明細書に記載のパー

40

50

セントの間のいずれのパーセント (w/w) でもあり得る。

【0019】

ビャクダン油はまた、ビャクダン堅果油のみを含み得、その場合、ビャクダン堅果油の濃度は約0.2%～約100% (w/w) である。例えば、ビャクダン堅果油の濃度は、約0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4.0%、4.1%、4.2%、4.3%、4.4%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%、5.0%、5.1%、5.2%、5.3%、5.4%、5.5%、5.6%、5.7%、5.8%、5.9%、6.0%、6.1%、6.2%、6.3%、6.4%、6.5%、6.6%、6.7%、6.8%、6.9%、7.0%、7.1%、7.2%、7.3%、7.4%、7.5%、7.6%、7.7%、7.8%、7.9%、8.0%、8.1%、8.2%、8.3%、8.4%、8.5%、8.6%、8.7%、8.8%、8.9%、9.0%、9.1%、9.2%、9.3%、9.4%、9.5%、9.6%、9.7%、9.8%、9.9%、10.0%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%または本明細書に記載のパーセントの間のいずれのパーセント (w/w) であり得る。

10

20

【0020】

ビャクダン油はまた、ビャクダン心材油およびビャクダン堅果油の組み合わせを含み得、その場合、ビャクダン心材油濃度およびビャクダン堅果油濃度は、それぞれ約0.2%～約99.8%であり得、混合濃度は100% (w/w) を超えない。

【0021】

対象のクロストリジウム感染症を治療または予防する方法を提供する。方法は、対象に、ビャクダン油の治療有効量を有する組成物を投与することを含み、対象は、クロストリジウム感染症に罹患しているかまたはクロストリジウム感染症を発症するリスクがある。

【0022】

さらに、対象でのクロストリジウム感染症の再発を低減する方法を提供する。本方法は、対象に、ビャクダン油の治療有効量を含む組成物を投与することを含み、対象は、クロストリジウム感染症を再発するリスクがある。

30

【0023】

クロストリジウムは、内生孢子を生成可能な桿状のグラム陽性菌の属である。本明細書に記載の方法は、いずれのクロストリジウム感染症の栄養型ならびに芽胞型の治療に使用され得る。いくつかのクロストリジウム種が、ヒトの疾患に関与している。これらのクロストリジウム種としては、これに限定されないが、クロストリジウム・ディフィシル (C. ディフィシル)、クロストリジウム・ボツリナム (C. ボツリナム)、クロストリジウム・パーフリンジェンス (C. perfringens)、クロストリジウム・テタニ (C. tetani) およびクロストリジウム・ソルデリ (C. sordelli) が挙げられる。

40

【0024】

C. ディフィシルは、抗生物質関連の下痢の最も重大な原因であり、偽膜性大腸炎、すなわち抗生物質による正常な腸内細菌叢の根絶の結果たびたび生じる大腸の重篤な炎症を引き起こし得る。成人集団のごくわずかな比率で、C. ディフィシル菌が、天然に腸内に常在している。その他は、病院、養護施設、または同様の施設で患者である間に、細菌の芽胞を偶然に取り込む。細菌が正常な腸内細菌叢を失った大腸内に存在する場合、例えば、広域抗生物質 (broad-spectrum antibiotic) を使用後に、消化管がC. ディフィシルで超過 (overrun) してしまう。この過密状態は有害であり、細菌が、膨満感、下痢および腹痛を引き起こし得る毒素を放出するためである。

50

【0025】

C. ボツリナムは、ボツリヌス中毒に見られる筋肉の弛緩性麻痺を引き起こす神経毒素を生成する。

【0026】

C. パーフリンジェンスは、不完全に調理された食肉および家禽、すなわち細菌の住処となる主犯による食中毒の一般的な原因である。疾患を媒介するウェルシュ菌エンテロトキシン (*clostridium perfringens enterotoxin*) (CPE) は、熱に不安定であり (74℃で不活性化する)、汚染された食品 (適切に加熱されなかった場合) や糞便で検出され得る。潜伏期間は、汚染された食品を摂取後、6~24時間 (通常10~12時間) である。食肉は十分に調理されているが、消費するかなり前に調理されていることがよくある。C. パーフリンジェンスは、調理温度に耐え得る芽胞を形成するので、長時間放置すると、その後発芽し、感染性細菌のコロニーが生じる。症状は、一般に、腹部痙攣および下痢であり、おう吐および発熱は稀である。

10

【0027】

C. テタニは、創傷により宿主の皮膚に侵入し、複製する。いったん感染が確定すると、C. テタニは2種類の外毒素、テタノリジンおよびテタノスパスミンを生成する。創傷で放出されたテタノスパスミンは、血液循環に吸収され全身の運動神経に到達する。この毒素は、脊髄、脳の神経末端を含む中枢神経系、末梢神経および自律神経系内のいくつかの箇所作用する。破傷風毒素が抑制性のインパルス遮断すると、神経伝達物質の放出を妨げることにより、破傷風の臨床症状が生じる。これらの抑制性神経伝達物質は、α運動ニューロンを抑制する。抑制が低下することにより、安静時でのα運動ニューロンの発火頻度が上昇し、強ばり、対抗しない筋収縮および痙攣が生じる。特徴は、痙攣 (ひきつり笑い)、牙関緊急 (「開口障害」で通常知られる)、および後弓反張 (硬直した後弓 (*arched back*)) である。発作が生じることもあり、また、自律神経系もまた影響を受けることがある。高血圧および頻拍と低血圧および徐脈とを交互に生じることもある。

20

【0028】

クロストリジウム感染症は、対象の消化管、例えば、胃、小腸、下部小腸または大腸で生じ得る。感染症はまた、対象の中枢神経系もしくは末梢神経系、または自律神経系で生じ得る。クロストリジウム感染症はまた、対象の尿路で生じ得る。全ての菌株が、本明細書で予想される。感染症の低下または低減は *in vitro*、*ex vivo* または *in vivo* で生じ得る。

30

【0029】

全体にわたり使用される場合、「感染症」という用語は、これらに限定されるものではないが、複製、芽胞形成、細菌の芽胞型から栄養型への移行、毒素生成および毒素の受容体介在性細胞侵入を含むクロストリジウムのライフサイクルの全ての段階を包含する。

【0030】

本明細書で用いられる場合、「対象」という用語は、脊椎動物、より具体的には、哺乳動物 (例えば、ヒト、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、非ヒト霊長類、ウシ、ネコ、モルモットまたは齧歯類)、鳥類、爬虫類または両生類であり得る。本用語は、特定の年齢または性別を意味しない。したがって、成人および新生児の対象 (雄かまたは雌か) を含めることを意図する。本明細書で用いられる場合、「患者」または「対象」は、同じ意味で使用されてもよく、疾患または障害をもつ対象を指す。「患者」または「対象」という用語は、ヒトおよび獣医学的 (*veterinary*) 対象を含む。

40

【0031】

本明細書で用いられる場合、「治療」、「治療する」、「治療すること」または「寛解させること」という用語は、疾患もしくは症状の1以上の兆候または症状を軽減させる方法を指す。したがって、本開示の方法では、疾患もしくは症状の1以上の兆候または症状の低減でも明らかのように、治療は、確定された疾患または症状の重症度の10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の低減

50

または寛解を指すことができる。例えば、これに限定されないが、クロストリジウム感染症を治療する方法は、対象の感染症の1以上の兆候または症状が対照と比較して10%低減する場合、治療と見なされる。例えば、クロストリジウム感染症を治療する方法は、本明細書に記載のビャクダン油を含む組成物を投与していない対照（control subject）と比較した時に、対象でのクロストリジウム感染症の1以上の兆候または症状が10%低減する場合、治療と見なされる。したがって、低減は、対照のレベルと比較した時に、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%、または10～100%のいずれの比率での低減であり得る。治療は、疾患、症状、または疾患もしくは症状の兆候の治癒または完全なアブレーションを指す必要がないことを理解すべきである。

10

【0032】

対象はまた、細菌の保菌をきたすクロストリジウムを常在させる（無症状であり得る）。例えば、対象は、発芽して活性な栄養型細胞になり得るクロストリジウム芽胞を常在させ得る。したがって、また本明細書では、対象（保菌者であるか、クロストリジウムの保菌者となるリスクをもつ）にビャクダン油の治療有効量を含む組成物を投与することを含む、クロストリジウム保菌を低減させる方法を提供する。本方法では、芽胞形成が低減、芽胞数が低減および／または活性な栄養型細胞になるために発芽する芽胞数が低減し得る。低減とは、対照と比較した場合に、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の低減であり得る。

【0033】

さらに、クロストリジウム芽胞個体群をビャクダン油の有効量と接触させることを含む、クロストリジウム芽胞の感染力を低減させる方法を提供する。本方法では、芽胞数および／または活性な栄養型細胞になるために発芽する芽胞数が低減し得る。低減とは、対照と比較した場合に、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の低減であり得る。

20

【0034】

芽胞個体群は、in vivo個体群またはin vitro個体群であり得る。

【0035】

本明細書で使用する場合、クロストリジウム感染症の再発を低減させることとは、対象のクロストリジウム感染症の再発（reappearance）の発現（onset）、発生（incidence）または重症度を予防する、妨げる（preclude）、遅延させる、回避する（avert）、除去する（obviate）、未然に防ぐ（forestall）、停止させる、または妨害する（hinder）方法を意味する。本明細書で使用する場合、クロストリジウム感染症の再発とは、クロストリジウム感染症の1以上の臨床症状がない期間後のクロストリジウム感染症の1以上の兆候または臨床症状を意味する。クロストリジウム感染症の再発は、クロストリジウム感染症の治療後、例えばC．ディフィシルのバンコマイシン、メトロニダゾールおよび／またはフィダキソマイシンによる治療後であり得る。クロストリジウム感染症の再発はまた、寛解後であり得る。再発は、治療後または寛解後数日、数週間、数ヶ月、または数年で起こり得る。例えば、本開示の方法は、クロストリジウム感染症の再発のリスクがある対照（本明細書に開示のビャクダン油を含む組成物を投与されていない）と比較して、クロストリジウム感染症の再発のリスクがある対象の、クロストリジウム感染症もしくはクロストリジウム感染症の1以上の兆候の再発の発現、発生または重症度の低減または遅延が見られる場合に、クロストリジウム感染症の発症を低減させると見なされる。本開示の方法はまた、治療を受ける前の対象の進行と比較して、本明細書に開示のビャクダン油を含む組成物が投与された後にクロストリジウム感染症を再発するリスクがある対象に、クロストリジウム感染症、またはクロストリジウム感染症の1以上の兆候の再発の発現、発生または重症度の低減または遅延がみられる場合に、クロストリジウム感染症の再発を低減させると見なされる。したがって、クロストリジウム感染症の再発の発現、発生または重症度の低減または遅延は、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%、またはその範

30

40

50

圀のいずれの量の低減であり得る。

【0036】

本明細書に記載の方法では、ビャクダン油の治療有効量を含む組成物は、対象のクロストリジウム感染症を選択的に抑制し得る。選択的な抑制とは、対象の消化管で正常な微生物糞の実質的な生存を維持しながら、クロストリジウム感染症が抑制することを意味する。

【0037】

本明細書に開示の投与方法では、各方法が、随意に、クロストリジウム感染症に罹患したまたはクロストリジウム感染症を発症するリスクがある対象を診断する段階を含む。本方法はまた、ビャクダン油組成物の有効性を評価すること、および治療レジメンを変更す

10

【0038】

本明細書に記載の組成物は、医薬組成物で提供され得る。組成物は、ビャクダン油の治療有効量を薬学的に許容可能な担体と組み合わせて含み、さらには、他の薬剤、医薬品（*pharmaceutical agent*）、担体、または希釈剤を含んでいてもよい。投与の意図する形態に応じて、医薬組成物は、固形、半固形または液体の剤形、例えば、錠剤、坐剤、ピル、カプセル、粉末、液体、または懸濁液、好ましくは正確な投与量（*dose*）の単回投与に適した単位剤形等であり得る。「薬学的に許容可能な」とは、生物学的にまたは他の所望されない材料ではなく、許容されない生物学的作用を引き起こすことなく、または含有する医薬組成物の他の成分と有害な態様で相互作用せずに、ビャクダン油と共に個人に投与され得る材料を意味する。

20

【0039】

ビャクダン油の治療有効量を含む組成物は、別の医薬品または薬剤と同時に投与され得る。医薬品は、単一の組成物でビャクダンの治療有効量により処方されるか、または別個の組成物で処方され得る。ビャクダン油の治療有効量を含む組成物はまた、別の医薬品による治療後、または治療前に投与され得る。例えば、これに限定されないが、ビャクダン油の治療有効量を含む組成物は、C. ディフィシルの再発を治療、予防、低減させるために、バンコマイシン、メトロニダゾールおよび／またはフィダキソマイシンの投与と同時に、投与後、または投与前に投与し得る。

【0040】

投与のいずれの適切な経路を利用してもよく、例えば、投与は全身または局所であり得る。全身投与には、注射または注入による投与が含まれる。他の投与経路（鼻腔内、経皮、エアロゾル、膈内、直腸内または経口投与等）もまた、考えられる。薬学的に許容可能な担体とは、生物学的にまた他の好ましくない材料ではなく、許容されない生物学的作用を引き起こすことなく、または有害な方法で医薬組成物に含有する他の成分と相互作用することなく、選択された化合物と共に個人に投与され得る材料を意味する。

30

【0041】

投与は、本明細書に記載の組成物の治療有効量を使用して、クロストリジウム感染症の再発を治療または低減するのに有効な期間、実施され得る。有効量は、当業者により決定されてもよく、哺乳動物では1日あたり活性組成物約0.5～約200mg/kg体重の例示的な投与量を含み、その投与量は、単回投与または個々の分割投与（1日あたり1～4回等）で投与されてもよい。そのような投与スケジュールは、対象および感染症の種類に応じて、数日間、数週間または数ヶ月持続され得る。あるいは、投与量は、1日あたり活性組成物約0.5～約150mg/kg体重、1日あたり活性組成物約0.5～100mg/kg体重、1日あたり活性組成物約0.5～約75mg/kg体重、1日あたり活性組成物約0.5～約50mg/kg体重、1日あたり活性組成物約0.5～約25mg/kg体重、1日あたり活性組成物約1～約20mg/kg体重、1日あたり活性組成物約1～約10mg/kg体重、1日あたり活性組成物約20mg/kg体重、1日あたり活性組成物約10mg/kg体重、または1日あたり活性組成物約5mg/kg体重であり得る。

40

50

【0042】

本明細書に教示した方法によれば、対象は、バックダン油の有効量が投与される。「有効量」および「有効投与量」という用語は、同じ意味で使用される。「有効量」という用語は、所望される生理反応が生じるのに必要ないずれの量と定義される。有効量および薬剤投与スケジュールは、実験的に決定してもよく、そのような決定を行うことは当業者の技能の範囲内である。投与の投与量範囲 (dosage range) とは、疾患または障害の1以上の症状に影響を与える（例えば、低減または遅延させる）所望の作用を得るのに十分な量の範囲である。投薬量は、実質的な副作用（所望されない交差反応、アナフィラキシー反応等）を引き起こすほどの量であるべきではない。通常、投与量は、使用する特有の化合物の活性、その化合物の代謝安定性および作用期間、対象の種、年齢、体重、総体的な健康状態、性別、および食生活、投与形態および投与期間、排泄速度、薬剤併用、ならびに特定の症状の重症度により変化するものであり、当業者により決定され得る。投与量は、いずれか禁忌である場合は、個々の医師により調製され得る。投与量は変更し得、毎日、1日だけまたは数日間、1回または複数回の投与で、投与される。医薬品の所与の分類の適切な投与量に関しては、ガイドラインが、文献に見られる。

10

【0043】

本明細書で用いられる場合、「担体」という用語は、いずれの賦形剤、希釈剤、増量剤 (filler)、塩、緩衝液、安定剤、可溶化剤、脂質、安定剤、または医薬処方物の使用のため当業者に周知の他の材料を包含する。組成物に使用する担体の選択は、組成物の意図する投与経路による。これらの材料を含有する薬学的に許容可能な担体および処方物の調製は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Edition, ed. University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia Pa., 2005に記載される。生理学的に許容可能な担体の例としては、緩衝液（リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、および他の有機酸緩衝液等）；酸化防止剤（アスコルビン酸等）；低分子量（約10残基より少ない）ポリペプチド；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等）；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドン等）；アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン等）；単糖類、二糖類、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリン等）；キレート剤（EDTA等）；糖アルコール（マンニトールまたはソルビトール等）；塩形成対イオン（ナトリウム等）；および／または非イオン性界面活性剤（TWEEN（登録商標）（ICI, Inc. ; Bridgewater, New Jersey）、ポリエチレングリコール（PEG）、および PLURONICS（商標）（BASF; Florham Park, NJ）等）が挙げられる。非経口注入に好適な組成物は、無菌の注入可能な溶液または分散液を再構成するために、生理学的に許容可能な無菌の水溶液または非水溶液、分散液、懸濁液または乳液、および無菌粉末を含んでもよい。好適な水性担体および非水性担体、希釈剤、溶媒またはビヒクルの例としては、水、エタノール、ポリオール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセロール等）、その好適な混合物、好適な油（オリーブ油等）および注入可能な有機エステル（オレイン酸エチル等）が挙げられる。適した流動性は、例えば、レシチン等の被覆剤の使用により、分散の場合に必要な粒径の維持により、および界面活性剤の使用により、維持され得る。

20

30

40

【0044】

これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分配剤 (dispensing agent) 等の補助剤を含有してもよい。微生物作用の防止は、様々な抗生物質および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等）により促進され得る。等張剤（例えば、糖、塩化ナトリウム等）もまた、含まれ得る。注入可能な医薬品形態の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）の使用により成し遂げられ得る。

【0045】

50

本明細書に記載の化合物またはその誘導体の経口投与用固形剤形としては、カプセル、錠剤、ピル、粉末、および顆粒が挙げられる。そのような固形剤形では、本明細書に記載の化合物またはその誘導体を、少なくとも1つの慣用の不活性賦形剤（または担体）（クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウム等）または（a）増量剤（filler）または増量剤（extender）（例えば、スターチ、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、およびケイ酸等）、（b）結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩（alginate）、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、およびアラビアゴム（acacia）、（c）保湿剤（例えば、グリセロール）、（d）崩壊剤（例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカスターチ、アルギン酸、ある複合ケイ酸塩（complex silicate）、および炭酸ナトリウム）、（e）溶液遅延剤（solution retarder）（例えば、パラフィン等）、（f）吸収促進剤（例えば、第4級アンモニウム化合物、（g）湿潤剤（例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロール）、（h）吸着剤（例えばカオリンおよびベントナイト）、および（i）滑沢剤（例えばタルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固形ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム）、またはそれらの混合物が挙げられる。カプセル、錠剤、およびピルの場合、剤形はまた、緩衝剤を含んでいてもよい。

10

【0046】

同様の種類の固形組成物をまた、ラクトースまたは乳糖ならびに高分子量ポリエチレングリコール等の賦形剤を使用した軟および硬ゼラチンカプセルの増量剤として使用してもよい。実施例に記載のように、ビャクダン油を、例えば、ポリエチレングリコール8000で処方し得る。この処方物はさらに、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（HPMCAS-LF）を含み得る。例えば、処方物は、約40%～約60%のビャクダン油、ポリエチレングリコール8000およびHPMCAS-LFを含み得、この場合、ポリエチレングリコール8000およびHPMCAS-LFは、処方物に約2:1～約10:1の比率で存在する。例えば、処方物でのビャクダン油の比率は、約40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59または60%であり得る。処方物はさらに、ポリエチレングリコール8000およびHPMCAS-LFを含み得、ポリエチレングリコール8000とHPMCAS-LFとの比率は約2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1、8:1、8.5:1、9:1、9.5:1または10:1の比率である。

20

30

【0047】

固形剤形（錠剤、糖衣錠、カプセル、ピル、および顆粒等）は、被覆剤およびシェル（当業者に公知の腸溶コーティングおよびその他等）により調製され得る。固形剤形は、乳白剤を含んでいてもよく、活性化合物または複数の活性化合物を腸管のある部分で、遅延放出する組成物であり得る。使用され得る包埋組成物の例としては、重合物質、およびワックスがある。活性化合物はまた、必要な場合、上記賦形剤のうち1以上とマイクロカプセル化した形態であり得る。

【0048】

40

本明細書に記載の化合物またはその誘導体の経口投与用の液体剤形としては、薬学的に許容可能な乳液、溶液、懸濁液、シロップ剤、およびエリキシル剤等が挙げられる。活性化合物の他に、液体剤形は、当技術分野で通常使用される不活性希釈剤（水または他の溶媒）、可溶化剤、および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油、具体的には綿実油、落花生油、トウモロコシ胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、ゴマ油、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタンの脂肪酸エステル、またはこれらの物質の混合物等を含み得る。そのような不活性希釈剤の他に、組成物はまた、添加剤、例えば湿潤剤、乳化剤、懸濁化剤、甘味料、香味剤（flavor

50

ing agent)、または香料(perfuming agent)等を含み得る。
【0049】

本明細書では、範囲は、ある「約」特定の値および／またはその値から別の「約」特定の値で表してもよい。そのような範囲が示される場合、ある特定の値および／またはその値から他の特定の値が含まれる。同様に、値が近似値として先の「約」を用いて示される場合、特定の値を開示していることは当然理解されるべきである。

【0050】

本出願の全体にわたり、様々な刊行物が参照される。これらの刊行物の開示のその全体が、参照により本出願に組み込まれる。

【0051】

いくつかの態様を記載してきた。しかしなお、様々な変更がなされてよいことが当然理解されるべきである。さらに、ある特徴または段階が記載される場合、組み合わせが明白に記載されていなくとも、その特徴は、本明細書中で他の特徴または段階と組み合わせ得る。したがって、他の態様が、本特許請求の範囲内に存在する。

【実施例】

【0052】

実施例 1

細菌細胞およびその保管

C. ディフィシル細菌培養株(BAA-1875、43594、43596)を、アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC; Manassas, VA)より取得した。C. ディフィシル培養物を、添加剤として0.1% 2-メルカプトエタノール(β -ME; BME)を含むReinforced Clostridial Medium(RCM)からなる液体の完全増殖培地(complete growth medium)に保管した。培養物を37°Cインキュベータで嫌気条件下で増殖させた(気体混合物: 80% N₂、10% CO₂、10% H₂を含む強く密封させたガスジャー(gas jar))。本研究に、示した細菌培養物を、10ml完全増殖培地を含有する14mlスナップキャップ付チューブ内で48時間増殖させた。培養物は対数期で依然として活発に増殖し、均一な細胞懸濁液が得られるまで(嫌気性ガス内で)摩砕(triturate)させた。

【0053】

定量化した細胞密度

細胞懸濁液を、ポリスチレンキュベット内のRCMに10分の1希釈し、OD₆₀₀の測定値(reading)を、RCMブランクと比較して測定した。次いで、各細菌株について、0.02 OD₆₀₀である40mlの懸濁液を完全増殖培地で生成した。

【0054】

油の連続希釈および試験濃度

試験油の連続希釈物を、無菌15mlチューブに、表2に記載のとおり最終的に2Xの濃度まで調製した。各油を、50%グリセロールと0.1%Tween 80により混合して、20X最終濃度で1.0mlの最終体積にし、次いでボルテックスして乳液を生成した。2X最終濃度で10mlの最終体積を生成するために、完全増殖培地の9mlを添加した。

【0055】

各濃度を、懸濁液の1mlを分配する前にボルテックスし、表3~5に示す試料チューブ番号(#1~#96)のように、5mlスナップキャップ付培養チューブに、適切な予備標識を施した。対照濃度および試験濃度を2連で分配し、「a」および「b」と標識した。

【0056】

10

20

30

40

【表 2】

表 2. 処方物、体積および方法

2X 最終濃度 (%)	最終体積 RCM+油 (ml)	体積 RCM(ml)	移動体積 (ml)	20X 最終濃度の油 体積(μ l)	グリセロール/Tween80 の体積(μ l)
0	10	9	1	0.000	1000
0.0625	10	9	1	6.25	993.75
0.125	10	9	1	12.5	987.5
0.25	10	9	1	25	975
0.5	10	9	1	50	950
1	10	9	1	100	900
2	10	9	1	200	800
4	10	9	1	400	600
合計	80	72	8	793.75	7206.25

10

【0057】

試験菌の植菌

20

各96チューブを次のように植菌し実験を開始した：各保存培養物（stock culture）の1.0mlを、示したように（表2～4）、適したチューブに分配した。個々のチューブを増殖について可視化することにより、チューブを監視し、完全増殖培地単独または記載の実験油を含有する増殖培地で4日間インキュベート後、各個々のチューブの画像を取得した。

【0058】

結果

表3～5はその結果を要約したものである。目視試験により、全ての対照チューブでC. ディフィシルの増殖が見られた。しかし、3種類の種が、異なる増殖パターンを有していた：BAA-1875は、チューブの底からおよそ液体カラムの3/4まで綿状の塊のように増殖したが、その他は、チューブの底に、綿状の塊（43594株）またはよりペレット化した塊（43596株）のように増殖した。S. アルバムおよびS. スピカタム油の両方の試験濃度の全てが、C. ディフィシルの全3種の成長を抑制した。したがって、ビャクダン油は、これらの細菌に対して有効な抗菌薬（antimicrobial）である。

30

【0059】

【表 3】

表 3. C. ディフィシル BAA-1875 株の増殖に対するビャクダン種の油の効果

試料 ブ#	チュー	油の種類	最終試験濃度 %	レプリカ	相対的 増殖
1		S. アルバム	対照	a	+++
2			対照	b	+++
3			0.0313	a	0
4			0.0313	b	0
5			0.0625	a	0
6			0.0625	b	0
7			0.125	a	0
8			0.125	b	0
9			0.25	a	0
10			0.25	b	0
11			0.5	a	0
12			0.5	b	0
13			1.0	a	0
14			1.0	b	0
15			2.0	a	0
16			2.0	b	0
17		S. スピカタム	対照	a	+++
18			対照	b	+++
19			0.0313	a	0
20			0.0313	b	0
21			0.0625	a	0
22			0.0625	b	0
23			0.125	a	0
24			0.125	b	0
25			0.25	a	0
26			0.25	b	0
27			0.5	a	0
28			0.5	b	0
29			1.0	a	0
30			1.0	b	0
31			2.0	a	0
32			2.0	b	0

10

20

30

【0060】

【表 4】

表 4. C. ディフィシル 4 3 5 9 4 株の増殖に対するビャクダン種の油の効果

試料 チューブ #	油の種類	最終試験濃度 %	レプリカ	相対的 増殖
33	S. アルバム	対照	a	+++
34		対照	b	+++
35		0.0313	a	0
36		0.0313	b	0
37		0.0625	a	0
38		0.0625	b	0
39		0.125	a	0
40		0.125	b	0
41		0.25	a	0
42		0.25	b	0
43		0.5	a	0
44		0.5	b	0
45		1.0	a	0
46		1.0	b	0
47		2.0	a	0
48		2.0	b	0
49	S. スピカタム	対照	a	+++
50		対照	b	+++
51		0.0313	a	0
52		0.0313	b	0
53		0.0625	a	0
54		0.0625	b	0
55		0.125	a	0
56		0.125	b	0
57		0.25	a	0
58		0.25	b	0
59		0.5	a	0
60		0.5	b	0
61		1.0	a	0
62		1.0	b	0
63		2.0	a	0
64		2.0	b	0

【 0 0 6 1 】

【表 5】

表 5. C. ディフィシル 4 3 5 9 6 株の増殖に対するビャクダン種の油の効果.

試料 ユーブ #	油の種類	最終試験濃度 %	レプリカ	相対的 増殖
65	S. アルバム	対照	a	+++
66		対照	b	+++
67		0.0313	a	0
68		0.0313	b	0
69		0.0625	a	0
70		0.0625	b	0
71		0.125	a	0
72		0.125	b	0
73		0.25	a	0
74		0.25	b	0
75		0.5	a	0
76		0.5	b	0
77		1.0	a	0
78		1.0	b	0
79		2.0	a	0
80		2.0	b	0
81	S. スピカタム	対照	a	+++
82		対照	b	+++
83		0.0313	a	0
84		0.0313	b	0
85		0.0625	a	0
86		0.0625	b	0
87		0.125	a	0
88		0.125	b	0
89		0.25	a	0
90		0.25	b	0
91		0.5	a	0
92		0.5	b	0
93		1.0	a	0
94		1.0	b	0
95		2.0	a	0
96		2.0	b	0

【0062】

ビャクダン油と他の油との比較

試験油を 2 X 最終濃度で調製した。簡潔には、各油を、50 % グリセロールおよび 0.1 % Tween 80 で 1 : 100 に希釈した（油の 1 % 最終濃度）。この懸濁液を 10 秒間激しくボルテックスし、次いで、さらにプロテオースフルクトースニュートラルレッド（Protease Fructose Neutral Red）（PFNR）増殖指示培地（0.05 % 最終油濃度）で 1 : 20 に希釈した。次いで、この作業用保存液（working stock）を 3 回以上 PFNR により希釈し 2 X にし、2 X の最終濃度である 4 つの作業用濃度が得られた。グリセロール：Tween 80 溶液を PFNR により 1 : 20 に希釈し、その後、3 回以上の 2 X 希釈で、ビヒクル対照として植菌した。希釈中、全試料をボルテックスし、懸濁液を確実に均質化した。全作業を、嫌気性グローブボックス（anaerobic glove box）内で実施し、試験試料および増殖培地で酸素を確実に排除した。

【0063】

各懸濁液の100 μ lを、図1に記載のようにウェルあたり2連で平板播種した。4つのレプリカ平板を作製した。細菌培地を、35℃のインキュベータ中のPFNR培養液で、嫌気条件で保管した（グローブボックス80%N₂、10%CO₂、10%H₂）。14mlスナップキャップ付チューブ内で増殖した示した細菌の24時間培養したものを、均質な懸濁液が得られるまで上下にピペティングした。細胞懸濁液を、ポリスチレンキュベット中でPBSに1/10希釈し、OD₆₀₀測定値をPBSブランクと比較して測定した。0.02 OD₆₀₀懸濁液の40mlを、PFNRの各細菌株用に作製した。0.02 OD₆₀₀細胞懸濁液の100 μ lを、試験懸濁液を予備的に投入したウェルの表面に平板塗抹した。最終体積は200 μ l（細胞濃度0.01 OD₆₀₀、各試験懸濁液は1X濃度）であった。各平板の第1カラムは、陰性対照としてPFNRのみを200 μ l含んでいた。

10

【0064】

平板を被覆し、次いで、グローブボックス内の35℃インキュベータに設置し、一晚インキュベートできるようにした。平板のインキュベート14時間後、平板をグローブボックスから取り出して、写真撮影し、450nmの吸光度で読み取った（黄色のピーク吸光度）。プレートをグローブボックス内に戻して、さらにインキュベートできるようにした。全体で38時間のインキュベーション後、プレートを再度グローブボックスより取り出して写真撮影し、450nmの吸光度を読み取った。図1は、西オーストラリアのビャクダン油および東インドのビャクダン油の両方がC. ディフィシルの有効な抗菌的阻害剤であることを示している。

20

【0065】

実施例 2菌株

クロストリジウム・ディフィシルNCTC13366 Ribotype 27（栄養型細菌および芽胞）を使用した。この菌株の栄養型細胞を、ブレインハートインフュージョン（BHIS）培養液およびアガーおよび0.1%タウロコール酸で増殖させた。以下に説明するように、この菌株の芽胞型を、0.1%タウロコール酸を含まないBHIS培養液およびアガーで増殖させた。

【0066】

試験化合物の調製

ビャクダン油（試験化合物）の200 μ LをDMSOの100 μ Lと混合し、次いで、0.01%Tween 80の7H12 4.7mLと組み合わせた。得られた溶液は、4%ビャクダン油および1%DMSOから構成された。化合物を分析してみると、ビャクダン油およびDMSOの濃度はそれぞれ2%および1%であった。

【0067】

最小発育阻止濃度（MIC）の測定

試験化合物のMICを、微量希釈法のCLSIガイドラインに基づき測定した。簡潔には、適切なブイヨン増殖培地（broth growth medium）に溶解した試験化合物を、2%~0.0001%となる2倍希釈で3連で分析した。細菌の新しい作業用保存液を解凍し、約 5×10^5 CFU/mLの濃度まで希釈し、次いで、全ての試験ウェルおよび陰性対照ウェルに添加し、適切な期間および条件でインキュベートした。インキュベート期間後に、試験ウェルを、菌の増殖を抑制する、試験化合物または対照化合物の最小濃度を視覚的に記録した。

40

【0068】

芽胞抑制分析

タウロコール酸は、C. ディフィシル芽胞の栄養型細菌への移行（発芽）に必要である。栄養型C. ディフィシルのMICのデータによれば、化合物は、栄養型段階の細菌で分析された濃度範囲全体にわたり抑制する。これは、この分析の化合物曝露部分からタウロコール酸を除去する必要があった。C. ディフィシル芽胞の抑制を試験するため、試験化

50

合物を、B H I S 培養液に曝露し、芽胞発芽の可能性を排除した。24時間の曝露後、各試験ウェルのアリコート、タウロコール酸を含有するB H I S 寒天平板培地に移し、芽胞が発芽し、次いでコロニー形成が可能となるようにした。アリコートを、平板培地の表面に塗抹し、次いで、48時間、嫌気性環境で37℃で、インキュベートした。各試験試料からのコロニーを計数し、陰性（未処置）対照により生成したコロニー数と比較した。試験試料が陰性対照試料より低いコロニー計数となったことは、試験化合物によるC. ディフィシル芽胞の抑制を示唆した。試験試料のコロニー数を、陰性対照試料のコロニー数で除算し、次いで、1.0で乗算して、阻害率を得た。

【0069】

【表5A】

10

クロストリジウム・ディフィシル NCTC13366 の芽胞抑制分析	
試験化合物濃度	阻害率
0.5%~0.0001%	有意でない抑制
1%	≥50%
2%	≥99%

【0070】

実施例3

処方物

負荷試験準備（Challenge Preparation）：酸素曝露を最小限にするために、嫌気性グローブボックスIW 305内で、負荷試験準備を行った。負荷試験用細菌（C. ディフィシル）のシード保存液を解凍し、1日目に適切な増殖培地に添加した。細菌を嫌氣的に一晩（18~24時間）、37℃でインキュベートした。負荷試験日（0日目）に、培地をDPBSで希釈し、10⁴ CFU/用量の標的濃度が得られた。給餌針付注射器に、負荷試験用材料を投入し、動物群に移入するため保留した。

20

【0071】

負荷試験処方物の保存、安定性、および取扱い：負荷試験用用量を投与まで冷凍保存または冷蔵し、投与期間にわたり安定なものと見なした。

【0072】

負荷試験用量の処方物濃度および均質性分析：負荷試験用の濃度を、負荷試験日に分光光度的に測定し、遡及的な生菌数により確認した。

30

【0073】

ポリマー担体：これらの研究で使用されるポリマー担体は、ポリエチレングリコール8000（PEG8000）および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（hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate）（HPMCAS-LF）を含む組成物であった。HPMCAS-LFを使用して、低pHの不溶性ポリマーを作製した。ポリマー担体およびビャクダン油を含む処方物には、約50%PEG8000、約41.67%ビャクダン油および約8.33%HPMCAS-LFが含まれた。

【0074】

40

試験系

およそ26~30g体重で0日目におよそ7~11週齢の60雌C57BL/6マウスを使用した。C57BL/6マウスはC. ディフィシルに感染しやすく抗生物質治療の評価に好適な動物モデルとして広く使用されている。ヒトの治療を模倣するため、治療は、強制経口投与および/または腹腔内投与により行われた。負荷試験を、強制経口投与により投与した（感染の自然経路を模倣する投与の有効かつ低侵襲経路であるため）。

【0075】

動物は、南方調査研究所（Southern Research Institute）に到着すると直ぐにA/BSL2封じ込め条件下で飼育した。マウスをマイクロアイソレータ（micro-isolator）で集団飼育（最大5匹/ゲージ）した。ゲージ

50

の底には、適切な寝具を使用した。業者により提供された寝床 (bedding) の分析は、研究結果を妨害または悪影響を与えることが見込まれ得る未知の混入物 (contaminant) の存在を確認するために、南方調査研究所の獣医、または指名された人により精査された。

【0076】

動物を、68～79°F (約20～26℃) の温度および30%～70%の相対湿度に維持された、環境モニタリングされた換気のよい部屋で飼育した。蛍光照明で1日あたり約12時間照射した。

【0077】

マウスに、認可された齧歯類用飼料#2016C (Harlan, Inc.; Madison, WI) を、研究前と研究期間中に給餌した。餌を、不断給餌した。製造業者により提供された餌の分析は、研究結果を妨害または悪影響を与えることが見込まれ得る未知の混入物の存在を確認するために、南方調査研究所の獣医、または指名された人により精査された。

【0078】

水 (パーミンガムの公共水道) は、研究前および研究期間中、不断供給された。動物施設からの水試料を定期的に分析し、分析は、研究結果を妨害または悪影響を与えることが見込まれ得る未知の混入物の存在を確認するために、南方調査研究所の獣医、または指名された人により精査された。

【0079】

動物に、社会的向上のため、施設内動物実験委員会 (Institutional animal Care and Use Committee) (IACUC) の承認を受けた精神的健康プログラム (psychological well-being program) を与えた。動物に、精神的健康のためケージを改良し、消耗品を豊富に供給した。

【0080】

到着すると、マウスを、AIBSL2施設で飼育した。研究を開始する前に、動物の全体的な健康状態と本研究での使用の受容性 (acceptability) を観察した。

【0081】

1週目の間、各マウスに、耳パンチ法により固有に識別化し、また、背中 of 皮下に移植可能なマイクロ識別装置 (チップ) (IPTT-300 Chip; Biomedical Data Systems Inc.; Seaford, DE) を挿入した。マイクロ識別チップにより、体温データをも取得する。チップまたは中継装置 (transponder) が入手できない場合は、体温を経直腸により取得した。

【0082】

実験計画

Provantisアプリケーション (Instem Life Sciences Systems, Ltd.; Staffordshire, United Kingdom) を、大部分の生存中 (in-life) データをオンラインで直接取得するために使用した。動物飼育室の環境モニタリング (すなわち、温度/湿度および明/暗サイクル) を、Edstrom社のウォッチドッグシステム (Watchdog system) (Edstrom Industries, Inc.; waterford, WI) を使用して、または手動で実施した。データのリマインダを手動でまたは適切な自動システムにより回収した。

【0083】

無作為化および群の割り付け (Group Assignment) : 体重が同程度である群を入手するため、全マウスを、コンピュータ処理の無作為化手順を使用して、それぞれの治療群に割り付けた。無作為化で必要とされる体重を、1週目で決定した (最低体重を無作為化から除外した)。無作為化後、マウスを以下に示す表6のように6群のうち1群に割り付けた :

10

20

30

40

50

【0084】

【表6】

表6

用量群	負荷試験前の治療				クロストリジウム・ディフィシル 負荷試験		負荷試験後の治療			マウス数
	対照品目	用量体積 (mL)	対照品目	用量体積 (mL)	病原菌濃度	用量体積 (mL)	試験／対照品目	用量体積 (mL)	用量濃度	
1	抗生物質カクテル	0.3	クリンダマイシン	0.4	1.0 X 10 ⁴	0.2	未治療	NA	NA	10
2	抗生物質カクテル	0.3	クリンダマイシン	0.4	1.0 X 10 ⁴	0.2	バンコマイシン	0.3	50mg/kg	10
3	抗生物質カクテル	0.3	クリンダマイシン	0.4	1.0 X 10 ⁴	0.2	ポリマー担体	0.3	62.5mg/用量	10
4	抗生物質カクテル	0.3	クリンダマイシン	0.4	1.0 X 10 ⁴	0.2	ビャクダン + 担体	0.3	62.5mg/用量	10
5	抗生物質カクテル	0.3	クリンダマイシン	0.4	1.0 X 10 ⁴	0.2	ビャクダン油	0.3	25mg/用量	10
6	抗生物質カクテル	0.3	クリンダマイシン	0.4	1.0 X 10 ⁴	0.2	ビャクダン油	0.3	50mg/用量	10

【0085】

治療手順：全治療用量は、動物に投与する前にボルテックスした。6、5および4日目に、動物に抗生物質カクテルを強制経口投与により0.3 mLの量で投与した。治療では、最初の投与日から、±1時間で投与した。1日目には、動物にクリンダマイシン（10 mg/kg）を腹腔内（IP）投与により0.4 mLの量で投与した。負荷試験後0～4日目に、動物に上述の表に列挙したような適切な試験品目を、強制経口投与により、0.3 mLの量で投与した。治療では、最初の投与日から、±1時間投与した。

【0086】

負荷試験：0日目に、マウスに、強制経口投与によりクロストリジウム・ディフィシルを0.2 mL体積で負荷試験を行った。細菌懸濁液は、予め充填した注射器に保留された状態で提供（および保存）され、各群への投与前に反転させた。マウスの負荷試験は、A/B S L 2 実験室の一次封じ込め（primary containment）装置内で実施された。使用されなかった負荷試験用材料の全てを凍結保存し、漂白剤の添加とこれに続くオートクレーブによるその後の廃棄用に細菌グループに渡された。

【0087】

絶食：動物は、研究工程中に絶食させなかった。

【0088】

臨床観察

経日的観察：全マウスを、研究前から研究期間にわたり死亡および瀕死の兆候を、1日2回観察した。

【0089】

詳細な観察：詳細な観察を、6日目から11日目まで毎日（または必要に応じより頻繁に）記録した。臨床兆候としては、これに限定されないが、機能低下（h y p o a c t i v e）、猫背姿勢、グルーミングの低下、下痢、斜視、神経系の兆候、または他の異常が挙げられる。

【0090】

10

体重：全動物の体重を、1週目の間に（無作為に）入手し、次いで、6日目から11日目まで毎日（または必要に応じより頻繁に）測定した。

【0091】

体温：体温を、6日目から11日目まで毎日（または必要に応じより頻繁に）測定した。

【0092】

糞試料：微生物分析のために、各動物の糞試料を1日目～4日目で（または必要に応じより頻繁に）採取した（S e c t i o n 11.10）。各動物の最低2糞ペレットの回収を試み；試料が採取できない場合、培養用スワブ（c u l t u r e s w a b）を使用して、試料をDPBSに入れた。採取した糞試料を、2つの無菌ポリプロピレン製バイアルに分け、 -70°C （ $\pm 10^{\circ}\text{C}$ ）で保管した。固形ペレットが採取できなかった場合、直腸の外部を拭き取り採取（s w a b）した。

20

【0093】

微生物学的分析：C. ディフィシルを単離するため、糞ペレットまたは拭き取り採取物（s w a b）をPBSに可溶化し、次いで、CDSAで培養した。次いで、寒天平板培地を嫌気槽に配置し、48～72時間、 36°C （ $\pm 10^{\circ}\text{C}$ ）でインキュベートした。C. ディフィシルコロニーを、コロニー形態により識別した。結果を、陽性（糞便にC. ディフィシルが存在）または陰性として記録した。

【0094】

C. ディフィシル毒素の有無を判断するために、糞ペレットを、酵素免疫測定法により定性的に分析した。C. ディフィシルを単離するため、組織を手動でホモジナイズし、無菌食塩水で段階希釈し、クロストリジウム・ディフィシル選択寒天培地（CDSA）に2連で平板塗抹し、コロニーを形成させるためインキュベートした。平板を計数し、CFU数／組織を決定した。

30

【0095】

結果

表7に示すとおり、ビャクダン油の単独またはポリマー担体との投与は、結果として、未治療およびプラセボ対照と比較して、C. ディフィシル感染症を減少させた。

【0096】

【表 7 - 1】

表 7

糞ペレットの定性分析					
グループ番号および治療	動物番号	ペレット採取日			
		1 日目	2 日目	3 日目	4 日目
1. 未治療	1	-	-	-	+
	2	-	-	+	+
	3	NA	NA	NA	NA
	4	-	+	+	-
	5	-	+	+	-
	6	+	+	-	-
	7	-	+	-	-
	8	-	+	-	-
	9	-	+	-	-
	10	-	+	-	-
2. バンコマイシン	11	-	-	-	-
	12	-	-	-	-
	13	-	-	-	-
	14	-	-	-	-
	15	-	+	-	-
	16	-	-	-	-
	17	-	-	-	-
	18	-	-	-	-
	19	-	-	-	-
	20	-	-	-	-
3. ポリマー担体 (プラセボ)	21	-	+	+	+
	22	+	+	+	+
	23	-	+	+	+
	24	-	+	+	+
	25	-	+	+	+
	26	-	+	+	-
	27	-	-	+	-
	28	-	+	-	-
	29	+	+	+	-
	30	-	-	-	-

10

20

30

40

【表 7 - 2】

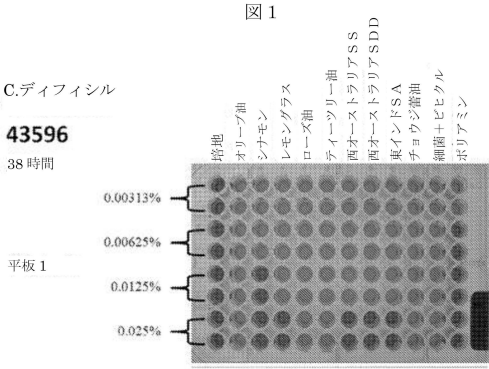
4. ビャクダン+担体	31	-	-	+	-
	32	-	-	-	-
	33	-	-	-	-
	34	-	-	-	-
	35	-	-	-	-
	36	-	-	+	+
	37	NA	NA	NA	NA
	38	+	+	+	-
	39	-	+	-	-
	40	-	-	+	+
5. 油 (25 mg)	41	-	-	+	NA
	42	-	-	+	-
	43	-	-	+	+
	44		-	-	+
	45	-	-	+	+
	46	-	-	+	+
	47	-	-	+	+
	48	-	-	+	+
	49	-	-	-	NA
	50	-	+	+	+
6. 油 (50 mg)	51	NA	NA	NA	NA
	52	NA	NA	NA	NA
	53	NA	NA	NA	NA
	54	NA	NA	NA	NA
	55	NA	NA	NA	NA
	56	NA	NA	NA	NA
	57	-	NA	NA	NA
	58	NA	NA	NA	NA
	59	NA	NA	NA	NA
	60	NA	NA	NA	NA

10

20

30

【図 1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	9/48	(2006.01)	A 6 1 K 9/48
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K 9/08
A 6 1 K	9/02	(2006.01)	A 6 1 K 9/02
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 クレメンツ, イアン

アメリカ合衆国 テキサス 7 8 2 5 8, サン アントニオ, トスカニー ストーン 1 8 6
1 8, スイート 1 0 0

(72)発明者 カステラ, ポール

アメリカ合衆国 テキサス 7 8 2 5 8, サン アントニオ, トスカニー ストーン 1 8 6
1 8, スイート 1 0 0

(72)発明者 リベンソン, コーリー

アメリカ合衆国 テキサス 7 8 2 5 8, サン アントニオ, トスカニー ストーン 1 8 6
1 8, スイート 1 0 0

審査官 鶴見 秀紀

(56)参考文献 特表2008-505621 (JP, A)

特表平10-505358 (JP, A)

国際公開第2011/130650 (WO, A1)

Flavour and Fragrance Journal, 2006年, Vol.21, No.3, pp.465-468, abstract, Tab.1

Pakistan Journal of Botany, 2011年, Vol.43, No.1, pp.531-538, abstract, Tab.2-4

Journal of Natural Products, 2005年, Vol.68, No.6, pp.819-824, abstract, Tab.1, 3, 4

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 6 / 0 0 - 3 6 / 9 0 6 8

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 P 1 / 0 4

A 6 1 P 3 1 / 0 4

A 6 1 P 4 3 / 0 0

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)