(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5864560号
(P5864560)

(45)発行日　平成28年2月17日(2016.2.17)　(24)登録日　平成28年1月8日(2016.1.8)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 31/675	(2006.01)	A61K	31/675
A61P 31/22	(2006.01)	A61P	31/22
A61K 47/38	(2006.01)	A61K	47/38
A61K 47/14	(2006.01)	A61K	47/14
A61K 47/10	(2006.01)	A61K	47/10

請求項の数 14　(全 24 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2013-514314(P2013-514314)
(86)(22)出願日	平成23年6月7日(2011.6.7)
(65)公表番号	特表2013-528219(P2013-528219A)
(43)公表日	平成25年7月8日(2013.7.8)
(86)国際出願番号	PCT/US2011/039505
(87)国際公開番号	WO2011/156416
(87)国際公開日	平成23年12月15日(2011.12.15)
審査請求日	平成26年6月6日(2014.6.6)
(31)優先権主張番号	61/426,373
(32)優先日	平成22年12月22日(2010.12.22)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	61/357,892
(32)優先日	平成22年6月23日(2010.6.23)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　500029420
ギリアード　サイエンシーズ，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４４０４，フォスター　シティ，　レイクサイド　ドライブ　３３３
(73)特許権者　512317261
カリム，　クライシャ　アブドゥール
南アフリカ共和国　４０１３　ダーバン，　プライベート　バッグ　７　コンジェラ，　ユニバーシティ　オブ　クワズール－ナタール，　ネルソン　アール　マンデラ　スクール　オブ　メディシン，　カプリサ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＨＳＶ－２の伝播を防ぐための局所用抗ウイルス処方物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
哺乳動物へのＨＳＶ－２の伝播または哺乳動物によるＨＳＶ－２の獲得を低減するか、または防ぐための組成物であって、該組成物は、抗ウイルス化合物を含み、該抗ウイルス化合物は、（Ｒ）－（１－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）プロパン－２－イルオキシ）メチルホスホン酸（テノホビル）または（Ｒ）－（１－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）プロパン－２－イルオキシ）メチルホスホン酸二リン酸無水物（テノホビルジホスフェート）を含む、組成物。
【請求項２】
ゲルとしてヒト女性の膣に適用されることを特徴とする、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
性行為の前に適用されることを特徴とする、請求項２に記載の組成物。
【請求項４】
性行為の後に適用されることを特徴とする、請求項２に記載の組成物。
【請求項５】
性行為の前および性行為の後に適用されることを特徴とする、請求項２に記載の組成物。
【請求項６】
１日１回または２回適用されることを特徴とする、請求項２に記載の組成物。
【請求項７】
前記組成物は、

成分	（％ｗ／ｗ）
テノホビル	０．２～２．００
ヒドロキシエチルセルロース、ＮＦ（Ｎａｔｒａｓｏｌ（登録商標）２５０Ｈ）	１～５．０
プロピルパラベン、ＮＦ	０．０１～０．１０
メチルパラベン、ＮＦ	０．１～０．２５
エデト酸二ナトリウム、ＵＳＰ	０．０２～０．１０
グリセリン、ＵＳＰ	３．００～３０．００
クエン酸、ＵＳＰ	０．５～２．００
純水、ＵＳＰ	１００％まで

を含む、請求項２に記載の組成物。

【請求項８】

水酸化ナトリウムおよび塩酸は、ｐＨを４．４に調整するために加えられる、請求項７に記載の組成物。

【請求項９】

前記組成物は、

	％ｗ／ｗ
テノホビル	１．００
ヒドロキシエチルセルロース、ＮＦ（Ｎａｔｒａｓｏｌ（登録商標）２５０Ｈ）	２．５０
プロピルパラベン、ＮＦ	０．０２
メチルパラベン、ＮＦ	０．１８
エデト酸二ナトリウム、ＵＳＰ	０．０５
グリセリン、ＵＳＰ	２０．００
クエン酸、ＵＳＰ	１．００
純水、ＵＳＰ	７５．２５
合計	１００．００

を含む、請求項２に記載の組成物。

【請求項１０】

水酸化ナトリウムおよび塩酸は、ｐＨを４．４に調整するために加えられる、請求項９に記載の組成物。

【請求項１１】

コンドーム上にコーティングされることを特徴とする、請求項１０に記載の組成物。

【請求項１２】

哺乳動物へのＨＳＶ－２の伝播を低減するか、または防ぐための組成物であって、（Ｒ）－（１－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）プロパン－２－イルオキシ）メチルホスホン酸を含む、組成物。

【請求項１３】

哺乳動物によるＨＳＶ－２の獲得を低減するか、または防ぐための組成物であって、（Ｒ）－（１－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）プロパン－２－イルオキシ）メチルホスホン酸を含む、組成物。

【請求項１４】

（Ｒ）－（１－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）プロパン－２－イルオキシ）メチルホスホン酸は、ゲルとして処方され、ここで前記組成物は、

	％ｗ／ｗ
テノホビル	１．００
ヒドロキシエチルセルロース、ＮＦ（Ｎａｔｒａｓｏｌ（登録商標）２５０Ｈ）	２．５０
プロピルパラベン、ＮＦ	０．０２
メチルパラベン、ＮＦ	０．１８

エデト酸二ナトリウム、ＵＳＰ	０．０５
グリセリン、ＵＳＰ	２０．００
クエン酸、ＵＳＰ	１．００
純水、ＵＳＰ	７５．２５
合計	１００．００

を含む、請求項１２または１３に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本願は、２０１０年６月１１に出願された米国仮特許出願第６１／３５４，０５０号、２０１０年６月２３に出願された米国仮特許出願第６１／３５７，８９２号、２０１０年１２月２２に出願された米国仮特許出願第６１／４２６，３７３号に対する優先権を主張し、これらのそれぞれの全体は、本明細書中で参考として援用される。

【０００２】

発明の分野

本発明は、一般に、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ－１およびＨＳＶ－２）、特にＨＳＶ－２の獲得および伝播を防ぐことにおいて使用するための抗ウイルス活性を有する化合物の処方物に関する。

【背景技術】

【０００３】

発明の背景

ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）感染および関連する疾患は、世界的に主要な公衆衛生問題である。抗ウイルス剤での処置によって、ＡＩＤＳ患者の生命を延長することにおいて大きな前進をしたが、完全な治療は存在しない。

【０００４】

単純ヘルペスウイルス２（ＨＳＶ－２）は、世界的に主要な公衆衛生問題である別の疾患である。ＨＳＶ－２は、世界中の性的に活発な成人の２０％において存在し、ＨＩＶを負う男性および女性において、ＨＳＶ－２感染の有病率は、８０％まで上昇し得ることが推定される。それは、性器潰瘍疾患の最も一般的な原因であるが、ほとんど完全に無症候である。

【０００５】

性感染ＨＩＶの流行とＨＳＶ－２との間の実質的な繋がりがあることが実証されており、ここでＨＳＶ－２の存在がＨＩＶの獲得を容易にする。例えば、３０を超える疫学研究により、流行するＨＳＶ－２は、ＨＩＶの伝播および獲得の２倍～４倍増加したリスクに関連することが実証されていることが開示される非特許文献１を参照のこと。

【０００６】

従って、ＨＩＶ／ＡＩＤＳおよび関連する疾患の獲得の問題に対する１つのアプローチは、新たに感染する個体の数を低減するためにＨＩＶおよびＨＳＶ－２の伝播のリスクを低減することである。また、多くの国々において、女性は、男性と比較して不均衡にＨＩＶ感染に冒されること（男性から女性へのＨＩＶの伝播は、女性から男性へと比較すると、７倍大きい効率を有することが推定される）を考慮すると、好ましいアプローチは、ＨＩＶおよびＨＳＶ－２に対して有効であり、女性達のパートナーが同意していてもしていなくても、または知っていても知らなくても、女性によって使用され得る組成物を提供することである。

【０００７】

［２－（６－アミノ－プリン－９－イル）－１－メチル－エトキシメチル］－ホスホン酸（テノホビル、ＰＭＰＡ）は、ＡＩＤＳを有する患者の処置において有用である強い抗レトロウイルス活性を有する周知の化合物である。例えば、テノホビルゲル処方物が開示される特許文献１を参照のこと。このテノホビルゲル処方物を用いて南アフリカにおいて行われた最近の臨床試験の結果により、上記処方物がＨＩＶの伝播を防ぐことにおいて有

効であるという主張が確かめられ（非特許文献２）、また、同じテノホビルゲル処方物が、ＨＳＶ－２の伝播を妨げることおよび／または防ぐことにおいて有効であることが実証された。テノホビルは強い抗レトロウイルス剤であることが知られていると以前の刊行物は示しているが、抗ヘルペス剤として有効であることは、以前に知られていなかったことを考慮すると、このことは驚くべきことである（例えば、非特許文献３、非特許文献４、および非特許文献５を参照のこと）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【特許文献１】国際公開第２００６／０１７０４４号

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Ｌａｗｒｅｎｃｅ Ｃｏｒｅｙらによる「Ｔｈｅ Ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ Ｈｅｒｐｅｓ Ｓｉｍｐｌｅｘ Ｖｉｒｕｓ－２ ｏｎ ＨＩＶ ａｃｑｕｉｓｉｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｍｉｓｓｉｏｎ」，Ｊ． Ａｃｑｕｉｒ． Ｉｍｍｕｎｅ Ｄｅｆｉｃ． Ｓｙｎｄｒ．，２００４；３５（５）
【非特許文献２】Ａｂｄｏｏｌ Ｋａｒｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０１０；３２９：１１６８－１１７４
【非特許文献３】Ｊ．Ｂａｌｚａｒｉｎｉ ｅｔ ａｌ．による「Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ Ａｎｔｉｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ ａｎｄ Ａｎｔｉｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ｔｈｅ （Ｓ） ａｎｄ （Ｒ） Ｅｎａｎｔｉｏｍｅｒｓ ｏｆ Ａｃｙｃｌｉｃ Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ Ｐｈｏｓｐｈｏｎａｔｅｓ」，Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ａｇｅｎｔｓ ａｎｄ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ，Ｆｅｂ．１９９３，ｐ３１２－３３８
【非特許文献４】Ｎｏｅｓａｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ８（１），ｐ１－２３（１９７７）
【非特許文献５】Ｄｅ Ｃｌｅｒｑ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ，Ｖｏｌ．１６，Ｎｏ４，ｐ５６９－５９６（２００３）

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１０】

発明の概要

本発明は、局所用（例えば、膣、直腸など）適用に適した抗ウイルス活性を有する化合物、特に［２－（６－アミノ－プリン－９－イル）－１－メチル－エトキシメチル］－ホスホン酸（テノホビル、ＰＭＰＡ）の処方物、ならびにＨＳＶ－１感染およびＨＳＶ－２感染の獲得および伝播を妨げることおよび／または防ぐことにおけるそれらの使用に関する。

【００１１】

１つの実施形態において、上記処方物は、ヒト女性の膣に適用（ａｐｐｌｙ）されるゲルである。上記ゲルは、１日１回または２回、性行為の前、または性行為の後、または性行為の前および性行為の後に適用される。上記ゲル処方物の１つの実施形態は、テノホビル、ヒドロキシエチルセルロース、プロピルパラベン、メチルパラベン、エデト酸二ナトリウム、グリセリン、クエン酸、および１００％までの純水の混合物を含み、ｐＨを約４．４に調整するために少量の１０％ｗ／ｗ水酸化ナトリウムおよび１０％ｗ／ｗ希塩酸を加えることを伴う。１つの例において、上記ゲル処方物は：

成分	（％ｗ／ｗ
テノホビル	０．２～２．００
ヒドロキシエチルセルロース、ＮＦ（Ｎａｔｒａｓｏｌ（登録商標）２５０Ｈ）	１～５．０
プロピルパラベン、ＮＦ	０．０１～０．１０

メチルパラベン、ＮＦ	０．１～０．２５
エデト酸二ナトリウム、ＵＳＰ	０．０２～０．１０
グリセリン、ＵＳＰ	３．００～３０．００
クエン酸、ＵＳＰ	０．５～２．００
純水、ＵＳＰ	１００％まで

を含み、ｐＨを約４．４に調整するために少量の１０％ｗ／ｗ水酸化ナトリウムおよび１０％ｗ／ｗ希塩酸を加えることを伴う。

【００１２】

上記ゲル処方物の１つの実施形態は：

	％ｗ／ｗ
テノホビル	１．００
ヒドロキシエチルセルロース、ＮＦ（Ｎａｔｒａｓｏｌ（登録商標）２５０Ｈ）	２．５０
プロピルパラベン、ＮＦ	０．０２
メチルパラベン、ＮＦ	０．１８
エデト酸二ナトリウム、ＵＳＰ	０．０５
グリセリン、ＵＳＰ	２０．００
クエン酸、ＵＳＰ	１．００
純水、ＵＳＰ	７５．２５
合計	１００．００

を含み、ｐＨを約４．４の標的に調整するために少量の１０％ｗ／ｗ水酸化ナトリウムおよび１０％ｗ／ｗ希塩酸を加えることを伴う。

【００１３】

上記ゲル処方物の第２の実施形態は：

	％ｗ／ｗ
テノホビル	１．００
ヒドロキシエチルセルロース、ＮＦ（Ｎａｔｒａｓｏｌ（登録商標）２５０Ｈ）	３．０
プロピルパラベン、ＮＦ	０．００５
メチルパラベン、ＮＦ	０．２２
エデト酸二ナトリウム、ＵＳＰ	０．０５
グリセリン、ＵＳＰ	５．０
クエン酸、ＵＳＰ	１．００
純水、ＵＳＰ	８９．６６
合計	１００．００

を含み、ｐＨを約４．４の標的に調整するために少量の１０％ｗ／ｗ水酸化ナトリウムおよび１０％ｗ／ｗ希塩酸を加えることを伴う。

【００１４】

上記ゲル処方物の第３の実施形態は：

	％ｗ／ｗ
テノホビル	１．００
ヒドロキシエチルセルロース、ＮＦ（Ｎａｔｒａｓｏｌ（登録商標）２５０Ｈ）	３．２５
プロピルパラベン、ＮＦ	０．００５
メチルパラベン、ＮＦ	０．２２
エデト酸二ナトリウム、ＵＳＰ	０．０５
グリセリン、ＵＳＰ	５．０
クエン酸、ＵＳＰ	１．００
純水、ＵＳＰ	８９．４１
合計	１００．００

を含み、ｐＨを約４．４の標的に調整するために少量の１０％ｗ／ｗ水酸化ナトリウムおよび１０％ｗ／ｗ希塩酸を加えることを伴う。

【００１５】

上記ゲル処方物の第４の実施形態は：

	％ｗ／ｗ
テノホビル	１．００
ヒドロキシエチルセルロース、ＮＦ（Ｎａｔｒａｓｏｌ（登録商標）２５０Ｈ）	３．５
プロピルパラベン、ＮＦ	０．００５
メチルパラベン、ＮＦ	０．２２
エデト酸二ナトリウム、ＵＳＰ	０．０５
グリセリン、ＵＳＰ	５．０
クエン酸、ＵＳＰ	１．００
純水、ＵＳＰ	８９．１６
合計	１００．００

を含み、ｐＨを約４．４の標的に調整するために少量の１０％ｗ／ｗ水酸化ナトリウムおよび１０％ｗ／ｗ希塩酸を加えることを伴う。

【００１６】

本発明の別の実施形態は、哺乳動物へのＨＳＶ－２の伝播を低減すること、または防ぐことにおいて使用するため、および哺乳動物によるＨＳＶ－２の獲得を低減すること、または防ぐことにおいて使用されるための（Ｒ）－（１－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）プロパン－２－イルオキシ）メチルホスホン酸に関し、特にここで、（Ｒ）－（１－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）プロパン－２－イルオキシ）メチルホスホン酸は、ゲルとして処方され、ここでその処方物は：

	％ｗ／ｗ
テノホビル	１．００
ヒドロキシエチルセルロース、ＮＦ（Ｎａｔｒａｓｏｌ（登録商標）２５０Ｈ）	２．５０
プロピルパラベン、ＮＦ	０．０２
メチルパラベン、ＮＦ	０．１８
エデト酸二ナトリウム、ＵＳＰ	０．０５
グリセリン、ＵＳＰ	２０．００
クエン酸、ＵＳＰ	１．００
純水、ＵＳＰ	７５．２５
合計	１００．００

を含む。

【００１７】

本発明は、一般に、性行為を通したＨＳＶ－１およびＨＳＶ－２の伝播のリスクを防ぎ、そして／または低減する組成物および方法に関する。それは、主に異性愛の行為（すなわち、男性／女性の膣性交）に向けられるが、本発明の組成物は、他のタイプの性的行動に携わる集団にも有用である。例えば、本発明の組成物は、肛門性交（男性／女性または男性／男性）に携わる集団によって使用され得；肛門性交において使用されることが意図される本発明の組成物は、好ましくは、緩衝能を、直腸において通常見出されるｐＨ値に調整するために、および上記処方物の潤滑性を変更することによって改変される。

【００１８】

異性愛の膣性交のために、上記組成物は、性交前に膣に挿入され得る。肛門性交（異性愛または同性愛）のために、上記組成物は、性交前に直腸に挿入され得る。膣性交または肛門性交のいずれかのために、上記組成物は、潤滑剤としても働き得る。追加の保護のために、一般に、上記組成物が、性交または他の性行為の前に適用されること、および適宜コンドームが使用されることが好ましい。さらにさらなる保護のために、上記組成物は、

性行為の完了後にできるだけ早く再適用され得る。

【００１９】

所望される場合、着香料、香気（ｓｃｅｎｔ）、芳香剤、および着色剤は、上記組成物の安全性または効力に干渉しない限り、上記組成物中に組み込まれ得る。実際に、本発明の組成物へのこのような着香料、香気、芳香剤、および着色剤の組込みは、上記組成物が性行為中に使用される見込みを増加させ得る。

【００２０】

本方法の１つの利点は、異性愛者、両性愛者、および同性愛者による多種多様な性行為（膣または肛門）中に保護のために使用され得ることである。ＨＩＶ、ＨＳＶ－１、およびＨＳＶ－２の伝播を低減する本方法の別の利点は、この方法が、挿入される集団によって最も容易に実行され得、そして／または使用され得ることである。従って、女性は、方法が使用されていることをパートナーが知っていても知らなくても、彼女自身を（彼女のパートナーをも）保護するために本発明を使用し得る。さらに、パートナーは、彼または彼女のパートナーの、ＡＩＤＳのないことの主張、または保護のためにコンドームを使用することに対する合意に依存することを必要とされない。性的集団のいずれか、または両方（特に女性の参加者）は、本方法の使用を開始し得、実行し得る。好ましくは、上記方法は性行為の前に使用され、最も好ましくは性行為の前および後の両方に使用される。

本発明の好ましい実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

（項目１）

哺乳動物へのＨＳＶ－２の伝播を低減するか、または防ぐための医薬の製造のための抗ウイルス化合物の使用。

（項目２）

哺乳動物によるＨＳＶ－２の獲得を低減するか、または防ぐための医薬の製造のための抗ウイルス化合物の使用。

（項目３）

前記抗ウイルス化合物は、（Ｒ）－（１－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）プロパン－２－イルオキシ）メチルホスホン酸（テノホビル）または生理学的に機能的なその誘導体を含む、項目１および２に記載の使用。

（項目４）

前記処方物は、ゲルとしてヒト女性の膣に適用される、項目３に記載の使用。

（項目５）

前記処方物は、性行為の前に適用される、項目４に記載の使用。

（項目６）

前記処方物は、性行為の後に適用される、項目４に記載の使用。

（項目７）

前記処方物は、性行為の前および性行為の後に適用される、項目４に記載の使用。

（項目８）

前記処方物は、１日１回または２回適用される、項目４に記載の使用。

（項目９）

前記処方物は、

成分	（％ｗ／ｗ
テノホビル	０．２～２．００
ヒドロキシエチルセルロース、ＮＦ（Ｎａｔｒａｓｏｌ（登録商標）２５０Ｈ）	１～５．０
プロピルパラベン、ＮＦ	０．０１～０．１０
メチルパラベン、ＮＦ	０．１～０．２５
エデト酸二ナトリウム、ＵＳＰ	０．０２～０．１０
グリセリン、ＵＳＰ	３．００～３０．００
クエン酸、ＵＳＰ	０．５～２．００
純水、ＵＳＰ	１００％まで

を含む、項目４に記載の使用。
（項目１０）
水酸化ナトリウムおよび塩酸は、ｐＨを４．４に調整するために加えられる、項目９に記載の使用。
（項目１１）
前記処方物は、

	%ｗ／ｗ
テノホビル	１．００
ヒドロキシエチルセルロース、ＮＦ（Ｎａｔｒａｓｏｌ（登録商標）２５０Ｈ）	２．５０
プロピルパラベン、ＮＦ	０．０２
メチルパラベン、ＮＦ	０．１８
エデト酸二ナトリウム、ＵＳＰ	０．０５
グリセリン、ＵＳＰ	２０．００
クエン酸、ＵＳＰ	１．００
純水、ＵＳＰ	７５．２５
合計	１００．００

を含む、項目４に記載の使用。
（項目１２）
水酸化ナトリウムおよび塩酸は、ｐＨを４．４に調整するために加えられる、項目１１に記載の使用。
（項目１３）
前記処方物は、コンドーム上にコーティングされる、項目１２に記載の使用。
（項目１４）
哺乳動物へのＨＳＶ－２の伝播を低減すること、または防ぐことにおいて使用するための（Ｒ）－（１－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）プロパン－２－イルオキシ）メチルホスホン酸。
（項目１５）
哺乳動物によるＨＳＶ－２の獲得を低減すること、または防ぐことにおいて使用するための（Ｒ）－（１－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）プロパン－２－イルオキシ）メチルホスホン酸。
（項目１６）
（Ｒ）－（１－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）プロパン－２－イルオキシ）メチルホスホン酸は、ゲルとして処方され、ここで前記処方物は、

	%ｗ／ｗ
テノホビル	１．００
ヒドロキシエチルセルロース、ＮＦ（Ｎａｔｒａｓｏｌ（登録商標）２５０Ｈ）	２．５０
プロピルパラベン、ＮＦ	０．０２
メチルパラベン、ＮＦ	０．１８
エデト酸二ナトリウム、ＵＳＰ	０．０５
グリセリン、ＵＳＰ	２０．００
クエン酸、ＵＳＰ	１．００
純水、ＵＳＰ	７５．２５
合計	１００．００

を含む、項目１４および１５に記載の使用。
【発明を実施するための形態】
【００２１】
最近、潜在的な殺菌剤として新たな化合物を試験する代わりに、ＨＩＶ治療において広く使用される高度に選択的および効率的なヌクレオチドＨＩＶ逆転写酵素（ＲＴ）インヒ

ビターであるテノホビルは、１％ゲルとして処方され、二重盲検プラセボ対照試験において約９００人のアフリカ人女性について試験された。この試験の結果は、ＨＩＶ－１の性感染の頻度において３９％の全体的な減少を示した。テノホビル処置に対して高いアドヒアランスを有する女性の間で、伝播の５４％の低減までこの予防効果はさらに高まった。従って、この試験は、ＨＩＶ－１の伝播を圧倒的に減少させる殺菌剤の最初の例となった。

【００２２】

驚くべきことに、単純ヘルペスウイルス２型（ＨＳＶ－２）の獲得のリスクの５１％の顕著な低減も上記試験において観測された。ＨＳＶ－２は、おそらく性器潰瘍化および炎症を誘導することによってＨＩＶ伝播を容易にするＨＩＶ－１と共通の共病原体（ｃｏｐａｔｈｏｇｅｎ）であるので、この観測は重要である。ＨＳＶにおけるテノホビルゲルのこの効果は、この高度に強い抗レトロウイルス性かつ抗ヘパドナウイルス性薬物が、ＨＳＶおよびほとんどの他のＤＮＡウイルスに対して、あったとしても最小のインビトロ活性を示すことが以前に示されていたので、予期されなかった。

【００２３】

本研究は、膣内に１％ゲルのテノホビルの局所投与によって達成される濃度が、複数の細胞系および初代細胞型におけるＨＳＶ－１およびＨＳＶ－２の両方の複製を阻害するものと等価である証拠を提供する。従って、臨床試験において観測されたテノホビルの抗ヘルペス活性は、その直接的な抗ヘルペス効果の結果である。

【００２４】

次に、本発明の特定の実施形態に対する言及が詳細になされる。本発明は、列挙される実施形態と共に記載されるが、上記実施形態は、本発明をそれらの実施形態に限定することが意図されないことが理解される。反対に、本発明は、特許請求の範囲によって定義されるように本発明の範囲内に含まれ得る全ての代替物、改変物、および等価物を含むことが意図される。

【００２５】

定義

以下の用語および句は、本明細書中で用いられる場合、そうでないと言及されない限り以下の意味を有することが意図される：

用語「治療上有効な量」は、疾患を処置するために被験体に投与される場合に、上記疾患に対する処置を達成するために十分である化合物の量を指す。「治療上有効な量」は、化合物、処置されるべき被験体の疾患、およびその重症度、年齢、体重などによって変動し得る。

【００２６】

「バイオアベイラビリティ」は、身体への薬学的活性薬剤の導入後に上記薬剤が標的組織に対して利用可能になる度合である。薬学的活性薬剤のバイオアベイラビリティの向上は、所与の用量について、より多くの薬学的活性薬剤が標的組織部位において利用可能であるので、患者にとってより効率的および有効な処置を提供し得る。

【００２７】

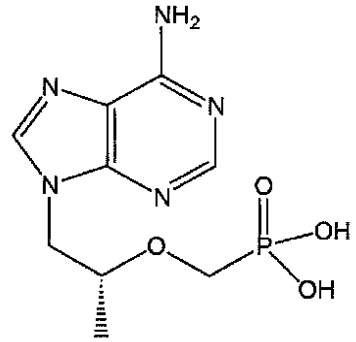
本発明の組み合わせの化合物は、「活性成分」または「薬学的活性薬剤」と称され得る。

【００２８】

ＰＭＰＡまたはテノホビル（米国特許第４，８０８，７１６号、同第５，７３３，７８８号、同第６，０５７，３０５号）は、構造：

【００２９】

【化１】



を有する。

【００３０】

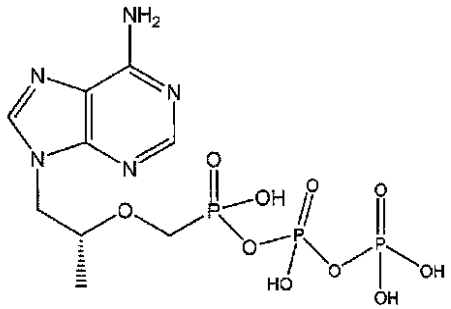
ＰＭＰＡ、テノホビルの化学名としては、（Ｒ）－９－（２－ホスホニルメトキシプロピル）アデニン；（Ｒ）－（１－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）プロパン－２－イルオキシ）メチルホスホン酸；およびホスホン酸，［［（１Ｒ）－２－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）－１－メチルエトキシ］メチル］が挙げられる。ＣＡＳ登録番号は、１４７１２７－２０－６である。

【００３１】

テノホビルのジホスフェートは、構造：

【００３２】

【化２】



を有し、（Ｒ）－（１－（６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル）プロパン－２－イルオキシ）メチルホスホン酸二リン酸無水物と名付けられる。

【００３３】

別の実施形態において、本発明は、肛門への上記処方物の局所投与を含む。別の実施形態において、本方法は、抗ウイルス化合物を経口適用することによって実施され得る。経口適用は、口内洗剤または含そう剤の形態での組成物を適用することによって適切に実施される。経口適用は、歯科手順中の感染を防ぐために特に好ましい。適切に、上記組成物は、歯科手順が始まる直前に適用され、その手順の間に定期的に適用される。

【００３４】

本発明はまた、エアゾール剤、泡沫剤、ゼリー剤、クリーム剤、坐剤、錠剤、タンポン剤などである処方物、および上記処方物でコーティングされたコンドームの使用を含む。好ましい実施形態において、上記コンドームは、抗ウイルス化合物、好ましくはテノホビルを含む潤滑剤または挿入向上剤（ｐｅｎｅｔｒａｔｉｏｎ　ｅｎｈａｎｃｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）でコーティングされる。潤滑剤および挿入向上剤は、米国特許第４，５３７，７７６号；同第４，５５２，８７２号；同第４，５５７，９３４号；同第４，１３０，６６７号、同第３，９８９，８１６号；同第４，０１７，６４１号；同第４，９５４，４８７号；同第５，２０８，０３１号；および同第４，４９９，１５４号に記載され、それらは本明細書中で参考として援用される。

【実施例】

【００３５】

実施例

以下の実施例は、本発明の範囲内の特定の実施形態をさらに記載し、実証する。実施例は、単に例示のために与えられ、本発明の趣旨および範囲から外れることなく多くのバリエーションが可能であるので、限定するものとして構築されない。以下の実施例は、例示することだけが意図され、あらゆる様式において本発明の範囲を限定することは意図されない。「活性成分」は、上に記載されるように、１つ以上のＮＲＴＩ、好ましくはテノホビルまたは生理学的に機能的なその誘導体を意味する。

【００３６】

材料および方法

細胞。ヒト胚肺（ＨＥＬ）線維芽細胞（ＨＥＬ－２９９；ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－１３７）を、１０％のウシ胎仔血清（ＦＣＳ）、１％のＬ－グルタミン、１％の可欠アミノ酸、および１％のピルビン酸ナトリウムを補ったＭＥＭアール培地（Ｇｉｂｃｏ，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，ＵＫ）において培養した。初代ヒトケラチノサイト（ＰＨＫ）を新生児の包皮から単離した。組織片をトリプシン－ＥＤＴＡとともに３７℃にて１時間インキュベートした。上皮細胞を分離し、以下の補充物：１ｍｌ当たり０．５μｇのヒドロコルチゾン、１ｍｌ当たり１０ｎｇの上皮増殖因子、２ｍＭのＬ－グルタミン、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、1×10^{-10}Ｍのコレラ毒素、１ｍｌ当たり５μｇのインスリン、１ｍｌ当たり５μｇのヒトトランスフェリン、および1ml当たり15×10^{-4}ｍｇの３，３’，５－トリヨード－２－サイロニンを含むケラチノサイト無血清培地（ケラチノサイト－ＳＦＭ）（Ｇｉｂｃｏ，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，ＵＫ）において培養した。上記ＰＨＫを、単層における抗ウイルスアッセイのために、および器官型ラフト培養物（ｏｒｇａｎｏｔｙｐｉｃ　ｒａｆｔ　ｃｕｌｔｕｒｅ）の調製のために使用した。ＴＺＭ－ｂｌ細胞は、Ｄｒ．Ｇ．Ｖａｎ　Ｈａｍ（ＩＴＧ，Ａｎｔｗｅｒｐ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）によって、親切にも提供された。

【００３７】

ウイルス。ＨＳＶ－１株のＫＯＳおよびＦ、ならびにＨＳＶ－２株のＧおよびＭＳを参照ヘルペスウイルスとして使用した。ベルギーにおいてウイルスに感染した個体から単離されたいくつかのＨＳＶ－１野生型（ｗｔ）［ＲＶ－６、ＲＶ－１３２、ＲＶ－１３４、Ｃ５５９１４３］、ＨＳＶ－１チミジンキナーゼ欠損型（TK^-）［ＲＶ－３６、ＲＶ－１１７、３２８０５８］、ＨＳＶ－２　ｗｔ［ＲＶ－２４、ＲＶ－１２４、ＮＡ、ＰＢ、ＮＳ、ＨＳＶ－４７］、およびＨＳＶ－２　TK^-［ＲＶ－１０１、ＲＶ－１２９、１９０２６５８９、ＬＵ、ＨＳＶ－４４］の臨床株を使用した。ＨＩＶ－１株III_Bは、Ｒ．Ｃ．Ｇａｌｌｏ（当時、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤにおける）によって提供された。

【００３８】

化合物。化合物の供給源は、以下の通りであった：アシクロビル［ＡＣＶ，９－（２－ヒドロキシエトキシメチル）グアニン］（ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ，Ｓｔｅｖｅｎａｇｅ，ＵＫ）；ガンシクロビル［ＧＣＶ，９－（１，３－ジヒドロキシ－２－プロポキシメチル）グアニン（Ｒｏｃｈｅ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）；ペンシクロビル［ＰＣＶ，９－（４－ヒドロキシ－３－ヒドロキシメチルブタ－１－イル）グアニン］（Ａｖｅｎｔｉｓ，Ｆｒａｎｋｆｕｒｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）；ブリブジン（ｂｒｉｖｕｄｉｎ）［（Ｅ）－５－（２－ブロモビニル）－１（－Ｄ－２’－デオキシリボフラノース－１－イル－ウラシル，ＢＶＤＵ］（Ｓｅａｒｌｅ，ＵＫ）；（Ｓ）－ＨＰＭＰＣ［シドホビル，ＣＤＶ，（Ｓ）－１－（３－ヒドロキシ－２－ホスホニルメトキシプロピル）シトシン］，ＰＭＥＡ，［アデホビル，ＡＤＶ，９－［２－（ホスホニルメトキシエチル）アデニン］、および（Ｒ）－ＰＭＰＡ［テノホビル，ＴＦＶ，（Ｒ）－９－［２－（ホスホニルメトキシプロピル）アデニン］］（Ｇｉｌｅａｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）。テノホビルジホスフェート（ＴＦＶ－ＤＰ）、およびアシクロビルトリホスフェート（ＡＣＶ－ＴＰ）は、Ｍｏｒａｖｅｋ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ

ｓ，Ｂｒｅａ，ＣＡから得た。

【００３９】

放射化学物質。［^{3}Ｈ］テノホビル（比放射能（ｒａｄｉｏｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ）：１５Ｃｉ／ｍｍｏｌ）、［８－^{3}Ｈ］ｄＧＴＰ（放射特異度：１７．９Ｃｉ／ｍｍｏｌ）、および［２，８－^{3}Ｈ］ｄＡＴＰ（（放射特異度：１５３Ｃｉ／ｍｍｏｌ）は、Ｍｏｒａｖｅｋ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｂｒｅａ，ＣＡ）からであった。

【００４０】

ＨＳＶ細胞変性効果（ｃｙｔｏｐａｔｈｉｃ　ｅｆｆｅｃｔ）（ＣＰＥ）低減アッセイ。ＨＥＬおよびＰＨＫ細胞をＣＰＥ低減アッセイを行うために使用した。両方の細胞型を、９６ウェルマイクロタイタープレートにおいて、それらの対応する増殖培地において培養した。コンフルエントな単層を１００ＣＣＩＤ$_{50}$（１ＣＣＩＤ$_{50}$は、細胞培養物の５０％について感染性であるウイルスストック希釈物に相当する）における各ウイルス株に感染させた。ＨＥＬ細胞においてウイルスの感染および成長を可能にするために使用した培地は、２％のＦＣＳを含むＭＥＭアール培地であった。２時間の吸着期間後、残留ウイルスを取り除き、感染した細胞を試験化合物（二連）の連続希釈物を含む培地においてさらにインキュベートした。インキュベーション時間の２日後～３日後、ウイルス細胞変性性（ｃｙｔｏｐａｔｈｉｃｉｔｙ）（ＣＰＥ）を視覚的に評価し、５０％効果濃度［ＥＣ$_{50}$、ウイルスＣＰＥを５０％まで低減するために必要とされる化合物の濃度］を決定した。各ウイルス株に対して試験した化合物のＥＣ$_{50}$を、少なくとも２つの独立した実験の平均値として計算した。ウイルス感染のために使用したダルベッコ－Ｆ１２培地［１０％のウシ胎仔血清（ＦＣＳ）、２ｍＭのＬ－グルタミン、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、１リットル当たり５ｍｌの１００×抗生物質－抗真菌剤（Ｇｉｂｃｏ，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を補った、１／３のＨＡＭＦ１２と２／３のダルベッコ改変イーグル培地との混合物］を除いて同様の様式で、ＰＨＫにおいて上記アッセイを行い、ケラチノサイト－ＳＦＭとダルベッコ－Ｆ１２培地との５０／５０（ｖ／ｖ）混合物をウイルス吸着後に加えた。

【００４１】

初代単球／マクロファージ細胞培養物のヘルペスウイルス感染。ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、健康な血清陰性のドナーの血液からＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ密度勾配遠心法によって得た。上記ＰＢＭＣを２０％の熱非働化（５６℃、３０分）ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）、ペニシリン（１００Ｕ／ｍＬ）、ストレプトマイシン（１００ｍｇ／Ｌ）、およびＬ－グルタミン（２ｍＭ）を補ったＲＰＭＩ　１６４０培地中に再懸濁し、次に４８ウェルプレート（１．８×１０^{6}細胞／ウェル）に播種した。単球／マクロファージ（Ｍ／Ｍ）細胞を、プラスチック上への接着によって分離した。５日後、非接着性細胞を温かい培地を用いて繰り返しやさしく洗浄することによって慎重に取り除き、接着性（９５％の純度）Ｍ／Ｍをさらに３日間培養して成熟させ、単層を形成させた。ＨＳＶ－２の細胞変性効果に高度に感受性のあるアフリカミドリザルの線維芽細胞様腎臓（Ｖｅｒｏ）細胞を１０％の熱非働化ＦＣＳを補ったＲＰＭＩ培地において成長させ、感染性ウイルスのタイター決定アッセイにおいて使用した。ヒトマクロファージにおけるテノホビルの抗ＨＳＶ２活性を評価するために、上記化合物を感染の１時間前に、漸増する濃度（０．０４μｇ／ｍｌ、０．２μｇ／ｍｌ、１μｇ／ｍｌ、５μｇ／ｍｌ、２０μｇ／ｍｌ、１００μｇ／ｍｌ、または５００μｇ／ｍｌ）でマクロファージに加えた。同様に、マクロファージ培養物を、対照薬物として使用した異なる濃度のアデホビル（０．０４μｇ／ｍｌ、０．２μｇ／ｍｌ、１μｇ／ｍｌ、５μｇ／ｍｌ、２０μｇ／ｍｌ、または１００μｇ／ｍｌ）またはアシクロビル（０．００８μｇ／ｍｌ、０．０４μｇ／ｍｌ、０．２μｇ／ｍｌ、１μｇ／ｍｌ、５μｇ／ｍｌ、２０μｇ／ｍｌ、または１００μｇ／ｍｌ）で処理した。

【００４２】

マクロファージ培養物を次に、試験化合物の存在下でＨＳＶ－２（１００ＣＣＩＤ$_{50}$）に感染させた。２時間のウイルス吸着後、あらゆる残留ウイルス粒子を取り除くために

培養物を広範囲に洗浄した。新鮮な培養培地および指示された濃度における化合物を次に、上記培養物に加えた。テノホビル、アデホビル、およびアシクロビルを実験にわたって維持した。適切な陽性（感染させたが未処理のＭ／Ｍ）対照および擬似感染陰性（感染させず未処理のＭ／Ｍ）対照も各実験のために行った。全てのアッセイを三連で行った。マクロファージに対する細胞変性効果を顕微鏡的観測によって毎日モニターし、感染後５日目～６日目に完了に至った。従って、ＨＳＶ－２の複製に対する上記化合物の潜在的な阻害効果を、感染の６日後に評価した。上清における感染性ウイルスの量をＶｅｒｏ細胞培養物において古典的な限界希釈アッセイによって決定した。生成されたウイルスのタイターをリード・ミュンヒ法に従って計算し、１ｍｌ当たりの５０％組織培養感染量（$ＴＣＩＤ_{50}$／ｍｌ）として表した。

【００４３】

阻害能力を％で表し、値１００をウイルス感染させた未処理培養物におけるウイルス生成とみなして計算した。

【００４４】

ＨＩＶ－１およびＨＳＶ－２でのＴＺＭ－ｂｌ細胞の共感染。ＴＺＭ－ｂｌ細胞系は、ＨｅＬａ細胞に由来し、高レベルのＣＤ４、ＣＣＲ５、およびＣＸＣＲ４を発現する。さらに、この細胞系は、ＬＴＲ駆動ホタルルシフェラーゼおよびＥ．ｃｏｌｉ－ガラクトシダーゼ遺伝子を用いて安定的に変換される（１５）。９６ウェルトレイにおいて、１日目に１０，０００個のＴＺＭ－ｂｌ細胞を播種した。２日目に上清を吸引し、テノホビルの連続希釈物１００μｌを細胞培養物に加えた。次にＨＩＶ－１（ＮＬ４．３）、ＨＳＶ－２（Ｇ）のいずれか、または両方のウイルスを一緒に含むウイルス懸濁液１００μｌを投与した。感染の２日後～３日後、ＨＩＶ－１感染をルシフェラーゼ活性の測定に基づいてモニターした。この手段のために、１００μｌの培養上清を取り除き、１００μｌのＢｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏ Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ Ａｓｓａｙ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＵＳＡ）を加えた。Ｓａｆｉｒｅ ２マイクロタイタープレートリーダー（Ｔｅｃａｎ，Ｍａｅｎｎｅｄｏｒｆ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて発光シグナルを測定した。擬似感染細胞のみを含む対照条件も、背景発光レベルを測定するために含めた。感染の３日後、ＨＳＶ－２誘導細胞変性性を巨大細胞形成に基づいて顕微鏡的に記録した。

【００４５】

器官型上皮ラフト培養。表皮等価物の調製のために、氷上にて１０倍濃縮ＨＡＭのＦ１２培地、１０倍再構成バッファー、およびＳｗｉｓｓ ３Ｔ３ Ｊ２線維芽細胞と混合したコラーゲンを用いて、コラーゲンマトリックス溶液を作製した。１ミリリットルのコラーゲンマトリックス溶液を２４ウェルマイクロタイタープレートのウェルに注いだ。３７℃にて一晩、１ｍｌの増殖培地を用いたゲル平衡化後、$２．５\times１０^{5}$のＰＨＫ細胞をゲルの上に播種し、浸した状態を２４時間～４８時間維持した。コラーゲンラフトを持ち上げ、空気と液体培養培地との間の界面においてステンレス鋼の格子上に置いた。上記増殖培地は、ケラチノサイト－ＳＦＭのために使用したのと同じ補充物を有する、１／３のＨＡＭ Ｆ１２と２／３のダルベッコ改変イーグル培地との混合物であった。上皮細胞を層状にし、培地を２日～３日毎に交換した。ラフトシステムにおける上記化合物の抗ウイルス効果の評価のために、２つの一連のラフトを、１つは組織学的実験のため、およびもう１つはプラーク低減アッセイによるウイルス生成の定量化のために並行して行った。ラフトを、持ち上げ後（ｐｏｓｔ－ｌｉｆｔｉｎｇ）１０日後に５，０００ＰＦＵのＨＳＶ－１（ＫＯＳ）株またはＨＩＶ－２（Ｇ）株に感染させ、次に培地を異なる希釈の上記化合物を含む培地に交換した。異なる濃度の上記化合物を含む増殖培地を２日後および３日後（分化の１５日後）に取替え、一連のラフトを１０％の緩衝化ホルマリン中で固定し、パラフィンに包埋し、組織学的評価のためにヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。別の一連のラフトを、ウイルス生成を定量化するために使用した。その目的のために、各ラフトを３ｍｌのリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）中で凍結させ、解凍して、感染した上皮からウイルスを放出させた。上清を１，８００ｒｐｍにおける遠心分離によって清浄化し、Ｈ

ＥＬ細胞培養物におけるプラークアッセイによってタイター決定した。各ラフトにおけるウイルス生成を次に計算した。各薬物濃度について２つのラフトを、ウイルス収量に対する上記化合物の効果を決定するために使用した。

【００４６】

ヒトエクスビボ組織。ヒト扁桃組織を、ＩＲＢ承認プログラム下でＣｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒ（Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ）において通常の扁桃摘除術を経験している患者から得た。頸部組織を、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｔｅｒｃｈａｎｇｅ（ＮＤＲＩ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，ＰＡ）を通して得た。組織を約８ｍｍ^{3}のブロックに切断し、培養培地におけるコラーゲンスポンジゲル上に、前に記載されたように（１６）空気－液体界面に置いた。手短に言えば、組織ブロックを１５％の熱非働化ウシ胎仔血清（ＦＣＳ Ｇｅｍｉｎｉ Ｂｉｏ－Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｗｏｏｄｌａｎｄ，ＣＡ）を含むＲＰＭＩ １６４０（ＧＩＢＣＯ ＢＲＬ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）培地において培養した。

【００４７】

扁桃組織：各実験条件について、２７の組織ブロック（９ブロック／ウェル／３ｍｌの完全培地）に各組織ブロックの上に置かれたＨＳＶ－１（株Ｆ）またはＨＳＶ－２（株ＧおよびＭＳ）（ＡＴＣＣ）のウイルスストック５μＬを接種した。共感染実験を５μＬのＨＳＶ－２（株Ｇ）および５μＬ（０．５ｎｇのｐ２４）のＸ４$_{\mathrm{LAI.04}}$（Ｒｕｓｈ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ Ｑｕａｌｉｔｙ Ａｓｓｕｒａｎｃｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（Ｃｈｉｃａｇｏ，ＩＬ）から得た）を連続して組織ブロックに接種することによって行った。扁桃組織を用いる全ての実験において、テノホビルをウイルス感染の１２時間前に培養培地に加え、各培養培地の取替えにおいて補給した。

【００４８】

頸膣組織：各実験条件のために、１６の組織ブロックを、５００μｌのＨＳＶ－２（株Ｇ）懸濁液に３７℃にて２時間浸し、ＰＢＳで３回洗浄し、次にゲルフォームラフト上に置いた。テノホビルを感染中に加え、各培養培地の取替えにおいて補給した。定量リアルタイムＰＣＲによって測定される場合に、単純ヘルペスウイルスの複製を上記培養培地へのウイルスＤＮＡの放出によって評価した（１７）。ＨＩＶ－１の複製をビーズベースのアッセイを用いて、ｐ２４キャプシド抗原の放出によって評価した（１８）。

【００４９】

ＨＳＶ－１およびＨＳＶ－２感染マウスのインビボ抗ウイルス活性。成体ＮＭＲＩ無胸腺ヌードマウス（体重約２０ｇ）を約１ｃｍ^{2}の表面にわたって腰仙部において皮膚切除（ｓｃａｒｉｆｙ）した。１マウス当たり５０μＬ中５×１０^{3}ＰＦＵのＨＳＶ－１（Ｋｏｓ株）または５×１０^{2}のＨＳＶ－２（Ｇ株）をマウスに接種した。テノホビル、アデホビル、およびシドホビルの局所用１％処方物を１００％ジメチルスルホキシドにおいてか、またはＣＡＰＲＩＳＡ ００４試験において用いられたのと同一のゲルにおいて調製した。各実験において、薬物のない試験処方物と同じプラセボ処方物で処置された動物の群を陰性対照として含めた。処置プロトコルにおいて、テノホビル、アデホビル、またはシドホビルを、１日に２回、感染後１時間～２時間から始めて５日間の期間、指示された処方物および薬物の濃度で動物に局所投与した。ウイルス接種の日は、常に０日目と見なした。全ての動物手順は、Ｋ．Ｕ．Ｌｅｕｖｅｎ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅによって承認された。病変の発症および死亡率を１ヶ月の期間にわたって記録した。動物を３０％超の体重損失または麻痺の発症が起こる場合に安楽死させた。生存率をカプラン－マイヤー法に従って推定し、ログランク検定（Ｍａｎｔｅｌ－Ｃｏｘ）検定（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ）を用いて比較した。

【００５０】

リンパ球ＣＥＭ、線維芽細胞ＨＥＬ、および上皮ＴＺＭ－ｂｌ細胞培養物におけるテノホビルの代謝。放射性同位元素標識されたテノホビルの代謝を以下の通りモニターした：ＣＥＭ、ＨＥＬ、またはＴＺＭ－ｂｌ細胞を、５ｍｌの培養フラスコ（２５ｃｍ^2）において、それぞれ４×１０^5／ｍｌ、５．１×１０^5／ｍｌ、および１７×１０^{5}細胞／ｍ

ｌで播種し、２μＭの［２，８－^{3}Ｈ］テノホビル（１０μＣｉ／フラスコ）とともにインキュベートした。上記細胞の播種時から７２時間後に、放射性同位元素標識された薬物を上記細胞培養物に２４時間加えた。この時点において、上記細胞を４℃で遠心分離（ＨＥＬおよびＴＺＭ－ｂｌ細胞について、培養受容物からの予めの取り外し後に）し、氷冷培地（血清なし）で２回入念に洗浄し、６０％の冷メタノールで沈殿させた。１０，０００ｒｐｍにおける遠心分離後、以前に記載された（１９）ようなＰａｒｔｉｓｉｌ－ＳＡＸ－１０ラジアルコンプレッションカラムを用いて、上清における放射性同位元素標識された［^{3}Ｈ］テノホビルおよびその代謝産物をＨＰＬＣ分析によって定量化した。［^{3}Ｈ］テノホビル、［^{3}Ｈ］テノホビル－ＭＰ、およびテノホビル－ＤＰのための保持時間は、約５分、約１６分、および約３２分であった。

【００５１】

ＨＳＶ－１　ＤＮＡポリメラーゼおよびＨＩＶ－１逆転写酵素アッセイ。ＨＳＶ－１ＤＮＡポリメラーゼおよびＨＩＶ－１　ＲＴアッセイについての反応混合物（４０μｌ）は、４μｌのＰｒｅｍｉｘ（２００ｍＭのＴｒｉｓ．ＨＣｌ、ｐＨ７．５；２ｍＭのＤＴＴ；３０ｍＭのＭｇＣｌ$_{2}$）、４μｌのＢＳＡ（５ｍｇ／ｍｌ）、１．６μｌの活性化仔ウシ胸腺ＤＮＡ（１．２５ｍｇ／ｍｌ）、０．８μｌのｄＣＴＰ（５ｍＭ）、０．８μｌのｄＴＴＰ（５ｍＭ）、０．８μｌのｄＧＴＰ（５ｍＭ）、２μｌの放射性同位元素標識された［^{3}Ｈ］ｄＡＴＰ（１ｍＣｉ／ｍｌ）（３．３μＭ）、１８μｌのＨ$_{2}$Ｏ、および異なる濃度（すなわち、２００μＭ、２０μＭ、２μＭ、０．２μＭ）のテノホビル－ＤＰ４μｌを含んだ。４μｌの組換えＨＳＶ－１　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｍ．Ｗ．Ｗａｔｈｅｎ（Ｐｆｉｚｅｒ，Ｋａｌａｍａｚｏｏ，ＭＩ）によって親切にも提供された）、または組換えＨＩＶ－１　ＲＴ（２０ｍＭのＴｒｉｓ．ＨＣｌ、ｐＨ８．０；１ｍＭのＤＴＴ；０．１ｍＭのＥＤＴＡ；０．２ＭのＮａＣｌ；４０％のグリセロールにおける）を加えることによって反応を開始し、反応混合物を６０分間（ＨＳＶ－１　ＤＮＡポリメラーゼ）、または３０分間（ＨＩＶ－１　ＲＴ）、３７℃にてインキュベートした。次に、重合反応を終結するために０．０２ＭのＮａ$_{4}$Ｐ$_{2}$Ｏ$_{7}$・１０Ｈ$_{2}$Ｏ中５％のＴＣＡ（氷冷）１ｍｌを加え、その後、酸不溶性沈殿物（放射性同位元素標識されたＤＮＡ）をＷｈａｔｍａｎガラスファイバーフィルターＧＦ／Ｃ型（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ＵＫ　Ｌｉｍｉｔｅｄ，Ｂｕｃｋｉｎｇｈａｍｓｈｉｒｅ，ＵＫ）上に捕捉し、遊離の放射性同位元素標識されたｄＡＴＰを取り除くために５％のＴＣＡおよびエタノールでさらに洗浄した。放射活性をＰｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｔｒｉ－Ｃａｒｂ　２８１０　ＴＲ液体シンチレーションカウンターにおいて決定した。

【００５２】

結果

複数の許容細胞型におけるＨＳＶ－１およびＨＳＶ－２の複製のテノホビルによる阻害

実験室ＨＳＶ株に対するテノホビルの活性をまず、ＨＥＬ細胞単層および初代ヒトケラチノサイト（ＰＨＫ）において評価し、ヌクレオシド（すなわち、アシクロビル、ペンシクロビル、ガンシクロビル、およびブリブジン）類似体および非環式ヌクレオチドホスホネート（ＡＮＰ）（すなわち、シドホビルおよびアデホビル）類似体の抗ＨＳＶ活性と比較した。テノホビルは、ＰＨＫにおいて、ＨＳＶ－１およびＨＳＶ－２に対して約１００μｇ／ｍｌ～約２００μｇ／ｍｌのＥＣ$_{50}$値でウイルス誘導細胞変性性を阻害した。アデホビルについてのＥＣ$_{50}$値は、３．６μｇ／ｍｌ～１３μｇ／ｍｌであり、シドホビルについては、０．６３μｇ／ｍｌ～４．４μｇ／ｍｌであった。ＨＳＶ－１に対してよりもＨＳＶ－２に対して著しく低い活性を有することが知られているブリブジンを除いて、ヌクレオシド類似体は、試験した非環式ヌクレオチドホスホネート類似体のうちのどれよりも活性があることが証明された。

【００５３】

非環式ヌクレオシドホスホネート（ＡＮＰ）のアデホビルおよびシドホビル、およびいくつかのヌクレオシド類似体と並行して、テノホビルをまた、ＨＥＬ線維芽細胞細胞培養物において、野生型およびアシクロビル抵抗性ウイルス株を含む、多様なＨＳＶ－１およ

びＨＳＶ－２臨床単離物に対して評価した。テノホビルは、ＨＳＶ－１　ｗｔ、チミジンキナーゼ欠損ＨＳＶ－１　ＴＫ$^{-}$、ＨＳＶ－２　ｗｔ、およびチミジンキナーゼ欠損ＨＳＶ－２　ＴＫに対して、それぞれ１３０μｇ／ｍｌ（１１４μｇ／ｍｌ～１６０μｇ／ｍｌの範囲）、≧１６６μｇ／ｍｌ（１１７μｇ／ｍｌ～≧２００μｇ／ｍｌの範囲）、≧１５７μｇ／ｍｌ（１２５μｇ／ｍｌ～≧２００μｇ／ｍｌの範囲）、および１５２μｇ／ｍｌ（１３１μｇ／ｍｌ～１７９μｇ／ｍｌの範囲）の平均EC_{50}値で全ての臨床単離物の細胞変性効果を阻害した。並行して試験される場合、アデホビルはテノホビルについて見られた平均EC_{50}値よりも１／２０～１／３２低い平均EC_{50}値を示したが、シドホビルが０．３５μｇ／ｍｌと０．６７μｇ／ｍｌとの間の範囲に及ぶ平均EC_{50}値を有して最も活性のあるＡＮＰであった。従って、テノホビルについての抗ヘルペスEC_{50}値は、シドホビルについてよりも１８１倍～４７４倍高かった。野生型および変異体ＴＫ$^{-}$　ＨＳＶ臨床単離物について同様のEC_{50}値を示した試験したＡＮＰと対照的に、アシクロビル、ガンシクロビル、ペンシクロビル、およびブリブジンは、チミジンキナーゼ欠損ヘルペスウイルス株に対してそれらの抗ヘルペス活性を失った。

【００５４】

テノホビル、アデホビル、およびアシクロビルを、初代単球／マクロファージ（Ｍ／Ｍ）細胞培養物においてそれらの抗ＨＳＶ－２活性についても評価した。ヘルペスウイルス生成は、対照ウイルス感染培養物の上清において２．８±０．９×10^{5}　$TCID_{50}$／ｍｌにまで達し、顕微鏡可視である９０％～１００％の細胞変性効果（ＣＰＥ）（図１）をもたらした。５００μｇ／ｍｌおよび１００μｇ／ｍｌの両方の濃度におけるテノホビルは、ウイルス感染後６日目に顕微鏡可視ＣＰＥの徴候が一切なく完全にウイルス複製を抑制した。２０μｇ／ｍｌおよび５μｇ／ｍｌにおいて、培養上清におけるウイルスタイターは、未処理の対照におけるウイルスタイターよりも１ｌｏｇ超低く、それぞれ約５％および３０％の可視ＣＰＥをもたらした。１μｇ／ｍｌまたは０．２μｇ／ｍｌの薬物濃度においては、テノホビルの明白な保護効果を観測しなかった（２．５×10^{5}　$TCID_{50}$／ｍｌ；≧７０％～８０％のＣＰＥ）（図１）。予期されたように、アデホビルは、Ｍ／Ｍにおいて、より抗ウイルス活性があった。５００μｇ／ｍｌと５μｇ／ｍｌとの間の薬物濃度において、上清におけるウイルスの粒子も可視ＣＰＥも上記細胞培養物において見出されなかった。１μｇ／ｍｌおよび０．４μｇ／ｍｌと同じくらい低いアデホビル濃度でさえ、ＨＳＶタイターを著しく低減し（８．５×10^{2}および５．４×10^{3}　$TCID_{50}$／ｍｌ）、可視ＣＰＥは、それぞれ５％および４５％であった。予期されたように、確立された抗ヘルペス薬物アシクロビルは、Ｍ／Ｍ細胞培養物におけるヘルペスウイルスの複製を阻害することにおいて極めて有効であることが証明された（上清において放出されたウイルスを完全に抑制し、そして０．００８μｇ／ｍｌと等しい濃度または０．００８μｇ／ｍｌよりも高い濃度において可視の細胞変性性がない）。

【００５５】

ＨＩＶ感染上皮ＴＺＭ－ｂｌ細胞培養物におけるテノホビルによるＨＳＶ－２の複製の阻害

上皮ＴＺＭ－Ｂｌ細胞は、ＨＩＶ（コ）レセプターＣＤ４、ＣＸＣＲ４、およびＣＣＲ５でトランスフェクションされたＨｅＬａ細胞に由来する。それらは、ＨＩＶおよびＨＳＶの両方によって感染し得る。発明者らは、これらの細胞をＨＩＶ－１（ＮＬ４．３）およびＨＳＶ－２（Ｇ）に共感染させ、ＨＩＶの複製をＬＴＲ駆動ルシフェラーゼ発現（発光）によってモニターし、ＨＳＶ－２の複製をウイルス誘導細胞変性性の顕微鏡読み取りによってモニターした。テノホビルは、共感染培養物において、単独でＨＳＶ－２に感染したＴＺＭ－ｂｌ細胞培養物を阻害するために必要されるテノホビル濃度と同様である約６０μｇ／ｍｌの薬物濃度でＨＳＶ－２の感染を防いだ。また、テノホビルによって、進行中のＨＳＶ－２感染の存在下、または非存在下でＨＩＶ－１を等しく抑制した（データは示されない）。従って、ＨＩＶ－１およびＨＳＶ－２の二重感染の実験条件下で、各ウイルスは、他のウイルスに対するテノホビルの抗ウイルス活性に影響を与えなかった。

【００５６】

器官型上皮ラフト培養物におけるテノホビルによるウイルス複製の抑制
分化したケラチノサイトは、インビボでのＨＳＶの産生性感染に対する主要な標的細胞であるので、ケラチノサイトの器官型ラフト培養物におけるテノホビルの抗ウイルス活性を評価した。この３次元培養モデルにおいて、ケラチノサイトは完全に分化し、従って、インビボでの組織状態を忠実に真似ていた。発明者らは、この系において、テノホビル、アデホビル、およびシドホビルのＨＳＶの複製を低減するための能力を比較した。上記器官型上皮ラフト培養物を分化の１０日後に感染させ、試験化合物の連続希釈物を用いて処理した。持ち上げ後１５日後（すなわち、処理の５日後）に、組織学的実験のために、およびウイルスの定量化のためにラフトを加工した。培養切片の組織学的実験は、対照ラフトにおいて、特徴的な層を有する完全に分化した上皮を示したが、ＨＳＶ感染ラフトは、明白なウイルス感染および上皮一帯にウイルスの広がりを示した（図２）。ラフトのＨＳＶ感染は、細胞変性効果を生じ、核内好酸性封入体の出現、代表的な上皮内小胞の形成および多核化と一緒にケラチノサイトの気球状化および網状変性をもたらした。

【００５７】
上記器官型培養物の形態学的分析は、２００μｇ／ｍｌおよび５０μｇ／ｍｌにおけるテノホビルでの処理がＨＳＶ－２誘導細胞変性性に対して上皮全体を保護し、他方、２０μｇ／ｍｌおよび５μｇ／ｍｌにおいて、正常な上皮の領域および破壊されたラフトを有する領域を有して、その化合物が部分的に保護することを示した（図２）。２μｇ／ｍｌの濃度において、テノホビルは、ＨＳＶ－２に対して不活性であった。≧２μｇ／ｍｌにおけるアデホビルの投与および０．２μｇ／ｍｌにおけるシドホビルの投与は、上皮組織の完全な保護をもたらした（データは示されない）。死滅細胞の数の増加または分化の変化として測定される毒性効果を、全ての試験した化合物の最高濃度（テノホビルについて２００μｇ／ｍｌ、ならびにアデホビルおよびシドホビルについて５０μｇ／ｍｌ）において一切観測しなかった。テノホビル、アデホビル、およびシドホビルの選択的抗ＨＳＶ効果をまた、上記ラフト培養物が参照ＨＳＶ－１実験室株に感染している場合に確かめた。この場合において、ウイルス誘導細胞変性効果からの完全な保護を、２００μｇ／ｍｌのテノホビルの濃度、２μｇ／ｍｌのアデホビルの濃度、および≧０．５μｇ／ｍｌのシドホビルの濃度において認めた。上記化合物のより低い濃度は、上皮の部分的保護（すなわち、５０μｇ／ｍｌのテノホビル）または完全な破壊（すなわち、２０μｇ／ｍｌのテノホビル）をもたらした。

【００５８】
アデホビルおよびシドホビルと比較したテノホビルの抗ウイルス効果を定量化するために、１ラフト当たりのウイルス収量を定量ＰＣＲによって決定した。図３に示されるように、１ラフト当たりのウイルス生成の濃度依存性阻害を、上記化合物の連続濃度を用いたラフトの処理後に観測した。テノホビルにより、試験した最高濃度（すなわち、２００μｇ／ｍｌ）でのウイルス生成（プラーク形成単位（ＰＦＵ））における２．６ｌｏｇの低減（ＨＳＶ－１）および５．４ｌｏｇの低減（ＨＳＶ－２）が実証された。５０μｇ／ｍｌにおけるテノホビルの濃度において、０．８１ｌｏｇ（ＨＳＶ－１）および１．７５ｌｏｇ（ＨＳＶ－２）のウイルス収量の低減を観測した。ＨＳＶ－２に感染したラフトにおいて、２０μｇ／ｍｌにおいてさえ、ウイルス生成における０．９ｌｏｇの低減を観測した。上記化合物のより低い濃度では、ラフトにおけるウイルス複製を低減することができなかった。予期されたように、アデホビルおよびシドホビルの両方は、ＨＳＶ複製に対してテノホビルよりも活性があることが証明された（図３Ａおよび３Ｂ）。

【００５９】
単独で感染したヒトエクスビボリンパ組織およびＨＩＶ－１に共感染したヒトエクスビボリンパ組織における、テノホビルによる単純ヘルペスウイルス２型の抑制
ＨＳＶ－１株Ｆ（$HSV\text{-}1_F$）、ＨＳＶ－２株Ｇ（$HSV\text{-}1_G$）、およびＨＳＶ－２株ＭＳ（$HSV\text{-}2_{MS}$）の複製に対するテノホビルの効果を、感染したヒト扁桃組織においてエクスビボで調査した（図４）。この系は、外因性刺激または活性化なしで、種々のウイルスの複製を支持する（１７）。このインビボ様組織系における接種の際に、組

織ブロックを浸している培養培地におけるウイルスＤＮＡの存在によって、示されるように、ＨＳＶ－１$_{F}$、ＨＳＶ－２$_{G}$、またはＨＳＶ－２$_{MS}$を効率的に複製した。全ての試験したドナーからの組織は、培養の９日間にわたって培養培地において、ＨＳＶ－１$_{F}$、ＨＳＶ－２$_{G}$、およびＨＳＶ－２$_{MS}$それぞれについて、７．８$\log_{10}$ ＤＮＡコピー／ｍｌ［四分位数間範囲（ＩＱＲ）７．１～８．１、ｎ＝５］、７．２５$\log_{10}$コピー／ｍｌ（ＩＱＲ７．２～７．９、ｎ＝６）、および６．４$\log_{10}$コピー／ｍｌ（ＩＱＲ６．１～７．５、ｎ＝３）に達するウイルスＤＮＡゲノムのメジアン蓄積を有する、明白な産生性ウイルス感染を支持する。

【００６０】

ＨＳＶ複製へのテノホビルの効果を試験するために、ヒト扁桃組織のブロックを３μｇ／ｍｌ～２４０μｇ／ｍｌの範囲に及ぶ薬物濃度で一晩処理し、ＨＳＶ－１$_{F}$、ＨＳＶ－２$_{G}$、またはＨＳＶ－２$_{MS}$に感染させた。テノホビルを培養期間全体にわたって維持し、各培地の取替えで置き換えた。テノホビルは、ＨＳＶ－１$_{F}$について７μｇ／ｍｌ［９５％の信頼区間（ＣＩ）：１０～４４］；ＨＳＶ－２$_{G}$について１４μｇ／ｍｌ（ＣＩ：１０～１６３）（図４Ａ）、およびＨＳＶ－２$_{MS}$について１９μｇ／ｍｌ（ＣＩ：２７～１２７）のＥＣ$_{50}$を有する用量依存の様式で、ＨＳＶ－１$_{F}$、ＨＳＶ－２$_{G}$、およびＨＳＶ－２$_{MS}$の複製を抑制した。従って、６６μｇ／ｍｌの濃度におけるテノホビルは、ＨＳＶ－１$_{F}$、ＨＳＶ－２$_{G}$、およびＨＳＶ－２$_{MS}$の複製を、感染したドナー適合（ｍａｔｃｈｅｄ）未処理組織と比較して、それぞれ９９±０．１％、９４±７％（図４Ａ）、および８９±２％まで低減した（ｐ＜０．０１）。６６μｇ／ｍｌのテノホビルで処理した組織において、感染後９日目に、培養培地におけるウイルスＤＮＡの放出によって測定される場合のＨＳＶ－１$_{F}$の複製は、未処理の適合ドナー組織（ｎ＝３）における８$\log_{10}$ ＤＮＡコピー／ｍｌ（ＩＱＲ７．８７～８．０４）と比較して４$\log_{10}$ ＤＮＡコピー／ｍｌ（ＩＱＲ３．９～４．３）であった。同様に、感染後９日目において、ＨＳＶ－２$_{G}$およびＨＳＶ－２$_{MS}$の複製は、未処理組織において、それぞれ７．６$\log_{10}$ ＤＮＡコピー／ｍｌ（ＩＱＲ７．４～７．８）、および７．３$\log_{10}$ ＤＮＡコピー／ｍｌ（ＩＱＲ６．９～７．６）をもたらしたが、６６μｇ／ｍｌのテノホビルで処理した適合ドナー組織において、５．２$\log_{10}$ ＤＮＡコピー／ｍｌ（ＩＱＲ３．６～６．１、ｎ＝１４）、および５．８$\log_{10}$ ＤＮＡコピー／ｍｌ（ＩＱＲ５．７～６．１、ｎ＝３）であった。

【００６１】

最も高い薬物濃度においてでさえ、ＨＳＶ－１$_{F}$、ＨＳＶ－２$_{G}$、およびＨＳＶ－２$_{MS}$の複製の抑制は、測定可能な扁桃組織リンパ球の枯渇と関係なかった：６０μｇ／ｍｌのテノホビルで処理した組織とドナー適合未処理組織との間で、総Ｔ細胞（ＣＤ３$^{+}$）、総Ｂ細胞（ＣＤ１９$^{+}$）、またはナイーブＴ細胞および記憶Ｔ細胞のサブセットの絶対数において、統計的有意差はなかった（ｎ＝３、ｐ＞０．４）。

【００６２】

ＨＳＶ－２およびＨＩＶ－１に対するテノホビルの二重抗ウイルス活性を評価するために、発明者らは、前に記載されるように（１６）扁桃組織をＨＳＶ－２$_{G}$およびＨＩＶ－１$_{X4LAI}$に共感染させ、培養期間全体にわたってそれらを６６μｇ／ｍｌの濃度におけるテノホビルで処理した。未処理の対照組織において、培養培地へのＨＳＶ－２$_{G}$ ＤＮＡの放出は、７．３$\log_{10}$コピー／ｍｌ（ＩＱＲ６．８～７．４）であり、他方、ＨＩＶ－１に共感染させたドナー適合テノホビル処理組織において、培養培地へのＨＳＶ－２$_{G}$ ＤＮＡの放出は、５$\log_{10}$コピー／ｍｌ（ＩＱＲ４．３～５．７、ｎ＝６）であった。従って、これらの組織において、６６μｇ／ｍｌのテノホビルは、ＨＳＶ－２$_{G}$の複製を９６±１％まで抑制した（ｎ＝６；ｐ＜０．０１）（図４Ｂ）。感染後９日目に、培養培地へのｐ２４の放出によって測定されたＨＩＶ－１$_{X4LAI}$の複製を、全ての試験した組織において完全に抑制した（未処理対照において２４６２±１１１７ｐｇ／ｍｌ対ドナー適合テノホビル処理組織において０ｐｇ／ｍｌ）（図４Ｂ）。

【００６３】

ＨＳＶ－２$_{G}$におけるテノホビルの抗ウイルス活性の特異性を確かめるために、発明者らは、３３μｇ／ｍｌの濃度における強いＨＩＶヌクレオシド逆転写酵素インヒビター（ＮＲＴＩ）ラミブジンを用いて組織を処理した。発明者らは、未処理のドナー適合ＨＳＶ－２$_{G}$感染組織と比較して、２つのドナーからの組織において、ＨＳＶ－２$_{G}$の複製へのラミブジンの効果を見出さなかった（データは示されない）。予期されたように、ラミブジンは、ＨＩＶ－１の複製において強い効果を示した。従って、テノホビルの抗ヘルペス効果は、ＮＲＴＩの一般的な特性ではない。

【００６４】

また、エクスビボでの扁桃組織において、テノホビル処理の起こり得る免疫調節効果を評価するために、発明者らは、培養培地において、６６μｇ／ｍｌの濃度におけるテノホビルで９日間処理したドナー適合組織から２０個のサイトカイン（ＩＬ－１、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＦＮ、ＣＣＬ３／ＭＩＰ－１、ＣＣＬ４／ＭＩＰ－１、ＣＣＬ２０／ＭＩＰ－３、ＣＣＬ５／ＲＡＮＴＥＳ、ＣＸＣＬ１２／ＳＤＦ－１、ＴＧＦ、ＴＮＦ、ＣＣＬ２／ＭＣＰ－１、ＣＣＬ１１／エオタキシン、ＣＸＣＬ９／ＭＩＧ、ＣＸＣＬ１０／ＩＰ－１０｀）の濃度を測定した。感染後９日目に、未処理組織およびテノホビルで処理した組織における評価したサイトカインのいずれの濃度間でも有意差はなかった（ｐ＞０．１５）。

【００６５】

ヒトエクスビボ頸膣組織におけるテノホビルによるＨＳＶ－２の抑制

頸膣組織においてテノホビルの抗ＨＳＶ活性を調査するために、この組織のブロックを前に記載されるように培養し、ＨＳＶ－２$_{G}$を接種し、薬物で処理した。１６６μｇ／ｍｌの濃度におけるテノホビルをＨＳＶ－２$_{G}$感染時に加え、各培地の取替えでそれを補給することによって実験の持続期間にわたって維持した。ＨＳＶ－２$_{G}$の複製を、頸膣組織ブロック（１条件当たり１６ブロック）を浸している培養培地へのウイルスのＤＮＡの放出によって評価した。テノホビルで処理されていない対照組織において、５つの全ての試験したドナーからの組織において、１２日間の培養にわたって６．６$\log_{10}$コピー／ｍｌ（ＩＱＲ５．３～８．２）のメジアン累積生成を有するウイルスの複製を検出した。テノホビルで処理した頸膣組織において、ウイルス生成を５．５$\log_{10}$コピー／ｍＬ（ＩＱＲ４．８～５．７、ｎ＝５）（図４Ｃおよび図４Ｄ）まで低減し、各実験におけるウイルス複製の低減を平均する場合に７８±９％の低減を反映した（ｐ＜０．０１）。

【００６６】

ＨＳＶ感染マウスにおけるテノホビルの活性

２つの異なるビヒクル－ＤＭＳＯ（図５）およびＣＡＰＲＩＳＡ　００４研究において使用されるゲルを用いて、テノホビル、アデホビル、およびシドホビルを、ＨＳＶ－１感染マウスおよびＨＳＶ－２感染マウスにおける抗ヘルペス薬（ａｎｔｉｈｅｒｐｅｔｉｃｓ）として評価した（データは示されない）。全ての化合物を１％の濃度で、感染の日から始めて５日間、ＨＳＶ－１感染マウスおよびＨＳＶ－２感染マウスに投与した。ＨＳＶ－１に感染し、１％のテノホビルで処置したマウスの罹患および生存曲線の両方は、プラセボ処置群と比較して有意に遅延した。予期されたように、動物がＤＭＳＯまたはゲル中１％のアデホビルを受けた場合、それぞれ８０％および１００％の生存を観測したので、アデホビルは、テノホビルと比較して、ＤＭＳＯ（図５Ａ）およびゲル処方物（データは示されない）の両方においてより効果的であることが証明された。ＤＭＳＯ処方物中１％のアデホビルで処置されたマウスが皮膚病変を発症せずに死亡したことに言及すべきである（図５Ａ）。ＤＭＳＯまたはゲル処方物のいずれかにおけるシドホビルでの処置は、ウイルス誘導罹患および死亡に対してマウスを完全に保護した。

【００６７】

テノホビルがＤＭＳＯ処方物においてＨＳＶ－２に対して評価される場合、感染の日から始めてテノホビルを受けた群とプラセボ群との間で、生存曲線および罹患曲線において、再度、統計的有意差があった。１％のアデホビルまたは１％のシドホビルを用いたＨＳＶ－２感染マウスの処置は、ウイルス誘導罹患および死亡に対して、それぞれ８０％およ

び１００％の保護をもたらした（図５Ｂ）。同様に、１％でゲル中に処方される場合に、テノホビルは、ヘルペスウイルス関連病変の出現および動物のその後の死亡を遅延した（データは示されない）。ゲル中に処方されたシドホビルは、ＨＳＶ－２誘導罹患および死亡に対して８０％の保護をもたらし、他方、アデホビルは、同じ実験条件下で病変の出現およびその後の死亡の有意な遅延を提供した。

【００６８】

リンパ球、上皮、および線維芽細胞細胞培養物において、テノホビルをその抗ウイルス性活性代謝産物に効率的に転換する

テノホビルのその抗ウイルス性活性（ジホスホリル化（ｄｉｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌａｔｅｄ））代謝産物への代謝変換を、以前に確立された手順（１９）に従って、ヒトリンパ球ＣＥＭ（ＨＩＶ感染実験に使用した）ならびにヒト上皮ＴＺＭ－ｂｌおよび線維芽細胞ＨＥＬ（ＨＳＶ感染実験に使用した）細胞培養物において研究した。培養物の開始後７２時間における２μＭの［２，８－^{3}Ｈ］テノホビルを用いた細胞の２４時間の間の処理は、テノホビル－ジホスフェートの形成をもたらし、Ｔリンパ細胞、上皮細胞、および線維芽細胞において、それぞれ１３ｐモル／１０^{9}細胞、６ｐモル／１０^{9}細胞、および１５ｐモル／１０^{9}細胞のレベルに達した。従って、インビボでのＨＩＶまたはＨＳＶ感染のいずれかに対して関連がある標的細胞を代表する複数の異なる細胞型において、テノホビルをその抗ウイルス性活性代謝産物に転換した。

【００６９】

テノホビルの活性代謝産物は、ＨＳＶ　ＤＮＡのポリメラーゼおよびＨＩＶ逆転写酵素の両方を効率的に阻害する

ウイルスをコードするヘルペスウイルスＤＮＡのポリメラーゼまたはＨＩＶ－１逆転写酵素のインヒビターとしての活性を有するために、テノホビルは、細胞酵素によって、そのジホスホリル化誘導体（テノホビル－ＤＰ）に転換される必要がある。活性代謝産物は、プライマー／鋳型として活性化仔ウシ胸腺ＤＮＡ、および競合基質として［２，８－^{3}Ｈ］ｄＡＴＰを用いて、標的酵素に対するその阻害活性について評価されてきた。テノホビル－ＤＰは、ＨＩＶ－１　ＲＴ（IC_{50}：４．３μＭ）およびＨＳＶ－１　ＤＮＡポリメラーゼ（IC_{50}：１．３μＭ）の両方を効率的に阻害する。従って、細胞培養物、器官型上皮ラフト培養物、ヒトリンパ球および頸部エクスビボ組織、ならびにウイルス感染マウスにおけるテノホビルの抗ヘルペス活性を、その活性代謝産物テノホビル－ＤＰによるウイルスＤＮＡポリメラーゼの阻害によって説明し得る。

【００７０】

処方物（膣のゲル）

	（％ｗ／ｗ）
テノホビル	１．００
ヒドロキシエチルセルロース、ＮＦ（Ｎａｔｒａｓｏｌ（登録商標）２５０Ｈ）	２．５０
プロピルパラベン、ＮＦ	０．０２
メチルパラベン、ＮＦ	０．１８
エデト酸二ナトリウム、ＵＳＰ	０．０５
グリセリン、ＵＳＰ	２０．００
クエン酸、ＵＳＰ	１．００
純水、ＵＳＰ	７５．２５
合計	１００．００。

【００７１】

水酸化ナトリウムおよび塩酸をｐＨを４．４の標的に調整するための１０％ｗ／ｗ溶液として使用する。メチルパラベンおよびプロピルパラベンを加熱したグリセリンに溶解させる。ヒドロキシエチルセルロースを加え、分散させて有機相を形成する。エデト酸二ナトリウムおよびクエン酸を純水に溶解させ、テノホビルを加え、分散させ、ｐＨを４．４に調整し、そして溶液を０．２２μｍのフィルターに通すことによって清浄化する。水相

および有機相を混合し、よく撹拌し、次にチューブまたはアプリケーターに充填する。

【００７２】

安全性および忍容性

１％のＢＩＤを用いたテノホビル膣ゲルは、限定された全身吸収性（ｓｙｓｔｅｍｉｃ ａｂｓｏｒｐｔｉｏｎ）を有し、膣のミクロフロラに対して起こり得る有益な効果を有して、禁欲的および性的に活発なＨＩＶ（－）およびＨＩＶ（＋）女性において忍容性が良好であった。

【００７３】

研究手順

本研究の目的は、膣に適用される場合に、単純ヘルペスウイルス、特にＨＳＶ－２の伝播を防ぐことにおけるテノホビルゲルの有効性を評価することであった。

【００７４】

本研究は、性感染ＨＩＶ感染に対して高いリスクがある１８歳～４０歳の８８９人の性的に活発な女性の中で、１％のテノホビルゲルの効果をプラセボゲルと比較した第ＩＩｂ相試験－２群二重盲検無作為化対照試験であった。

【００７５】

プラセボゲル（「万能（ｕｎｉｖｅｒｓａｌ）」プラセボゲルとして公知）を研究の最終段階におけるあらゆる起こり得る影響（マイナスまたはプラス）を最小にするために処方した。それは、上皮細胞の腫脹または脱水を避けるために等張である。それは、４～５のｐＨにおいて処方されたが、最小の緩衝能を有した。等量の精液と混合される場合、上記プラセボゲルは、精液ｐＨ（７．８～７．７）において、取るに足らない減少のみを引き起こした。上記プラセボゲルは、ゲル化剤としてヒドロキシエチルセルロース（ＨＥＣ）を含み、その粘性は、テノホビルゲルの粘性と同等であった。上記ゲルは、抗ＨＩＶまたは抗ＨＳＶ－２の特性を有さない。上記ゲルは、保存剤としてソルビン酸を含んだ。ソルビン酸は、抗ＨＩＶ活性を有さず、ヒト細胞によって容易に代謝される。プラセボゲルを以下のように処方した：

【００７６】

【表１】

化学名	%w/w	量
純水	96.34	674.4 リットル
塩化ナトリウム	0.85	6.545 Kg
ヒドロキシセルロース NF	2.7	20.79 Kg
ソルビン酸 EP/NF	0.10	770.0 g
水酸化ナトリウム NF pH4.4 まで適量）	0.0020	15.4 g
水酸化ナトリウム NF	0.0080	61.6 g

割り当てた研究製品を保存および適用する適切な方法を参加者に教育した。参加者に、膣性交の各行為の１２時間前までに製品の１用量（１つのアプリケーターの中身全体）を膣に挿入し（性交は、製品の挿入後すぐに行われ得る）、性交後できるだけすぐに、とはいえ１２時間以内に第二用量を挿入することを指示した。

【００７７】

研究参加者に以下を勧めた：

・単に割り当てられた製品を膣に適用すること。

・ゲル挿入後２時間は膣洗浄もしくは他の方法で膣を洗浄しないこと、または他の物体もしくは膣製品を挿入しないこと。女性が性交後に膣洗浄する計画である場合、膣洗浄後にゲルを挿入することを彼女に勧めた。

・彼らの研究製品を適切に保存すること（直射日光の当たらない涼しい乾燥した場所で）

。
・コンドームを使用してもしなくても、研究製品を使用すること。
【００７８】
研究参加者は、彼らの参加期間の間、毎月の追跡訪問を完了し、ＨＩＶおよびＨＳＶ－２について試験するために、登録時、次に追跡の間の予め特定された時点、および研究終了時に採血した。
【００７９】
結果
ＨＳＶ－２の存在を、Ｋａｌｏｎ　ＨＳＶ－２型特異的ＥＩＡ（Ｋｏｌｏｎ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｌｔｄ．，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ）を用いて、採った血液サンプルにおいて決定した。登録時、８８８人の女性のうち４５４人（１人の女性は、試験のために保管された血液を有さなかった）は、既存のＨＳＶ－２感染を有し、５１．１％の有病率をもたらした。残りの４３４人の女性を、試験への参加時にＨＳＶ－２に感染しやすいとみなし、終了時のＨＳＶ－２状態をこれらの女性のうちの４２６人において決定した。これらの女性のうちの４人は、保管された研究終了時の標本を有さず、４人は、研究終了時において不確定なＨＳＶ－２の結果を有したことに留意すべきである。
【００８０】
研究期間の間テノホビル処方物を使用した２０５人の女性のうち２９人はＨＳＶ－２に感染した。研究期間の間プラセボを提供された２２４人の女性のうち５８人はＨＳＶ－２に感染した。従って、テノホビルゲルは、ＨＳＶ－２に対して５１％の保護を提供した。
【００８１】
【表２】

	テノホビル処方物 参加者の数=202	プラセボ 参加者の数=224
HSV-2 感染者の数	29	58
女性-追跡の年数	293.3	287.3
女性 100 人当たりの HSV-2 感染率	9.9	20.2

本明細書中に引用される全ての刊行物および特許出願は、あたかも個別の刊行物または特許出願のそれぞれが具体的におよび個別に参考として本明細書中で援用されることが示されるのと同程度まで、参考として本明細書中で援用される。
【００８２】
特定の実施形態が上に詳細に記載されるが、当業者は、実施形態において、その教示から外れることなく多くの改変が可能であることを明らかに理解する。全てのそのような改変は、本発明の特許請求の範囲内に包含されることが意図される。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI	
A61K 47/18	***(2006.01)***	A61K	47/18
A61K 47/12	***(2006.01)***	A61K	47/12
A61K 47/02	***(2006.01)***	A61K	47/02
A61K 47/04	***(2006.01)***	A61K	47/04

(31)優先権主張番号 61/354,050
(32)優先日 平成22年6月11日(2010.6.11)
(33)優先権主張国 米国(US)

(73)特許権者 512317272
カリム, サリム エス. アブドゥール
南アフリカ共和国 ４０１３ ダーバン, プライベート バッグ ７ コンジェラ, ユニバーシティ オブ クワズールーナタール, ネルソン アール マンデラ スクール オブ メディシン, カプリサ
(73)特許権者 512317283
カルサニ, アイーシャ
南アフリカ共和国 ４０１３ ダーバン, プライベート バッグ ７ コンジェラ, ユニバーシティ オブ クワズールーナタール, ネルソン アール マンデラ スクール オブ メディシン, カプリサ
(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72)発明者 キラール, トーマス
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４４０４, フォスター シティー, チェベック レーン ７４０
(72)発明者 カリム, クライシャ アブドゥール
南アフリカ共和国 ４０１３ ダーバン, プライベート バッグ ７ コンジェラ, ユニバーシティ オブ クワズールーナタール, ネルソン アール マンデラ スクール オブ メディシン, カプリサ
(72)発明者 カリム, サリム エス. アブドゥール
南アフリカ共和国 ４０１３ ダーバン, プライベート バッグ ７ コンジェラ, ユニバーシティ オブ クワズールーナタール, ネルソン アール マンデラ スクール オブ メディシン, カプリサ
(72)発明者 カルサニ, アイーシャ
南アフリカ共和国 ４０１３ ダーバン, プライベート バッグ ７ コンジェラ, ユニバーシティ オブ クワズールーナタール, ネルソン アール マンデラ スクール オブ メディシン, カプリサ
(72)発明者 ルーニー, ジェイムス フランシス
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０２８, ポートラ バレー, ウエストリッジ ドライブ １１８

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 国際公開第２００９／１２７８２５（WO, A1）
国際公開第２００８／１４８０１８（WO, A1）
特表２００５－５２７５４６（ＪＰ, A）

特表２００８－５０５９０２（ＪＰ，Ａ）
Antivir. Ther., 2009, Vol.14, No.8, pp.1113-1124
Clin. Microbiol. Rev., 2003, Vol.16, No.4, pp.569-596
J. Med. Chem., 1996, Vol.39, No.17, pp.3263-3268

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)

Ａ６１Ｋ　３８／００－３８／５８
Ａ６１Ｋ　４１／００－４５／０８
Ａ６１Ｋ　４８／００
Ａ６１Ｋ　３１／３３－３３／４４
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）