

(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2005-519868**(P2005-519868A)**

(43) 公表日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(51) Int.Cl. ⁷		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/045		A 6 1 K 31/045	4 C O 7 6
A 6 1 K 9/06		A 6 1 K 9/06	4 C 2 O 6
A 6 1 K 9/10		A 6 1 K 9/10	
A 6 1 K 47/34		A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/36		A 6 1 K 47/36	
		審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 63 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2003-535721 (P2003-535721)	(71) 出願人	500539033
(86) (22) 出願日	平成14年10月15日 (2002.10.15)		アバニール・ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	平成16年6月8日 (2004.6.8)		アメリカ合衆国、92121 カリフォル
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/033019		ニア州、サン・ディエゴ、ソレント・パレ
(87) 国際公開番号	W02003/032915		ー・ロード、11388
(87) 国際公開日	平成15年4月24日 (2003.4.24)	(74) 代理人	100064746
(31) 優先権主張番号	60/330,444		弁理士 深見 久郎
(32) 優先日	平成13年10月16日 (2001.10.16)	(74) 代理人	100085132
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森田 俊雄
		(74) 代理人	100083703
			弁理士 仲村 義平
		(74) 代理人	100096781
			弁理士 堀井 豊
		(74) 代理人	100098316
			弁理士 野田 久登
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 n - ドコサノールによるウイルス阻害

(57) 【要約】

本発明は、局所治療用調製物、およびウイルスおよび炎症疾患を処置するため、ならびに、皮膚および粘膜の局所炎症の痛みを減少させるための方法に関する。本調製物には、n - ドコサノールを含むクリームが含まれる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

実質的に、約 10 重量 % の n - ドコサノール、約 5 重量 % の、モノステアリン酸スクロース、ジステアリン酸スクロース、およびその混合物からなる群より選択されるステアリン酸エステル、約 8 重量 % の軽ミネラルオイル、約 5 重量 % のプロピレングリコール、約 2 . 7 重量 % のベンジルアルコール、および約 69 . 3 重量 % の水からなる、ウイルスおよび炎症疾患の処置における、皮膚および粘膜への適用のための、治療用クリーム。

【請求項 2】

実質的に、約 10 重量 % の n - ドコサノール、約 5 重量 % の、モノステアリン酸スクロース、ジステアリン酸スクロース、およびその混合物からなる群より選択されるステアリン酸エステル、約 8 重量 % の軽ミネラルオイル、約 5 重量 % のプロピレングリコール、約 2 . 7 重量 % のベンジルアルコール、および約 69 . 3 重量 % の水からなる、安定した治療用局所クリームを、皮膚または粘膜に適用することを含む、皮膚および粘膜のウイルス感染および炎症を処置する方法。

10

【請求項 3】

実質的に、約 10 重量 % の n - ドコサノール、約 5 重量 % の、モノステアリン酸スクロース、ジステアリン酸スクロース、およびその混合物からなる群より選択されるステアリン酸エステル、約 8 重量 % の軽ミネラルオイル、約 5 重量 % のプロピレングリコール、約 2 . 7 重量 % のベンジルアルコール、および約 69 . 3 重量 % の水からなる組成物を、炎症表面に適用することを含む、皮膚および粘膜の表面炎症の痛みを減少させる方法。

20

【請求項 4】

皮膚または粘膜のウイルス感染および炎症の処置のための薬剤の調製における、実質的に、約 10 重量 % の n - ドコサノール、約 5 重量 % の、モノステアリン酸スクロース、ジステアリン酸スクロース、およびその混合物からなる群より選択されるステアリン酸エステル、約 8 重量 % の軽ミネラルオイル、約 5 重量 % のプロピレングリコール、約 2 . 7 重量 % のベンジルアルコール、および約 69 . 3 重量 % の水からなる組成物の使用。

【請求項 5】

皮膚または粘膜の表面炎症の痛みを減少させるための薬剤の調製における、実質的に、約 10 重量 % の n - ドコサノール、約 5 重量 % の、モノステアリン酸スクロース、ジステアリン酸スクロース、およびその混合物からなる群より選択されるステアリン酸エステル、約 8 重量 % の軽ミネラルオイル、約 5 重量 % のプロピレングリコール、約 2 . 7 重量 % のベンジルアルコール、および約 69 . 3 重量 % の水からなる組成物の使用。

30

【請求項 6】

実質的に、糖に基づくエステル界面活性剤、約 5 重量 % を超える、n - ドコサノール、ミネラルオイル、皮膚軟化共溶媒および水からなる、ウイルスおよび炎症疾患の処置における、皮膚および膜への適用のための、治療用クリーム。

【請求項 7】

前記クリームが、少なくとも 3 ヶ月の期間、および繰り返し凍結融解サイクルの後、少なくとも 40 の温度で安定である、請求項 6 に記載の治療用クリーム。

【請求項 8】

前記糖に基づくエステル界面活性剤が、ヤシ脂肪酸スクロース、ステアリン酸スクロースおよびジステアリン酸スクロースからなる群より選択される、請求項 6 に記載の治療用クリーム。

40

【請求項 9】

前記糖に基づくエステル界面活性剤が、ヤシ脂肪酸スクロース、ステアリン酸スクロースおよびジステアリン酸スクロースからなるスクロースエステル類の群から選択される、少なくとも 1 つの化合物を含み、ここで、スクロースエステル（類）が、約 3 重量 % 以上のクリームを含む、請求項 8 の治療用クリーム。

【請求項 10】

前記スクロースエステル（類）が、約 5 重量 % 以上のクリームを含む、請求項 9 に記載

50

の治療用クリーム。

【請求項 1 1】

前記皮膚軟化共溶媒が、ポリオキシプロピレンステアリルエーテル、エチルヘキサノール、およびベンジルアルコールまたはそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 6 に記載の治療用クリーム。

【請求項 1 2】

前記 n - ドコサノールが、少なくともおよそ 10 重量 % のクリームを含む、請求項 6 に記載の治療用クリーム。

【請求項 1 3】

主要な治療用組成物が、実質的に n - ドコサノールからなり、前記クリームが、ヤシ脂肪酸スクロース、ステアリン酸スクロースおよびジステアリン酸スクロースからなる群より選択される 1 つ以上の化合物、およびポリオキシプロピレンステアリルエーテル、エチルヘキサノールおよびベンジルアルコールからなる群より選択される 1 つ以上の化合物に基づく、安定で、有効な治療用クリーム。 10

【請求項 1 4】

前記スクロースエステル（類）が、少なくともおよそ 5 重量 % のクリームを含む、請求項 1 3 に記載の治療用クリーム。

【請求項 1 5】

前記 n - ドコサノールが、少なくともおよそ 10 重量 % のクリームを含む、請求項 1 3 に記載の治療用クリーム。 20

【請求項 1 6】

少なくとも 1 つのスクロースエステルが存在し、総組成物の約 3 重量 % を含む条件で、5 ~ 15 重量 % の総クリーム、総クリームの 0 ~ 15 重量 % からなるステアリン酸スクロース、総クリームの 0 ~ 10 重量 % からなるヤシ脂肪酸スクロース、総クリームの 0 ~ 10 重量 % からなるジステアリン酸スクロース、総クリームの 3 ~ 15 重量 % からなるミネラルオイル、総クリームの 0 . 5 ~ 10 重量 % からなるベンジルアルコール、および総クリームの 40 ~ 70 重量 % からなる水の処方を有する請求項 1 3 に記載の治療用クリーム。

【請求項 1 7】

治療用活性組成物が、実質的に n - ドコサノールからなり、前記クリーム基体が、実質的に、糖に基づくエステル界面活性剤、n - イコサノール、n - ヘンイコサノール、n - トリコサノール、n - テトラコサノール、n - ペンタコサノール、n - ヘキサコサノール、n - ヘプタコサノール、および n - オクタコサノールまたはこれらの混合物からなる群より選択される、20 ~ 28 炭素原子を有する、少なくとも 1 つの長鎖脂肪族アルコール、ミネラルオイル、皮膚軟化共溶媒および水をからなる安定した治療用局所クリームを適用することを含む、皮膚および粘膜のウイルス感染および炎症を処置する方法。 30

【請求項 1 8】

n - ドコサノールが、半分以上の長鎖脂肪族アルコールを含む請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

皮膚および粘膜のウイルス感染および炎症を処置する方法であって、
少なくとも 1 つのスクロースエステルが存在するという条件で、
約 5 ~ 20 重量 % の n - ドコサノール、
約 0 ~ 15 重量 % のステアリン酸スクロース、
約 0 ~ 10 重量 % のヤシ脂肪酸スクロース、
約 0 ~ 10 重量 % のジステアリン酸スクロース、
の処方を有する局所クリームを適用することを含み、
ここで、スクロース（類）が、約 3 重量 % 以上のクリームを含み、
ポリオキシプロピレンステアリルエーテルまたはベンジルアルコールのいずれかが、少なくとも約 1 重量 % の量で存在するという条件で、 40 50

約 3 ~ 15 重量 % のミネラルオイル、
約 2 ~ 10 重量 % のプロピレングリコール、
約 0 ~ 5 重量 % のポリオキシプロピレン - 15 ステアリルエーテル、
約 0.5 ~ 5 重量 % のベンジルアルコール、および
約 40 ~ 70 重量 % の水を含む、方法。

【請求項 20】

スクロースエステル（類）が、約 5 重量 % 以上のクリームを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

少なくとも 1 つのスクロースエステルが存在するという条件で、
約 5 ~ 20 重量 % の n - ドコサノール、
約 0 ~ 15 重量 % のステアリン酸スクロース、
約 0 ~ 10 重量 % のヤシ脂肪酸スクロース、
約 0 ~ 10 重量 % のジステアリン酸スクロース、
の処方を有する抗炎症および抗ウイルスクリームであって、
スクロースエステル（類）が、約 3 重量 % 以上のクリームを含み、
ポリオキシプロピレンステアリルエーテルまたはベンジルアルコールのいずれかが、少なくとも約 1 重量 % の量で存在するという条件で、
約 3 ~ 15 重量 % のミネラルオイル、
約 2 ~ 10 重量 % のプロピレングリコール、
約 0 ~ 5 重量 % のポリオキシプロピレンステアリルエーテル、
約 0 ~ 5 重量 % のベンジルアルコール、および
約 40 ~ 70 重量 % の水を含む、クリーム。

10

20

【請求項 22】

スクロースエステル（類）が、約 5 重量 % 以上のクリームを含む、請求項 21 に記載の抗炎症クリーム。

【請求項 23】

生理学的に適合可能な担体中の n - ドコサノールの組成物を炎症表面に適用することを含む、皮膚または膜の表面炎症の痛みを減少させる方法であって、前記 n - ドコサノールが、前記組成物の約 5 ~ 約 25 重量 % からなる方法。

30

【請求項 24】

前記生理学的に適合可能な担体が、ヤシ脂肪酸スクロース、ステアリン酸スクロースおよびジステアリン酸スクロースからなる群より選択する 1 つ以上の化合物、およびポリオキシプロピレンステアリルエーテル、エチルヘキサンジオール、およびベンジルアルコールからなる群より選択される 1 つ以上の化合物を含むクリーム基体である、請求項 23 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウイルスおよび炎症疾患の処置のため、および皮膚および粘膜の局所的な炎症の痛みを減少させるための局所治療用調製品および方法に関する。調製品には、n - ドコサノールを含むクリームが含まれる。

40

【背景技術】

【0002】

ほとんどの抗ウイルス治療用化合物は、感染標的細胞内での、種々の特定のウイルス遺伝的複製機構を阻害する。これらのアプローチは、宿主細胞に対する毒性、薬物耐性ウイルス亜株の誘導、および、宿主細胞に対する突然変異誘発物質および / または催奇形性剤として働く可能性などの不利な点を有する。その結果、そのような宿主細胞に対する有害な影響のない、効果的な治療を提供する新規抗ウイルス化合物に対する検索が、最重要事項である。

50

【0003】

再発型口 - 顔面単純ヘルペス (再発型単純口唇ヘルペス、HSL) は、米国人口の20 ~ 40パーセントで起こると見積もられる、一般的な疾患である (Higgins CR, Schofield JK, Tatnall FM, Leigh IM J. Med. Virol. Suppl. 1; 22 - 6, 1993)。この疾患の主要な特徴は、単純ヘルペスウイルス (一般的に1型 [HSV - 1]) の、ストレス、日光、熱、呼吸管感染および月経のような刺激に対する応答における、発疹の前の潜伏維持能力である (Spruance SL, in Clinical management of herpes viruses, Sacks SL, Straus SE, Whitley RJ, Griffiths PD, editor, Amsterdam: ISO Press, p. 3 - 42, 1995)。発疹下で進行しない症状は、中止または非障害症状として呼ばれてきた。古典的な障害は、創傷の前の水疱 - 潰瘍状態へ進展するものであった。

10

【0004】

HSLは、7 ~ 10日のうちに通常発生する、治癒を伴って自己制限される (Spruance SL, Overall JC, Kem E, Krueger GG, Pliam V, Miller W New Engl. J. Med. 297: 69 - 75, 1997, Spruance SL Semin. in Dermatol. 11: 200 - 6, 1992、およびShafraan SD, Sacks SL, Aoki FY, Tyrrell DL, Schlech WF^{3rd}, Mendelson J. Rosenthal D, et al. J. Infect. Dis. 176: 78 - 83, 1997)。障害は、発生の8時間以内にしばしば最大の障害重症度となり、急速に進行する (Spruance SL, Wenerstrom G. Oral Surg. 58: 667 - 71, 1984)。したがって、治療用処置に関する時間帯は小さく、抗ウイルス治療は初期に投与することが重要である。発疹またはそれより後期に開始した抗ウイルス治療は、障害重度または中断障害の頻度に有意な影響を与えることが出来ない。

20

【0005】

宿主細胞に潜在的に有害ではない抗ウイルス活性を提供する化合物が同定され、いくらかの将来有望な結果が示されてきた。経口抗ウイルス薬剤、塩化水素バラシクロビルが、生殖器ヘルペス発生を抑制するため、および生殖器ヘルペスの再発発生の処置のために使用される。1970年代後半、たとえば、Snipesとその共同研究者ら (Snipes W, Person S, Keller G, Taylor W, Keith A Antimicrob. Agents Chemother. 11: 98 - 104 (1977); Sands J. Auperin D, Snipes W Antimicrob. Agents Chemother. 15: 67 - 73 (1979)) が、飽和および不飽和両方の、中鎖長のアルコールに対するかかる活性を示している一連の研究を報告した。最適な抗ウイルス活性が、10 ~ 12炭素長飽和アルコールで観察され、14 ~ 18炭素長のアルコールではより少ない抗ウイルス活性が観察され、それより長い鎖長のアルコールは試験しなかった。

30

【0006】

有意な抗ウイルス活性がC - 10およびC - 12アルコールで観察された一方で、これらの化合物はまた、細胞毒性および溶血性効果を示した。同様の観察が、不飽和アルコールおよびモノグルセリド類で見られ、3つの二重結合を含むC - 18アルコールで弱い活性が見られた。続いて、Clarkとその共同研究者ら (Clark LL, 米国特許第4, 670, 471号 (1987)、McBride PT, Clark LL, Krueger GG J. Invest. Dermatol. 89: 380 - 383 (1987)) は、30炭素長飽和アルコール、トリアコンタノールが、抗ヘルペス剤としての活性を有すると結論づけた。しかしながら、組織培養研究により、トリアコンタノールが、直接の抗ウイルス活性を欠くことが示されたので、動物実験で観察された見かけの抗ヘルペス活性は、この化合物の免疫調節効果を反映したものである可能性が考えられる。

40

【0007】

50

1974年には、*n*-ドコサノールが、全身の治療的価値を有すると報告された。たとえば、Debat、米国特許第4,186,211号は、経口で服用したときに、1-ドコサノールが、前立腺の肥大の処置において治療的に効果的であることを報告した。同様の研究が、10年後に、Yamamoto et al.、たとえば米国特許第4,624,966号にて報告され、だがしかしそこでは、間違った化学名で、*n*-ドコサノールをポリフェニル化合物として列記されており、治療における*n*-ドコサノールの経口または非経口投与を記述している。

【0008】

18炭素より長い化合物が、局所抗ウイルスまたは炎症活性を有するかどうかを確かめるために試験されてきた(Katz et al. PCT明細書第WO97/16434号)。10 *n*-ドコサノールの抗ウイルス特性を試験した、我々の研究室での試験は良好であった(Katz, DH, 米国特許第4,874,794号)。

【0009】

n-ドコサノールは、*in vitro*にて、HSV-1およびHSV-2、サイトメガロウイルス、水痘・帯状ヘルペスウイルスおよびヒトヘルペスウイルス6を含む、広いスペクトルの脂質エンベロープウイルスを阻害する(Katz DH, Marcelletti JF, Khalil MH, Pope LE, Katz LR. Pto c. Natl. Acad. Sci. USA 88:10825-9, 1991; Katz DH, Marcelletti JF, Pope LE, Khalil MH, McFadden RR, Katz LR, Katz DH Drugs of the Future 17:879-82, 1992; Pope LE, Marcelletti JF, Katz LR, Katz DH J. Lipid Res. 37:2167-78, 1996、およびPope LE, Marcelletti JF, Katz LR, Lin JY, Katz DH, Parish ML, Spear PG Antivir. Res. 40:85-94, 1988)。その活性の機構は新規であり、細胞取り込みおよび代謝変換の後、*n*-ドコサノールは、1または2段階のウイルス進入、核局在化の遮断および続くウイルスの複製を阻害する。より最近の実験により、*n*-ドコサノールが、主に宿主細胞とのウイルス融合の工程にて干渉することによって、抗-HSV活性を示す可能性があることが示唆されている(Pope LE, Marcelletti JF, Katz LR, Lin JY, Katz DH, Parish ML, Spear PG Antivir. Res. 40:85-94, 1988)。2000年7月に、*n*-ドコサノール10重量%クリームが、米国食品医薬品局によって、再発型口顔面単純ヘルペス感染のためのOTC局所処置として許可された(登録商標AbbreviaTM)。 30

【0010】

安定した、効果的な*n*-ドコサノール含有局所処方では課題を示している。特定の従来の処方のクリームおよび軟膏が予備評価に適合しうる一方で、特定の賦形剤が、*n*-ドコサノールの活性に対して不利であり得る。たとえば、浸透増強剤がしばしばそのような処方において、賦形剤として使用されるが、局所処方における賦形剤の安定化活性における効果は、実際には予測し得ない。たとえば、Rajadhyakshaによって報告されたアゾンは、優れた浸透増強剤であるが、クリーム処方における安定化成分としては知られていない。 40

【0011】

ココナツ脂肪酸のスクロースエステルが、浸透増強剤として処方されている、Cheng et al.、米国特許第4,865,848号および他の特許。しかしながら、Cheng et al.は、これらの物質からのクリームの安定性を示唆しておらず、また、Cheng et al.特許からそのような安定性を推察する理由は存在していない。そのような化合物における文献では、これらの物質は、C-20~C-28脂肪族アルコール含有クリームの安定化において、とりわけ効果的であるとは示唆されていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

安定した効果的なn - ドコサノール含有局所処方 は課題を示している。特定の従来の処方のクリームおよび軟膏は、予備評価では適用しうる一方で、特定の賦形剤が、n - ドコサノールの活性に不利であり得る。したがって、長期間安定であり、生理学的に許容可能であり、皮膚および膜への局所適用に好適である、n - ドコサノールの再生可能で効果的な処方に対する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0013】

第1の実施形態において、治療用クリームが、約10重量%のn - ドコサノール、約5重量%の、モノステアリン酸スクロース、ジステアリン酸スクロースおよびこれらの混合物からなる群より選択されるステアリン酸エステル、約8重量%の軽ミネラルオイル、約5重量%のプロピレングリコール、約2.7重量%のベンジルアルコール、および約69.3重量%の水を含む、ウイルスおよび炎症疾患の処置における、皮膚および粘膜への適用のために提供される。

10

【0014】

第2の実施形態において、皮膚および粘膜のウイルス感染および炎症を処置する方法が、約10重量%のn - ドコサノール、約5重量%の、モノステアリン酸スクロース、ジステアリン酸スクロースおよびこれらの混合物からなる群より選択されるステアリン酸エステル、約8重量%の軽ミネラルオイル、約5重量%のプロピレングリコール、約2.7重量%のベンジルアルコール、および約69.3重量%の水を含む、安定な治療用局所クリームを、皮膚および粘膜への適用することを含んで提供される。

20

【0015】

第3の実施形態において、皮膚および粘膜の表面炎症の痛みを減少させる方法が、約10重量%のn - ドコサノール、約5重量%の、モノステアリン酸スクロース、ジステアリン酸スクロースおよびこれらの混合物からなる群より選択されるステアリン酸エステル、約8重量%の軽ミネラルオイル、約5重量%のプロピレングリコール、約2.7重量%のベンジルアルコール、および約69.3重量%の水を含む組成物を、炎症表面に適用することを含んで提供される。

【0016】

第4の実施形態において、皮膚および粘膜のウイルス感染および炎症の処置のための医薬品の調製において、約10重量%のn - ドコサノール、約5重量%の、モノステアリン酸スクロース、ジステアリン酸スクロースおよびこれらの混合物からなる群より選択されるステアリン酸エステル、約8重量%の軽ミネラルオイル、約5重量%のプロピレングリコール、約2.7重量%のベンジルアルコール、および約69.3重量%の水を含む、組成物の使用が提供される。

30

【0017】

第5の実施形態において、皮膚または粘膜の表面炎症の痛みを減少させるための医薬品の調製において、約10重量%のn - ドコサノール、約5重量%の、モノステアリン酸スクロース、ジステアリン酸スクロースおよびこれらの混合物からなる群より選択されるステアリン酸エステル、約8重量%の軽ミネラルオイル、約5重量%のプロピレングリコール、約2.7重量%のベンジルアルコール、および約69.3重量%の水を含む、組成物の使用が提供される。

40

【0018】

第6の実施形態において、治療用クリームが、糖に基づくエステル界面活性剤、約5重量%を超えるn - ドコサノール、ミネラルオイル、皮膚軟化共溶媒および水を含む、ウイルスおよび炎症疾患の処置における、皮膚および膜への適用のために提供される。

【0019】

第6の実施形態の第1の態様において、クリームは、少なくとも3ヶ月、繰り返し凍結融解サイクルの後、少なくとも40の温度で安定である。

50

【 0 0 2 0 】

第 6 の実施形態の第 2 の態様において、糖に基づくエステル界面活性剤は、ヤシ脂肪酸スクロース、ステアリン酸スクロースおよびジステアリン酸スクロースからなる群より選択される。

【 0 0 2 1 】

第 6 の実施形態の第 3 の態様において、糖に基づくエステル界面活性剤は、ヤシ脂肪酸スクロース、ステアリン酸スクロースおよびジステアリン酸スクロースからなるスクロースエステル群より選択される、少なくとも 1 つの化合物を含み、ここで、スクロースエステル（類）は、3 重量 % 以上でクリームに含まれる。他の態様において、スクロースエステル（類）は、約 5 重量 % 以上でクリームに含まれる。

10

【 0 0 2 2 】

第 6 の実施形態の第 4 の態様において、皮膚軟化共溶媒は、ポリオキシプロピレンステアリルエーテル、エチルヘキサジオールおよびベンジルアルコールまたはこれらの組み合わせからなる群より選択される。

【 0 0 2 3 】

第 6 の実施形態の第 5 の態様において、n - ドコサノールは、少なくともおよそ 10 重量 % でクリームに含まれる。

【 0 0 2 4 】

第 7 の実施形態において、安定で、効果的な治療用クリームは、主要な治療用組成物が、実質的に、n - ドコサノールからなり、クリーム基体が、ヤシ脂肪酸スクロース、ステアリン酸スクロースおよびジステアリン酸スクロースからなる群より選択される 1 つ以上の化合物、およびポリオキシプロピレンステアリルエーテル、エチルヘキサジオールおよびベンジルアルコールからなる群より選択される 1 つ以上の化合物を含むように提供される。

20

【 0 0 2 5 】

第 7 の実施形態の第 1 の態様において、スクロースエステル（類）は、少なくともおよそ 5 重量 % でクリームに含まれる。

【 0 0 2 6 】

第 7 の実施形態の第 2 の態様において、n - ドコサノールは、少なくともおよそ 10 重量 % でクリームに含まれる。

30

【 0 0 2 7 】

第 7 の実施形態の第 3 の態様において、治療用クリームは、少なくとも 1 つのスクロースエステルが存在し、総組成物の約 3 重量 % を含む条件で、総クリームの 5 ~ 15 重量 % までで作製される n - ドコサノール、総クリームの 0 ~ 15 重量 % からのステアリン酸スクロース、総クリームの 0 ~ 10 重量 % からのヤシ脂肪酸スクロース、総クリームの 0 ~ 10 重量 % からのジステアリン酸スクロース、総クリームの 3 ~ 15 重量 % を含むミネラルオイル、総クリームの 0 . 5 ~ 10 重量 % からなるベンジルアルコール、および総クリームの 40 ~ 70 重量 % からなる水の処方を有する。

【 0 0 2 8 】

第 8 の実施形態において、皮膚および粘膜のウイルス感染および炎症を処置する方法が、実質的に n - ドコサノールを含み、前記クリーム基体が、実質的に、糖に基づくエステル界面活性剤、n - エイコサノール、n - ヘンエイコサノール、n - トリコサノール、n - テトラコサノール、n - ペンタコサノール、n - ヘキサコサノール、n - ヘプタコサノール、および n - オクタコサノールまたはその混合物からなる群より選択される、20 ~ 28 炭素原子を有する、少なくとも 1 つの長鎖脂肪族アルコール、ミネラルオイル、皮膚軟化共溶媒および水を含む、安定した治療用局所クリームを適用することを含んで提供される。

40

【 0 0 2 9 】

第 8 の実施形態の第 1 の態様において、n - ドコサノールは、半分以上の長鎖脂肪族アルコールを含む。

50

【0030】

第9の実施形態において、皮膚および粘膜のウイルス感染および炎症を処置する方法は、少なくとも1つのスクロースエステルが存在するという条件で、約5～20重量%のn-ドコサノール、約0～15重量%のステアリン酸スクロース、約0～10重量%のヤシ脂肪酸スクロース、約0～10重量%のジステアリン酸スクロース、の処方を有する局所クリームを適用することを含んで提供され、ここで、スクロース(類)は、約3重量%以上のクリームを含み、ポリオキシプロピレンステアリルエーテルまたはベンジルアルコールいずれかが、少なくとも約1重量%の量で存在するという条件で、約3～15重量%のプロピレングリコール、約2～10重量%のプロピレングリコール、約0.5～5重量%のベンジルアルコール、および約40～70重量%の水が含まれる。

10

【0031】

第9の実施形態の第1の態様において、スクロースエステル(類)は、約5重量%以上でクリームに含まれる。

【0032】

第10の実施形態において、抗炎症および抗ウイルスクリームが、少なくとも1つのスクロースエステルが存在するという条件で、約5～20重量%のn-ドコサノール、約0～15重量%のステアリン酸スクロース、約0～10重量%のヤシ脂肪酸スクロース、約0～10重量%のジステアリン酸スクロース、の処方を有して提供され、ここで、スクロース(類)が、約3重量%以上のクリーム、ポリオキシプロピレンステアリルエーテルまたはベンジルアルコールいずれかが、少なくとも約1重量%の量で存在するという条件で、約3～15重量%のプロピレングリコール、約2～10重量%のプロピレングリコール、約0.5～5重量%のベンジルアルコールおよび約40～70重量%の水が含まれる。

20

【0033】

第10の実施形態の第1の態様において、スクロースエステル(類)は、約5重量%以上のクリームを含む。

【0034】

第11の実施形態において、皮膚または膜の表面炎症の痛みを減少させる方法が、薬理的に許容可能な担体中のn-ドコサノールの組成物を、炎症表面に適用することを含んで提供され、前記n-ドコサノールは、前記組成物の約5～約25重量%で含まれる。

【0035】

第11の実施形態の第1の態様において、前記生理学的に適合可能な担体は、ヤシ脂肪酸スクロース、ステアリン酸スクロースおよびジステアリン酸スクロースからなる群より選択する1つ以上の化合物、およびポリオキシプロピレンステアリルエーテル、エチルヘキサジオール、およびベンジルアルコールからなる群より選択される1つ以上の化合物を含むクリーム基体である。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

以下の説明および実施例により、本発明の好ましい実施形態の詳細を説明する。当業者は、本発明の範囲内で多数の変化および改変があることを認識されたい。したがって、好ましい実施形態の説明は本発明の範囲を限定するとみなされるべきではない。

40

10%ドコサノールクリーム

クリームを調製するために、水に不溶性の化合物であるn-ドコサノール(純度98%; M. M i c h e l a n d C o . , N e w Y o r k , N . Y .)をヤシ脂肪酸スクロース、ステアリン酸スクロース、ジステアリン酸スクロース、ミネラルオイル、プロピレングリコールおよびポリオキシプロピレン-15-ステアリルエーテルと、80にて混合した。水を加え、混合してクリームとした。

【0037】

クリームはまた、n-ドコサノールを除くすべての物質を水に加えてクリームの主成分を形成させ、それにn-ドコサノールを混合することによって作ってもよい。

【0038】

50

以下の割合が一般的に適していることが分かった。n - ドコサノール、5 ~ 25 重量% (または少なくとも1つの他の20 ~ 28 炭素原子を有する長鎖の脂肪族アルコール、すなわちn - エイコサノール、n - ヘネイコサノール、n - トリコサノール、n - テトラコサノール、n - ペンタコサノール、n - ヘキサコサノール、n - ヘプタコサノール、およびn - オクタコサノールとの混合物中のn - ドコサノール) ; ステアリン酸スクロース、0 ~ 15 重量% ; ヤシ脂肪酸スクロース、0 ~ 10 重量% ; ジステアリン酸スクロース、0 ~ 10 重量% (少なくとも1つのスクロースエステルが存在し、そのスクロースエステルが全組成の内約3 重量%以上、好ましくは10 重量%を占めるという条件下で) ; ミネラルオイルNF、3 ~ 15 重量% ; プロピレングリコールUSP、2 ~ 10 重量% ; ポリオキシプロピレン - 15 - ステアリルエーテル、0 ~ 5 重量% ; ベンジルアルコールNF、0 ~ 5 重量% (ポリオキシプロピレンステアリルエーテルかベンジルアルコールのどちらかが2 重量%の量で存在するという条件下で) ; 精製水、40 ~ 70 重量%。しかしながら、ある実施形態においては別の割合が好ましいこともある。

10

【0039】

以下の割合が、一般的に最適であると分かった。20 ~ 28 炭素原子を有する、少なくとも1つの他の長鎖脂肪族アルコール、n - ドコサノール、5 ~ 10 重量% (または少なくとも1つの他の20 ~ 28 炭素原子を有する長鎖の脂肪族アルコール、すなわちn - エイコサノール、n - ヘネイコサノール、n - トリコサノール、n - テトラコサノール、n - ペンタコサノール、n - ヘキサコサノール、n - ヘプタコサノール、およびn - オクタコサノールとの混合物中のn - ドコサノール) ; ステアリン酸スクロース、6 重量% ; ヤシ脂肪酸スクロース、5 重量% ; ジステアリン酸スクロース、5 重量% (少なくとも1つのスクロースエステルが存在し、そのスクロースエステルが全組成のうち約3 重量%以上、好ましくは10 重量%をしめるという条件下で) ; ミネラルオイルNF、8 重量% ; プロピレングリコールUSP、5 重量% ; ポリオキシプロピレン - 15 - ステアリルエーテル、2 ~ 3 重量% ; ベンジルアルコールNF、2 ~ 3 重量% (ポリオキシプロピレンステアリルエーテルかベンジルアルコールのどちらかが2 重量%の量で存在するという条件下で) ; 精製水、55 ~ 60 重量%。しかしながら、ある実施形態においては別の割合が好ましいこともある。

20

【0040】

ポリオキシプロピレンステアリルエーテルまたはベンジルアルコールおよびスクロースエーテルの代わりに2 - エチル - 1, 3 - ヘキサジオールを含む処方もまた、有効であることが分かった。しかしながら、ある実施形態、例えば繰り返し局所的に使用することを目的とした組成においては2 - エチル - 1, 3 - ヘキサジオール以外の組成物が好ましいこともある。

30

【0041】

好ましい実施形態のn - ドコサノール組成 (処方I) を下記の表1に記載している。

【0042】

【表 1】

表 1

n - ドコサノール製剤 I

成分	重量%	作用／原理
n - ドコサノール	10.0	有効成分
ステアリン酸スクロース	11.0	乳化剤、皮膚軟化剤
ヤシ脂肪酸スクロース	5.0	乳化剤、皮膚軟化剤
ミネラルオイルNF	8.0	皮膚軟化剤
プロピレングリコールUSP	5.0	両親媒溶剤、湿潤剤、 皮膚感触変更剤、防腐補助剤
2 - エチル - 1, 3 - ヘキサジオール	2.7	両親媒溶剤、防腐補助剤
精製水 q s a d	58.3	賦形剤溶剤

10

【0043】

この n - ドコサノールクリームは、n - ドコサノールが動物のヘルペスモデルに対して一貫して活性をもつことが分かった、広範囲の動物を用いた治療試験を行なえる短い期間より長く十分な安定性をもち（図 1 ~ 3）、安全で、耐性であることが示されたヒト臨床研究の最初の第 I 相に用いた。アメリカ合衆国以外の特定の国では、2 - エチル - 1, 3 - ヘキサジオールを繰り返し使用することが容認されない可能性がある。そのため、他の実施形態においては、2 - エチル - 1, 3 - ヘキサジオールを等量（2.7 重量%）でポリオキシプロピレン - 15 - ステアリルエーテルに換え、5 重量%のステアリン酸スクロースを 5 重量%のジステアリン酸スクロースに交換することが好ましい。結果生じた n - ドコサノール組成物（処方 I I）を下記の表 2 に記載している。

20

【0044】

【表 2】

表 2

n - ドコサノール処方 I I

成分	重量%	作用／原理
n - ドコサノール	10.0	有効成分
ステアリン酸スクロース	6.0	乳化剤、皮膚軟化剤
ヤシ脂肪酸スクロース	5.0	乳化剤、皮膚軟化剤
ジアステリン酸スクロース	5.0	乳化剤、皮膚軟化剤
ミネラルオイルNF	8.0	皮膚軟化剤
プロピレングリコールUSP	5.0	両親媒溶剤、湿潤剤、皮膚 感触変更剤、防腐補助剤
ポリオキシプロピレン - 15 ステ アリルエーテル	2.7	両親媒溶剤、防腐補助剤
精製水 q s a d	58.3	賦形剤溶剤

30

40

【0045】

この改変した処方 I I により、最終的な薬剤産物の物理的な安定性が得られ、モルモットを用いたヘルペス動物モデルにおいて良好な働きをすることができる（図 1 および 2 を参照のこと）。しかしこの処方 I I は USP の防腐剤効果試験で不合格であった。したがってこの処方 I I は USP の防腐剤効果試験に合格することを必要としない使用、すなわち、ヒト

50

以外への使用にのみ、適している。下記のように、両親媒性賦形剤としてポリオキシプロピレン - 15 - ステアリルエーテルをベンジルアルコールに交換することにより微生物学的安定性を改善することができる。

【0046】

安定な組成物が得られる特定の特に好ましい実施形態では、ここで界面活性剤は約5重量%で存在する、記載した分類の界面活性剤の1つまたは2つのみを用いる。安定したクリームを産生するために、界面活性剤をわずかな種類で、および少量で用いる能力は、われわれの研究室での研究において予想外の望ましい結果であった。界面活性剤が過剰であると界面活性剤の濃度が5重量%以上で、炎症の可能性が増すことから、過剰の界面活性剤は望ましくない。さらに、過剰量の非イオン界面活性剤を含む処方ではしばしば防腐効果についての問題が起こる。

10

【0047】

親水性 - 脂肪親和性平衡 (HLB) 値が9.0 ~ 13.0の範囲の、いくつかの界面活性剤混合物を利用する際、種々のn - ドコサノールクリームを処方し、ついで最適のエマルジョン特性、物理的性質、薬効および加速に対する物理的安定性について選別した。ほとんどの薬剤エマルジョンは、最適なHLBにするために2成分の界面活性剤混合物を基にしているが、試験結果から、改善したn - ドコサノール処方においてはステアリン酸スクロース単独のものが他の界面活性剤混合物と同等の、以上の働きをすることが明らかになった。そのような界面活性剤混合物を含むn - ドコサノール処方 (処方III) は以下である。

20

【0048】

【表3】

表3

n - ドコサノール (処方III)

成分	重量%	作用/原理
n - ドコサノール	10.0	有効成分
ステアリン酸スクロース	5.0	乳化剤、皮膚軟化剤
ミネラルオイルNF	8.0	皮膚軟化剤
プロピレングリコールUSP	5.0	両親媒溶剤、湿潤剤、皮膚感触変更剤、防腐補助剤
ベンジルアルコールNF	2.7	両親媒溶剤、防腐補助剤
精製水 q s a d	69.3	賦形剤溶剤

30

【0049】

処方Iと比較した時の処方IIIの相違点としては、2 - エチル - 1,3 - ヘキサンジオールを、安全な使用と公定地位の長い歴史を持つ公知の防腐剤および両親媒溶媒であるベンジルアルコールに交換したことがあげられる。ベンジルアルコールの液体特性および類似作用により、エチルヘキサンジオールからの交換が合理的で危険性が低いものとなっている。産物の薬剤特性を変えずに、および顕微鏡検査に基づくエマルジョンの品質に負の影響を与えずに、および加速試験において物理的性質を失うことなく、総界面活性剤濃度を5重量%活性まで減少させた。処方の性質に実質的な影響を与えずにヤシ脂肪酸スクロースを処方から除去した。

40

【0050】

クリームは加熱および成分の付加により、またはさらに好ましい、油溶解性成分の混合および水溶性組成物と別々に加熱する手法により作製することができる。次に、熱油溶解性組成物を激しく混合しながら熱い水層に加える。表4は評価した処方の要約である。

【0051】

【表 4】

表 4

処方（重量%組成物）

成分	I	II	IA	III	作用／原理
n - ドコサノール	10.0	10.0	10.0	10.0	有効成分
ステアリン酸スクロース	11.0	6.0	11.0	5.0	乳化剤、皮膚軟化剤
ヤシ脂肪酸スクロース	5.0	5.0	5.0	—	乳化剤、皮膚軟化剤
ジアステリン酸スクロース	—	5.0	—	—	乳化剤、皮膚軟化剤
ミネラルオイルNF	8.0	8.0	8.0	8.0	皮膚軟化剤
プロピレングリコール	5.0	5.0	5.0	5.0	両親媒溶剤、防腐補助剤
2 - エチル - 1, 3 - ヘキサジオール	2.7	—	—	—	両親媒溶剤、防腐補助剤
ポリオキシプロピレン - 15 ステアリルエーテル	—	2.7	—	—	両親媒溶剤、防腐補助剤
ベンジルアルコールNF	—	—	2.7	2.7	両親媒溶剤、防腐剤
水	58.3	58.3	58.3	69.3	賦形剤溶剤

10

20

【0052】

30

n - ドコサノール処方 III は加速物理的安定性のスクリーニング（42℃ で保存、凍結融解周期）に合格し、また USP 防腐剤効果試験にも合格した。度重なる根拠によりモルモットヘルペスモデルにおける薬効が実証された。

【0053】

安定性を観察するために、n - ドコサノールクリーム処方を、室温（30℃）、高い温度（42℃）、およびポリプロピレン瓶中での凍結融解、というさまざまな条件下で保存した。凍結融解の試料を 48 時間の凍結融解周期、すなわち凍結温度（-15℃）で 24 時間および室温にて 24 時間に適用した。クリーム試料をそれぞれの条件下で保存し、さまざまな設定時間において、物理的な安定性を視覚的に検査した。30℃ にて 12 ヶ月後、または 42℃ にて 3 ヶ月後、または 24 回の凍結融解周期後、全ての試料が灰色がかった白色のクリームとして残った。シネシスまたは層分離の履歴は見られなかった。上記の視覚的検査に基づいて、10 重量%の n - ドコサノールの処方 III は任意の規定された条件下では物理的に安定であるとみなした。

40

【0054】

処方 III の正確な保存寿命は測定しなかったが、経験値から、保存寿命は市販の n - ドコサノール含有クリームよりも適当であることが示唆される。したがって、特定の n - ドコサノール処方是不安定である一方で、特定の処方、安定でかつ有効であることが分かった処方 III は好ましい。

【0055】

疎水性および親水性化合物のクリーム処方の技術分野の当業者は、ある実施形態におい

50

である置き換えも好ましいことを理解される。例えば、グリセロールまたはその他のグリコールをプロピレングリコールの代わりに用いることは、割合をいくつか調整すれば好ましい。ポリプロピレン-15-ステアリルエーテルをその他のポリオキシレンが基礎になっているエーテルに置き換えることも可能であることが分かった。糖が基礎になっているエーテルについても、含まれる全体量が *n*-ドコサノールを安定化させるのに十分であれば、相対的な割合は大幅に変更してよい。この量は好ましくは約 5 ~ 25 重量%であるが、最少量および最大量は正確には測定していない。

【0056】

特に好ましい実施形態においては、*n*-ドコサノールクリーム処方 10 重量% *n*-ドコサノール、5 重量%のステアリン酸スクロース、8 重量%のミネラルオイル NF、5 重量%のプロピレングリコール USP、2.7 重量%のベンジルアルコール NF および 69.3 重量%の精製水からなる処方 IIII である。

10

【0057】

有効量の *n*-ドコサノールを単体でまたはその他の前記のアルコールとの混合物として含む、長期間安定なクリーム調製物を調製し、それらの化合物の薬理学を解明した。好ましい実施形態においては、通常取り扱い条件下で 1 年以上の保存寿命を持つ、すなわち 1 年以上室温で安定であり、凍結融解周期の繰り返しの耐えることができ、ヒトの治療を含む、動物の皮膚または膜組織のウイルス誘導性および炎症性の疾患の治療への利用に適しているような、長期間安定な局所的クリーム処方が得られる。クリームの成分としては、生理的な有効成分としての *n*-ドコサノール単体、またはその他の典型的な長鎖 (C-20 ~ C-28) 脂肪族アルコールとの混合体、水、油、糖のエステル、および脂肪酸、生理的に不活性である、または体内で代謝することができるエステル、皮膚または膜組織の作用部位への *n*-ドコサノールの浸透を補助し、および生理的に有効なアルコールに対する安定な担体形成を補助する皮膚軟化剤があげられる。

20

【0058】

糖を基本とするエステルは、分子量が約 150 を超える、好ましくは 250 を超える糖部位および分子量が約 150 以上、好ましくは 250 を超える脂肪酸からなる。エステルは約 400 以上の分子量を有する。ここで用いる糖とは、高級アルコールのケトンまたはアルデヒド誘導体である、甘いまたはほのかに甘い炭水化物を指し、糖類および二糖類の両方を含むが、二糖類を基本とするエステルが好ましい。高分子量の多価アルコールを従来の糖と置き換えてよい。そのようなエステル化した糖を基本とした界面活性剤の例証は一般的な化学文献および様々なカタログ、例えば、McCutcheon's directories, Volume 1 - EMULSIFIERS & DETERGENTS、および Volume 2 - FUNCTIONAL MATERIALS、(McCutcheon's Division, The Manufacturing Confectioner Publishing Co., Glen Rock, NJ, USA, 1993) で見ることが出来る。スクロース脂肪酸エステルが好ましい。ステアリン酸スクロースおよびジステアリン酸スクロースは、クリームの油と水層を乳化させるような *n*-ドコサノールクリーム処方に利用するのに好ましい非イオン性の界面活性剤である。これらの界面活性剤は非炎症性であり、そのため例えばヘルペスウイルスによって引き起こされる水疱の治療に特に好ましい。ステアリン酸スクロースは、従来の界面活性剤 (例えば *Brj*、*Myrj*、および *Span* という登録商標の界面活性剤、ICI Americas of Wilmington、DE から売り出されている界面活性剤) と比べて、*n*-ドコサノールに対する界面活性剤としてより優れた性質を示す。

30

40

【0059】

ポリプロピレングリコールは、局所用処方に安全に使用されている長い歴史を持つので、*n*-ドコサノールクリーム処方への利用に好ましい。クリーム処方へのプロピレングリコールの利用法のひとつは、皮膚になめらかで柔軟な感覚を与える湿潤剤としての利用である。ミネラルオイルもまた、*n*-ドコサノールクリーム処方へ利用するのに好ましい。*n*-ドコサノールとともに、好ましいクリーム処方の液体層を形成する。ミネラルオイル

50

は局所用産物に安全に使用されている長い歴史をもち、例えば経皮的な水分喪失を防ぎ、局所用産物のテクスチャーを向上させる働きをすることにより、皮膚軟化剤として働くような作用をもってよい。

【0060】

ある薬理学的研究は、これらの研究で用いる細胞に対してより適合性があるが、効果的な局所治療に必要な濃度および安定性を欠くことがあるために、ある実施形態においては局所用の薬剤調製物として適さない、懸濁液を用いて実施された。

【0061】

ある実施形態の一般的に好ましいクリーム処方は、最終的なクリーム処方の全重量に基づいた重量に関して、n - ドコサノールは典型的には約5 ~ 約16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25重量%であり、さらに好ましくは約6、7、8、または9重量% ~ 約11、12、13、14、または15重量%であり、最も好ましくは、10.0%であり、ステアリン酸スクロースは、典型的には約0 ~ 約11、12、13、14、または15重量%であり、好ましくは約1、2、または3重量% ~ 約4、5、6、7、8、9、または10重量%であり、および/またはヤシ脂肪酸スクロースは、典型的には約0 ~ 約11、12、13、14、または15重量%であり、好ましくは約1、2、または3重量% ~ 約4、5、6、7、8、9、または10重量%であり、および/またはジステアリン酸スクロースは、典型的に約0 ~ 約11、12、13、14、または15重量%であり、好ましくは約1、2、または3重量% ~ 4、5、6、7、8、9、または10重量%である。少なくとも一つのスクロースエステルまたは同等の糖を基礎としたエステルが概して、全体の化合物の少なくとも約3%、好ましくは約4重量% ~ 約6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15重量%、最も好ましくは約5.0重量%を構成し、油、例えばミネラルオイルNFは典型的には、約3重量% ~ 約15重量%、好ましくは約4、5、6、または7重量% ~ 約9、10、11、または12重量%、最も好ましくは約8.0重量%である。グリコール、例えばプロピレングリコールUSP、または同等物は概して、約2重量% ~ 約8、9、または10重量%、好ましくは約3または4重量% ~ 約6または7重量%、最も好ましくは約5.0重量%であり、皮膚を軟化するグリコールエステル、例えばポリプロピレン - 15 - ステアリルエーテル、またはベンジルアルコールは典型的には、約0 ~ 約3.5、4、4.5、または5重量%、好ましくは約0.5、0.75、1、1.24、1.5、1.75、2、2.25、2.5、または2.6重量% ~ 約2.75、2.8、2.9、または3重量%、最も好ましくは約2.7重量%であり、水は概して、約40、41、42、43、または44重量% ~ 約70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、または80重量%、好ましくは約45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、または55重量% ~ 56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、または69重量%、最も好ましくは約69.3重量%である。この一般的な処方の範囲内で、安定であり、上記の、本明細書に記載されている明細および指標で説いたデータに基づいて示される治療効果をあらわすような特定の処方を多く調製してよい。したがって、有効な局所治療用化合物が、n - ドコサノールを単体で、または通常の間鎖(C - 20 ~ C 28)脂肪族アルコールとの混合物として必ず含む効果的な局所治療用組成物を調製しうる。

【0062】

本処方は、医薬の製造において、また、ヒトおよび動物患者の治療においても利用してよい。

実験

HSV誘導障害におけるn - ドコサノールクリームの効果を、実験動物モデルにおいて確認するため、およびその活性をZOVI RAXのものと比較するために、無毛モルモットに、 1×10^6 PFUのHSV - 1を接種し、ついで、n - ドコサノール含有または対照クリーム、またはZOVI RAX軟膏いずれかで処置した。n - ドコサノールクリームは、記述したように構築した。対照クリームは、ステアリン酸をn - ドコサノールと置換

10

20

30

40

50

したことを以外は、同様の様式で構築した。処置は、ウイルス接種2または48時間後のいずれかで開始した。部位を、指定した時間点で、膿のたまった水膨れとして定義される、小胞形成に関して評価した。

【0063】

図1は、処方Iと、処方IIの異なる3つの調製物、ならびにZOVRAXの比較活性を示している。n-ドコサノールクリームは処方Iおよび処方IIは両方とも、ZOVRAX軟膏よりもより大きな阻害力を示した。

【0064】

図2は、処方I、処方IAおよび処方IIの比較活性を示している。HSV-1誘導障害の優位な阻害が、3つのすべての処方に関して示された。

10

【0065】

図3は、処方III対処方Iの活性の比較を示しており、また、相対的界面活性剤濃度が、処方Iのものより改変されたこれらの処方の特定の改変を図示している。

【0066】

界面活性剤濃度の改変は、薬物活性の程度に、好ましい有害効果を有することが発見された。処方IIIは、HSV誘導障害に対して、強力な阻害力を有することが示された。

【0067】

再発型口または生殖器HSVまたはII感染のボランティア患者も急性ヘルペス発生の種々の段階で、局所n-ドコサノール含有クリームで処置した。処置を、前駆症状段階の間に開始する場合、n-ドコサノールクリームは、感染のさらなる進行を阻止しうる（すなわち、小胞形成を防止する）。処置を、小胞形成がすでに起こった後に開始する場合、n-ドコサノールクリームは、そのようなヘルペス障害の治癒（すなわち再上皮化の完了）のための時間を短縮しうる。

20

【0068】

処方内での10重量% n-ドコサノールの選択を、無毛モルモットでの用量応答試験にて調べた。無毛モルモットの背中部分に、すでに記述したように、HSV-2を摂取させた。この部位を、1、5、10および20重量% n-ドコサノール処方処置した。n-ドコサノールを含まない、賦形剤対照もまた本研究に含めた。図4で図示した結果は、ウイルス接種の72時間後、未処理部位が平均41小胞を提示したことを示している。20重量%および10重量% n-ドコサノール含有クリームは、それぞれ50%および60%まで、小胞数を阻害した。1重量%および5重量% n-ドコサノール含有クリームは、10重量%調製物よりも効果が小さかった。対照賦形剤は、適切な阻害効果を示さなかった。

30

【0069】

クリーム内でのn-ドコサノールの濃度が、n-ドコサノールクリームの物理的外見、安定性、および効果において役割を果たす可能性があることが観察された。5、10および20重量% n-ドコサノールを含むクリームの比較を実施した。一般的に、産物の粘土が、処方中のn-ドコサノールの濃度と直接関連して変化することが観察された（図4）。5重量%処方が、ローション様の形態で、もっとも低い粘度を持ち、相に分離する傾向にあった。20重量%処方方は、もっとも高い粘度を持ち、すり込むことが難しく、ヒト皮膚上に白色残余物を残す傾向にあった。クリームからのn-ドコサノールの完全な除去により、結果として、室温での一晩の保存の後、相分離を起こす水性ローション型処方となる。10重量%処方方は、物理的に安定であり、化粧学的にもっとも満足がいくもので、簡単にすり込み、ヒト皮膚上に残余物を残さない。結果により、活性成分としてのその機能に加えて、n-ドコサノールはまた、試験したクリーム内で、濃厚化剤およびエマルジョン安定剤としても機能することが明らかになった。無毛モルモットでのin vivo試験により、10重量%処方が、5重量%または20重量%処方よりもよい効果を有することが示された。10重量%処方がほとんどの適用で好ましいけれども、一方で、特定の実施形態において、10重量%より少ない、たとえば5重量%またはそれ以下のn-ドコサノールを含む処方が好ましい可能性があり、他の実施形態では、10重量%以上、たとえ

40

50

ば20重量%以上のn - ドコサノールを含む処方が好ましい可能性がある。

【0070】

ベンジルアルコールが、特定の環境下で、ある程度の抗ウイルス活性を有することが報告されてきたので (Farah, A. E. et al., 米国特許第4, 200, 655号)、前記処方内の抗ウイルス薬剤として、ベンジルアルコールが作用するかどうかを決定するために、好ましい実施形態の処方を試験した。ベンジルアルコールおよびn - ドコサノールを含むクリーム (10重量% n - ドコサノールクリーム)、およびベンジルアルコールのみを含むクリーム (プラセボ) を、無毛モルモットにおけるHSV - 2誘導皮膚障害において試験した。モルモットの背中部位にHSV - 2を植え付けた。この部位を、図5で示したように処置し、ウイルス接種48、56、72および78時間後に、賦形剤形成に関して評価した。48時間の時点で、未処理部位で、平均44小胞が存在し、接種後、72時間まで、比較的一定に保たれた。78時間の時点で、小胞の分解が明瞭になってきており、接種後96時間までに、小胞はもはや見られなくなった。n - ドコサノールクリームでの処置により、48 ~ 56時間の時点で、50 ~ 60%まで、小胞数が阻害され、解析の72 ~ 78時間の時点で、優位により大きな割合まで阻害された。対照賦形剤での処置は、どの時点でも小胞数に好ましい効果はなかった。未処理および処理部位を、切断し、ウイルス培養に進めた。小胞の存在は、処置またはアッセイの時間にかかわらず、感染ウイルスの存在と直接関連した (図示せず)。したがって、小胞数は、本明細書で記述した試験において、疾患状態の適切な指示物である。さらに、クリームおよびプラセボを、口唇ヘルペスの患者、68人を含む、パイロット第II相試験で試験した。二重盲検試験の結果は、n - ドコサノールクリームの早期での適用が、半分近くまで、事象の期間を減少させた。処理群の平均出現期間は、3.4日であり、一方で、プラセボ群は、平均6.6日の出現であった。

【0071】

上記の結果により、処方内でのn - ドコサノールの存在は、有意な抗ウイルス活性をもたらすことが示されている。

【0072】

n - ドコサノールの抗ウイルス活性がまた、ベンジルアルコールを含む10重量% n - ドコサノールクリーム処方の任意の賦形剤を含まない、非イオン性界面活性剤Pluronic F - 68中のn - ドコサノールの懸濁処方においても示されてきた。図6にて要約した結果は、2つの重要な点を示している。第1に、パネルAで示したように、Pluronic F - 68中のn - ドコサノールの懸濁処方はまた、クリーム処方で観察されたように、ウイルス感染の2時間後に適用した場合に、HSV - 1感染小胞を阻害した。したがって、未処理部位は、ウイルス感染48時間後に、平均74の小胞を示したが、n - ドコサノール/Pluronic F - 68で処理した部位ではたった28小胞しか観察されなかった (63%阻害)。ヒトにおける特定のHSVに対するFDA - 許可処置である、ZOVIRAXでの処置もまた、小胞数の減少に関連したが、しかし、n - ドコサノールのものより小さかった。

【0073】

n - ドコサノールでの連続処置の結果、72時間の時間点で、より少ない小胞となった。n - ドコサノール調製物に対する賦形剤対照は、いずれの時間点でも効果を持たなかった。

【0074】

図6から得られる第2の主要な点は、n - ドコサノールが、小胞が発現した後に投与しても、HSV - 1誘導疾患の分解を促進することである (パネルB)。種々の部位が、48時間点にて、おおよそ等しい数の小胞を示したが、その時間まで、処理していなかったため、予想されたものである。48時間の時点で平均73小胞から、72時間の時点で43処方まで、未処理部位で小胞数が減少した。ZOVIRAXでの処置は、72時間の時点での適度の促進された小胞分解と関連し (27小胞、未処理部位に対して37%減少)、これは、同様の設定の他の実験と一致する。重要なことに、n - ドコサノール/F - 6

8 の適用は、未処理群と比較したときに、77%の小胞数の減少によって示されたように、小胞分解を有意に促進した。同様の結論が、同様のデザインの試験におけるクリーム処方を用いて得られた。このことは、n - ドコサノールが、HSV 誘導疾患の過程の後に、予防的に投与する必要がないことを示している。

【0075】

3つの安全性および耐性試験を、健康な白人男性および女性ボランティアで実施した。合計78人の健康なボランティアに薬剤を投与した。安全性試験により、n - ドコサノール10重量%クリームの処方は、光毒性を引き起こさないが、若干の初期刺激があり、また、低頻度ではあっても、アレルギー感受性を引き起こす可能性があることが示された(78人の接触皮膚炎経験者への暴露により1対象)。

10

【0076】

2つの臨床効果研究および試験を完了した。試験Aは、再発型口唇ヘルペスの63人の患者(男性および女性)での、無作為、二重盲検、プラセボコントロール試験であった。口唇ヘルペス試験、試験Aにおける、31人のn - ドコサノール10重量%クリーム処置患者のすべてがその処置を完了し、31人の患者の内2人が、クリーム適用後に、激しいまたは刺激感受性を報告した。

【0077】

臨床検査値(血液化学、血液学、尿解析)における臨床的に有意な変化は、いずれの試験でも現れなかった。試験Bは、再発型生殖器ヘルペスの、45人の女性患者での、無作為、二重盲検、プラセボコントロール試験であった。生殖器研究、研究Bでの、22人のn - ドコサノール10重量%クリーム処置患者のすべてが、薬物に関連する副作用を報告すること無しに、その処置を完了した。

20

【0078】

研究A

65人の患者(年齢18~60歳)が、研究Aに参加し、32人の患者をまず、10重量% n - ドコサノールクリームを与えるようにまず無作為化し、33人をまず、プラセボクリームを与えるように無作為化した。処置を患者で開始し、処置を、前駆症状または紅斑段階で開始した場合に「早期」、丘疹段階またはそれより後期の場合に、「後期」と定義した。2人の患者を解析より除外した。63人の評価可能な患者のうち、22人を、試験のクロスオーバー期にエントリーした。さらに、13人の患者を、同一の研究医薬品で、1つ以上の事象を処置した。したがって、48人を、10重量% n - ドコサノールクリームで処置し、15人を、プラセボクリームで処置した、98人のヘルペス事象を解析した。

30

【0079】

研究Aの結果を、表5において、第1処置事象、クロスオーバー処置およびすべての処置事象の合計にしたがって要約した。

【0080】

【表 5】

表 5

研究 A：口唇再発ヘルペス事象の時間対治癒（日）

パート A：第一事象の解析

	n - ドコサノール 10 重量%			プラセボ		
	平均	SD	(n)	平均	SD	(n)
早期処置	2. 5	2. 4	(10)	6. 8	4. 2	(4)
後期処置	6. 8	3. 2	(21)	7. 3	2. 7	(29)
全処置	5. 4	3. 6	(31)	7. 3	2. 8	(32)

10

パート B：クロスオーバー研究の解析

	n - ドコサノール 10 重量%			プラセボ		
	平均	SD	(n)	平均	SD	(n)
早期処置	2. 7	2. 2	(7)	7. 0	(1)	
後期処置	5. 6	2. 1	(15)	8. 0	2. 6	(21)
全処置	4. 7	2. 5	(22)	8. 0	2. 5	(22)

20

パート C：本研究における全ての処置事象の解析

	n - ドコサノール 10 重量%			プラセボ		
	平均	SD	(n)	平均	SD	(n)
早期処置	3. 4	3. 0	(13)	6. 7	3. 9	(7)
後期処置	6. 5	2. 7	(35)	7. 4	2. 7	(43)
全処置	5. 7	3. 1	(48)	7. 3	2. 9	(50)

【0081】

30

31 人の患者を、10 重量% n - ドコサノールで口唇ヘルペスの第 1 事象を処置し、32 人をプラセボで処置した（パート A）。n - ドコサノール群中 10 人の患者およびプラセボ群中 4 人の患者を、早期処置として分類した。早期処置 n - ドコサノール群での平均治癒時間は、他の処置様式と比較して、4. 3 ~ 4. 8 日減少した。この差は、n - ドコサノールに対して統計学的に有意であった（ $P = 0.0001$ ）。後期治療群においては、n - ドコサノールは、第 1 事象における平均治癒時間を 0. 5 日減少させたが、これは統計学的に有意でなかった。

【0082】

クロスオーバー試験を行った 22 人の患者のうち、研究の両方のパートにて、早期にその障害を処置した数（クロスオーバー期にて、7 人が n - ドコサノールを使用し、1 人がプラセボを使用した）は、意味のある統計学的解析には少なすぎた（パート B）。しかしながら、実質的な数（クロスオーバー期にて、10 人が n - ドコサノールを使用し、21 人がプラセボを使用した）を後期、その障害に関して処置し、したがって、この観点から、患者内比較が可能である。後期処置の結果の変数の解析により、n - ドコサノールに対して、有意な差が明らかになった（ $P = 0.03$ ）。

40

【0083】

研究 A の 98 の処置事象すべてからのデータを一緒に評価する（単一事象、クロスオーバー事象および同一の薬剤によるさらなる事象）ことにより、n - ドコサノール処置患者（5. 7 日）対プラセボ処置患者（7. 3 日）において、1. 6 日の平均総治癒の統計学的に有意な（ $P = 0.02$ ）減少が明らかである（パート C）。合計で、20 の事象を、

50

早期処置として分離し、局所 n - ドコサノールは、3 . 3 日まで、平均治癒時間を減少させた ($P = 0 . 05$)。最終的に、n - ドコサノールでの早期処置の効果を、他のすべての処置法と比較し、早期処置 n - ドコサノール群での平均治癒時間 (3 . 4 日) が、他の群での 6 . 5 ~ 7 . 4 日の範囲から、非常に有意に異なっており、この差は、n - ドコサノールに関して非常に有意である ($P = 0 . 0002$)。n - ドコサノール 10 重量 % の後期処置と、早期および後期プラセボ処置の間の差は有意ではなかった。

【 0 0 8 4 】

表 5 で要約したデータによって表されるように、(前駆症状または紅斑段階での) 10 重量 % n - ドコサノールクリームによる早期処置によって、他の処置で得られたものと比較して、非常に有意な治癒時間の短縮が得られた。さらに、障害が現れてから開始した、後期処置は結果として、他の解析を介してではなく、本研究のクロスオーバー部分で、n - ドコサノール処置群における治癒時間の、統計学的に有意な減少となった。

10

【 0 0 8 5 】

研究 B

再発型生殖器ヘルペスの 60 人の女性患者を、症状のない、そして前駆段階ではない間に、研究にエントリーした。13 人の対象を、早期段階生殖器ヘルペス再発の処置のために、患者開始試験において、まず、10 重量 % n - ドコサノールクリームを与えるように無作為化し、13 人には、プラセボクリームを与えた。44 人の患者に処置を開始し、ヘルペス事象が出たならば、病院に戻ってきてもらい、これらの患者のうち 22 人に、n - ドコサノールを与え、22 人にプラセボを与えた。

20

【 0 0 8 6 】

16 人の評価可能な n - ドコサノール患者における治癒までの平均時間は、1 . 8 ~ 8 . 6 日の範囲の、4 . 7 日 \pm 1 . 9 であり、18 人の評価可能なプラセボ患者では、1 . 7 ~ 10 . 4 日の範囲の、5 . 1 日 \pm 2 . 3 であった。この差は統計学的には有意ではない ($P = 0 . 5827$ 、t - 検定)。不従順であったか、または投与中断した、また観察可能な事象のない、前駆症状の状態の、または同時に酵母感染のあった、非生殖器障害の患者は評価可能ではないと考えた。すべての患者を含めた場合、n - ドコサノールの治癒までの平均時間は、1 . 8 ~ 9 . 8 日の範囲の、5 . 5 日 \pm 2 . 5 であった。プラセボ群に関しては、治癒は、平均 4 . 7 日 \pm 2 . 3 で達成された。この群の治癒時間は、1 . 7 ~ 10 . 4 日の範囲であった。2 つの処置群の間で、治癒までの平均時間に統計学的に有意な差はなかった ($p = 0 . 2703$ 、t - 検定)。

30

【 0 0 8 7 】

患者を、処置を開始した時の障害の段階 (前駆症状、紅斑または丘疹) にしたがって、層別した場合にも、統計学的に有意な差はなかった。患者レーティングに基づいた平均治癒時間は、臨床医のものと同一であった (全 n - ドコサノール患者 5 . 6 日対全プラセボ患者 4 . 5 日)。

【 0 0 8 8 】

3 つの痛み解析を、痛みの患者の自己査定に基づいて実施し、「痛み無し」を維持する時間、最初の「痛み無し」の時間、および痛みの最初の減少の時間を実施した。

【 0 0 8 9 】

「痛み無し」を維持する時間は、適用した時の最初の痛みから、1) 痛みが、2 回連続する記録の時間に、「痛み無し」とスコア化された場合、および 2) 事象の残りの間、さらなる痛みの記録が、「中程度」痛みの 2 つの連続する記録の 2 つの分離した事象よりも頻度も重傷度も大きくない場合の時間、までを測定した。最初の「痛み無し」までの時間は、適用時の最初の痛みから、「痛み無し」の最初の記録までの間隔として定義した。痛みの最初の減少までの時間は、適用時の最初の痛みの時間から、痛みのレベルの減少が記録された時間までで測定し、先の査定に関連する。最初の 24 時間内に痛みが消えたか、痛みの報告を行わなかったため、何人かの患者をこれらの解析から除外した。

40

【 0 0 9 0 】

n - ドコサノールで処置した、15 人の評価可能な患者は、14 人の評価可能なプラセ

50

が患者よりも、より早く「痛み無し」の維持応答を達成し、*n*-ドコサノール患者に関しては、平均 3.2 ± 1.9 であり、対して、プラセボ患者に関しては、 4.1 ± 2.5 であった。*n*-ドコサノール患者はまた、プラセボ患者よりもはやく、「痛み無し」を達成した。*n*-ドコサノール患者は、痛みが開始したのち、平均 2.6 ± 2.1 で「痛み無し」を最初に記録し、一方プラセボ患者は、痛みが開始した後、平均 3.4 ± 2.1 で、「痛みなし」を最初に記録した。評価可能な *n*-ドコサノール患者のうち、先行適用における痛みと関連して、痛みの最初の減少が、痛みが開始した後、平均 1.2 ± 1.0 で起きた。プラセボ患者では、平均 1.8 ± 1.4 にて、痛みの最初の減少が起こった。これらの違いは、統計学的には有意ではなかった（それぞれ $p = 0.2775$ 、 0.325 および 0.1757 、*t*-検定）。従わなかったか、投与中断した、または観察可能な事象を伴う前駆症状を持たない、または同時の酵母感染を有する、非生殖器障害の患者は、評価可能ではないと考えた。

10

【0091】

好ましい実施形態において、皮膚または膜の表面炎症の痛みを減少させる方法は、生理学的に適合可能な担体中で、任意に、*n*-エイコサノール、*n*-ヘネイコサノール、*n*-トリコサノール、*n*-テトラコサノール、*n*-ペンタコサノール、*n*-ヘキサコサノール、*n*-ヘプタコサノール、および *n*-オクタコサノール、またはその混合物を含む、 $20 \sim 28$ 炭素原子を有する、少なくとも1つの長鎖脂肪族アルコールとの組み合わせで、*n*-ドコサノールの組成物を、炎症表面に適用することを含み、前記アルコールは、前記組成物の約5～約25重量%含まれる。好ましくは、生理学的担体は、ヤシ脂肪酸スクロース、ステアリン酸スクロースおよびジステアリン酸スクロースからなる群より選択される1つ以上の化合物、およびポリオキシプロピレンステアリルエーテルエチルヘキサンジオールおよびベンジルアルコールからなる群より選択される1つ以上の化合物を含む、クリーム基体である。

20

【0092】

10重量% *n*-ドコサノールクリームで処理した患者およびプラセボクリームを与えた患者間で、時間対治癒において、研究Bにて、統計学的に有意な差が見られなかったものの、*n*-ドコサノールで処置した評価可能な患者の間で、時間対治癒が減少する傾向が観察された。これらの異なる痛み解析のすべては、その差が統計学的に有意ではないけれども、*n*-ドコサノール 10重量%クリームを与えた患者において、痛みのより迅速な分解を示した。この研究で、統計学的な優位性を検出できなかったのは、部分的に、(1) 研究集団が小さかった、(2) 生殖器ヘルペス障害の自然歴に関連して、2つの研究群の間で、研究エントリーが異なること、および(3) 事象における2つの群の障害段階および処置開始の間に、同等ではない分散があることが反映されうる。

30

【0093】

臨床試験に加えて、いくつかの研究を、*n*-ドコサノールの薬理学評価を説明するために実施した。これらの研究は、結果として、図7～13にて記述し、以下で議論する。

【0094】

n-ドコサノールの、生物学的システムへ許容可能な伝達を可能にする、適切な処方が開発された。最初に、不活性および非毒性界面活性剤、Pluronic F-68中の、*n*-ドコサノール分子の懸濁液を処方することによって達成された。そのような懸濁液は均質であり、直径平均 0.10 ミクロンの粒子を含む *n*-ドコサノールからなる。この方法で懸濁させると、*n*-ドコサノールは、類人猿およびヒト細胞株の、1型および2型単純ヘルペスウイルス(HSV)感染性に対して、*in vitro*での阻害活性を示す。*n*-ドコサノール/Pluronic懸濁液は、HSVの野生型およびアシクロビル抵抗性変異体に対して、等しく効果的である。

40

【0095】

したがって、図7、パネルAに示したように、アシクロビルおよび *n*-ドコサノールは、野生型HSV-2による、プラーク形成を等しく阻害する。図7、パネルBは、アシクロビル-抵抗性HSV-2変異体が、アシクロビルによって阻害されないけれども、*n*-

50

ドコサノールによって阻害されることを図示している。Pluronic界面活性剤のみでは、任意の抗ウイルス活性を欠く。宿主細胞毒性は、3 mMの濃度では、n - ドコサノールで観察されなかった。

【0096】

n - ドコサノールがその抗ウイルス活性を示す機構を描写するために設計した、大規模な研究を実施した。本研究の結果の全体的な意味は、化合物が、細胞内へのウイルス侵入および感染した標的細胞の核への遊走の共通の経路の1つ以上を干渉することが明らかになったことである。この概念を支持している証拠の鍵となる点は、以下のように要約可能である。(a) ウイルスを、n - ドコサノールと混合し、ついで懸濁液より回収し、通常の感染性を保持していることを示すことが可能であるので、化合物は直接の殺ウイルス活
10
性を持たない。(b) 化合物は、標的細胞上のHSV - 特異的レセプターに対するヘルペスウイルスの結合を阻害しないけれども、n - ドコサノールの存在下で、標的細胞レセプターに結合したHSVウイルス粒子が、長時間、細胞表面に残る。および(c) 吸収された、ウイルスの細胞核への続く誘導が、検出可能HSVコアおよびエンベロップタンパク質、前早期タンパク質ICP - 4を発現している細胞の数、および第2ブランクアッセイによって測定されたように、阻害される。

【0097】

上記のウイルス吸収での遅延が、図9で要約した実験で図示されている。この実験で、HSV - 2を、n - ドコサノールの存在する場合およびしない場合で、Vero細胞とともに4 にてインキュベートして、ウイルスのレセプター結合を可能にさせた。3時間後
20
の時点で、すべての培養物を洗浄し、ついで、ウイルス侵入工程を開始させるために、37 にて再プレート化した。その後20分の間隔にて、種々の培養物を、表面結合物を除去し、不活性化するが、しかしHSVウイルス粒子を吸収しない条件である、pH 3.0 クエン酸緩衝液に暴露し、最適なHSVブランクを発達させるために必要な、完全に44時間の期間、再培養した。0時間にてクエン酸緩衝液に暴露したすべての培養物は、予想されたように、ブランクの発達がなかった。

【0098】

グラフ上の一番上の線で示したように、HSV - 2の内在化が、未処理およびPluronic対照試験培養中で、37 に移動した後、20分以内に実質的に完了する。一方、n - ドコサノール試験培養中のHSVの内在化は、20分まで、40%完了未満であり
30
、各完了まで1時間以上を必要とした。これらの結果は、ウイルス感染および/または経膜誘導の速度が、n - ドコサノールによって、いくつかの方法で遅延することを、はっきりと示唆している。

【0099】

内在化の後でも、n - ドコサノール処置細胞にて、完了し、細胞核への続くウイルス遊走が有意に阻害される。したがって、ELISAによって検出可能なHSVコアおよびエンベロップタンパク質抗原両方の量、ならびに免疫蛍光による、核内HSV - 特異的前 - 早期タンパク質ICP - 4を発現している感染細胞の数が、80%以上まで減少する。最終的に、第2ブランクアッセイ培養にて測定されるように、感染ウイルスの複製が、n -
40
ドコサノール処置した細胞中で、99%以上まで、明らかに減少する。

【0100】

要約すると、n - ドコサノールの存在は、ウイルス結合の開始段階には影響を与えないけれども、いくつかの、まだ決定はされていない機構を介して、標的細胞質内へのウイルスの侵入を有意に遅らせる。さらに、核への遊走および局在化の工程が続いて阻害され、生産性ウイルス複製における有意な減少という最終的な効果となる。

【0101】

n - ドコサノールが、その抗ウイルス活性を発揮する重要な機構をよりよく定義するために、n - ドコサノールの、界面活性剤安定化懸濁液からの、細胞取り込み、分布および代謝が研究されてきた。そのような研究の結果により、この化合物の抗ウイルス活性の代謝塩基に対する興味深い真相が見えてきた。放射標識n - ドコサノールが、培養Vero
50

細胞内に次第に取り込まれ、暴露の6～12時間に、細胞あたりのピーク取り込みに達したことが示された。いったん化合物が細胞に結合したならば、非特異的に関連した、細胞結合粒子を効果的に除去する、臭化セシウムによる大規模な洗浄によってでさえ、除去ができないので、この工程は、不可逆的である。

【0102】

第2に、開始濃度にて、培養液に加えた1%より少ない総n-ドコサノールが、24時間以内に細胞に結合するようになる。それにもかかわらず、これは、原形質膜にて典型的に見られる脂質分子の数を近似する数量である、細胞あたりおよそ 8×10^9 分子に相关する。

【0103】

培養液に加えた懸濁液中の、n-ドコサノールのそのような小さな画分が、細胞結合するという事実は、実際の生物活性用量が、培養液に加えた薬物量よりも少ないオーダーの規模であることを示唆している。

【0104】

超音波分散細胞の分画遠心法によって回収した細胞内小画分を試験する細胞分布研究によって、放射活性化合物の75%暴露の12時間後に、細胞膜が含まれ、1%未満ものが、核画分に結合し、放射活性のバランスは、可溶性細胞質画分と関連することが示された。

【0105】

n-ドコサノールの代謝変換の解析により、化合物が、極性化合物に次第に代謝され、これが、薄層クロマトグラフィーによって、同化(エーテル結合)または異化(酸化)反応のいずれかを介して産出される、ホスファチドであると明らかにされた。図10は、n-ドコサノール処理Verob細胞の抽出物の、シリカゲルカラムからのメタノール抽出(ホスファチド含有)画分の、薄層クロマトグラフィー解析を示している。代謝されないn-ドコサノールを、クロロホルムにて、シリカより先に溶出された。示したように、およそ62%のカウントが、ホスファチジルコリンの領域に移動し、38%が、ホスファチジルエタノールアミンの領域に移動した。

【0106】

本発明者らの研究によりまた、そのような代謝変換が、適切な代謝阻害剤によって阻害されることが示された。したがって、効果的なエネルギー位置のアジ化ナトリウムおよび2-デオキシグルコースが、90%まで、Verobによるn-ドコサノールの取り込み、および80%まで、極性代謝物への代謝変換両方を減少させる。アジ化ナトリウムおよび2-デオキシグルコースの組み合わせは、主に、エンドサイトーシスを阻害することによる、n-ドコサノールの細胞取り込みを阻害し、しかしながら、エネルギーに依存する様式の機構、またはn-ドコサノールの続くエネルギー依存代謝によって促進される受動的拡散機構を含む、他の取り込みの機構もまた、これらのエネルギー位置によって阻害されうる。

【0107】

このような研究の興味深い態様は、組成物の抗ウイルス活性におけるn-ドコサノールの極性代謝物としての可能性の指摘である。マウスの線維芽細胞の、上述のようなn-ドコサノールの代謝変換を通して得られた生成物と類似するエーテル結合化合物を含む、遊離脂肪族アルコール類の増加およびグリセリド類の上昇の双方に関連のあるポリエチレングリコール誘導融合への抵抗が最近立証された。

【0108】

n-ドコサノールの酵素的変換が、その抗ウイルス活性に対して、必要条件である可能性を調査するために、実験を実施した。そのような研究の結果により、まず、細胞取り込みの速度および程度ではなく、n-ドコサノールのその極性代謝物への代謝変換の速度および程度を、化合物を懸濁させるために使用した、界面活性剤の性質によって決定し、実際に、代謝変換の効率が、n-ドコサノールの抗ウイルス活性の程度と、直接相關することが示された。

10

20

30

40

50

【0109】

そのような研究を実施する初期段階には、n - ドコサノールを懸濁させるため、異なる界面活性剤への変更が含まれる。Tetronic 908は、Pluronic F68に非常に関連し、両方ともエチレンオキシドとプロピレンオキシドとのブロックコポリマーである。しかし、Pluronicは、分子量8,400の二官能性ポリマーであり、Tetronic 908は、プロピレンオキシドとエチレンオキシドをエチレンジアミンに加え、結果として、25,000の平均分子量の分子となる、四官能性コポリマーである。特に、Vero細胞を、等しい用量の、Tetronic対Pluronic中に懸濁させたn - ドコサノールに暴露する場合に、化合物の、極性代謝物への代謝の速度および程度は、Pluronic懸濁液よりも、Tetronicにて、有意に高い。放射10
活性n - ドコサノールの総取り込みは、2つの異なる懸濁液処方からで等しく、代謝変換のみが有意に異なった。Pluronic懸濁液よりもTetronicからのこの高い代謝変換との相関が、n - ドコサノールによるHSV複製の阻害に関するED₅₀が、Tetronic中で5 ~ 10 mMであり、Pluronic中より、およそ3倍高いことの発見である。これは、Tetronic中のn - ドコサノールで処置した細胞における代謝変換の3倍高いレベルに関連することが明らかである。

【0110】

これらの発見が、とりわけ、Vero細胞培養系に特異的なものである可能性を排除するために、Vero細胞に関連する、上皮様ウシ腎臓細胞MDBKが、n - ドコサノールの抗HSV活性に対する、興味深い明らかな抵抗性を示すという事実の利点を用いて、相反解析を実施した。この差は、n - ドコサノールが、HSV誘導プラークを阻害することにおいて、Vero細胞にて、MDBK細胞においてよりも、3 ~ 4倍効果的であるほど、有意である。総細胞取り込みおよび相対代謝の比較により、n - ドコサノール取り込みの総量および代謝変換の相対量は、MDBK細胞において、Vero細胞にて3 ~ 4倍高かった。MDBK細胞対Vero細胞での、取り込みの減少および代謝の減少の効果をあわせて、図11にて図的に描写しており、これは、72時間後に、Vero細胞は、およそ4倍多い量のホスファチド代謝物を含み、この溶媒系にて、最初から維持されたことを示している。2つの細胞株にて代謝される数のうち、形成される主要な種類のホスファチド、ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンの相対量は、2つの細胞で異ならなかった。さらに、パルス相実験により、両方の株が、組み込まれた数のすべ20
てを、より極性の形態に最終的に変換することが示された。30

【0111】

このような結果は、MDBK細胞が、Vero細胞内では、効果が小さいか、または効果がないかいずれかである、フィードバック型の機構を介して、n - ドコサノールの取り込みおよび/または代謝を効果的に制御しうることを示唆している。

【0112】

以上で要約した機構的な観察と一致して、n - ドコサノールが、多数の異なるウイルス、とりわけ、その外部エンベロープ内に脂質を含み、感染標的細胞へ侵入するために、融合機構を使用するものを、干渉する可能性があることが予想された。表6は、n - ドコサノールの抗ウイルス活性に感受性であることが示された、ヒトおよび齧歯類脂質エンベロープウイルスを要約している。40

【0113】

【表 6】

表 6

脂質エンベロープウイルスに対する n - ドコサノールの抗ウイルス活性の
スペクトル

ヒトウイルス	齧歯類ウイルス
単純ヘルペス (Herpes Simplex) - 1 および 2	サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus)
水痘・帯状ヘルペス ウイルス (Varicella Zoster Virus)	フレンド白血病ウイルス (Friend Leukemia Virus)
ヒトヘルペスウイルス-6 (Human Herpes Virus-6)	LP-BM5 ウイルス
呼吸器合胞体ウイルス (Respiratory Syncytial Virus)	
サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus)	
A 型インフルエンザ (Influenza A)	
HIV-1	

10

20

【0114】

試験したすべての脂質エンベロープウイルスが、本薬剤によって効果的に阻害されうる。n - ドコサノールは、in vitro および in vivo 両方で、抗ウイルス活性を有する。抗レトロウイルス活性を持ち、毒性のない処方、ヒトおよび家畜動物における種々のレトロウイルス疾患を処置するのに、非常に有用である。それにもかかわらず、AIDS の処置に対する関わり合い、ネコ白血病ウイルス、ウシ白血病ウイルス、ならびに HTLV - 1 および - 2 のような、レトロウイルスによって引き起こされる疾患に対する、処置計画の有用性は、人道主義的な意味において、非常に有益である。研究により、n - ドコサノールが、in vitro および in vivo で、齧歯類レトロウイルスの複製を阻害することが確立された。

30

【0115】

初期の研究は、齧歯類 Friend 白血病ウイルス (FV ; 8) に焦点が当てられた。成体マウスへの FV の接種により、白血球創始物、とりわけ好塩基球赤芽細胞の白血病が誘導される。この赤白血病は、ウイルス感染赤血球細胞の急速な増殖、ウイルス血症、免疫抑制、および最終的な動物の死によって特徴づけられる。FV の静脈内注射によって、脾臓のような造血器官、および感染赤血球を介して循環される。そのような感染脾臓を、ウイルス感染の 10 日後に固定した場合、分散した顕微鏡的なモジュールを器官の表面上に見ることができ、これらは、白血病細胞のクローンを表し、脾臓病巣アッセイの基礎を形成する。

40

【0116】

図 12 にて要約した実験は、n - ドコサノールが、75 フォーカス形成ユニットの Friend ウイルスを静脈内注射した、大人マウスにおける Friend ウイルス誘導白血病およびウイルス血症を阻害することを示している。処置群には、ウイルス接種と同日、および続く 3 日間毎日 1 回、静脈内で、種々の用量の n - ドコサノールまたは Pluronic F - 68 賦形剤のみを注射した。10 日後、各群の半分の動物を犠牲死させ、そ

50

の脾臓内での白血病巣の存在に関して試験し、一方で、残りの動物は、さらに10日間飼育し、ウイルス血症をモニタした。n - ドコサノールでの処置は、パネルAで示しているように、白血病巣の発達、そしてパネルBで示しているように、ウイルス血症両方に、非常に明確な用量依存阻害効果を持った。一方で、対照としての同量のPluronic F - 68賦形剤での処置では、識別できる効果は見られなかった。推論*in vitro*研究により、初代胎児繊維芽細胞培養における、Friendウイルスの複製に対する、本薬剤の非常に強い活性が示唆されたので、これらの結果は、ウイルス複製におけるn - ドコサノールの阻害活性を反映していると考えられる。n - ドコサノールは、HIV - 1およびヒトヘルペスウイルス6の*in vitro*複製を阻害する。

【0117】

HIVにおける初期研究は、米国健康保険局との共同研究により実施され、これらの型のいくつかの実験のうちの1つを、図13にて要約している。正常のヒト末梢血単核細胞を、培地のみ、またはn - ドコサノール、Pluronic F - 68対照賦形剤、またはホスホノギ酸(PFA)の存在下で、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA + 5ユニット/ ml のIL - 2で活性化した。翌日、培養液に、HIV - 1ウイルスを接種し、p24ウイルス抗体の検出によって、ウイルス複製の証拠に関して、4日後に試験した。かなりのレベルのHIV - 1複製が、対照処置培養液中で起こり、未処理群で観察されたものと匹敵した。示したように、n - ドコサノールは、PHA/IL - 2刺激ヒト末梢血単核細胞の培養液中で、HIV - 1に対する、用量依存阻害効果を示した。もっとも高い用量での活性は、非常に強力な抗ウイルス化合物である、ホスホノギ酸(PFA)で観察されたものと匹敵した。

【0118】

n - ドコサノール 10重量%クリーム(ドコサノール)が、急性HSLの事象の局所処置に対して、プラセボと比較して効果的であるかどうかを決定するために、2つの独立した、臨床開始、二重盲検、プラセボコントロール試験を、計21の施設で実施した。文書化されたHSLの経歴を持つ、すでに健康な大人を、n - ドコサノールまたはポリエチレングリコールプラセボに無作為化し、事象の、前駆症状または紅斑段階で処置を開始した。処置は、一日2回の訪問で、治癒が起こる(外皮が突然落ちるか、または活性障害の証拠がもはやなくなる)まで、一日5回行った。

【0119】

n - ドコサノール 10重量%クリーム各グラムは、皮膚および粘膜へ、簡単に適用でき、迅速に消える、白色、非脂肪性、湿潤クリームに処方された、100mgのn - ドコサノールを含んでいる。比較には、n - ドコサノール10.0重量%、ステアリン酸スクロースおよびジステアリン酸スクロース5重量%、軽ミネラルオイルNF8.0重量%、プロピレングリコールUSP5.0重量%、ベンジルアルコールNF2.7重量%および精製水USP69.3重量%が含まれた。混合物は、グラクソスミスクライン(GlaxoSmithKline of Research Triangle Park, NC)によって、商標ABREVA(商標)にて、アバニル ファーマシューティカルズ(Avanir Pharmaceuticals)からのライセンスとして市販されている。n - ドコサノールを欠くが、PEGを含むプラセボ処方を、n - ドコサノール10重量%の存在下と同一の薬剤として使用した。PEG処方、局所アシクロビルに対する賦形剤および局所HSL試験に対するプラセボとしてすでに使用されたものと同一であり、FDAとの相談により選択された(Spruance SL、Wenersstrom G. Oral Surg. 58:667 - 71, 1984; Spruance SL, Schipper LE, Overall JC, et al. J. Infect. Dis. 146:85 - 90, 1982、およびFiddian AP、Ivanyi L. B. Brit. J. Dermatol. 109:321 - 6, 1983を参照のこと)。この例の場合、10重量%濃度での活性薬剤基質、n - ドコサノールが、クリームの濃度の主要な一因となるものであるので、クリームの賦形剤をプラセボとして使用することは不可能である。これを除去することによって、盲検のための対照として明らかに好適ではない、

10

20

30

40

50

水性賦形剤が産出される。

【0120】

患者を、米国中にて、大学病院、開業病院および公的医療機関を含む21の病院で採用した。8つの施設を、試験#06に割り当て、13の施設を、試験#07に割り当てた。すべての施設を、組み合わせ研究に含め、#06/07とした。組み合わせ研究において、12パーセント以上の総研究集団、または個々の研究において24パーセント以上を単一の施設で行うことがないようにした。これらの施設において、前駆症状または紅斑の開始に気づいた12時間以内に、臨床評価のために参加した、18歳以上の、男性および女性免疫適格患者を採用した。患者の病歴により、兆候および症状は、12時間以上存在してはならず、臨床試験において、事象が、紅斑段階下で進展してはならない。それ以外は健康であると決定された患者は、過去12ヶ月の間に、少なくとも2回の再発で、HSLの臨床歴を持っていなければならない。もっとも最近の前事象は、スクリーニングの少なくとも14日前に治癒していなければならない。すべての施設に関して、施設査察会議(Institutional Review Board)許可を、プロトコルおよびインフォームド Consent 文書に対して得た。すべての患者に、まず、試験の目的とリスクを説明し、登録の前に、サインされた Consent 文書を得た。

10

【0121】

対象者は、処置期間の間、口または口の周辺に化粧品を使用しないことに同意した。子供のいる女性は、確立された出産制御の方法を実践していることであり、参加に際し、陰性尿試験によって決定されたように、妊娠はしていなかった。局所化粧品に対して公知のアレルギーの対象者は、鼻孔上、あごのした、または口の中の障害を有するので、除外した。試験の30分前の間、または以内での、調査薬剤の使用および、試験の前、7日間、またはそれ以内での、承認された抗ウイルス剤、局所コルチコステロイド、またはHSLに対する他の任意の非特異的治療の使用は禁止された。免疫刺激または免疫抑制を誘導することが知られている全身コルチコステロイド類または他の薬剤の同時の使用もまた禁止された。

20

【0122】

試験は、HSLの急性再発の患者集団における、プラセボとの、局所n-ドコサノールの、安全性、効果、および耐性の比較および評価のために、多施設、無作為化、二重盲検、プラセボコントロール、並行群、臨床開始、早期処置試験であった。処置を、前駆症状または紅斑段階における症状の事象開始、または丘疹段階の前、12時間以内に開始した。対照を、n-ドコサノールまたはプラセボ処置いずれかで、4つのブロックでの施設にて、二重盲検様式で、無作為化した。研究開始の時点で、研究薬剤の第1適用は、病院にて、対照によって実施された。続く適用は、対照によって、通常の労働時間に実施された。研究薬剤は、最大10日間、治癒するまで、1日あたり5回、障害部位に適用した。対照に、激しい運動、シャワーまたは入浴の後に、試験薬剤を再適用するように指示した。これらの追加の適用は、スケジュールとして計数しなかった。対照に、研究薬物適用時間の日記をつけさせた。

30

【0123】

対象者には、最初に七日間の、調査員または他の教育された臨床医による1日2回の査定に対して報告するよう求めた。病院訪問は、6時間より短くなく、16時間より長くなくべきである。最初の処置領域を、基準臨床査定として、症例報告書(CRF)内でのダイアグラム上で記録した。処置領域における局在サインおよび症状を、各訪問時に記録し、これには、前駆症状/紅斑、丘疹、小胞、潰瘍、かさぶたまたは治癒皮膚(残余紅斑ありまたはなし)、および痛み、熱、かゆみまたはひりひり感の対照報告がふくまれた。7日以内に停止または治癒しなかったHSL事象の患者はまた、8~10日間、1日1回実施した。10日間以内に、停止または治癒しなかったHSL事象は処置を中止し、障害停止、治癒または副作用の点で再び査定した。すべてのベースラインおよび効果、安全性パラメータは、臨床医が決定した。

40

【0124】

50

第1効果エンドポイント（時間対治療）を、治療開始の日および時間から、すべての局所サインおよび症状の完全な解決が記録された、すなわち、障害がなくなったか、または完全な治療が起こった（10日目に検閲）、病院訪問の日および時間まで、計算し、それには、古典的な事象、および停止事象両方の患者が含まれる。（最終10日目訪問の時間を、10日目において検閲した対象者における初期エンドポイント解析のために使用した）。古典的事象を煩っている患者に関して、完全治療は、「活性障害の証拠なしで、かさぶたがなく、紅斑、離脱またはわずかな非対称性が含まれる、残余ローション後皮膚変化が存在するか、またはしない」として定義した。

【0125】

第2エンドポイントには、1)古典的エピソード（小胞またはより後期の段階まで進展した事象、10日目に検閲）の完全な治療、2)事象停止、3)痛みの完全な休止、および4)丘疹段階に至るまで進展しなかった事象として定義された、停止事象の割合が含まれる。停止事象は、HSL関連兆候または症状の休止が報告された病院訪問の時点で、治療されたと考えられた。

10

【0126】

局所n-ドコサノール10重量%クリーム安全性および耐性を、副作用報告および臨床研究変数の査定によって決定した。

【0127】

組み合わせ研究のための試料の大きさは、先の臨床研究からのデータに基づいた。組み合わせ研究は、700人の評価可能な患者（各群350人）で行うと計画され、これにより、82%の力で、処置群とプラセボ群間の13時間平均差違の検出が可能になった。2つの副研究をまた、別々に解析した。

20

【0128】

統計学的方法論を、プロトコール中に概略した。強度対処置（ITT）集団には、薬物治療を受け、少なくとも1つの処置評価をされたすべての患者が含まれた。効果評価可能集団を、プロトコールにしたがわせ、すくなくとも80%のスケジュール用量を適用した。プロトコールのずれを、研究が進む前に評価した。安全性評価可能集団には、少なくとも1つの、研究薬物治療の適用を使用したすべての患者が含まれる。

【0129】

人口統計学および病歴データを、処置群によって表に記入し、連続変数に対して、記述統計学を使用した。絶対的変数に対しては、頻度および割合を使用した。兆候および症状、前駆症状の局在、現在の経験内容、および障害段階のようなベースライン変数を、変数の解析およびCochran-Mantel-Haenszel検定のいずれかをを用いて、無作為処置群間での均質性に関して比較した（Agresti A.「絶対的データ解析への導入（An introduction to categorical data analysis）」New York:Wiley 1996; pp. 60-4を参照のこと）。ベースライン生存兆候に関する記述統計学を計算した。

30

【0130】

初期効果解析のために、少なくとも1つのベースライン後効果査定を受けたすべての患者を含んだ。時間対事象分布を、Kaplan-Meierプロダクトリミット見積もりによって見積もった（Kaplan EL, Meier P. J. Am. Stat. Assoc. 53: 457-81, 1958）。時間対事象分散を、ウィルコクソン検定のGehan一般化を用いて、処置間で比較し、施設によって層別化した（Gehan EA Biometrika 52: 203-23, 1965）。FDAとの諮問にて、処置の効果が、処置期間の早期で予想される場合により力を発揮するので、一般化ウィルコクソン検定が選ばれた。信頼区間（時間差）を、層別ウィルコクソン検定の絶対値逆転によって得た。その障害が、10日の時点で治療しなかった対照からの局所査定を、その時点で打ち切った。停止事象のパーセンテージを、ベースライン訪問時のもっとも最近の段階にて表示している。

40

【0131】

50

プロトコールにおいて重要なベースライン共変動に対する可能性のある適用が同定された。一般化ウィルコクソン検定は、共変動に対する適用を簡単に許容しないので、比例ハザード回帰（Cox回帰）を、共変動適用が、処置に対するp-値に効果を有するかどうかを測定する方法として使用した。報告されたすべてのp-値は、未適用解析を表している。

【0132】

組み合わせ研究において、743人の対照を、21の米国施設で無作為化した。373人の固体をn-ドコサノールを投与するために無作為化し、370人を、プラセボを投与するために無作為化した。3人のn-ドコサノール処置患者および3人のプラセボ処置患者（試験集団の0.8%）は、最初の訪問の後、病院へ戻ってこなかった。これらの6人の患者は、安全性解析に加えたが、プロトコールデザインあたり、程度対処置効果手段より除外した。効果評価可能集団は、程度対処置集団とほぼ同一であり、97.4%の無作為化患者が、効果評価可能であった。そのように、ITT集団のデータのみを議論する。

10

【0133】

副研究#06において、8施設で、370人の患者を無作為化し、185人をn-ドコサノールに、185人をプラセボに無作為化した。副研究#07では、13施設で、373人の患者を無作為化し、188人をn-ドコサノールおよびプラセボに無作為化した。

【0134】

組み合わせ研究のITT集団に関する患者人口統計およびベースライン特徴を、表7に示している。個々の研究の人口統計は、同様であるが、示していない。人種、年齢またはHSL再発の頻度での、処置間の有意な差はなかった。研究患者の平均年齢は、37歳であり、18~80歳の範囲であった。小さな性差が同定された。主要な研究参加者は女性および白人であるが、男性も、プラセボレシピエントと比較して、小さな集団のn-ドコサノールレシピエントに含まれた（25%対33%、それぞれ、 $p = 0.01$ ）。登録において、全ての再発事象は、期間としては12時間以下であった。75%~80%の間の患者が、紅斑での処置を示し、残りは前駆症状のみを示していた。この期間は、両方の処置群で同一であった（表10も参照のこと）。ベースラインで報告された痛みはまた、処置群間で異ならなかった。

20

【0135】

ベースライン訪問で報告された患者によって得られた、HSLの過去の経験をまた、組み合わせ研究に関して、表7で要約している。処置群間で、HSLの最初の開始からの時間、または最後のHSL事象からの時間、先の年での事象の回数、通常局在前駆症状を経験する患者の割合、またはもっとも最近のHSL事象の期間において、統計学的に有意な差はなかった。しかしながら、n-ドコサノールレシピエントは、プラセボレシピエントと比較して、より長い歴史的な平均事象を報告した（9.5対8.4日、それぞれ、 $p = 0.02$ ）。この統計学的な差はまた、研究#06でも観察された（それぞれ、10.1対8.4日、 $p = 0.01$ ）。最も最近の先の事象の平均期間（n-ドコサノール対プラセボ、10.0対8.4日、 $p = 0.02$ ）もまた、研究#06でも統計学的に異なった。HSL歴における処置群の差は、研究#07では観察されなかった。統計学的差が、処置群間での人口統計的研究で観察された場合、Cox回帰解析を使用して、共変動効果を査定した。

30

40

【0136】

これは経験あるHSL集団であった。参加者は、20年より大きな平均HSL歴で、過去12ヶ月、5事象の中央値を報告した。99%以上の参加者が、そのHSL事象の前に、通常前駆症状を経験したと報告した。

【0137】

n-ドコサノール群のための参加者の平均数は、24.1であり、プラセボ群のための平均数は25.7であった。処置コンプライアンスを、実際に行った適用の数を、行うべきであった数と比較して査定し、n-ドコサノール群で、平均99.2%であり、プラセボ群で平均99.6%であった。適用またはコンプライアンスの数に関して、処置群間で

50

統計学的に有意な差はなかった。

【 0 1 3 8 】

【表 7】

表 7

I T T 集団組み合わせ研究 06 / 07 のために、患者特性および歴史情報

パラメータ	ドコサノール (N=370)	プラセボ (N=367)	p- 値 ^a
性別			0.007
男	91 (24.6%)	122 (33.2%)	
女	279 (75.4%)	245 (66.8%)	
人種			NS ^b
白人	348 (94.1%)	345 (94.0%)	
黒人	10 (2.7%)	13 (3.5%)	
アジア人	2 (0.5%)	1 (0.3%)	
ラテンアメリカ人	8 (2.2%)	4 (1.1%)	
その他	2 (0.5%)	4 (1.1%)	
年齢 (年)			NS
N	370	367	
平均 (SD)	37.2 (12.8)	37.4 (13.4)	
幅	18 - 77	18 - 80	
ベースライン 時の障害の段階			NS
前駆症状	71 (19.2%)	80 (21.8%)	
紅斑	299 (80.8%)	287 (78.2%)	
患者歴からの平均事象期間 (日)			0.016
N	370	367	
平均 (SD)	9.5 (4.2)	8.4 (3.7)	
幅	1 - 42	1 - 30	
もっとも直近の事象の期間 (日)			NS
N	370	367	
平均 (SD)	9.1 (5.0)	8.2 (4.2)	
幅	1 - 60	1 - 30	
ロー顔面単純ヘルペスの最後の開始からの時間 (月)			NS
N	369	366	
平均 (SD)	3.0 (2.2)	3.0 (2.2)	
幅	0 - 11	0 - 12	
ロー顔面単純ヘルペスの最初の開始からの時間 (月)			NS
N	370	366	
平均 (SD)	22.4 (13.8)	21.4 (13.2)	
幅	0 - 68	0 - 64	
過去 12 ヶ月の事象の数			NS
N	370	367	
平均 (SD)	5.2 (3.7)	5.1 (3.1)	
幅	2 - 40	2 - 20	
患者が、局在化紅斑を経験したか			NS
いいえ	3 (0.8%)	1 (0.3%)	
はい	367 (99.2%)	366 (99.7%)	

^aP-値、部位に適合させた Cochran-Mantel-Haenszel 検定からの分類パラメータ。処置、部位および部位対処置相互作用に関する効果との、種々のモデルの解析からの連続パラメータに関する P-値

^b有意ではない

有効性データを、表 8 にて、組み合わせ研究および副研究両方に関して、要約している。組み合わせ研究の結果のみを、本文章で議論する。非常に大部分の参加者は、10 日処置期間の間、治癒した（91%の n - ドコサノール参加者および 90%のプラセボ参加者）。治癒までの時間に関する Kaplan - Meier 曲線を、図 14 で表示している。すべての障害に関する、中間値時間対完了治癒は、n - ドコサノール参加者に関して、4.08 日であり、対してプラセボ参加者に関して、4.80 日であり、15%の差違であった（ $p = 0.008$ 、95% CI 2、22 時間）。治癒時間の分布もまた、25 および 75 百分率で、n - ドコサノール処置で好ましかった。

【0140】

男性の数における差に関する比例ハザード回帰を用いる共変量適合は、時間対治癒に関する p - 値に影響を持たないが、しかし、歴史事象間隔に関して、p - 値が減少した（すなわちより有意になった）。

【0141】

【表 8】

表 8

I T T 集団の効果エンドポイント

	組み合わせ研究 06/07			研究 06			研究 07		
	中間値差 ^a	ドコサノール 中間値時間 ^b	p-値 ^c (95% CI)	中間値差 ^a	ドコサノール 中間値時間 ^b	p-値 ^c (95% CI)	中間値差 ^a	ドコサノール 中間値時間 ^b	p-値 ^c (95% CI)
パラメータ									
時間対治癒 (全事象)	17.5 時間	97.8 時間	0.008 (2, 22)	18.9 時間	94.9 時間	0.023 (1.5, 25.75)	15.9 時間	102.3 時間	0.153 (-2.25, 23.75)
時間対治癒 (古典的事象)	1.6 時間 ^d	142.1 時間	0.023 (1, 24.5)	0.5 時間	137.8 時間	NS ^e (-4.25, 24.25)	22 時間	143.0 時間	0.021 (1, 37.5)
痛みおよびすべての症状 (熱、かゆみ、ひりひり感) の休止までの時間	13.4 時間	52.3 時間	0.002 (3, 16.5)	12.8 時間	52.3 時間	0.02 (1.25, 18.25)	12.9 時間	52.9 時間	0.03 (0.5, 19.75)

中間値は、Kaplan-Meier 見積りに依存する。

^a 中間値時間対事象における n - ドコサノールとプラセボ間の差

^b n - ドコサノール処置群に関する、事象までの中間値時間

^c 部位により層別した Gehan 一般化ウェルコクソン検定からの p-値

^d 2.5 および 7.5 百分率。差違はおおよそ 1.9 時間。

^e 有意ではない

【0142】

およそ 60 ~ 65 % の対象者で、古典的事象が発達した。時間対治癒における差 (表 8) は、n - ドコサノール対プラセボ処置群にて、統計学的により短かった (p = 0.02

10

20

30

40

50

、95% C11、24.5時間)。このエンドポイントに関して、平均値(1時間)よりも、より大きな差が、25および27百分率(～19時間)にて観察された。

【0143】

古典的事象に関して、個々の障害段階の時間対休止に関する値を、表9に表示している。小胞の時間対休止に関する中間値は、およそ2.1日であり、堅かさぶたの時間対休止に関する中間値は、およそ5.8日であった。どちらも、処置群間で統計学的に差はなかった。しかしながら、潰瘍/軟かさぶた段階の中間値時間対休止が、n-ドコサノールでより短かった(3.61対3.94日、 $p < 0.001$; 95% C18、25時間)。

【0144】

【表 9】

表 9

古典的事象からの個別事象段階の時間対休止

パラメータ	組み合わせ研究 06/07		研究 06		研究 07	
	ドコサノール	プラセボ	p-値 ^a (95% CI)	ドコサノール	プラセボ	p-値 ^a (95% CI)
(処置開始から) 小胞 段階の休止までの平均値 時間	50.5	50.7	NS ^b (-1.75, 9)	49.4	49.9	NS (-3.5, 9.75)
(処置開始から) 小胞 潰瘍/軟かさぶた段階 までの平均値時間	86.7	94.5	<0.001 (8, 25)	76.5	89.0	0.014 (2.25, 24.25)
(処置開始から) 小胞 潰瘍/軟かさぶた段階までの 平均値 時間	142.8	142.3	NS (-2, 21)	138.8	138.3	NS (-5.75, 23.5)
				146.0	145.3	NS (-5.25, 26.75)

^a中間値は、Kaplan-Meier 見積もりに依存する^a部位により層別した Gehan-般化ウェルコクソン検定からの P-値^b有意ではない

【0145】

ITT 群中の 737 患者のうち、合計 705 (96%) を、プラセボおよび n - ドコサノール処置集団間に等しく分布させ、彼らは研究の間に、障害の痛みおよび/または熱、

10

20

30

40

50

かゆみまたはひりひり感を経験した。全ての参加者に関する、痛みおよび/または熱、かゆみまたはひりひり感の完全な中止までの中間値時間(表9)は、n - ドコサノールレスピエントに関して、2.18日であり、対してプラセボレスピエントに関しては、2.74日であった(およそ20%減少、 $p = 0.002$; $CI = 3, 16.5$ 時間)。

【0146】

ベースラインでの状態による中止事象の患者の結果を、表10にて要約している。全ての対象に対して、より中止事象に向かう傾向(統計学的差はない)が、39.7%の、中止事象を経験しているn - ドコサノールレスピエントにて同定され、一方、プラセボレスピエントでは34.1%であった($p = 0.109$; オッズ比に対する $CI = 0.95, 1.73$)。紅斑にて処置を始めた対象において、副研究#06に関して、34.3%のn - ドコサノールレスピエント対23.3%のプラセボレスピエント($p = 0.048$, $CI = 1.00, 2.75$)が中止事象を経験した。事象中止までの時間は、急速であり、処置群間で差はなかった。

【0147】

【表 10】

表 10

ベースライン時での段階による中止事象の患者の割合

ベースライン時の 段階	組み合わせ研究			研究 06			研究 07		
	ドコサ ノール	プラセボ	p 値 ^a (95% CI)	ドコサ ノール	プラセボ	p 値 ^a (95% CI)	ドコサ ノール	プラセボ	p 値 ^a (95% CI)
全患者 (ベースライン時、 前駆症状または紅斑)	39.7% N=370 ^b	34.1% N=367	0.109 (0.95, 1.73)	38.8% N=183	30.1% N=183	0.078 (0.96, 2.24)	40.6% N=187	38.0% N=184	NS (0.73, 1.73)
ベースライン時 前駆症状	63.4% N=71	52.5% N=80	NS ^c (0.65, 2.76)	55.0% N=40	48.0% N=50	NS (0.55, 3.02)	74.2% N=31	60.0% N=30	NS (0.37, 5.71)
ベースライン時 紅斑	34.1% N=299	28.9% N=287	NS (0.88, 1.78)	34.3% N=143	23.3% N=133	0.048 (1.00, 2.75)	34.0% N=156	33.8% N=154	NS (0.59, 1.59)

0.0より大きなオッズ比は、nードコサノール患者が、中止事象を持つプラセボ患者より可能性があることを示唆している。

^aN=評価した患者の総数

有意ではない

【 0 1 4 8 】

副作用は、定量的および定性的に、n - ドコサノール処置患者およびプラセボ処置患者

間で同様であった。少なくとも1つの副作用が、組み合わせ研究集団に関して、19.6% (73/373) のn-ドコサノールレシピエント、および18.9% (70/370) のプラセボレシピエントで報告された。核処置群にて、5.9%の患者によって報告された頭痛が、もっとも共通の副作用であった。適用部位反応 (n-ドコサノール群の2.1%およびプラセボ群の1.9%) および処置領域の外側の単純ヘルペス (2.4%のn-ドコサノール群および1.4%のプラセボ群) をのぞいて、全ての副作用は、いずれの処置群でも、2%以下の患者によって報告された。2人の患者 (各群1人) が、それぞれ、発疹および処置領域外の、単純ヘルペスの副作用のために、本研究から離脱した。血清学または臨床化学パラメータいずれにおけるベースラインからの変化に関しては、処置群間で、統計学的に有意な差はなかった。

10

【0149】

n-ドコサノール10%クリームでのこの試験により、再発HSLの早期臨床開始治療の臨床的な効能が示唆されている。組み合わせ研究解析により、時間対完全治癒、古典的事象の時間対完全治癒、ほとんどの活性感染障害段階 (潰瘍/軟かさぶた) の停止、および全てのHSV症状の停止において、統計学的に有意な減少が示された。中間値時間対治癒は、最初の効果パラメータであり、プラセボと比較して、0.72日まで減少した。古典的障害の時間対治癒および潰瘍/軟かさぶたの時間対停止もまた有意に減少した。潰瘍/軟かさぶた段階は、ウイルス複製および炎症のピーク期間を示し、これは、その応答の感受性を示しうる。

【0150】

20

個々の副研究 (#06および#07) で同定された、統計学的差違は、組み合わせ研究においてよりも、わずかに弱く、より少ない参加者を反映している。副研究は、組み合わせ研究に対して、および互いに対して、処置効果は同様であった。副研究を通して結果の一致を、本明細書で報告された一般化ウィルコクソン (Generalized Wilcoxon) に加えて、比例オッズ回帰 (Proportional Odds Regression)、比例ハザード回帰 (Proportional Hazards Regression) およびログ-ロジスティック回帰 (Log-Logistic Regression) 法を含む、種々の解析方法および測定方法を用いて解析した (結果は示していない)。見積もられた処置効果は、使用した効果の測定にかかわらず、非常に同類である。さらに、計算された処置効果に関する信頼区間は、ほとんど完全に重なっている。

30

【0151】

副研究に関する組み合わせ解析アプローチは、プロトコールによって計画された。組み合わせた2つの研究は、HSLにおける2つの局所ペンシクロビルクリーム研究のそれぞれに関して報告されたもののおよそ半分のコホートサイズを示すが、それにもかかわらず、研究は、HSLの治癒および症状成分両方に対する、n-ドコサノールの臨床的、および統計学的有意さを示した。(HSLにおける、局所ペンシクロビルクリーム研究の議論に関しては、Spruance SK, Rea TL, Thoming C, Tucker R, Saltzman R, Boon R JAMA 277:1374-9, 1997、およびRabom GW 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, 1996を参照のこと。) この早期の、臨床開始モデルを、1日2回の観察で使用する場合、700~800患者のコホートが、HSLのこれらの鍵となる効果成分を示すのに必要であるようにみえる。一方で、障害予防の実演は、より大きな患者集団を必要とする可能性がある。n-ドコサノール処置の好ましい興味深い傾向にも関わらず、本研究は、不運にも、今日まで、観察した率における障害予防を提示するために十分な力はなく、障害予防は、はっきりと示されてきていない。しかしながら、障害開始の前の臨床開始処置により、存在する場所で (適切なコホートサイズで) この処置利点の実演に関する潜在力を明らかに提示されている。前駆症状期において処置を自己で開始する大きな患者集団が、実際に、処置の開始の前に、早期に確立した障害

40

50

を有する可能性があるので、他の報告された研究デザインのいずれもが、そのような効果を提示する機会を実際に提供しない。(Spruance SL, Overall JC, Kern E, Krueger GG, Pliam V, Miller W New Engl J Med. 297: 69 - 75, 1997、および Spruance SL Semin. in Dermatol. 11: 200 - 6, 1992)。

【0152】

ペンシクロビルクリーム1%は現在、再発型口唇単純ヘルペスの局所処置のために、処方箋によって入手可能である。ペンシクロビルクリームのための製品取扱説明書からの情報に基いて、現在の研究の2倍以上の大きさの米国多施設癌研究において、Spruance et al. が、ペンシクロビル処置患者が、0.5日の差で、平均治癒時間が有意に短く経験したことを示した(4.5対5.0日; $p < 0.001$)。(Spruance SK, Rea TL, Thoming C, Tucker R, Saltzman R, Boon R JAMA 277: 1374 - 9, 1997)。障害痛みの平均期間のおよそ半日の減少によって示されたように(3.9対4.4日、 $p < 0.001$)、障害痛みは減少した。Spruance et al. は、ウイルス離脱が、ウイルス離脱の欠失までの中間値時間において差は観察されなかったけれど(3.0対3.0日)、続く離脱時間にわたる変化(小胞および潰瘍/軟かさぶた)によって提示されたように、ペンシクロビルによって減少したことを報告した。多数の対象を試験しなければならないので、ペンシクロビルクリームでの抗ウイルス効果を示すことの難しさにより、生殖器ヘルペスの研究であった、感受性効果マーカーを作製するために、ウイルス培養液を積極的に得るべきであることが示唆される(Diaz-Mitoma F, Ruben M, Sacks SL, MacPherson P, Caissie G. J. Clin. Microbiol. 34: 657 - 63, 1996、Sacks SL, Aoki FY, Diaz-Mitoma F, Sellors J. Shafraan SD JAMA 276: 44 - 9, 1996、および Sacks SL, Tyrrell DL, Lawee D, Schlech W, Gill MJ, Aoki FY et al. J. Infect. Dis. 164: 665 - 72, 1991を参照のこと)。治癒の遅延における可能性のある効果のため、積極的ウイルス培養は、HSLにおいて、しばしば追跡されてきておらず、言い換えればHSL研究におけるこのパラメータの感度の欠如に関与しう。したがって、ウイルス培養は、現在の研究では実施されなかった。

【0153】

ペンシクロビル研究において観察されたように、これらの研究で、約5日のプラセボ処置時間は、7~10日のHSL障害治癒の報告された通常歴史よりも短い(Spruance SL, Overall JC, Kern E, Krueger GG, Pliam V, Miller W New Engl J Med. 297: 69 - 75, 1997; Spruance SL. Semin. in Dermatol. 11: 200 - 6, 1992; および Shafraan SD, Sacks SL, Aoki FY, Tyrrell DL, Schlech WF 3rd, Mendelson J, Rosenthal D et al. J. Infect. Dis. 176: 78 - 83, 1997)。これにより、HSLにてよく認識された、プラセボ効果の疑惑が持ち上がる(Spruance SL, 「ヘルペスウイルスの臨床管理(Clinical management of herpes viruses)」、Sacks SL, Straus SE, Whitley RJ, Griffiths PD, editors, Amsterdam: IOS Press, p. 3 - 42, 1995、および Guinan ME, MacCallman J, Kern ER, Overall JC Jr., Spruance SL JAMA 243: 1059 - 61, 1980)。プラセボ効果はしばしば、皮膚科の製品で現れ、これは、一般的にプラセボ処置に関連した、生理学的効果からのみでなく、未処理の皮膚の生理をそれ自身が変える障害を単にカバーしていることから由来する(プラセボ効果は、Chaput de Saintonge DM, Herxheimer A Lancet 344: 995 - 8, 1994にて議論されてい

る)。

【0154】

H S L 中の n - ドコサノール 10 % クリームの効果は穏やかである可能性があるが、疾患の自己制限特性が、患者に対して、ほとんど一日 (18 時間) 大きく間隔を減少させる。さらに、臨床効果の明らかな程度が、以上で議論したように、H S L の処置において、十分なプラセボ効果であると見なされるまで減少しうる。治癒時間の減少は、痛みの緩和および / または熱、かゆみまたはひりひり感が付随し、また患者に重要である。障害のほとんどの重度の段階 (潰瘍 / 軟かさぶた) の時間は有意に減少し、先に報告されなかった医学的に重要な効果である。一般用医薬品 (O T C) としてのその許可により、もっとも効果的である可能性のある、事象の段階の早期に適用可能である。

10

【0155】

ドコサノールは、細胞質膜とのウイルス融合の正常の工程を阻害すること、したがって、進入を阻害し、続いてウイルス複製を制限することによって、宿主細胞内へのウイルス侵入を阻害するように見える。n - ドコサノールおよびその代謝物は、ウイルスタンパク質または核酸と直接は相互作用しない。したがって、薬物耐性 H S V の出現はあまりない。抗ウイルスヌクレオシドからの異なる活性様式のために、存在することが示された場合でも、n - ドコサノールに対する耐性は、他の局所または全身性抗ウイルス薬の効果を減衰はしない。さらに、固有の活性機構が、抗ウイルスヌクレオシドとの組み合わせ治療が考慮すべきものであることを示唆している。

20

【0156】

要約すると、n - ドコサノール 10 % クリームは、早期 H S L における、臨床開始、プラセボコントロール、臨床試験において効果的であることが示された。この処置により、全体の事象持続期間、古典的障害へ発達する事象の持続期間、およびすべての障害症状の持続期間を減少させる。これらの研究に基づいて、n - ドコサノール 10 重量 % クリームを、H S L の過程で、出来るだけ早く開始すべきである。

【0157】

モルモットモデルを使用して、2つの処方での 10 % ドコサノールの *i n v i v o* 効果を試験するために、研究を構築した。臨床試験により、2000 年 7 月に F D A 承認に導かれた、口唇単純ヘルペス (H S L) の処置における、ドコサノール 10 % クリーム (「 d o c 」) の効果が示唆された。ドコサノールは、*i n v i t r o* にて抗ウイルス活性を示すが、動物 H S V モデルにおいて、矛盾した結果が報告された。

30

【0158】

無毛および H a r t l e y (毛を刈り、N a i r で処理した) モルモットに、電気入れ墨マーカーク、または 20 ゲージニードルでひっかいて、H S V - 1 (3 × 10 P F U M a c l n t y r e または K O S) または H S V - 2 (2 × 10 P F U M C) を、背中に 6 ~ 8 カ所接種させた。d o c または賦形剤 (「 v e h 」) の処置を、12 時間後に開始し、1 日 3 ~ 4 回続けた。ウイルス滴定がピークの時に、動物を安楽死させ、障害を取り除き、ウイルス滴定を、V e r o 細胞内での、ホモジェネートの細胞変性効果を査定することによって決定した。

【0159】

無毛モルモットにおいて、H S V - 1 および H S V - 2 に対する d o c の抗ウイルス活性が、入れ墨マーカークでの接種の後、小胞の数が減少したこと (たとえば、H S V - 2 に関して、平均 $v e h = 21.4 \pm 2.4$ 対平均 $d o c = 12.7 \pm 1.9$ 、 $p < 0.01$)、および両方の接種方法に関して、ウイルス滴定の減少 (たとえば、H S V - 1 に関して、平均 $\log v e h = 4.0$ 対平均 $\log d o c = 3.6$ 、 $p < 0.001$ 、および H S V - 2 に関して、平均 $\log v e h = 5.84$ 対平均 $\log d o c = 4.84$ 、 $p < 0.002$)、によって示された。障害スコアまたは乱切による接種に続くサイズの減少はなかった。H a r t l e y モルモットにおいて、H S V - 1 および H S V - 2 小胞数が阻害された (たとえば、H S V - 2 平均 $\log v e h = 26.7 \pm 8$ 対平均 $\log d o c = 7.7 \pm 4.8$ 、 $p < 0.002$)。ウイルス滴定の阻害は、無毛動物にお

40

50

いてより少なかったが、いくつかの実験で、統計学的に有意であった（HSV-1 平均 $\log_{veh} = 6.38$ 対平均 $\log_{doc} = 5.79$ 、 $p < 0.001$ 、HSV-2 に関して、平均 $\log_{veh} = 5.47$ 対平均 $\log_{doc} = 5.07$ 、 $p = 0.06$ ）。処方の違いは観察されなかった。

【0160】

Doc は、無毛モルモットにおいて、HSV-1 および HSV-2 ウイルス滴定、および無毛および Hartley モルモット両方において、小胞数を減少させた。2つのモデルで、効果における差が、臨床効果を示唆しているにもかかわらず、動物モデルにおいて、doc にて、以前の変化した結果を説明しうる。入れ墨ガンでの接種を含む、無毛モデルが、臨床 HSV 感染のよりよいモデルであり得る。

10

【0161】

以上で議論したように、n-ドコサノールは、組織培養液中で、HSV 複製を阻害する、飽和 22 炭素一級アルコールである。たとえば、Katz et al., 「1-ドコサノールの抗ウイルス活性、単純ヘルペスを含む、脂質エンベロープウイルスの阻害剤 (Antiviral activity of 1-docosanol, an inhibitor of lipid-enveloped viruses including herpes simplex.)」Proc. Natl. Acad. Sci. (1991) 88:10825-9、および Pope et al., 「n-ドコサノールの抗単純ヘルペスウイルス活性は、ウイルス侵入工程の阻害を含む (The anti-herpes simplex virus activity of n-docosanol includes inhibition of the viral entry process.)」Antivir. Res. 40:85-94 (1998) を参照のこと。実験動物における疾患の期間を短縮することも示された。Marcelletti et al., 「ドコサノール (Docosanol)」17:879-82 (1992)。臨床試験は、口唇単純ヘルペスの処置における、ドコサノール 10% クリーム (doc) の効能を示唆した。Habbema et al., 「再発型口唇ヘルペスの処置における n-ドコサノール 10% クリーム (n-Docosanol 10% cream (doc) in the treatment of herpes simplex labialis.)」Acta Derm. Venereol. 76:479-81 (1996)。大規模二重盲検において、370 人のドコサノール処置患者における中間値時間対治癒は、4.1 日であり、367 人のプラセボ処置患者において観察されたものよりも 18 時間短かった ($p = 0.008$)。Sacks, et al., 「口唇単純ヘルペスに対する、局所ドコサノール 10% クリームの臨床効果：多施設、無作為化、プラセボコントロール試験 (Clinical efficacy of topical docosanol 10% cream for herpes simplex labialis: A multicenter, randomized, placebo-controlled trial.)」J. Amer. Acad. Derm. 45:222-30 (2001) を参照のこと。ドコサノール群はまた、1) 痛みおよびすべての他の症状 (かゆみ、熱および / またはひりひり感、 $p = 0.002$)、2) 古典的障害の完全治癒 ($p = 0.023$)、および 3) 古典的障害の潰瘍 / 軟かさぶた段階の休止 ($p < 0.001$) までの、処置開始からの時間を減少させることを示した。FDA が、ヘルペスに対する一般用医薬品処置として、ドコサノール 10% クリームを、2000 年 7 月に許容した。ドコサノールは、HSV-1 および HSV-2、サイトメガロウイルス、水痘帯状ヘルペスウイルスおよびヒトヘルペスウイルスを含む、脂質エンベロープウイルスの広範なスペクトルを、in vitro にて阻害する。データは、細胞取り込みおよび代謝変換の後、ドコサノールが、宿主細胞とのウイルス融合を阻害し、核局在化および続くウイルス複製を阻害することによって、ウイルス侵入を阻害することを示唆している。たとえば、Pope et al., 「n-ドコサノールの抗単純ヘルペスウイルス活性は、薬剤の細胞内代謝変換と相関する (Anti-herpes simplex virus activity of n-docosanol co

20

30

40

50

r relates with intracellular metabolic conversion of the drug.)」J. Lipid Res. 77: 2167-78 (1996)を参照のこと。この活性機構は、抗ウイルス活性は、DNA合成の阻害の結果である、ヘルペス感染に関する他の利用可能な処置選択肢のものとは異なる。Elion, 「アシクロビル：発見、活性機構および選択性 (Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity)」J. Med. Virol. 1: 2-6 (1992)を参照のこと。

【0162】

ドコサノールおよびアシクロビルを、2つの型の処方、クリーム処方およびポリエチレングリコール - (PEG) 基礎軟膏で調製した。両方の処方の比較を、表11a (ドコサノールおよびアシクロビルクリームの組成物) および表11b (PEG中のドコサノールおよびアシクロビルの比較) にて列記している。

【0163】

【表11】

表11a

成分	処方 (% w/w)		
	賦形剤	ドコサノール 10 %クリーム	アシクロビル 5 % クリーム
ドコサノール	0	10	0
アシクロビル	0	0	5
クリーム賦形剤	100	90	95

図11b

成分	処方 (% w/w)		
	PEG 賦形剤	PEG 中のドコ サノール 10 %クリーム	PEG 中のアシクロ ビル 5% クリー ム
ドコサノール	0	10	0
アシクロビル	0	0	5
PEG 3350	30	15	20
PEG 400	70	75	75

【0164】

無毛およびHartleyハムスター (Cr1: (HA)BR) を、チャールズリバー (Charles River) 研究所より得た。これらを使用の前に7日間隔離し、食事と水を任意に与えた。動物を個々にケージにいれ、逼迫病原体なしの条件下で飼育した。HSV-1の2つの株 (Kos株およびMacIntyre株) およびHSV-1のMS株を使用した。ウイルスは、これらの実験での使用の前のモルモットにおいて、先に滴定した、細胞培養調製物であった。

【0165】

接種の前に、有毛モルモットを、電気カミソリでかり、温水でしめらせ、ついでNair脱毛剤クリームを、3~4回適用して、残っている毛を除去した。ついで、無毛および有毛動物の両方の背中を温水で洗浄し、完全に乾かした。接種方法1にて、モルモットの背中を、8平方のグリッド内でマークし、それぞれの領域内で、10mm直径の障害 (傷) を、ウイルスを皮膚に適用し、20ゲージ接種ニードルを用いて、10光垂直および水

平擦過傷で領域を傷つけることで誘導した。接種方法2においては、6平方のグリッドを、マーキングペンで書いた。各平方に、電気入れ墨ガン（スパルディング アンド ロガーズ社（Spaulding and Rogers, Inc.）、Voorheesville, NY）にて、50～751用量のウイルスを接種した。器具を、ダイヤル設定17にて、各接種部位にて、80回誘発した。

【0166】

接種方法1（傷つけ）にて、各障害（傷）の長さおよび幅を測定し、障害を、0（正常）から4（最大）までの範囲で、日々スコアを割り当てた。これらの測定を、4日目での犠牲死の段階まで続けた（Hartleyモルモット）。障害内に小胞が形成されうるが、小胞間に傷はなかった。この接種方法にて、小胞を測定し、記録したが、総関与領域は測定しなかった。

10

【0167】

動物を、ウイルス滴定がピークの時点で犠牲死させた。各障害を含む皮膚を、犠牲死動物より取り除き、2% FBS、0.18% NaHCO_3 、および50 g/mlゼンタマイシンを含むMEM中の、およそ10% w/v懸濁液中でホモジナイズした。連続希釈を、Vero細胞の24時間単層を含む96ウェルプレート内で、三重ウェルにてアッセイした。プレートを密封し、37℃にて7日間インキュベートし、ついで認識可能なウイルス細胞毒性効果に関して、顕微鏡下で試験した。

【0168】

表12に記述した実験に関して、スチューデントt-検定を使用して、平均障害サイズおよび平均障害ウイルス滴定を比較した。ランク付け合計解析を使用して、局所スコアを評価した。全ての他の実験に対して、因子としての処置に関して、一方向Analysis of Variance（ANOVA）を、各研究に関して別々に実施した。ANOVAが有意な場合、ついで最小平方（LS）は障害ウイルス滴定を意味し、小胞数を計算し、未修正多重比較を、処置の全ての対に関して、これらの平均における差に関して試験するために実施した。

20

【0169】

【表 1 2】

表 1 2

無毛モルモットにおける、HSV-1 誘導障害における局所治療の効果

処置	平均障害スコア \pm SD		平均障害サイズ \pm SD		平均ウイルスタイ ター 4 日目 (log ₁₀ /g \pm SD)
	2 日目	3 日目	2 日目	3 日目	
10% ドコサノール (PEG)	0.7 \pm 0.3	0.8 \pm 0.3	32.9 \pm 14.5	40.8 \pm 18.4	3.7 \pm 1.2**
10% ドコサノール (クリーム)	0.6 \pm 0.3	0.8 \pm 0.3	34.2 \pm 16.1	43.3 \pm 18.3	3.6 \pm 1.3**
5% アシクロビル (PEG)	0.6 \pm 0.3	0.8 \pm 0.3	25.8 \pm 13.6	35.0 \pm 15.7	4.0 \pm 1.1**
5% アシクロビル (クリーム)	0.4 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2***	13.2 \pm 10.3***	13.6 \pm 9.0***	3.1 \pm 0.8***
クリーム賦形剤	0.5 \pm 0.2	0.5 \pm 0.3	24.0 \pm 11.5	29.3 \pm 15.7	4.9 \pm 0.8
PEG 賦形剤	0.7 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3	33.7 \pm 14.8	38.0 \pm 13.7	4.7 \pm 0.8
未処理	0.6 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3	28.2 \pm 9.5	38.6 \pm 14.1	5.0 \pm 0.7

* t l d \times 4 ウイルス曝露後 12 時間で開始する

*P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001 適切なプラセボと比較

*P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001 未処理対照との比較

【0170】

調製した処方を、以上の表 1 1 a および 1 1 b で列記している。全ての試料を、実験的に使用する前に、解析的試験にかけた。ドコサノールを含むクリーム処方、白色、無臭、非染色および非水溶性クリームである。ドコサノールがない場合、クリーム賦形剤およびクリーム賦形剤中の 5 % アシクロビルは、水様性、ローション様粘度を有する。PEG 賦形剤は、ドコサノールおよびアシクロビルを含む処方において白色になる、透明で、水溶性軟膏である。

【0171】

表 1 1 a および 1 1 b にて列記した処方を、接種方法 1 (傷つけ) を用いて、無毛モデルにて、HSV-1 によって誘導した皮膚障害の処置における効力に関して評価した。局所処置を 12 時間後に開始し、合計 10 処置を、各 8 時間ごとに続けた。障害の大きさおよび重症度を、感染の 2 日目および 3 日目に査定した。4 日目に、各障害を切除し、ウイルス含量に関してアッセイした。

【0172】

結果を表 1 2 にて要約した。障害の大きさおよびスコアは、クリームまたは軟膏中のドコサノールによって、またはアシクロビル軟膏によって、阻害されなかった。障害の大きさおよび重症度のより大きな阻害が、一般的に、処置を過去 4 日間続けた場合に観察されることが報告されたが、この研究でのモルモットが、ウイルス含量の測定のために 4 日目に犠牲死されるので、障害の大きさおよび重症度における効果が観察されとは予想されなかった。ウイルス滴定減少データにより、両方の賦形剤でのドコサノール処置が、未処理対象平均値と比較した場合に、およそ 1 log₁₀ にて、平均ウイルス滴定 / グラムを減少させたことが示唆された。この差は、統計学的に有意であった (p < 0.01)。PEG 中のドコサノールは、1.0 log₁₀ までウイルス滴定を減少させ、PEG 中のアシクロビルは、0.7 log₁₀ までウイルス滴定を減少させた。アシクロビルおよびドコサノール間の差は、統計学的に有意でなかった。

【0173】

表 12 における結果に基づき、また PEG 賦形剤が、PEG 中のドコサノールのものと一致して同様であるので、PEG 処方をさらなる研究のために選択した。方法 2 でウイルスを接種させた無毛モルモットにおける試験の結果を、図 15 にて例示している。ウイルス滴定レベルは、賦形剤試験部位 (平均 $\log_{10} = 4.0$) と比較して、ドコサノール (平均 $\log_{10} = 3.5$) およびアシクロビル (平均 $\log_{10} = 3.0$) にて、統計学的に有意に減少した。

【0174】

無毛モルモットに、背部上各 8 カ所にて、入れ墨接種で、MacIntyre 株 HSV-1 ($60 \mu\text{l} \quad 5 \times 10^6 \text{PFU/ml}$) を接種させた。処置を接種後 12 時間で開始し、3 日間、各日 3 回繰り返した。障害皮膚を、最終処置の 12 時間後、4 日目に回収し、ウイルス含量に関してアッセイした。処置群は、doc = PEG 中 10% ドコサノール (10 部位)、acy = PEG 中 5% アシクロビル (10 部位)、veh = PEG 賦形剤 (10 部位)、および none = 処置なし (8 部位) であった。

10

【0175】

同様の観察が、HSV-2 (MS 株) による無毛モルモットの続く接種にて得られた。HSV-2 ウイルス滴定レベルは、PEG 賦形剤処置部位 (平均 $\log_{10} = 5.8$) と比較した場合に、PEG 中のドコサノールでの局所処置 (平均 $\log_{10} = 5.2$) および PEG 中のアシクロビル (平均 $\log_{10} = 5.0$) での局所処置によって、統計学的に有意に減少した。ウイルス滴定は、局所投与の後、75% (ドコサノール) および 78% (アシクロビル) 減少した。感染後 3 日目および 4 日目での小胞 / 部位の数もまた査定し、図 17 に示している。

20

【0176】

無毛モルモットに、背部表面上の各 6 カ所に、物質と方法にて記述したように、入れ墨ガンを用いて、HSV-2 の MS 株 ($60 \mu\text{l} \quad 1 \times 10^6 \text{PFU/ml}$) を接種させた。処置を、接種後 12 時間で開始して、3 日間、8 時間ごとに繰り返した。小胞数を 3 日目および 4 日目に計数した。障害皮膚を、4 日後、最終処置後 12 時間で回収し、ウイルス含量をアッセイした。すべての処置を、処置をしなかった 3 部位のみを除いて、9 つの部位に適用した。

【0177】

無毛モルモットモデルにおける疾患期間は、ウイルスの接種後 4 ~ 5 日である。無毛モルモットでの疾患の期間は 8 ~ 9 日である。長期疾患期間により 2 つの利点が提供される。1) 口唇ヘルペスに対して、8 ~ 10 日間のヒトにおける疾患経過をよりよく示す、2) 治療効果を観察する広範囲のウインドを提供する。Spruance, 「再発型口 - 顔面単純ヘルペスウイルス感染の自然歴 (The natural history of recurrent oral-facial herpes simplex virus infection.)」Semin. Dermatol. 11: 200-6 (1992)、Whitley et al. 「単純ヘルペス感染 (Herpes simplex virus infections.)」Lancet 357: 1513-18 (2001) を参照のこと。モデルは、難点があるが、Nair 処置、続く脱毛により皮膚がひりひりし、したがって、適用した処方に対する感受性が悪化する。クリーム処方賦形剤は、結果として、Hartley モルモットモデルにおいて、適切な賦形剤に対するドコサノールクリーム処置の結果を解釈することが不可能になる、重度の刺激となった。この刺激は、無毛モデルでは起こらない。

30

40

【0178】

入れ墨ガンでの HSV-2 の接種により、9 日目までの完全分解を伴う、6 日までの長い間に渡り分離障害が発生する。処置研究において、動物を、ピークウイルス滴定レベルの検出のために、6 日目に犠牲死させた。小胞数を、犠牲死の時点まで報告した。処置を、接種 12 時間後に開始し、1 日目から 3 日目まで、各日 4 回、4 日目から 5 日目まで、各日 3 回繰り返す、計 9 回処置した。皮膚試料を、ウイルス滴定の解析のために 6 日目に回収した。障害あたりの平均ウイルス滴定を、各処置に関して、図 18 にて示している。

50

統計学的情報を、図の下の方で要約している。3日目から5日目に観察された小胞数を、図19に示しており、これは、障害ウイルス滴定として、同様のパターンの結果を示している。

【0179】

Hartley モルモットに、背部表面上の各6カ所に、材料と方法にて記述したように、入れ墨ガンを用いて、HSV-2のMS株(60 μ l 2.9 \times 10PFU/ml)を接種させた。処置を、接種後12時間で開始して、3日間、4回/日で繰り返した。小胞数を3、4および5日目に計数した。障害皮膚を、6日後、最終処置後12時間で回収し、ウイルス含量をアッセイした。各処置を9つの部位に適用した。

【0180】

ドコサノールでの先の研究には、ウイルス滴定計測が含まれなかったが、治癒が起こるまでの小胞数の計数によって査定したように、疾患期間の減少に焦点を当てた。早期の研究によって観察されたより早い治癒時間は、抗ウイルス活性に関連しない活性機構によるものでありえた。この研究からの結果により、ドコサノール含有処方が、結果として、無毛(賦形剤または未処理部位と比較して)およびHartley モルモットモデル(未処理部位と比較して)両方において、HSV-1およびHSV-2を感染させたモルモットの皮膚で、ウイルス含量を減少させることになることが確立した。観察された障害は、アシクロビルにて観察されたものとほぼ同等であり、2つの処置の間で、統計学的に有意な差は、一般的に観察されなかった。

【0181】

局所適用化合物の抗HSV活性は、使用した局所賦形剤に非常に依存している。Sidwell et al., 「実験動物での、1型ヘルペスウイルス誘導皮膚障害におけるDMSO賦形剤中のピダラビンの効果(Effect of vidarabine in DMSO vehicle on type 1 herpesvirus-induced cutaneous lesions in laboratory animals)」Chemother. 33:141-50(1987)を参照のこと。他の賦形剤が、抗ウイルス活性を潜在的に増強可能であるけれども、PEGおよびクリーム賦形剤両方が、ドコサノールおよびアシクロビルの伝達に関して、相対的によく働いたことが明らかである。

【0182】

2つのモデルにおける異なる結果は、化学的に脱毛し、刈った皮膚において誘導された刺激の結果であり得る。刺激は、治癒率を変化しうる炎症を誘導する。ウイルス滴定レベルの減少が、無毛およびHartley モルモットにおけるドコサノール処置の後に観察されたが、賦形剤処理部位と比較した統計学的な有意さは、無毛モデルにおいて、より再現よく示された。障害あたりのウイルス滴定の減少もまた、効果の程度は、小胞数を評価したときよりも小さかったけれども、小胞数の減少に相関した。

【0183】

入れ墨ガンで接種させた、無毛モルモットモデルは、皮膚誘導ヘルペス障害の処置における、ドコサノール処方の効果の再現ある証拠を提供し、これは、Hartley モルモットモデルよりもより再現される結果を提供する。この研究の結果より、ドコサノールは、これらのモデル系において、アシクロビル軟膏でのものとほとんど等しい程度まで、HSVの複製を阻害することが確立され、このことは、ヘルペスの処置におけるその効果が、その抗ウイルス活性からの結果であり得ることを示唆している。

【0184】

n-ドコサノール10%クリームとして処方されたn-ドコサノールを、単純ヘルペス感染の局所処置に関して研究した。再発型口-顔面単純ヘルペス感染の治癒時間を減少させる効果が、第II相および第III相プラセボコントロール試験にて示されてきた。陽性の結果がまた、HIV-1陽性患者における皮膚カポジ肉腫障害に対する局所処置として、n-ドコサノール10%クリームを用いた、第III相パイロット試験にて得られた。n-ドコサノール局所クリームは、赤毛サルにおけるSIVmac251の膣伝染を防

10

20

30

40

50

止し、このことは、化合物が、ヒトにおけるHIVの伝染を予防するために、予防的に有用であり得る、抗微生物機能をもつことを示唆している。

【0185】

n - ドコサノールは、広範囲の脂質エンベロープウイルスに対して、*in vitro*にて、抗ウイルス活性を示している。感受性ヒトウイルスには、HSV - 1およびHSV - 2（アシクロビル抵抗性株および臨床単離物を含む）、A型インフルエンザ、呼吸器合胞体ウイルス、サイトメガロウイルス、水痘・帯状ヘルペスウイルス、ヒトヘルペスウイルス6およびHIV - 1が含まれる。ID₅₀値（50%阻害が観察される濃度）は、これらの感受性ウイルスに関して、3 ~ 12 mMの範囲であった。非エンベロープウイルスおよびエンドサイトーシスされるエンベロープウイルスは、n - ドコサノールの効果に対して、明らかな抵抗性を有する。*in vitro*効果研究に関して、不溶性n - ドコサノールを、この分子を、不活性、非毒性界面活性剤Pluronic F - 68、ポリエチレンオキシドとポリプロピレンオキシドのブロックコポリマー、または関連する分子Tetronic F - 68中に懸濁させて処方した。*in vitro*活性のために必要な、比較的高い濃度のn - ドコサノールは、界面活性剤安定粒子の生理学的性質の結果であり得る。しかしながら、300 mMほどのn - ドコサノール濃度は細胞毒性ではないので、薬剤に対する治療指数は好ましい。

10

【0186】

一般的にHSVで実施した研究により、ウイルス調製物が、感染性の欠損なしに、化合物と混合可能であるので、n - ドコサノールは、ウイルスを直接的に不活性化しないことが示唆された。代わりに、薬物は、ウイルス複製を阻害する様式で、標的細胞を明らかに改変する。研究により、放射標識n - ドコサノールが、宿主細胞に非常に組み込まれ、ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンのクロマトグラフィー性質を有する、リン脂質に代謝されることが示された。さらに、n - ドコサノール代謝の量を増加させる条件が、抗ウイルス活性の量を増強し、これは、薬物のこの細胞内代謝変換が、抗ウイルス活性に必要であることを示唆している。

20

【0187】

n - ドコサノールは、二次ブランクアッセイにて評価されたように、HSV - 誘導ブランク形成およびウイルス粒子の産出を阻害する。また、ELISAによって測定されたように、HSVコアおよびエンベロープタンパク質の産出、および細胞内HSV - 1特異的前 - 早期タンパク質を発現している細胞数を阻害する。これらの観察により、n - ドコサノールが、HSV感染における早期段階を干渉することが示唆された。

30

【0188】

（1）ウイルスゲノムの、感受性宿主細胞の核内への侵入において、 α - ガラクトシダーゼを発現しているHSV組換え体ウイルス、（2）細胞内へのHSVピリオンタンパク質の侵入における、 α - ガラクトシダーゼを発現するために形質転換した宿主細胞、および（3）塩化オクタデシルローダミンBで蛍光標識したHSV - 2を用いて、n - ドコサノールの抗 - HSV活性に対する活性機構を調査するために、研究を実施した。

【0189】

n - ドコサノール（98%純度、M. Michel, New York）を、一般的に以下のように、Tetronic 908（ポロキサミン 908、New 25000、BASF; Parsippany, NJ）中に懸濁した。Tetronic 908を、37 生理食塩水中、1.6 mMまで希釈し、ついで溶液を50 まで熱した。n - ドコサノールを、食塩水中Tetronicに、300 mMまで加え、混合液を、65 Wの初期出力にて、21分間、超音波処理し（Branson 450ソニファイア、Danbury, CT）、この懸濁液を86 で暖めた。得られた懸濁液は、透過電子顕微鏡によって測定されたような、 μ 平均サイズ0.1ミクロンの、非常に細かな球形粒子からなる。

40

【0190】

ヘパリンおよびNP - 40をシグマ（Sigma, St. Louis, MO）より得、

50

オクタデシルローダミンBを、モレキュラー プローブス (M o l e c u l a r P r o b e s, Eugene, OR) より得た。抗gD中和モノクローナル抗体 (I I I - 174) を産出した。ブランク減少アッセイを、典型的に、V e r o細胞 (A f r i c a n G r e e nサル肝臓; A T C C第C C L - 81) にて実施した。H E p - 2 (ヒト類表皮カルシノーマ、A T C C第C C L - 23)、細胞株およびN C - 37ヒトB細胞 (A T C C第C C L 214) を、アメリカン タイプ カルチャー コレクション (A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n) より得た。C H O - I E 8細胞株を開発した。これは、プロマイシン (P u r) 選別可能マーカーおよびH S V - I I C P 4プロモーターの制御下l a c Zを含むプラスミドでの、C h i n e s eハムスター卵巣細胞 (C H O - K I、A T C C第C C L - 61) のトランスフェクションによって選別した。細胞株を、P u r中で選別し、H S V感染の後、 - ガラクトシダーゼの発現に関して、ただし感染のない状態で選別した。

10

【0191】

H S V - 1のM a c l n t y r e株 (V R - 539) およびH S V - 2のM S株 (V R - 540) を、A m e i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o nより得た。H S V - 2 (333)、野生型株を、F r e d R a p p博士より得た。ストック調製物を、V e r o細胞内で、ブランク形成ユニット (P F U) のレベルに関して滴定し、- 80 にて冷却して保存した。H S V - 1 (K O S) g L 86は、g L O R Fが、C M Vプロモーターの制御下、l a c Zで置換される、複製不全変異体である。この変異体は、g L - 発現V e r o細胞中で増殖させ、完全に感染したが、非補体細胞において、ただ一回の複製しか可能ではない。

20

【0192】

培養した細胞を、L - グルカミン、ペンストレップを含み、5 % F C Sを含むD M E M (c D M E M) 中で、35 - mmウェル (2 ml、 3×10^5 細胞 / ml) に入れた。n - ドコサノールまたは相当する対照賦形剤 (n - ドコサノールを含まない) を、培養の開始の時点で加えた。ついですべての培養液に、175 p . f . u . のH S V - 1またはH S V - 2を接種させた。

【0193】

培養液をさらに42 ~ 44時間インキュベートし、新鮮な培地で1回洗浄し、染色および固定し (染色 / 固定剤は、メタノール中1 . 25 mg / mlのカルボール - フクシン + 2 . 5 mg / mlのメチレンブルーからなる)、ついで培養顕微鏡 (10 × 倍率) を用いて、H S V - 誘導ブランクに関してスコア化した。データは、二重の培養液の平均であり、5 ~ 10 % 以上は変化しなかった。

30

【0194】

感染24時間前、培養細胞を、10 % ウシ胎児血清 (F E S) を含む0 . 5 ml c D M E M中で、 2.5×10^6 細胞 / ウェルにて、24ウェル (16 - mm) 内に蒔いた。細胞接着の後 (4 ~ 6時間後)、ヘパリン、n - ドコサノール - 界面活性剤、または界面活性剤のみを、0 . 5 ml D M E M / 10 % F E S内の細胞に加えた。薬剤は、望む最終濃度の2倍で、培地内に溶解させた。感染のために、0 . 7 mlの培地を、各ウェルより除去し、25 μ lのウイルス懸濁液を、残りの0 . 3 mlに加えて、少なくとも20 p . f . u . / 細胞のウイルス用量を得た。プレートを3時間、37 にて振り、ついでさらに2 ~ 3時間、37 C O₂インキュベーター内に入れた。

40

【0195】

感染後5 ~ 6時間の時点で、細胞に、2 % ホルムアルデヒドおよび0 . 2 % グルタルアルデヒドを含むP E Sを与え、洗浄し、ついで0 . 02 % N P - 40、0 . 01 % デオキシコレートおよび2 mM M g C l₂で浸透させた。再び洗浄した後、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - - ガラクトピラノシド (X - g a l) を、青色生成物の発生のために加えた。基質を除去し、50 % グリセロールで置換した。プレートの写真を撮った。各ウェル中の色の量を定量するために、すべての細胞からグリセロールを除去し、ついで蒸留H₂Oで3 × 洗浄した。D M S O (0 . 6 ml) を、色素を可溶化するために加

50

え、 $100\mu\text{l}$ の各試料ウェルを、24ウェルプレートから、96ウェルプレートに移した後、 OD_{600} を、96ウェルプレートリーダーを用いて記録した。

【0196】

H S Vエンベロープを、塩化オクタデシルローダミンB (R - 18)で標識した。N C - 37ヒトB細胞を、 2.5×10^5 細胞/ ml にて、フラスコあたり25mlでインキュベートした。細胞を、添加無しで、または15mMのn - ドコサノールまたは相当するT e t r o n i c 908の存在下で、37 にて一晚インキュベートした。細胞を、遠心によって回収し、 1×10^6 細胞/ ml まで再懸濁した。分液 (試験チューブ中0.2ml) を、 $100\mu\text{l}$ R - 18 標識H S V - 2の添加の前、20分間4 にて冷却した。4 にて3時間後、本来の濃度にて、n - ドコサノールまたはT e t r o n i c 908を含む3mlの培地を加え、試料を、種々の時間、37 にてインキュベートした。細胞を4 にて遠心し、生理食塩水にて洗浄し、遠心し、食塩水中10%ホルマリン (3ml) 中に再懸濁させた。細胞を生理食塩水にて洗浄し、10%F C Sを含むP B S中に再懸濁させた。蛍光強度を、蛍光活性化細胞ソーターを用いることによって測定した (F A C S c a n、ベクトン - デッキンソン (B e c t o n - D i c k i n s o n))。

10

【0197】

薬物の活性形態は、およそ3時間の半減期で、細胞膜内で有限な寿命を有する。抗ウイルス活性は、H S Vの添加の前にn - ドコサノールとともにインキュベートした標的細胞内で増加する。これは、図20aにて例示しており、H S V - 誘導プラークの阻害における、9mMのn - ドコサノールとのV e r o細胞のインキュベーション時間の効果を示している。この実験において、9mMのn - ドコサノールは、ウイルス添加と同時に加えた場合、または3時間前、28%、V e r o細胞におけるプラーク形成を阻害し、これは、阻害の6時間前に、薬剤で細胞を処理した場合に増加し、もっともよい阻害は、H S V - 1添加の24時間前に処理した細胞で見られた。中間の時間間隔は調べなかった。

20

【0198】

V e r o細胞が、n - ドコサノールとのインキュベーションの最適時間の後に、H S V感染に対する抵抗性を保つ長さを確立させるために、V e r o細胞を、21~27時間、9mMのn - ドコサノールとともにインキュベートした。ついで、取入れられていない薬剤を含む培地を除去し、新鮮な培地で置換した。薬剤は置換しなかった。すぐに、または37 で、1、3または6時間後に、H S V - 1を加えた。H S V - 1の添加後2時間、過剰なウイルスを除去し、プラーク還元アッセイを、上記のように続けた。図20bで示したように、観察された抗ウイルス活性 (%阻害プラーク形成) が、薬物除去とウイルスの添加の間の時間が増加するので、徐々に減少した。薬物除去とH S V - 1添加の間の3時間のうちに、50%の阻害活性が失われ、6時間間隔では、H S V - 1プラーク形成の阻害は観察されなかった。

30

【0199】

H S V - 1の特定の細胞表面レセプターへの接着は、n - ドコサノール処置細胞内で、影響を受けない。先の研究により、H S V - 1の、特定の細胞表面レセプターへの接着が、n - ドコサノール処置細胞で影響を受けないことが確認された。15mMのn - ドコサノールとともにインキュベートしたV e r o細胞は、2p.f.u./細胞にて加えた、[3 H] H S V - 1の正常レベルに結合した。ヘパリンは、この相互作用を96%阻害した。結合アッセイの特異性を、[³ H] H S V結合を阻害しなかった、正常マウス血清と比較して、96%まで結合を減少させたマウスH S V - 1免疫血清を用いて確認した。

40

【0200】

- g a lの産出が、H S V - 1 (K O S) g L 8 6が感染した、n - ドコサノール処置H E p - 2細胞中で阻害される。H S Vの標的細胞内への侵入における、n - ドコサノール処置の効果を調査するために、ウイルス構築物H S V - 1 (K O S) g L 8 6を使用した。l a c Z発現が、C M Vプロモーターの制御下である、その複製不全変異体において、- ガラクトシダーゼが、感受性宿主細胞核へのウイルスゲノムの侵入後に発現する。X - g a lの添加は結果として、感染した細胞の数に対する青色比の発生となる。シグ

50

ナルの強度は、ウイルス結合を阻害するヘパリン（図21を参照のこと）、またはgDへのモノクローナル抗体を中和することを含む侵入を阻止する薬剤、侵入に必要なHSV-特定タンパク質によって阻害される。このシグナルは、アシクロビルまたはDNA断片複製を阻害する他の薬剤によっては阻害されない。

【0201】

HSV-1 (KOS) gL86の侵入における、0.9~9.9 mM (0.333.3 mg/ml)の範囲の用量での、HEp-2細胞のn-ドコサノール処置の効果を試験した。HEp-2細胞を、変異体ウイルスを添加する前に、Tetronic 908中に懸濁させたn-ドコサノールの示した濃度とともに、24時間インキュベートした。感染後5~6時間の時点で、細胞を固定し、浸透させ、X-galを加えた。n-ドコサノール処置は、結果として、4 mMほど低いn-ドコサノール濃度にて、より少ない青色細胞の目に見える産出となった。ほとんど色の発生が、それぞれ8および10 mMのn-ドコサノールで処理した細胞では見られなかった。ウイルス感染の阻害を定量化するために、HEp-2細胞内の基質を、DMSOの添加によって可溶化し、OD₆₀₀を図21に示したように記録した。n-ドコサノールに関するID₅₀は、およそ7 mMであり、Vero中、それぞれ、4および9 mM、またはHSV産物およびプラーク形成の阻害に対する、ID₅₀値とほぼ等しい。n-ドコサノールを含まない、賦形剤、Tetronic 908は、ウイルス侵入を阻害しなかった。事実、等しい量の賦形剤での細胞の処理は、40%ほど、青色発生を増強した。ヘパリンを、1および10 μg/mlの間の濃度で試験し、阻害は、6 μg/mlにて完全になるように見えた。これらの結果により、HSVゲノムが、n-ドコサノール処置細胞内の核へ、効果的に侵入しないことが確立された。n-ドコサノールが、ウイルス接着を阻害できないことと併せて、この実験により、ウイルス侵入の段階が、n-ドコサノール処置によって阻害されること、およびウイルス接触に続くが、ウイルスゲノムの侵入の前に、この事象が起こることが示唆された。

10

20

【0202】

n-ドコサノールは、CHO-IE8細胞のHSV-2 (333)感染を阻害する。n-ドコサノール処置細胞内でのウイルス侵入の阻害の点をさらにせばめるために、CHO細胞にPur選択マーカーおよびHSV-1 ICP4プロモーターの制御下でlacZを含むプラスミドのトランスフェクションによって選別したCHO-IE8細胞内への、HSV-2の侵入における薬物の効果を調査した。X-gal発現は、細胞内へのウイルス侵入に際して即時におこり、核へのビリオン伝達に依存しない事象である、細胞内へのHSVビリオンタンパク質の進入に際して誘導される。色の発生は、感染した細胞の数に比例し、先のアッセイでのように、ウイルス接着を阻害するヘパリンによって、および(gDへの抗体のような)進入を阻害する薬剤によって、しかし、アシクロビルおよび他のDNA断片複製阻害剤によってではなく、効果的に阻害される。

30

【0203】

図22で例示したように、n-ドコサノールは、このアッセイにおいて、β-ガラクトシダーゼ発現を阻害する。賦形剤のみでのCHO-IE8細胞の処置は、結果として、OD₆₀₀のわずかな増加となり(~10%)、細胞のn-ドコサノールの処置は、結果として、感染した細胞を示している発色の、濃度依存的減少となる。この実験において、30 mMのn-ドコサノールは、未処理の細胞と比較して40%、Tetronic 908処置細胞と比較して55%、色の産出を阻害した。無処理細胞と比較において、観察された最大阻害はおよそ75%であった。これは、結合アッセイにおける阻害の欠失と併せて、ウイルス接着の後、ただしビリオンタンパク質の放出と、VP16トランスアクティベーター活性の前の事象間に、阻害の時点を狭める(進入直後事象は、核へのビリオン伝達に依存しない)。

40

【0204】

n-ドコサノール処置NC-37ヒトB細胞は、塩化オクタデシルローダミンB標識HSV-2との融合の減少を示す。脂質エンベロープ融合依存ウイルスに対するn-ドコサノールの阻害効果の選択性、および殺ウイルス効果の欠損のために、本発明者らは、n-

50

ドコサノールが、標的細胞とのウイルス粒子の効果的な融合を予防するために、標的細胞膜を変化させることによって、ウイルス侵入を阻害する可能性を考慮した。n - ドコサノールの、細胞膜とのHSV融合における効果を調査するために、本発明者らは、蛍光デクエンチングアッセイを構築した。元のHSV - 2ピリオンの膜を、塩化オクタデシルローダミン (R - 18) で標識化し、ヒトB細胞に加えた。このモデルにおいて、細胞膜へのウイルス融合が起こる場合に、緊密にパックされたローダミン分子が、宿主細胞のより大きな膜内に拡散する。これは、蛍光自己消滅を軽減し、シグナル強度の増加を引き起こす。

【 0 2 0 5 】

NC - 37ヒトB細胞を、R - 18標識化HSV - 2の添加の24時間前に、15 mMのn - ドコサノールで処理した。図23に示すように、このn - ドコサノールの濃度が、処理をしなかった細胞と比べて、およそ50%まで、ウイルス/細胞融合とともに起こる蛍光強度の相対的増加を阻害した。NC - 37細胞のTetronic対照懸濁液での処置は阻害せず、代わりに、蛍光強度の認識可能な増加を引き起こし、以上で議論した - gal発現系での観察を連想させる (図21および22)。Tetronic対照のみで観察された効果と比較して、n - ドコサノールは、76%ほどまで、蛍光応答を阻害した。n - ドコサノールは、融合工程の間のみ加えた場合には阻害せず、細胞との化合物の前インキュベーション期間が必須であった。このことは、抗ウイルス工程における代謝変換に関する要求と一致する。この観察はさらに、n - ドコサノールの存在が、それ自身クエンチはせず、蛍光の阻害をしないことを確定した。1 : 40希釈での抗 - gD抗体 (浸潤の特異的阻害剤) は、蛍光シグナルにおける増加を完全に阻害し (示していない)、このことは、実験プロトコルが、ウイルス浸潤の適切な測定を確認している。これらの結果により、HSVウイルス粒子の、宿主膜への融合が、n - ドコサノール処置細胞で有意に阻害されることが示唆される。

【 0 2 0 6 】

最も入手可能である治療用化合物は、ウイルスおよび感染標的細胞によって共有される複製工程を阻害し、したがって、毒性、変異原性および/または催奇形性であり、実質的に、薬物耐性ウイルス変異体亜種を誘導しうる。したがって、新規抗ウイルス化合物、とりわけ、新規の活性機構を有するものの同定が重要である。22炭素、飽和、一級アルコール、n - ドコサノールは、毒性、変異原性または催奇形性特性を持たない。従来の抗ウイルス薬剤の活性様式と比較して、n - ドコサノールの抗HSV活性に対する優れた機構は、細胞膜およびHSVエンベロープ間の融合の阻害であり、結果として、進入および続くウイルス複製の阻害であるように見える。活性機構は、単独または細胞内への進入の主要な方法として、融合を使用し、単一ウイルスタンパク質を標的化する他の抗ウイルス薬剤に対するその活性様式と対照をなす、全ての試験した脂質エンベロープウイルスに対する、n - ドコサノールの効果を説明する。この活性機構に基づくと、n - ドコサノールの抗ウイルス効果に対して抵抗性のHSV株の出現はあり得ない。

【 0 2 0 7 】

先の結果により、n - ドコサノールが、脂質エンベロープウイルスに対して特異的であり得ること、および細胞膜との融合によって、まず細胞に進入する脂質エンベロープウイルスが、n - ドコサノールによって効果的に阻害されること、が示唆されてきた。一方、この薬物は一般的に、非エンベロープであるか、エンベロープおよびエンドサイトーシスであるかいずれかのウイルスに対する検出可能な効果を持たない。この一般的なパターンの一つの例外は、インフルエンザAであり、これは、レセプター仲介エンドサイトーシスを介して細胞に進入することが報告されてきたが、しかしn - ドコサノールによって効果的に阻害されるエンベロープウイルスである。

【 0 2 0 8 】

n - ドコサノールによる抗ウイルス阻害に必要なin vitro用量 (mM) は、アシクロビルのような既存の治療用化合物での結果と比較して高い。これは、n - ドコサノール界面活性剤安定化懸濁液の性質からの結果であり得る。n - ドコサノールの不溶性の

ために、粒子は、熱力学的に安定であり、培養細胞への伝達を非効率的とする。放射標識化 *n* - ドコサノールを用いて決定したように、培養液に加えた *n* - ドコサノールの 1000 分子のうち 1 以下が、細胞に進入する。

【0209】

ウイルス複製の最適な障害が、HSV を *n* - ドコサノールの添加 6 ~ 24 時間で加えた、Ver o 細胞培養液で観察された。この観察は、抗ウイルス活性に対してあきらかに必要な事象である、時間依存取り込みおよび宿主細胞の *n* - ドコサノールの代謝によって説明される。*in vivo* でのこの代謝変換の速度は、組織培養系の人工環境において観察されたものより早い可能性があり、特に界面活性剤安定化粒子の温度安定性が考慮される。本明細書で報告した、*n* - ドコサノール処置細胞における HSV に対する抵抗性の段階的な欠失がまた、必要とされる脂質代謝のみではなく、一定に吸収され、置換される細胞膜それ自身の、急速な回転によると予想される。しかしながら、この急速な回転でも、ウイルス侵入が、取入れられていない薬剤の除去の後数時間、減少した。

10

【0210】

さらに、局所適用クリームが、*n* - ドコサノールの一定貯蔵として働き、皮膚表面に残る。入手可能なデータにより、*n* - ドコサノールが、ウイルス複製における早期事象を障害するが、細胞に接着する HSV の量は障害しない、宿主細胞における効果を示すことが示唆された。したがって、*n* - ドコサノールの、ウイルス侵入における革新的に早期の事象における効果が試験された。

【0211】

HSV - 1 (KOS) gL86 の HEp - 2 細胞への浸潤は、Ver o 細胞において、HSV - 1 または HSV - 2 産出 ($ID_{50} = 4 \text{ mM}$) またはプラーク形成 ($ID_{50} = 9 \text{ mM}$) の障害とほぼ等しく、濃度依存で ($ID_{50} = 7 \text{ mM}$) *n* - ドコサノールによって障害され (図 21)、*n* - ドコサノールが、ウイルス複製周期の早期事象を障害することが確かめられた。*-* ガラクトシダーゼ発現における *n* - ドコサノールの障害活性は、賦形剤のみのあきらかな刺激活性を中和するはずであるが、機構は明らかでない。HSV - 2 進入の *n* - ドコサノール障害がまた、ビリオン関連調節タンパク質の処置細胞内への放出の減少によって確認された (図 22)。 *n* - ドコサノール処置は、HSV 前初期プロモーター (ICP4) の制御か、安定にトランスフェクトされた lacZ 遺伝子を含む標的細胞における *-* ガラクトシダーゼの発現において、80% もの減少を引き起こした。 *n* - ドコサノール処置細胞内でのウイルス接着の障害の欠失と併せ、この観察により、*n* - ドコサノールが、ウイルス接着の後、ただし外皮タンパク質の放出前に起こる事象を障害することが確認された。これは、前早期進入事象であるが、核内のビリオン局在化に依存しない。ウイルス複製におけるさらなる早期事象はまた、*n* - ドコサノールによって障害される。

20

30

【0212】

n - ドコサノールは、ウイルス/細胞融合の生物物理学的工程を障害すると思われる。HSV エンベロープ内へ挿入される、塩化オクタデシルロードミン B の融合依存デクエンチングは、*n* - ドコサノール処置細胞にて有意に障害された (図 23)。蛍光障害の濃度依存性は、他の *in vitro* アッセイにおいて、*n* - ドコサノールによる HSV - 1 複製の障害に関して観察されたものと比例した。*n* - ドコサノールまたはその代謝物の取り込み、および正常の膜組成物の結果としての摂動が、接着ビリオンの融合を障害する方法で、細胞質膜の生物物理学的特性を変化させうる。この化合物は、進入の天然に存在する細胞メディエーターの機能を障害しうる。

40

【0213】

細胞質膜と HSV エンベロープ間の融合の障害、および続く複製事象の欠失は、*n* - ドコサノールの抗 HSV 活性に対する優れた機構であり得る。この活性機構は、一般的に、*n* - ドコサノールの障害効果に感受性のウイルスのスペクトルに対して適用可能であり得る。

【0214】

50

以上の記述は、本発明のいくつかの方法および材料を開示している。本発明は、この方法および材料の改変を許容し、また、制作方法および器具の変化も許容する。そのような改変は、本開示および本明細書にて開示された実施の考慮により、当業者に明らかになるであろう。その結果として、本発明は、本明細書にて開示された特定の実施形態に制限される意図はなく、全ての改変および変化が、付随する請求項にて組み込まれたような、本発明の意図および精神の範囲内である。本明細書で引用された全ての特許、明細書および他の参考文献は、その全てが参考文献として組み込まれている。

【図面の簡単な説明】

【0215】

【図1】単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)に関連する実験に対するものであり、無毛モルモットにおける、HSV-1誘導皮膚障害に対する、処方I(n-ドコサノール、10.0重量%;ステアリン酸スクロース、11.0重量%;ヤシ脂肪酸スクロース、5.0重量%;ミネラルオイル、8.0重量%;プロピレングリコール、5.0重量%;2-エチル-1,3-ヘキサジオール、2.7重量%;および精製水、58.3重量%)と、処方II(5重量%のステアリン酸スクロースを、ポリオキシプロピレン-15-ステアリルと同等量のジステアリン酸スクロースおよびエチルヘキサジオールに代えた以外は処方Iと同じ)およびZOVIAX(アシクロビル、Burroughs Wellcome Co., Research Triangle Park, NC;ウイルスDNAポリメラーゼの活性化を阻害するようなHSV感染の治療)の3つの異なる調製物での比較活性を表している。

10

20

【図2】単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)に関連する実験に対するものであり、処方I、処方II、および処方IA(n-ドコサノール、10.0重量%;ステアリン酸スクロース、11.0重量%;ヤシ脂肪酸スクロース、5.0重量%;ミネラルオイル、8.0重量%;プロピレングリコール、5.0重量%;ベンジルアルコール、2.7重量%;および精製水、58.3重量%)の比較活性を表す。

【図3A】単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)に関連する実験に対するものであり、処方Iと処方III(n-ドコサノール、10.0重量%;ステアリン酸スクロース、5.0重量%;ミネラルオイル、8.0重量%;プロピレングリコール、5.0重量%;ベンジルアルコール、2.7重量%;および精製水、58.3重量%)の比較活性を表している。

30

【図3B】単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)に関連する実験に対するものであり、相対的界面活性剤濃度について処方Iを改変した特定の処方の活性について比較をしたものを図示している。界面活性剤濃度の改変は、薬物活性の範囲に相当の悪影響を与えることが分かっている。

【図4】単純ヘルペスウイルスII型(HSV-2)に関連する実験に対するものであり、無毛モルモットにおけるHSV-2誘導皮膚障害の阻害に対する、処方IIIの投与量と反応の関係を表すデータを図示している。

【図5】単純ヘルペスウイルスII型(HSV-2)に関連する実験に対するものであり、スクロールエステル界面活性剤系に基づいた、クリーム含有n-ドコサノール(処方III)もまた、無毛モルモットにおけるHSV-2誘導皮膚障害を阻害することを図示している。

40

【図6A】小胞ができる前に使用した場合に、界面活性剤Pluronic F-68を用いて懸濁液として処方したn-ドコサノールがまた、HSV-1に誘導される小胞形成が阻害されることを実証するデータを図示している。この懸濁液処方、ベンジルアルコールを含む、n-ドコサノール含有クリームの賦形剤を含まない。

【図6B】小胞ができた後に使用した場合に、非イオン性界面活性剤Pluronic F-68中の懸濁液として処方したn-ドコサノールがまたHSV-1に誘導される小胞形成が阻害されることを実証するデータを図示している。この懸濁液処方、ベンジルアルコールを含む、n-ドコサノール含有クリームの賦形剤を含まない。

【図7】単純ヘルペスウイルスII型(HSV-2)に関連する実験に対するものであり

50

、*n*-ドコサノールの薬理学を説明するデータを表している。*n*-ドコサノールがアシクロビル耐性HSV-2を阻害することを示すデータを表している。Vero細胞を35mmウェル中で、培地のみ、または指示濃度のアシクロビル、*n*-ドコサノール-Pluronic F-68懸濁液、または対照懸濁液(Pluronic F-68のみ)の存在下で培養した(6分、ウェルごと10⁵細胞)。この培養物に24時間後に、150PFUの野生型HSV-2または、野性型HSV-2から実験室で単離したアシクロビル抵抗性のどちらかを接種させ、44時間後にブランク精製および20μg/mlのアシクロビル中を通し、プレートをインキュベートし、固定、染色してブランクの数を計測した。表示したデータは、2連の培養物から計測されたブランクを示す。アシクロビルまたは*n*-ドコサノールで処理した培養物において観察されたものを、非処理の対照培養物のものと比較した阻害率を丸かっこで示す。 10

【図8】単純ヘルペスウイルスII型(HSV-2)に関連する実験に対するものであり、*n*-ドコサノールの薬理学を説明するデータを表している。モルモットにおける皮膚HSVに対する*n*-ドコサノールの局所的エマルジョン処方用量反応を示すデータである。無毛モルモットの背中を洗浄して、入れ墨器具を用いて皮膚に刺すことにより、精製したHSV-2を接種した。ウイルスを接種して2時間後、接種部位を100μlのクリーム含有*n*-ドコサノールまたは対照賦形剤で処理するか、または処理しなかった。その部位について、ウイルスの接種の24、30、48、52、および56時間後に同様の処理をした。指示時間で、部位ごとの小胞の数を測定した。データは、測定ごと2連の部位から導いた小胞数の平均値および標準エラーとして表している。丸かっこ内の数字は、非処理部位と比較した、処理部位における小胞数の阻害率を示す。 20

【図9】単純ヘルペスウイルスII型(HSV-2)に関連する実験に対するものであり、*n*-ドコサノールの薬理学を説明するデータを表している。HSV-2が*n*-ドコサノール処理したVero細胞の表面に長時間残ることを示すデータである。Vero細胞を図7に記載のように培養し、一晚インキュベートした。この培養物を次に4℃まで冷却し、100PFUのHSV-2を接種させて4℃にて3時間インキュベートした。0時間において培養物を培地で洗浄し、新鮮な培地(指示阻害剤を含む)に接種し、37℃にてインキュベートした。それぞれの指示時間において、培養物をクエン酸塩緩衝液(pH2.5)で洗浄し、新鮮な培地(阻害剤を含まない)に接種した。全部で44時間インキュベーションした後、培養物を染色してHSV-2誘導ブランクを計測した。データは、群ごと3連の培養物から導いた、幾何学的平均値および標準エラーで表している。 30

【図10】*n*-ドコサノールの薬理学を説明するデータを表している。ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンの特性を示す*n*-[¹⁴C]ドコサノールの放射性代謝物のデータを示す。シリカ脂質画分のメタノール溶出物の一部(0.5ml)を窒素大気下で蒸留し、20μlのクロロホルム：メタノール(3：2；v：v)中に再懸濁させてシリカ薄層クロマトグラフィー(TLC)シート上につけた。クロロホルム：メタノール：酢酸：水(60：50：1：4；v：v：v：v)で展開後、ヨウ素蒸気で標準部位を染色し、プラスチックの後ろ側のシートを5mmの片に切った後、閃光分光分析により画分ごとのcpmを測定した。

【図11】*n*-ドコサノールの薬理学を説明するデータを表している。*n*-[¹⁴C]-ドコサノールがMDBK細胞によってよりも、Vero細胞によって多く代謝されることを示すデータである。VeroまたはMDBK細胞は記載のように平板培養した。*n*-[¹⁴C]-ドコサノールを6mM(0.24mM Tetronic 908)になるように加え、培養物を37℃/CO₂にて72時間インキュベートした。細胞を抽出して、ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸(20：30；1；v：v：v)を展開液として用いてTLCにより分析した。この溶媒系では、極性リン脂質はもとのままにとどまる。*n*-[¹⁴C]-ドコサノールの移動位置を示す。2連の平板培養地を、同一の放射性標識を含まない懸濁液で処理し、血球計算板を用いて、トリパンブルーを除いて細胞を計測した。 40

【図12】*n*-ドコサノールの薬理学を説明するデータを表している。*n*-ドコサノールが、Friendウイルス誘導白血病およびウイルス血症を*in vivo*で阻害するこ 50

とを示すデータである。成体のBALB/cマウスに、75の脾臓病巣形成FVユニットを静脈注射により注入した。処理群に対し、ウイルスの植菌と同日および続く3日間に毎日一回、指示用量のn-ドコサノールまたはPluronic賦形剤を単独で静脈注射により注入した。10日後に、それぞれの群の実験動物の半数について、脾臓中の白血球病巣を検査した(パネルA)。残りのマウスをさらに10日間維持管理し、ウイルス血症について測定するために出血させた(パネルB)。X-Cプラーク検定によりウイルス血症を測定した。簡単に言えば、初期の線維芽細胞培養物は、14日齢のBALB/c胚をトリプシンにより消化し、10%のウシ胎児血清を含むDMEM中で培養することにより得られる。72時間後、細胞を16mmの皿(10^5 /ウェル)中に移し、 $5\mu\text{g/ml}$ のポリブレンで前処理し、次にFriendウイルス株の75X-Cプラーク形成ユニットまたは試験血漿の希釈物を感染させた。7日間インキュベートした後、培養物に放射線を照射し、X-C細胞で覆った(3×10^5 /ウェル)。3日後に培養物を洗浄し、染色して、多核化巨大細胞のプラークを計測した。表示したデータは、群ごと3匹から得た、脾臓病巣またはX-Cプラーク形成ユニットの幾何学的な平均値および標準エラーである。

【図13】n-ドコサノールの薬理学を説明するデータを表している。n-ドコサノールにより、PHA/IL-2活性化ヒト末梢血単核細胞の培養物中のHIV-1の複製が*in vitro*で阻害されることを示すデータである。ヒト末梢血単核細胞を、5ユニット/mlのIL-2を含む $1\mu\text{g/ml}$ のPHAを単独で、またはさらに $100\mu\text{g/ml}$ のPFAも、n-ドコサノール/Pluronic F68の指示用量で、または高用量のn-ドコサノール/Pluronic F68に含まれるPluronic F-68対照賦形剤の量を含む培地で培養した。一晚インキュベートした後、培養物を1ビリオン/細胞の多重度でHIV-1を植菌した。37℃にて24時間インキュベートした後、培養物を洗浄し、PHAおよびIL-2を含むが阻害剤を含まない新鮮な培地でインキュベートした。4日後に、HIV-1に対するp24特異的ELISAによりHIV-1の複製を測定した。

【図14】n-ドコサノール10重量%クリームを用いた急性HSLの治療における、回復の経過についてのKaplan-Meier分布を図示している。治療の開始から全ての局所的な兆候および症状が臨床的に観察されるまで、回復の経過を測定した。

【図15】無毛モルモットにおける、PEG処方を用いたHSV-1阻害をグラフ表示したものである。

【図16】無毛モルモットにおける、PEG処方を用いたHSV-2阻害をグラフ表示したものである。

【図17】無毛モルモットにおける、HSV-2小胞の数をグラフ表示したものである。

【図18】Hartleyモルモットにおける、HSV-2阻害をグラフ表示したものである。

【図19】Hartleyモルモットにおける、HSV-2小胞の数をグラフ表示したものである。

【図20】細胞をウイルス付加の前にn-ドコサノールでインキュベートした際の、HSV-1の増加の阻害を示し、この阻害効果の半減期はおおよそ3時間である。(A) Vero細胞を平板培養して、9mMのn-ドコサノール、対応する対照培地で、または何も付加せず、HSV-1の付加に先立って0、3、6、または24時間インキュベートした。ウイルスプラーク検定を続け、p.f.u.の数を測定した。データは非処理のウェルと比較した阻害率として表す。(B) Vero細胞を平板培養し、n-ドコサノールまたは対応する対照培地を加えて、細胞を10%の加湿CO₂中で37℃にてインキュベートした。21、24、25、26、および27時間後(HSV-1付加の6、3、2、1、および0時間前)に、薬剤を含有している培地を除去し、細胞を培地で洗浄した。全部で27時間後、HSV-1を全てのウェルに加えた。2時間後にウイルス含有賦形剤を除去し、ウイルスまたは薬剤を含まない新鮮な培地に取り替えた。培養物を(A)と同様の手法で、インキュベートしてHSV誘導プラークの数を測定した。

【図21】n-ドコサノール処理細胞中でインキュベートした際の、HSV-1(KOS

）g L 8 6 の H E p - 2 への進入を示す。培養物のウェルへの H E p 2 細胞の接着の後、n - ドコサノール - 賦形剤、賦形剤のみを添加、または薬剤を加えなかった（対照）。感染させてから 5 ～ 6 時間後、細胞に X - g a l を加え、6 0 0 n m での吸光度を測定した。

【図 2 2】T e t r o n i c 9 8 で懸濁させた n - ドコサノールが、H S V - 2 (3 3 3) の C H O - I E 8 細胞への侵入を阻害することをグラフで明示したものである。C H O - I E 8 細胞を 2 4 ウェルのプレート中にまいた。X - g a l を加え、6 0 0 n m での吸光度を測定した。

【図 2 3】n - ドコサノール処理した N C - 3 7 ヒト B 細胞についての実験結果をグラフで表示したものであり、その細胞は、塩化オクタデシルローダミン B で標識した H S V - 2 により、融合の減少をみせている。N C - 3 7 ヒト B 細胞を、1 5 m M の n - ドコサノール、対応する濃度の T e t r o n i c 9 0 8 (0 . 1 m M) の存在下で、または何も加えずにインキュベートした。細胞を集めて、化合物がそれぞれ元の濃度で存在するところで R - 1 8 標識した H S V - 2 を等分に加えた。続いて 3 7 にて指示時間でインキュベートし、細胞を固定して F A C スキャンにより蛍光強度を測定した。

10

【図 1】

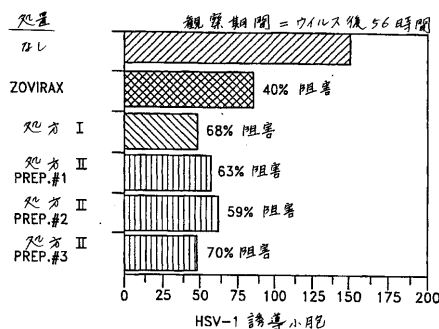


FIG. 1

【図 2】

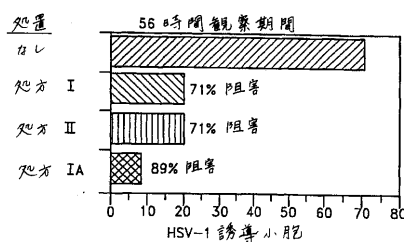


FIG. 2

【図 3 A】

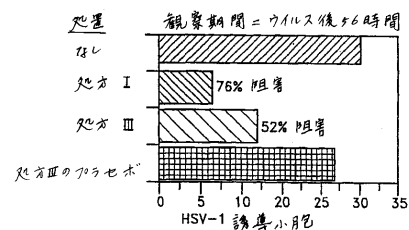


FIG. 3A

【図 3 B】

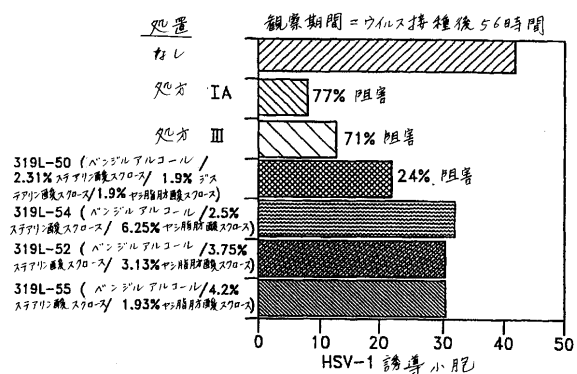


FIG. 3B

【図 4】

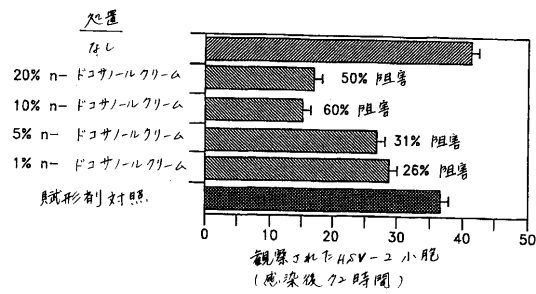


FIG. 4

【図 6 A】

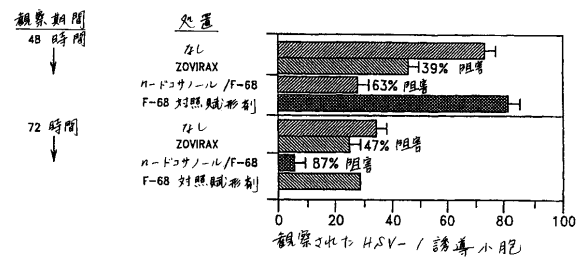


FIG. 6A

【図 5】

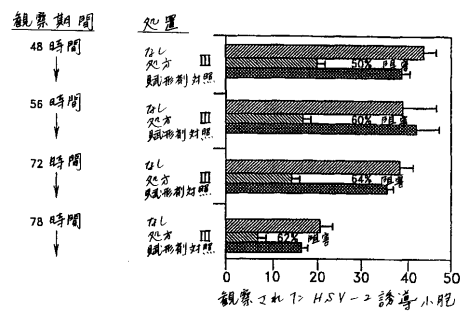


FIG. 5

【図 6 B】

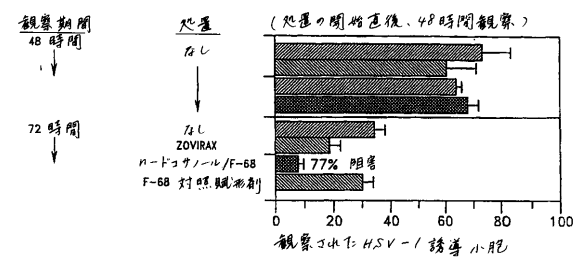


FIG. 6B

【図 7】

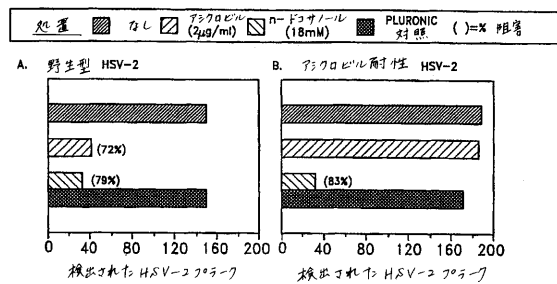


FIG. 7

【図 9】

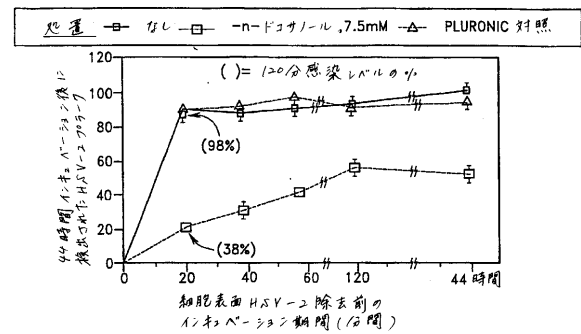


FIG. 9

【図 8】

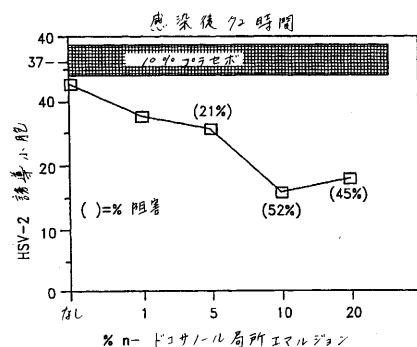


FIG. 8

【図 10】

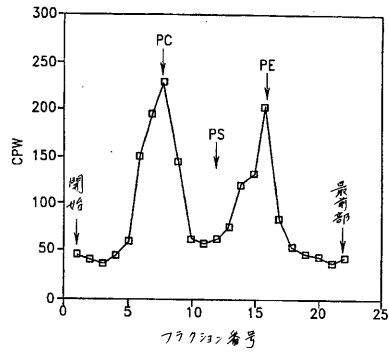


FIG. 10

【図 11】

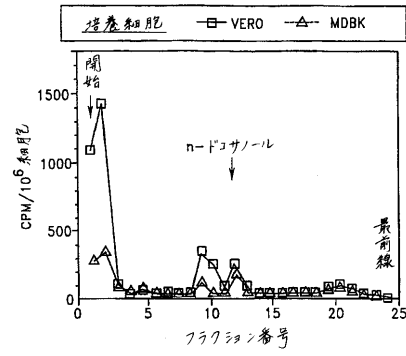


FIG. 11

【図 12】

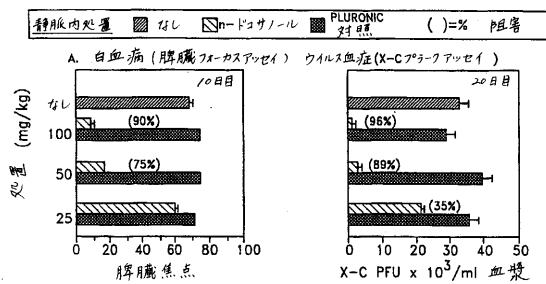


FIG. 12

【図 13】

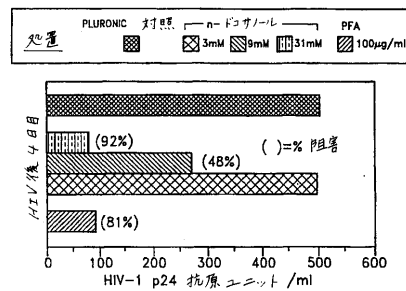


FIG. 13

【図 14】

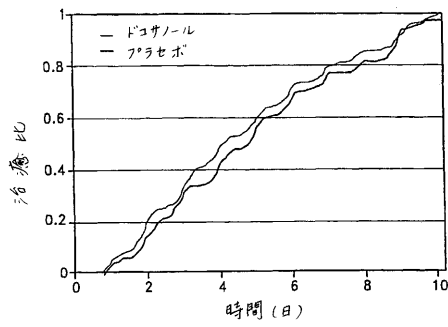


FIG. 14

【図 15】

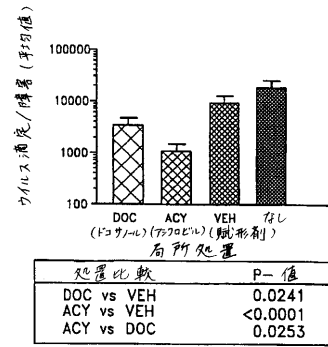


FIG. 15

【図 16】

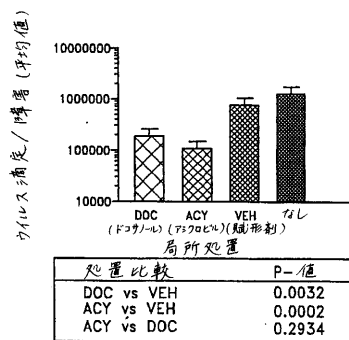


FIG. 16

【図 17】

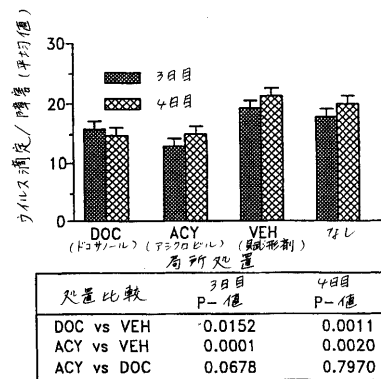


FIG. 17

【図 18】

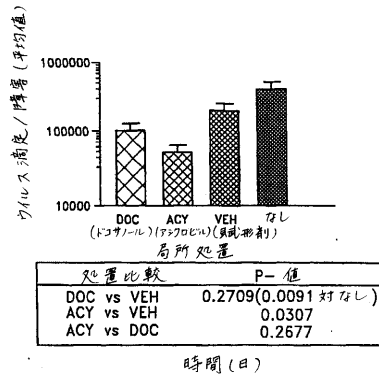


FIG.18

【図 19】

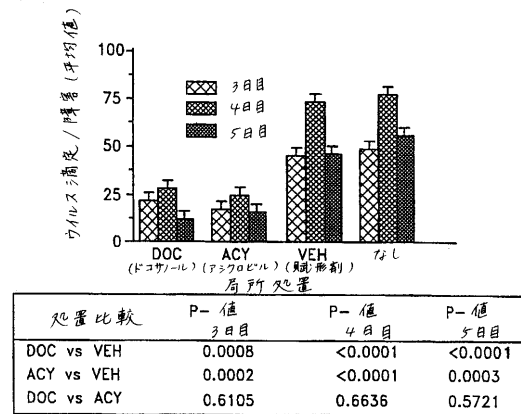


FIG.19

【図 20】

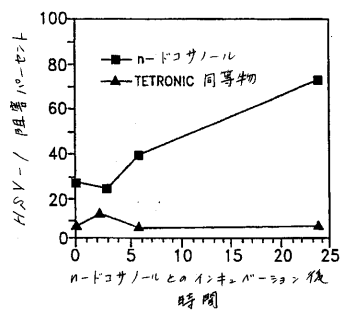


FIG.20A

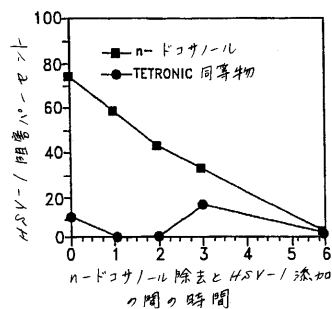


FIG.20B

【図 21】

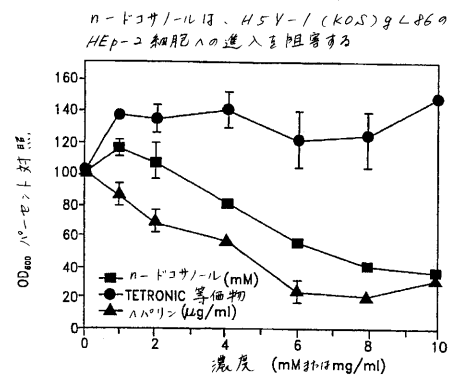


FIG.21

【図 22】

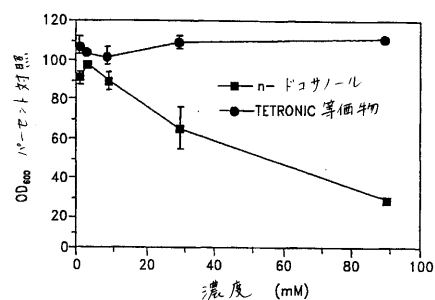


FIG.22

【図 23】

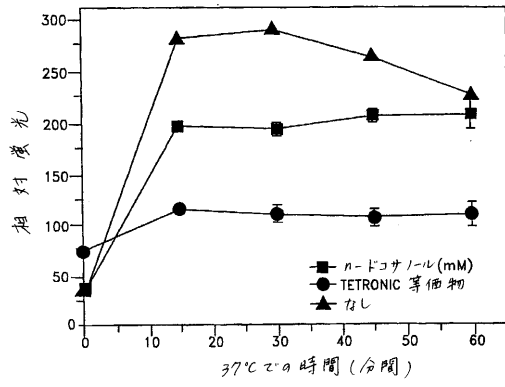


FIG.23

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/33019																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 47/10 US CL : 514/724, 886, 969 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) U.S. : 514/724, 886, 969 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) west																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y, P</td> <td>US 6,342,537 B1 (THOMSEN et al.) 29 January 2002 (29.01.2002), see entire document.</td> <td>1-24</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,948,822 A (POPE et al.) 7 September 1999 (07.09.1999), see entire document.</td> <td>1-24</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y, P	US 6,342,537 B1 (THOMSEN et al.) 29 January 2002 (29.01.2002), see entire document.	1-24	Y	US 5,948,822 A (POPE et al.) 7 September 1999 (07.09.1999), see entire document.	1-24									
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
Y, P	US 6,342,537 B1 (THOMSEN et al.) 29 January 2002 (29.01.2002), see entire document.	1-24																		
Y	US 5,948,822 A (POPE et al.) 7 September 1999 (07.09.1999), see entire document.	1-24																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="2"> * Special categories of cited documents: </td> <td> "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 </td> </tr> <tr> <td> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance </td> <td> "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 </td> <td></td> </tr> <tr> <td> "E" earlier application or patent published on or after the international filing date </td> <td> "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 </td> <td></td> </tr> <tr> <td> "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) </td> <td> "&" document member of the same patent family </td> <td></td> </tr> <tr> <td> "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means </td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td> "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:		"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	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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		"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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		"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)	"&" document member of the same patent family		"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		
* Special categories of cited documents:		"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																		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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																			
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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																			
"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)	"&" document member of the same patent family																			
"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																				
Date of the actual completion of the international search 03 March 2003 (03.03.2003)		Date of mailing of the international search report 28 JUL 2003																		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Lakshmi S Channavajjala</i> Telephone No. 703-308-1235																		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/44	A 6 1 K 47/44	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100109162

弁理士 酒井 将行

(72)発明者 カッツ,デービッド・エイチ

アメリカ合衆国、9 2 0 3 7 カリフォルニア州、ラ・ホーヤ、ラ・ホーヤ・ランチョ・ロード、
1 7 7 5

(72)発明者 ハリール,モハメド・エイチ

アメリカ合衆国、9 2 1 3 0 カリフォルニア州、サン・ディエゴ、スミス・キャニオン・コート
、4 9 5 8

(72)発明者 ポープ,ローラ・イー

アメリカ合衆国、9 2 0 0 6 カリフォルニア州、カールズバッド、カリェ・マドリード、7 9 6
7

(72)発明者 マーセレッティ,ジョン・エフ

アメリカ合衆国、9 2 1 2 0 カリフォルニア州、サン・ディエゴ、ガラ、5 4 4 3

F ターム(参考) 4C076 AA06 AA17 BB21 BB31 CC04 CC35 DD37 DD46 DD68 EE52

4C206 AA01 AA02 CA03 MA03 MA05 MA28 MA48 MA76 MA83 ZB11

ZB33