



Certification

We, the undersigned, do hereby certify the following: We are fluent in the English and Japanese languages. We have translated and/or reviewed the translation of the Japanese document identified as: JPOO/04617 (Priority Document for the '506 Patent), and find it to be a true and accurate translation to the best of my knowledge and ability.

We certify under penalty of perjury that the foregoing is true and correct.

Signature Miki Yanai

Miki Yanai Hernandez

Signature BKST

Brenda K. Seat, Esq.

Date: September 26, 2016

PCT/JP00/04617
11.07.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 25 AUG 2000	
WIPO	PCT

JP 00/4617

4

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: July 28, 1999

Application Number: Heisei 11 [1999] Patent Application Number 214369

Applicant(s): Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

August 11, 2000

Commissioner,
Patent Office

Kozo Oikawa [signature with the official seal]

Application Number: Priority Certificate 2000-3062601

[Document Name]	PETITION FOR PATENT APPLICATION JP-11531
[Reference Number]	July 28, 1999
[Filing Date]	Commissioner of Patent Office, Takeshi
[To Whom]	Isayama
[International Patent Classification]	C12Q 1/18
[Inventor] [Residence or Address]	c/o DEVELOPMENT Research Laboratories, KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD., 14 Shinomiyaminamigawara -cho, Yamashina-ku, Kyoto-shi, Kyoto-fu
[Name]	Yoshiyuki Tatsumi
[Inventor] [Residence or Address]	c/o DEVELOPMENT Research Laboratories, KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD., 14 Shinomiyaminamigawara-cho, Yamashina-ku, Kyoto-shi, Kyoto-fu
[Name]	Mamoru Yokoo
[Inventor] [Residence or Address]	c/o KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD., 28-8 Honkomagome 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo-to
[Name]	Kosho Nakamura

[Inventor]		
[Residence or Address]	c/o DEVELOPMENT Research Laboratories, KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD., 301 Gensuke, Fujiyama-shi, Shizuoka-ken Tadashi ARIKA	
[Name]	Tadashi ARIKA	
[Patent Applicant]	KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.	
[Identification No.]	1000124269	
[Name]	KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.	
[Patent Representative]	100065226	
[Identification No.]	Sohta Asahina	
[Patent Attorney]	06-6943-8922	
[Name]	100098257	
[Telephone No.]	Keiji Saki	
[Patent Representative Appointed]	001627	
[Identification No.]	¥21,000	
[Patent Attorney]	Specification 1	
[Name]	Drawing(s) 1	
[Indication of Charge]	Abstract 1	
[Number in Prepayment File]	9002226	
[Sum of Payment]	Necessary	
[List of Filing Materials]		
[Material Name]		
[Material Name]		
[Material Name]		
[Number of General Power of Attorney]		
[Necessity of Proof]		

[Document Name]

SPECIFICATION

[Title of the Invention]

METHOD FOR DETECTING PATHOGENIC
MICROORGANISM AND ANTIMICROBIAL AGENT,
METHOD FOR EVALUATING EFFECT OF
ANTIMICROBIAL AGENT, AND ANTIMICROBIAL AGENT
OBTAINED THEREBY

[CLAIMS]

1. A method for detecting a pathogenic microorganism which comprises infecting an animal or a biosample with the pathogenic microorganism, administering an antimicrobial agent comprising a compound having an antimicrobial effect or a composition thereof before or after the infection, then removing the antimicrobial agent, and thereafter detecting the viable pathogenic microorganism in the infected site with the pathogenic microorganism.

2. The method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 1, in which the pathogenic microorganism is a bacterium or a fungus.

3. The method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 2, in which the fungus is a pathogenic fungus causing superficial mycosis or deep mycosis.

- 2 -

4. The method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 1, in which the antimicrobial agent is a therapeutic agent for superficial mycosis, a therapeutic agent for deep mycosis and an antibacterial agent.

5. The method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 1, which comprises removing the antimicrobial agent using dialysis or ultra filtration.

6. The method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 1, in which the infected site with the pathogenic microorganism is a skin or a nail.

7. The method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 1, in which the administration of the antimicrobial agent is carried out percutaneously, orally or intravenously.

8. The method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 1, which comprises treating the infected site with the pathogenic microorganism with a digestive enzyme to detect the pathogenic microorganism.

9. A method for evaluating an effect of an antimicrobial agent which comprises detecting a pathogenic microorganism according to the method for detecting the pathogenic microorganism of Claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8.

- 3 -

10. An antimicrobial agent obtained according to the method for evaluating an effect of an antimicrobial agent of Claim 9.

11. A method for detecting an antimicrobial agent which comprises infecting an animal or a biosample with a pathogenic microorganism, administering an antimicrobial agent comprising a compound having an antimicrobial effect or a composition thereof before or after the infection, then excising the infected site with the pathogenic microorganism, placing and cultivating it on an agar medium containing the pathogenic microorganism, and thereafter detecting the antimicrobial agent existing in the infected site with the pathogenic microorganism through a growth inhibition of the pathogenic microorganism observed around the infected site with the pathogenic microorganism.

[DETAILED EXPLANATION OF THE INVENTION]

[Technical Field of the Invention]

The present invention relates to a method for evaluating an effect of an antimicrobial agent on pathogenic microorganism. In particular, it relates to a method for evaluating an effect of an agent wherein an antimicrobial agent existing in the infected site of an animal or a biosample with a pathogenic microorganism after therapy is removed and then the viable pathogenic microorganism remaining in the infected site with the pathogenic microorganism is detected and determined with accuracy.

[Prior Art]

A method for evaluating a drug effect with an animal model

- 4 -

is needed in order to explore a novel antimicrobial agent (also hereinafter "referred to "drug"). Further, a method for evaluating a drug effect with accuracy is needed because of great importance in view of predicting a clinical therapeutic efficiency thereof.

Historically, an experimental dermatophytosis model that back, planta and interdigital of a guinea pig have been infected with *Trichophyton mentagrophytes* has been used in order to evaluate an effect of an antifungal agent on dermatophytosis. Such animal models have been already employed to develop some antifungal agent. The evaluation of the effect of such antifungal agent is carried out by applying the antifungal agent to the infected animal, excising the skin after the certain period of time to cut into plural small pieces, cultivating the skin pieces on the medium, and counting the number of pieces wherein no growth of fungus is seen or the number of animals or feet wherein no growth of fungus is seen in all skin pieces, as an indicator (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 36: 2523-2525, 1992, 39: 2353-2355, 1995). Hereinafter, the conventional method for evaluating the drug effect is referred to as "the conventional method".

Although the drug having a potent activity against *Trichophyton in vitro* such as lanoconazole or amorolfine has been marketed in these days, an improvement of cure rate in a clinical use is hardly seen. As a main reason thereof, a relapse that since fungus in the skin is not completely killed after a treatment, the fungus grow again is pointed.

In also animal experiments, when an effect of lanoconazole on guinea pig models of tinea pedis was evaluated using the conventional method, though "fungus-negative" was observed in all feet

- 5 -

out of 20 feet 2 days after the last treatment, a relapse was observed in 11 out of 20 feet 30 days after the last treatment, and no correlation was seen between the effect 2 days after the last treatment and the effect 30 days after the last treatment (36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, Louisiana, 1996, Abstr. F80).

As a reason thereof, there were followings. Since itraconazole have very potent antidermatophyte activity *in vitro*, itraconazole persisted in the skin 2 days after the last treatment in the concentration wherein the sterilization effect was shown. Therefore, when the skin is excised and cultivated on the medium to detect fungus, the itraconazole remaining in the skin is diffused in the medium, and therefore, no fungus was detected due to prevention of the growth regardless of the presence of viable fungus in the excised skin. On the other hand, since the concentration of the drug remained in the skin is reduced 30 days after the last treatment, fungus in the skin can grow again and can be detected by culture study.

According to this hypothesis, it is ascertained that the drug remain in the skin through the inhibition of the growth of fungus around the skin blocks completely, when the itraconazole-treated skin blocks were located and cultivated on the medium which contains dermatophytes.

Therefore, it became clear that the conventional method has the problem that the drug effect can not be accurately evaluated, because the drug effect is evaluated so that there is apparent therapeutic effect due to the drug remaining in the skin.

- 6 -

Herefrom, in the case of evaluating a drug effect on antimicrobial agent, especially antifungus agent, it is necessary to evaluate the drug effect after removing the agent remaining in the infected site of the animal or the biosample with a pathogenic microorganism, such as a skin after treatment.

[Problems to be Solved by the Invention]

The present invention aims to provide a novel method for evaluating an effect of an antimicrobial agent and an antimicrobial agent obtained according to the method for evaluating an effect of an antimicrobial agent. In particular, the invention provides a method for detecting a viable pathogenic microorganism which comprises administering an antimicrobial agent to an animal or a biosample, then removing the antimicrobial agent, and thereafter detecting the viable pathogenic microorganism in the infected site with the pathogenic microorganism; a method for evaluating effect of an antimicrobial agent comprising the method for detecting a pathogenic microorganism which can accurately evaluate the effect of the antimicrobial agent without the influence of the antimicrobial agent remaining in the infected site of the animal or the biosample with the pathogenic microorganism; an antimicrobial agent obtained according to the method for evaluating the effect of the agent; and a method for detecting an antimicrobial agent wherein an antimicrobial agent is administered to an animal or biosample and the antimicrobial agent existing in the infected site of the animal or the biosample with a pathogenic microorganism is detected.

In addition, "presence" includes the meaning of "remaining".

[Means to Solve the Problems]

- 7 -

To solve the above problems, the inventors have researched intensively in order to seek for a method to accurately evaluate the effect of an antimicrobial agent without the influence of the antimicrobial agent remaining in the infected site of the animal or the biosample with a pathogenic microorganism. As a result, the inventors have found a method to accurately evaluate the effect of antimicrobial agent such as antifungal agent, comprising : fully removing an antimicrobial agent remaining in the infected site of the animal or the biosample with a pathogenic microorganism, and detecting and determining a viable pathogenic microorganism in the infected site with the pathogenic microorganism such as skin, thus completing the present invention.

That is, the present invention relates to a method for detecting a pathogenic microorganism which comprises infecting an animal or a biosample with the pathogenic microorganism, administering an antimicrobial agent comprising a compound having an antimicrobial effect or a composition thereof before or after the infection, then removing the antimicrobial agent, and thereafter detecting the viable pathogenic microorganism in the infected site with the pathogenic microorganism (Claim 1),

the method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 1, in which the pathogenic microorganism is a bacterium or a fungus (Claim 2),

the method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 2, in which the fungus is a pathogenic fungus causing superficial mycosis or deep mycosis (Claim 3),

the method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 1, in

- 8 -

which the antimicrobial agent is a therapeutic agent for superficial mycosis, a therapeutic agent for deep mycosis and an antibacterial agent (Claim 4),

the method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 1, which comprises removing the antimicrobial agent using dialysis or ultra filtration (Claim 5),

the method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 1, in which the infected site with the pathogenic microorganism is a skin or a nail (Claim 6),

the method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 1, in which the administration of the antimicrobial agent is carried out percutaneously, orally or intravenously (Claim 7),

the method for detecting a pathogenic microorganism of Claim 1, which comprises treating the infected site with the pathogenic microorganism with a digestive enzyme to detect the pathogenic microorganism (Claim 8),

a method for evaluating an effect of an antimicrobial agent which comprises detecting a pathogenic microorganism according to the method for detecting the pathogenic microorganism of Claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8 (Claim 9),

an antimicrobial agent obtained according to the method for evaluating an effect of an antimicrobial agent of Claim 9 (Claim 10), and

a method for detecting an antimicrobial agent which comprises infecting an animal or a biosample with a pathogenic microorganism, administering an antimicrobial agent comprising a compound having an antimicrobial effect or a composition thereof before or after the infection, then excising the infected site with the pathogenic

- 9 -

microorganism, placing and cultivating it on an agar medium containing the pathogenic microorganism, and thereafter detecting the antimicrobial agent existing in the infected site with the pathogenic microorganism through a growth inhibition of the pathogenic microorganism observed around the infected site with the pathogenic microorganism (Claim 11).

[Embodiment of the Invention]

As an animal employed in the present invention, there includes mammal such as mice, rat, guinea pig or rabbit. As a biosample, there includes a skin of back or planta, a nail or the like, which is taken from such animal.

A method for infecting such animal or biosample with a pathogenic microorganism includes an inoculation percutaneously, orally, intravenously, transbronchially, transnasally or intraperitoneally. Especially in case of the skin, there includes a method for inoculating it on the skin, a method for inoculating on the exposed demis, the closed patch method, intracutaneous injection or the like.

The term "skin" means a tissue including the three layers being epidermis, demis and subcutaneous tissue, accompanied by pilus (hair), nail, glandulae sebaceae, glandulae sudoriferae and glandulae mammaria as appendages.

In the present invention, the term "pathogenic microorganism" means a microorganism which causes human and animal disease in one way or another. An example of the pathogenic microorganism (hereinafter referred to "microorganism") is bacteria including aerobic Gram-negative bacillus and coccus such as

- 10 -

Pseudomonas and *Neisseriaceae* species; facultative anaerobic Gram-negative bacillus such as *Escherichia*, *Salmonella* and *Enterobacter* species; Gram-positive coccus such as *Staphylococcus* and *Streptococcus* species. The other examples of microorganism are fungi including Hyphomycetes such as *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* species; Blastomycetes such as *Candida* and *Malassezia*; Ascomycetes such as *Aspergillus* species; Zygomycetes such as *Mucor* species; and variants thereof. Examples of such variants are resistant strain which naturally obtains drug resistance; auxotrophic mutation strain which comes to have nutritious dependency; artificial mutation strain which is artificially mutated by treatment with mutagenic agent; and the like.

Mycosis means a disease which is caused by invading and proliferating in the tissue of human or animal. Usually, mycosis is broadly divided into superficial mycosis and deep mycosis. A seat of the disease lie in the skin or visible mucosa in case of the former, in viscus, central nervous system, subcutaneous tissue, muscle, bone or articulation in case of the latter. Chief example of superficial mycosis is dermatophytosis which is caused by infecting with dermatophyte such as *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* species, including three disease, tinea, tinea favosa and tinea imbricata. Tinea may be conventionally employed a synonymous with dermatophytosis.

In the present invention, an antimicrobial agent means a compound having an antimicrobial effect or a composition containing the compound. The composition includes a preparation form being artificial composition and a natural composition such as a natural product.

- 11 -

A method for administration of the antimicrobial agent in the present invention depends on the kind thereof and includes topical application, subcutaneous administration, oral administration, intravenous administration or the like.

When the method for detecting the pathogenic microorganism, the method for evaluating the drug effect and the method for detecting the antimicrobial agent according to the present invention is carried out, either an infection with microorganism or an administration of the antimicrobial agent may be carried out first. Especially, in the method for evaluating the drug effect of the present invention (hereinafter referred to "the present evaluation method"), a therapeutic effect of the antimicrobial agent can be evaluated in case where the antimicrobial agent is administered after the infection with microorganism, meanwhile, the effect of the antimicrobial agent protecting from the infection and the retention capacity thereof can be evaluated in case where the infection with microorganism is carried out after the administration of the antimicrobial agent. In order to evaluate the retention capacity of the antimicrobial agent, the evaluation can be carried out with varying the period until infection with microorganism from the administration of the antimicrobial agent.

In the present invention, it is preferable to use dialysis or ultra filtration for removing the antimicrobial agent in view of simpleness, but not limited thereto as long as a microorganism used in the present evaluation method and the like is not affected by it.

In dialysis, a marketed dialysis membrane made of cellulose is convenient. A membrane made of other material can be used without problem, as long as the microorganism used in the

- 12 -

present evaluation method and the like can not be passed, and the antimicrobial agent can be passed through it. Since sizes of most fungi and bacteria are at least $0.2 \mu\text{m}$, it is preferable to use the membrane having less than $0.2 \mu\text{m}$ of the pore size, particularly it is suitable to use dialysis membrane having fractional molecular weight of 1,000 to 50,000.

As outside solutions used in dialysis, there include physiological saline, distilled water, phosphate buffered physiological saline, other buffer and the like.

In removing the antimicrobial agent according to the present invention, even though the infected site with the microorganism is the nail, organ or the like as well as the skin, the antimicrobial agent can be efficiently removed. Usually, since there is the case where it takes longer time for dialysis to remove the antimicrobial agent from nail than skin, the following treatment with digestive enzyme may be carried out before removing it in order to enhance the removal effect.

Dialysis conditions depend on variety, dose concentration, dose term and the drug holidays (the term until evaluation from last day of treatment) of an antimicrobial agent. Therefore, it is preferable to previously investigate the dialysis conditions enabling the antimicrobial agent to be removed from the treated skin about individual cases using the following detecting method of the existing antimicrobial agent in the infected site with a microorganism in the present invention (hereinafter referred to "the present method for detecting an agent") to adjust the conditions appropriately.

Whether an antimicrobial agent has been removed can be

easily determined using the following method.

The present method for detecting an agent is carried out by placing and cultivating the infected site with a microorganism which is subjected to the removing method of the antimicrobial agent (e.g. an skin piece) or a suspension obtained according to the following extraction procedure of the microorganism from the above skin piece on an agar medium containing the microorganism, and observing a growth inhibition of the microorganism found around it. When there is the remaining antimicrobial agent, the growth inhibition of the microorganism is observed.

The present evaluation method can be carried out by locating and cultivating, on a medium, the skin piece in which a removal of an antimicrobial agent has been determined using the above mentioned present method for detecting the agent after carrying out the appropriate removal of the antimicrobial agent and observing whether there is a growth of microorganism or not, or by smearing and cultivating a suspension obtained according to the extraction procedure of the microorganism from the skin piece on an agar medium and counting colonies emerging on those medium.

A treatment with trypsin can be carried out in order to extract a microorganism efficiently from a biosample such as a skin or a nail. Other digestive enzyme than trypsin such as pronase or keratinase, or a keratin resolvent such as urea also can be used without limitation to trypsin as long as they have an extraction effect. It is necessary to adjust concentrations of the digestive enzyme such as trypsin and keratin resolvent in a treating solution, and reaction time

- 14 -

to no affect range to a microorganism. The treatment with digestive enzyme such as trypsin may be carried out either before or after dialysis. When the treatment with trypsin is carried out before dialysis, it is necessary to remove the digestive enzyme sufficiently so that the microorganism is not affected on dialysis.

As a medium used for a cultivation of a microorganism in the present invention, any medium can be used as long as it can be conventionally used for the cultivation and a separation of the microorganism. In the case of fungi, the example of the medium is Sabouraud medium, modified Sabouraud medium, Czapek agar medium, Potato dextrose agar medium or the like. On the other hand, in the case of bacteria, example of the medium is Mueller Hinton medium, modified Mueller Hinton medium, Heart Infusion agar medium, Brain Heart Infusion agar medium, normal agar medium or the like.

A reacting temperature is 10 to 40°C, preferably 20 to 40°C. A microorganism may be cultivated with standing during a sufficient time when the microorganism can be grown, for example, 1 to 20 days for fungi, 1 to 5 days for bacteria.

The present evaluation method can be utilized as an evaluation method of a drug effect in *exo vivo* which comprises infecting a skin, a nail excised from an animal body with a microorganism, thereafter administering an antimicrobial agent as a test compound, then removing the antimicrobial agent and detecting and determining quantity of the microorganism in the sample.

The present evaluation method also can be applied to an evaluation of an antimicrobial agent such as a therapeutic agent for deep mycosis or an antibacterial agent as well as an evaluation of an

- 15 -

effect of a therapeutic agent for superficial mycosis. That is to say, it is possible to evaluate an effect of a therapeutic agent for deep mycosis or an antibacterial agent by means of administering an antimicrobial agent to an animal infected with a microorganism such as a fungus or a bacterium by inoculating percutaneously, orally, intravenously, transbronchially, transnasally, intraperitoneally, then obtaining biosample such as skin, kidney, lung or brain, and detecting the viable microorganism in the biosample in which the remaining antimicrobial agent has been removed.

In addition, the present evaluation method enables a quantitative comparison of antimicrobial effects by means of determining the number of viable microorganisms in the treated biosample.

That is to say, a test of significance is carried out about the number of microorganisms in the infected site with the microorganism for the treated group with drug and for the reference infected group using a statistical method such as Kruskal-Wallis Test, and thereby a quantitative comparison between the groups can be done.

As the antimicrobial agent obtained by the present evaluation method, there is an antimicrobial agent comprising a compound having an eradication effect for microorganism *in vivo* or a composition for therapy of the superficial mycosis, deep mycosis or bacterial infection containing the compound; an antimicrobial agent having the true effect selected by means of showing a statistically significant effect; furthermore, an antimicrobial agent having an excellent eradication effect for microorganism *in vivo*, which is selected by means of clarifying the pure antimicrobial activity thereof; or an

- 16 -

antimicrobial agent of the complete cure type without relapse. A concrete example is a compound which shows a therapeutic effect like KP-103 mentioned below.

The antimicrobial agent obtained in such manner can be used as a drug composition, the drug composition in order to sterilize a microorganism. In other words, it comes to be a drug composition which cures disease such as mycosis completely, and prevents a relapse.

EXAMPLE

The present invention is further explained in details based on the Examples hereinafter, but is not limited thereto.

Millipore Filter (made by Millipore Corporation, HA, diameter 47 mm, 0.45 μ m) was placed on Brain-Heart-infusion agar medium (available from Nissui Pharmaceutical Co., LTD.), and 10^6 cells of microconidium of *Trichophyton mentagrophytes* KD-04 strain were applied thereon. The cultivation was carried out at 30°C under 17 % of CO₂ for 7 days. After the cultivation, an appropriate amount of physiological saline containing 0.05 % of Tween 80 was dropped on the filter and arthroconidia were collected using a platinum loop. After a hyphal mass was removed with a sterile gauze, the number of arthroconidia in the arthroconidia suspension was calculated by hemocytometer to adjust in concentration of 1×10^8 arthroconidia / ml to obtain a fungal inocula.

A guinea pig model of interdigital type of tinea pedis was

- 17 -

prepared according to the method of Arika et al (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 36: 2523-2525, 1992). Concretely, in two hind foots of male Hartley strain guinea pigs of 7 weeks age, the interdigital skin was lightly abraded with sandpaper. A paper disc (AAdisc available from Whatmen International Ltd cut in 8 x 4 mm) moisten with the above-mentioned solution of the inoculated organism was applied onto the region between the interdigital toes of the hind feet and fixed using Self-adhering-Foam Pad (Restone 1560M; available from 3M) and adhesive stretch bandage (ELASTPORE; available from Nichiban Co., Ltd). The paper disc and the bandage were removed seven days after the infection.

Preparation of drug-solution and topical treatment for guinea pig model of interdigital type of tinea pedis

A marketed 1 % lanoconazole solution (commercial name: Astat (trade name) solution) and a solution in which KP-103 synthesized in Development Research Laboratories of Kaken Pharmaceutical Co., Ltd. ((2R, 3R)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(4-methylenepiperidine-1-yl)-1-(1H-1,2,4-triazole-1-yl) butane-2-ol, the compound as described in Example 1 in WO 94/26734) was solved in a concentration of 1 % in polyethylene glycol #400 : ethanol (75 : 25 v/v) mixture were used as test substance. Each solution in an amount of 0.1 ml was applied to the plantar skin once a day from 10 days after the infection for 10 days.

COMPARATIVE EXAMPLE 1

Conventional method for evaluating drug effect

- 18 -

The conventional method was described as follows. For the infected control group without an application of the drug, the KP-103-treated group and the lanoconazole-treated group, 10 guinea pigs (hereinafter referred to "animal") were employed, respectively. Animals of each group were sacrificed two days after and 30 days after the last treatment. Their two hind feet were excised and wiped with the cotton swab containing alcohol sufficiently. A skin of whole sole was excised and cut into 15 skin pieces in total including 12 skin pieces from plantar parts and 3 skin pieces from an interdigital part. Each skin pieces were placed on 20 ml of Sabouraud dextrose agar medium (available from Difco laboratories) containing 50 μ g of chloramphenicol (available from Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 100 μ g of gentamicin (available from Schering-Plough Corporation), 50 μ g of 5-fluorocytosine (available from Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) and 1 mg of cycloheximide (available from Nacalai Tesque, Inc.) per ml. An antibiotic substance added to the medium was set to a condition which enables bacteria not to grow and which enables fungi to grow without problem. After 10 days of cultivation at 30°C, the result is described as "fungus-negative" when no growth of fungus was observed in all skin pieces, and the number of fungus-negative feet was determined. In the evaluation of the effect 30 days after the last treatment, two days after the last treatment the treated feet were wiped with a cotton swab containing alcohol and fixed with the bandage in order to prevent a reinfection. The bandage was changed once a week. The therapeutic effects of KP-103 and lanoconazole two days after and 30 days after the last treatment are shown in Table 1.

- 19 -

TABLE 1

Comparison of the therapeutic effect of two days after and 30 days after the last treatment according to conventional method

Test substance	The number of fungus-negative feet/ Total number of infected feet	
	Two days after the last treatment	30 days after the last treatment
Infected control	0/20	0/20
KP-103	20/20	16/20
Lanocanazole	20/20	9/20

As shown in the Table 1, in the KP-103-treated group, fungus-negative was observed in all feet two days after the last treatment, and also fungus-negative was observed in 16 out of 20 feet 30 days after the last treatment. On the other hand, in the lanocanazole-treated group, fungus-negative was observed in all feet two days after the last treatment, but fungus-negative was observed in only 9 feet 30 days after the last treatment. The number of fungus-negative feet decreased 30 days after the last treatment. It was thought that the therapeutic effect of lanocanazole observed two days after the last treatment resulted from the inhibition of the growth of fungus caused by an interfusion of the drug remaining in the treated skin into culture system, because lanocanazole had a potent *in vitro* antifungal activity against dermatophytes, it was eight-fold more active than KP-103 against *Trichophyton* with a growth inhibitory concentration of 15.6 ng/ml. The determination test of the remaining agent was carried out.

- 20 -

EXAMPLE 1

Determination of drug remaining in skin which has been already evaluated five days after last treatment according to conventional method

A model was prepared according to Comparative Example 1. Lanocanazole being a test compound was used for a therapeutic experience as 1 % solution with the same vehicle as KP-103. For the infected control group without an application of a drug, the KP-103-treated group and the lanocanazole-treated group, 20 animals were employed, respectively. The two hind feet were excised from each animal five days after the last treatment in the same manner as in Comparative Example 1. A total of 20 left feet were used for an evaluation by the conventional method, and a total of 20 right feet were used in the present evaluation method.

The skin pieces of left foot were placed on 20 ml of Sabouraud dextrose agar medium containing *Trichophyton mentagrophytes* KD-04 strain (2×10^4 cells/ml) and the antibiotic substance described in Comparative Example 1. After the cultivation was carried out at 30°C for 3 days, a growth inhibitory-zone of fungus appeared around the skin was observed and was photographed for 10 out of 20 feet. Figure 1 is an electronic data of the photograph of the skin after the cultivation in the above-mentioned condition. (a) indicates the infected control group without the drug application, (b) the KP-103-treated group and (c) the lanocanazole-treated group. One plate was explained as a representative of ten plates corresponding to each animal in the infected control group (a). In Figure 1, S indicates one of 15 skin pieces of planta derived from the animal and M the

- 21 -

above mentioned medium. S and M described in both the KP-103-treated group (b) and the lanoconazole-treated group (c) are also the same. In the medium, the white zone shows the growth of fungus, on the other hand, the black zone shows the inhibition of the growth of fungus.

As shown in Figure 1, a good growth of the fungus was observed around the skin piece of the infected control group without any drug. In the group treated with KP-103, the growth of fungus was observed in all skin pieces, although in around the skin pieces the growth of fungus was slightly inhibited as compared with the infected control group. On the other hand, the growth of fungus was completely inhibited in around the skin pieces treated with lanoconazole. As these results, the therapeutic effect of lanoconazole in the conventional method shown in Table 1 was considered as an apparent therapeutic effect such that the agent remaining in the skin come to be mixed in culture system to inhibit the growth of fungus.

Therefore, it came to appear that the drug effect could not be evaluated by the conventional method precisely.

EXAMPLE 2

Determination of remaining drug after removing drug from skin

As Example 1, 20 right feet were excised from each animal five days after the last treatment, and sufficiently wiped with the cotton swab containing alcohol. The planta was cut off from each foot. The skin minced by a scissors was put into dialysis membrane (fractional molecular weight: 12,000-14,000, made of cellulose, available from VISKASE SALES Corporation) together with 4 ml of distilled water.

- 22 -

Dialysis was carried out under 3 L of distilled water at 4°C for 2 days. The dialysis water was changed twice a day 4 times in total. The content was transferred into a glass homogenizer. Thereto 4 ml double-concentration phosphate buffered saline containing 4 % of trypsin derived from pig pancreas (available from BIOZYME Laboratories Limited) was added and the resulting mixture was homogenized. It was left at 37°C for one hour and was filtrated with the two-ply gauze. The resulting filtrate was centrifuged. To a precipitate obtained by removing the supernatant were added 8 ml of phosphate buffered saline containing 2 % of trypsin and further it allowed to react with shaking at 37°C for one hour. After a centrifugation, the precipitate obtained by removing the supernatant was washed three times by centrifuging with phosphate buffered saline in order to remove trypsin. To the precipitate 2 ml of the same saline were added to prepare a suspension thereof.

When dialysis and the treatment with trypsin were carried out using the same fungus used in this Example, an affect of these procedures on a survival rate of fungus could not be observed.

Previously, a well was prepared in the center of Sabouraud dextrose agar medium (20 ml) containing *Trichophyton mentagrophytes* KD-04 strain (2×10^4 cells/ml) and the antibiotic substance described in Comparative Example 1. Into the well 100 μ l of the above mentioned suspension were added to cultivate at 30°C for three days. After the cultivation, a growth inhibitory-circle of fungus appeared was observed and 10 out of 20 feet were photographed. Figure 2 is an electronic data of the photograph of the skin after the cultivation in the above mentioned condition. (a) indicates the

- 23 -

infected control group without the drug application, (b) the KP-103-treated group and (c) the lanoconazole-treated group. One plate was explained as a representative of ten plates corresponding to each animal in the infected control group (a). In Figure 2, E indicates the skin suspension prepared from planta of the animal and M the above mentioned medium. E and M which are described in both the KP-103-treated group (b) and the lanoconazole-treated group (c) are also the same. In the whole medium, the white zone shows the growth of fungus, on the other hand, the black zone around the well shows the inhibition of the growth of fungus.

In Figure 1 showing the conventional method, no growth of fungus was observed in around the skin of the lanoconazole-treated group taken five days after the last treatment and the remaining drug was determined in the skin. By contrast, in Figure 2, although few growth-inhibitory circles were observed in 2 out 10 feet suspension obtained by removing the drug using dialysis treatment of the present invention for the skin of the lanoconazole-treated group taken five days after the last treatment, the growth-inhibitory circle was never observed in residual 8 feet.

Since it came to appear that the drug remaining in treated skin could be sufficiently removed using dialysis according to the present invention, it was confirmed that the evaluation of the drug effect was not affect by the remaining drug.

EXAMPLE 3

Detection of viable fungus in skin and evaluation of drug effect

To two medium of Sabouraud dextrose agar medium (20

- 24 -

ml) containing the antibiotic substance described in Comparative Example 1 were applied 100 μ l of the suspension from one right feet of each animals obtained in Example 2. After the cultivation was carried out at 30°C for 10 days, the result is described as "fungus-negative" when a colony of fungus was not observed in two agar plates (detection limit: 10 CFU (colony forming unit)/feet). The number of fungus-negative feet were counted. On the other hand, left feet were evaluated in the same manner as in Comparative Example 1. Table 2 shows the result of comparing the therapeutic effect evaluated by the conventional method with that by the present evaluation method.

TABLE2

Comparison of therapeutic effect of five days after last treatment

Test substance	The number of fungus-negative feet/ Total number of infected feet	
	Conventional Method	Present evaluation method
Infected control	0/20	0/20
KP-103	19/20	17/20
Lanoconazole	20/20	3/20

In case of the group treated with KP-103, no significant difference was observed in the number of fungus-negative feet, even if the number was evaluated by either the conventional method or the present evaluation method, as shown in Table 2. The rate of a fungus-negative foot evaluated by the present evaluation method is

- 25 -

85% in case of KP-103. On the other hand, in the group treated with lanoconazole, although "fungus-negative" was observed in all feet by the conventional method, but "fungus-negative" was just observed in only three feet by the present evaluation method.

As mentioned above, it became clear that using the present evaluation method, a true drug effect can be substantially evaluated without an affect by the remaining drug after the treatment therewith.

Furthermore, a result in the present evaluation method correlates with a result obtained by evaluation in the conventional method described in Comparative Example 1 in 30 days after the last treatment. Thereby, by using the present evaluation method, an effect of an antimicrobial agent to prevent a relapse can be estimated by the evaluation at an early time after a treatment. Therefore, a complete cure type of the antimicrobial agent without the relapse can be obtained by using the present evaluation method.

[Effect of the Invention]

As mentioned above, recently developed drugs having an extremely potent activity against *Trichophyton in vitro* such as lanoconazole bring about the judgement of fungus-negative according to the conventional method regardless of the existence of the no-treated fungus in the skin, since the drug remaining in the treated skin inhibits a growth of the fungus in the skin.

On the contrary, according to the present invention, an effect of an antimicrobial agent can be evaluated accurately, since a remaining drug can be removed by dialyzing the infected site with a microorganism of animal or biosample such as the treated skin using a

- 26 -

dialysis membrane. Furthermore, although it is difficult to compare quantitatively an antimicrobial effect such as an antifungal effect in conventional method, the present evaluation method enables the antimicrobial effects to compare quantitatively, since the number of viable fungi in the infected site of an animal or a biosample such as a skin can be determined precisely. In addition, the therapeutic effect based on the present evaluation method reflect a result as to relapse in the conventional method and therefore an effect to prevent relapse can be estimated by evaluating at earlier time after the treatment according to the present evaluation method. Therefore, in the present evaluation method, a true effect of an antimicrobial agent can be evaluated and it is possible to select an antimicrobial agent having an excellent sterilization effect against fungi *in vivo* or an antimicrobial agent of complete cure type which does not bring about relapse. As mentioned above, the present evaluation method is very useful as a method for evaluating the antimicrobial agent.

[BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS)

[Fig. 1] An electronically processed photograph to identify the agent remaining in the skin which is previously evaluated by the conventional method in the detecting method of the antimicrobial agent five days after last treatment in the present invention. (a) shows the infected control group, (b) the KP-103-treated group, (c) the lanoconazole-treated group.

[Fig. 2] An electronically processed photograph to identify agent remaining in the skin which is previously evaluated by the detecting method of the antimicrobial agent five days after last treatment in the

- 27 -

present invention. (a) shows the infected control group, (b) the KP-103-treated group, (c) the Itraconazole-treated group.

[Explanation of Symbols]

S: Skin pieces of planta derived from guinea pig

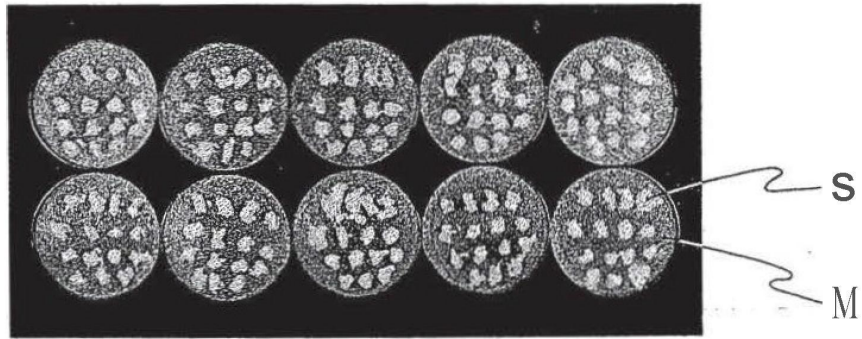
E: Skin suspension prepared from planta of the guinea pig

M: Sabouraud dextrose agar medium containing Trichophyton mentagrophytes KD-04 strain

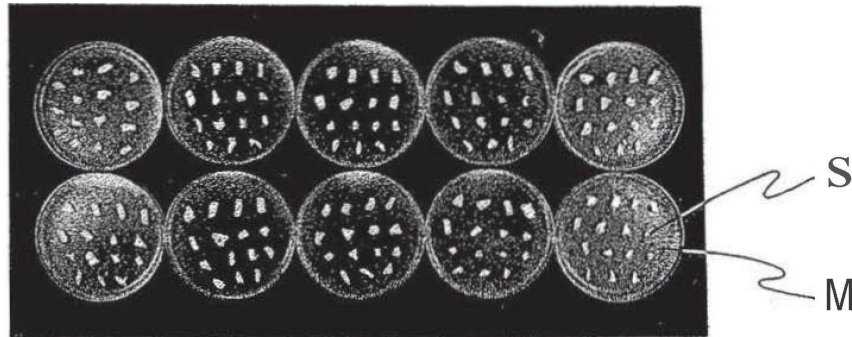
[Document Name] DRAWINGS

[Fig. 1]

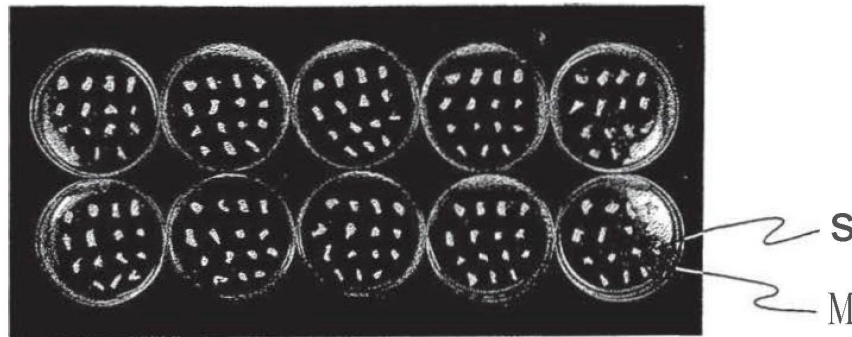
(a)



(b)

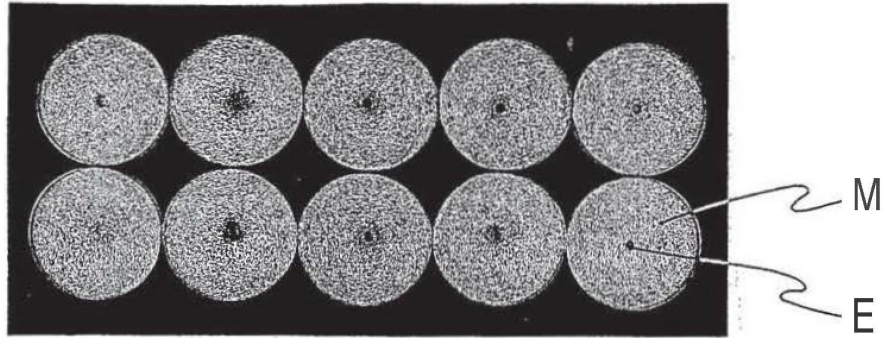


(c)

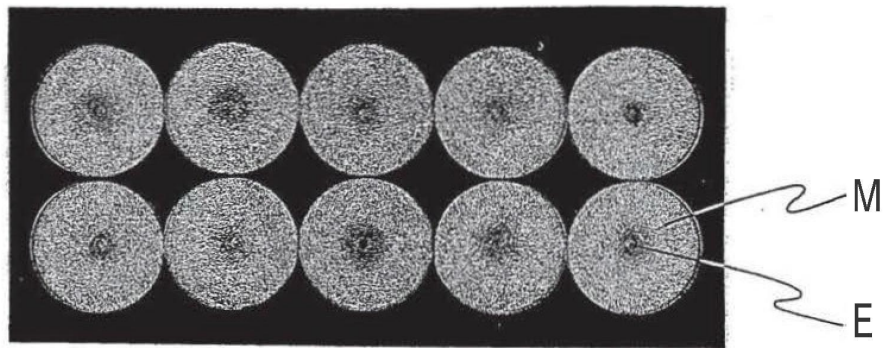


[Fig. 2]

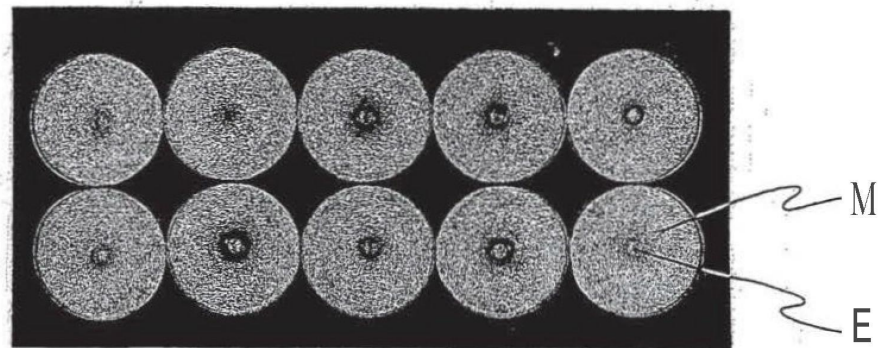
(a)



(b)



(c)



Information of Applicant History

Identification Number	[000124269]
1. Date of modification	August 10, 1990
[Reason(s) of modification]	New registration
Address	28-8 Honkomagome 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo-to
Name	Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.

10/031929
PCT/JP00/04617
11.07.00

JP 00/4617

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 25 AUG 2000
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 1999年 7月28日

出願番号
Application Number: 平成11年特許願第214369号

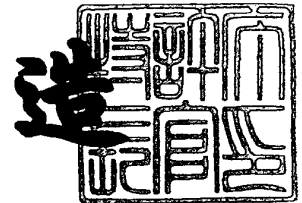
出願人
Applicant (s): 科研製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月11日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3062601

【書類名】 特許願
【整理番号】 JP-11531
【提出日】 平成11年 7月28日
【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿
【国際特許分類】 C12Q 1/18

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市山科区四ノ宮南河原町14番地 科研製薬株式会社 開発研究所内

【氏名】 巽 良之

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市山科区四ノ宮南河原町14番地 科研製薬株式会社 開発研究所内

【氏名】 横尾 守

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区本駒込二丁目28番8号 科研製薬株式会社内

【氏名】 中村 公章

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県藤枝市源助301番地 科研製薬株式会社 開発研究所内

【氏名】 有可 正

【特許出願人】

【識別番号】 000124269

【氏名又は名称】 科研製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100065226

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 宗太

【電話番号】 06-6943-8922

【選任した代理人】

【識別番号】 100098257

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐木 啓二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001627

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9002226

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 病原微生物および抗微生物剤の検出法ならびに抗微生物剤の薬効評価法およびそれにより得られる抗微生物剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 動物または生体試料に病原微生物を感染させ、該感染の前または後に、抗微生物作用を有する化合物またはそれを含有する組成物からなる抗微生物剤を投与し、ついで前記抗微生物剤を除去したのち、病原微生物被感染部位に生存する病原微生物を検出する病原微生物の検出法。

【請求項 2】 前記病原微生物が細菌または真菌である請求項 1 記載の病原微生物の検出法。

【請求項 3】 前記真菌が表在性真菌症または深在性真菌症の原因菌である請求項 2 記載の病原微生物の検出法。

【請求項 4】 前記抗微生物剤が表在性真菌症治療剤、深在性真菌症治療剤または抗細菌剤である請求項 1 記載の病原微生物の検出法。

【請求項 5】 前記抗微生物剤を透析または限外ろ過により除去する請求項 1 記載の病原微生物の検出法。

【請求項 6】 前記病原微生物被感染部位が皮膚または爪である請求項 1 記載の病原微生物の検出法。

【請求項 7】 前記抗微生物剤の投与を経皮投与、経口投与または静脈内投与により行う請求項 1 記載の病原微生物の検出法。

【請求項 8】 病原微生物の検出のため病原微生物被感染部位を消化酵素処理する請求項 1 記載の病原微生物の検出法。

【請求項 9】 請求項 1、2、3、4、5、6、7 または 8 記載の病原微生物の検出法により病原微生物を検出することからなる抗微生物剤の薬効評価法。

【請求項 10】 請求項 9 記載の抗微生物剤の薬効評価法に基づいて得られる抗微生物剤。

【請求項 11】 動物または生体試料に病原微生物を感染させ、該感染の前または後に、抗微生物作用を有する化合物またはそれを含有する組成物からなる抗微生物剤を投与し、ついで病原微生物被感染部位を採取し、それを病原微生物

を含む寒天培地上に置き培養後、前記病原微生物被感染部位の周囲に観察される病原微生物の発育阻止により前記病原微生物被感染部位に存在する抗微生物剤を検出する抗微生物剤の検出法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、病原微生物に対する抗微生物剤の薬効評価法に関し、さらに詳しくは、治療後に動物または生体試料の病原微生物被感染部位に存在する抗微生物剤を除いたあと前記病原微生物被感染部位に生存する病原微生物を検出し正確に定量することのできる薬効評価法に関する。

【0002】

【従来の技術】

新規な抗微生物剤（以下、薬剤ともいう）を探索するためには、動物モデルを用いた薬効評価法が必要であり、また、臨床上的治療効果を予知する上でも極めて重要であるため薬効を正確に評価できる方法が必要である。

【0003】

従来、白癬に対する抗真菌剤の薬効評価にはモルモットの背部、足底または趾間部にトリコフィトン メンタグロフィテス (*Trichophyton mentagrophytes*) を感染させる実験的白癬モデルが使用されている。これらの動物モデルは既にいくつかの抗真菌剤の開発に用いられてきた。これら抗真菌剤の薬効評価は、感染動物に抗真菌剤を塗布し、一定期間経過後に皮膚を採取、裁断し複数の小断片に切り分け、この皮膚片を培地上で培養し菌の発育が見られない断片の数、または全ての皮膚片で菌の発育が見られない動物または足の数を指標として行われている (*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36:2523-2525, 1992.)。以下、従来の薬効評価法を従来法という。

【0004】

近年、白癬菌に対して強力なインビトロ活性を有しているラノコナゾール、アモロフィンなどの薬剤が上市されたにも関わらず、臨床における治癒率の向上はあまり認められていない。その主な原因として、治療後に皮膚内の菌が完全に

死滅していないために再び菌が増殖する再燃が指摘されている。

【0005】

動物実験においても従来法でラノコナゾールのモルモット足白癬モデルにおける効果を評価すると、最終治療2日後では、20足中全足に菌の陰性化が観察されたが、最終治療30日後では20足中11足に再燃が観察され、最終治療2日後の効果と最終治療30日後の効果との間に相関性が認められなかった(36th International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, Louisiana, 1996, Abstr.F80)。

【0006】

この原因としては、ラノコナゾールは極めて強いインビトロ抗白癬活性を有しており、最終治療2日後では皮膚に殺菌作用を示す濃度の該薬剤がまだ残留しており、その皮膚を採取して菌の検出のために培地上で培養した際に、残留する該薬剤が培地中に混入し、皮膚内に菌が生存しているにもかかわらず菌の発育が阻止され菌が検出されなかったが、一方、最終治療30日後では皮膚内に残留する該薬剤の濃度が低下し、皮膚内の菌は再増殖することができ、それゆえ菌が検出されたと考えた。

【0007】

この仮説をもとに、予め菌を含有させた培地上にラノコナゾールによる治療後の皮膚片を置き培養した結果、皮膚片の周囲で菌の発育は完全に阻止され、皮膚内に該薬剤が残留していることが確認された。

【0008】

従って、従来法では皮膚内に残留する薬剤により見かけ上治療効果があるように評価されてしまい、薬効を正確に評価できないという問題点があることが明らかになった。

【0009】

このことから、抗微生物剤、とくに抗真菌剤などの薬効を評価する場合、治療後の皮膚など動物または生体試料の病原微生物被感染部位に残留する薬剤を除いた上で評価する必要があると考えた。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、抗微生物剤の新規な薬効評価法および該薬効評価法に基づいて得られる抗微生物剤を提供することを目的としており、詳しくは、動物または生体試料に抗微生物剤を投与し、ついで該抗微生物剤を除去したのち、前記動物または生体試料の病原微生物被感染部位に生存する病原微生物の検出法、前記病原微生物の検出法からなる動物または生体試料の病原微生物被感染部位に残留する抗微生物剤の影響を受けず正確に該抗微生物剤の薬効を評価できる抗微生物剤の薬効評価法および前記薬効評価法に基づいて得られる抗微生物剤、さらには、抗微生物剤を投与した動物または生体試料の病原微生物被感染部位に存在する該抗微生物剤を検出する抗微生物剤の検出法を提供するものである。

【0011】

なお、「存在」には「残留」の意を含むものとする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

前記課題を解決するために、本発明者らは抗微生物剤を投与した動物または生体試料の病原微生物被感染部位に残留する該抗微生物剤の影響を受けない正確な抗微生物剤の薬効評価法を求め鋭意研究を重ねた結果、動物または生体試料の病原微生物被感染部位に残留する抗微生物剤を十分に除いたあとに、皮膚など前記病原微生物被感染部位に生存する病原微生物を検出および定量することにより、抗真菌剤など抗微生物剤の薬効を正確に評価できる方法を見出し、本発明を完成するにいたった。

【0013】

すなわち、本発明は、
動物または生体試料に病原微生物を感染させ、該感染の前または後に、抗微生物作用を有する化合物またはそれを含有する組成物からなる抗微生物剤を投与し、
ついで前記抗微生物剤を除去したのち、病原微生物被感染部位に生存する病原微生物を検出する病原微生物の検出法（請求項1）、
前記病原微生物が細菌または真菌である請求項1記載の病原微生物の検出法（請求項2）、

前記真菌が表在性真菌症または深在性真菌症の原因菌である請求項 2 記載の病原微生物の検出法（請求項 3）、

前記抗微生物剤が表在性真菌症治療剤、深在性真菌症治療剤または抗細菌剤である請求項 1 記載の病原微生物の検出法（請求項 4）、

前記抗微生物剤を透析または限外ろ過により除去する請求項 1 記載の病原微生物の検出法（請求項 5）、

前記病原微生物被感染部位が皮膚または爪である請求項 1 記載の病原微生物の検出法（請求項 6）、

前記抗微生物剤の投与を経皮投与、経口投与または静脈内投与により行う請求項 1 記載の病原微生物の検出法（請求項 7）、

病原微生物の検出のため病原微生物被感染部位を消化酵素処理する請求項 1 記載の病原微生物の検出法（請求項 8）、

請求項 1、2、3、4、5、6、7 または 8 記載の病原微生物の検出法により病原微生物を検出することからなる抗微生物剤の薬効評価法（請求項 9）、

請求項 9 記載の抗微生物剤の薬効評価法に基づいて得られる抗微生物剤（請求項 10）、および

動物または生体試料に病原微生物を感染させ、該感染の前または後に、抗微生物作用を有する化合物またはそれを含有する組成物からなる抗微生物剤を投与し、ついで病原微生物被感染部位を採取し、それを病原微生物を含む寒天培地上に置き培養後、前記病原微生物被感染部位の周囲に観察される病原微生物の発育阻止により前記病原微生物被感染部位に存在する抗微生物剤を検出する抗微生物剤の検出法（請求項 11）

を提供するものである。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明に用いられる動物としては、哺乳類、たとえばマウス、ラット、モルモット、ウサギなどがあげられる。生体試料としては、これら動物から採取した背部または足裏部皮膚、爪などがあげられる。

【0015】

これら動物または生体試料への病原微生物の感染方法としては、経皮、経口、経静脈、経気道、経鼻、腹腔内などの接種があげられる。とくに皮膚の場合、皮膚上に塗布する方法、真皮を露出させて該真皮上に塗布する方法、クローズドパッチ法、皮内注射法などがあげられる。

【0016】

皮膚という語は、表皮、真皮および皮下組織の3層を含み、付属器官として毛、爪、脂腺、汗腺、乳腺などを伴う組織を意味する。

【0017】

本発明で病原微生物という語は何らかの形で人や動物に疾病を起こす微生物を言う。病原微生物（以下、微生物という）として具体的に、細菌としては、シュードモナス属（*Pseudomonas*）、ナイセリア属（*Neisseriaceae*）などの好気性グラム陰性桿菌および球菌、大腸菌（*Escherichia*）、サルモネラ属（*Salmonella*）、エンテロバクター属（*Enterobacter*）などの通性嫌気性グラム陰性桿菌、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）、連鎖球菌（*Streptococcus*）などのグラム陽性球菌などが例示できる。真菌としては、トリコフィトン属（*Trichophyton*）、ミクロスポラム属（*Microsporium*）などの不完全糸状菌やカンジダ属（*Candida*）、マラセチア属（*Malassezia*）などの不完全酵母、アスペルギルス属（*Aspergillus*）の子嚢菌類、ムコール属（*Mucor*）の接合菌類およびこれらの変異株があげられる。これらの変異株としては、自然に薬剤に対して耐性を獲得した耐性株、栄養依存性を有するようになった栄養依存性変異株、変異原処理などを行い人為的に変異させた人工変異株などが例示できる。

【0018】

真菌症とは、真菌が人や動物の組織内に侵入し増殖して発症にいたった疾患群を言い、通常、表在性真菌症と深在性真菌症に大別され、前者では、皮膚と可視粘膜に病巣があり、後者では、内臓、中枢神経系、皮下組織、筋肉、骨、関節が侵される。とくに表在性真菌症には、白癬菌（*Trichophyton*属）、小孢子菌（*Microsporium*属）および表皮菌（*Epidermophyton*属）の皮膚糸状菌の感染によって起こされる皮膚糸状菌症があり、白癬、黄癬および渦状癬の3疾患が含まれる。白癬は慣例的に皮膚糸状菌症と同義語的に用いられることがある。

【0019】

本発明において、抗微生物剤とは、抗微生物作用を有する化合物、または、その化合物を含む組成物を意味し、組成物には人為的な組成物である剤形と天然抽出物など的人為的でない組成物が含まれる。

【0020】

本発明における抗微生物剤の投与は、その種類によって異なり、外用塗布、経皮投与、経口投与または静脈内投与などがあげられる。

【0021】

本発明において、微生物の感染と抗微生物剤の投与とは、いずれを先に行ってもよい。とくに本発明の薬効評価法（以下、本評価法という）においては、微生物の感染後に抗微生物剤の投与を行えば抗微生物剤の治療効果を評価でき、一方、抗微生物剤の投与を行ったあと微生物を感染させる場合は抗微生物剤の感染予防作用およびその貯留性を評価することができる。抗微生物剤の貯留性を評価する場合には、抗微生物剤投与後、微生物感染までの期間を変化させて評価すればよい。

【0022】

本発明において、抗微生物剤の除去には、本評価法などに用いられる微生物に影響を与えなければとくに限定されるものではないが、簡便性の点で透析または限外ろ過が好適に使用される。

【0023】

透析には市販のセルロース製の透析膜が便利であるが、その他の材質であっても本評価法などに用いられる微生物が通過せず、抗微生物剤が透過できる膜であれば問題なく使用できる。大部分の真菌および細菌の大きさは $0.2\mu\text{m}$ 以上であることから、孔径が $0.2\mu\text{m}$ 未満の膜が望ましく、とくに、分画分子量1000~50000の透析膜が好適に使用できる。

【0024】

透析に用いる外液は、生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝化生理食塩液および他の緩衝液などがあげられる。

【0025】

本発明における抗微生物剤の除去では、微生物被感染部位が皮膚のみならず爪や臓器などの場合でも該抗微生物剤を効率良く除去することができる。通常、皮膚に比べ爪からの抗微生物剤除去には長期間の透析を必要とする場合があり、除去効果を高めるには後述の消化酵素処理を除去前に行ってもよい。

【0026】

透析条件は該抗微生物剤の種類、投与濃度、投与期間および休薬期間（最終治療日から評価までの期間）によって異なるため、後述する本発明の微生物被感染部位に存在する抗微生物剤の検出法（以下、本薬剤検出法という）などにより、事前に治療後の皮膚から該抗微生物剤を除去できる透析条件を個々の場合について調べ、適宜調整すればよい。

【0027】

抗微生物剤が除去されていることを確認するには以下の方法により容易に行うことができる。

【0028】

本薬剤検出法は、前記抗微生物剤の除去方法により処理した微生物被感染部位、たとえば皮膚片など、または、後述する該皮膚片などからの微生物の抽出操作に従って得た懸濁液を、該皮膚片などに感染させた微生物を含む寒天培地上に置き、培養後、それらの周囲に観察される微生物の発育阻止を観察することにより行う。残留抗微生物剤が存在する場合、微生物の発育阻止が観察されることになる。

【0029】

本評価法は、とくに、適切な抗微生物剤の除去が行われたあと前記本薬剤検出法により抗微生物剤の除去が確認された皮膚片を培地上に置いて培養し、微生物の発育の有無を観察したり、または該皮膚片などから微生物の抽出操作によって得られた懸濁液を寒天培地に塗抹して培養し、培養後、培地上に出現したコロニー数を計測することにより行うことができる。

【0030】

皮膚および爪などの生体試料から微生物を効率良く抽出するためにトリプシン処理を行うことができるがとくに限定されるものではなく、トリプシン以外のプ

ロナーゼ、ケラチナーゼ等の消化酵素や尿素などの角質溶解剤も抽出効果が確認されれば使用可能である。但し、トリプシンなどの消化酵素や角質溶解剤の処理濃度および反応時間は微生物への影響の無い範囲で設定する必要がある。トリプシンなどの消化酵素の処理は透析の前および後のいずれに行ってもよい。但し、透析前にトリプシン処理を行った場合は透析の際には微生物への影響を無くすために消化酵素を十分に除去しておかなければならない。

【0031】

本発明において、微生物の培養に用いる培地としては、通常、培養や菌分離などに用いているものであれば問題はなく、たとえば、真菌ではサブロー培地、改変サブロー培地、ツアパック寒天培地、ポテトデキストロース寒天培地などが例示できる。一方、細菌については、ミュラー・ヒントン培地、改変ミュラー・ヒントン培地、ハート・インヒュージョン寒天培地、ブレイン・ハート・インヒュージョン寒天培地、普通寒天培地などが例示できる。

【0032】

微生物の培養温度は、10～40℃、好ましくは20～40℃で微生物が生育するのに十分な時間、例えば真菌では1～20日間、細菌では1～5日間静置培養すれば良い。

【0033】

本評価法は、動物の生体から摘出した皮膚、爪などに微生物を感染させたあと、被検体として抗微生物剤を投与し、しかるあとに該抗微生物剤を除き、試料内の微生物を検出し定量するエキソピボでの薬効評価法としても利用できる。

【0034】

また、本評価法は、表在性真菌症治療剤の薬効評価のみならず、深在性真菌症治療剤、抗細菌剤などの抗微生物剤の評価にも応用できる。すなわち、動物に経皮、経口、経静脈、経気道、経鼻、腹腔内などの接種により真菌、細菌などの微生物を感染させたあと、抗微生物剤を投与し、しかるあとに皮膚、腎臓、肺、脳などの生体試料を採取し、該生体試料に残留している該抗微生物剤を除いたあとに該生体試料に生存する微生物を検出することで、深在性真菌症治療剤や抗細菌剤の薬効評価が可能である。

【0035】

さらに、本評価法では、治療した生体試料中の生存微生物数を測定することで、抗微生物作用の定量的な比較が可能となる。

【0036】

すなわち、薬剤治療群および感染対照群における微生物被感染部位での微生物数を、クラスカル-ワーリス検定 (Kruskal-Wallis Test) などの統計学的方法を用いて有意差検定を行うことにより、群間の定量的な比較ができる。

【0037】

本評価法に基づいて得られる抗微生物剤とは、生体内での除菌効果を有する化合物またはそれを含有する表在性真菌症、深在性真菌症または細菌感染症の治療のための組成物からなる抗微生物剤であり、統計学的に有意な効果を示し選択される真の薬効を持った抗微生物剤、さらには、本評価法によりその薬剤の純粋な抗微生物活性が明らかにされて選択される生体内での除菌効果に優れる抗微生物剤または再燃を起こさない完治型の抗微生物剤をあげることができる。具体例としては、後述するKP-103のような薬効を示す化合物があげられる。

【0038】

そのようにして得られた抗微生物剤は、薬剤組成物として用いることもでき、微生物を殺菌するための薬剤組成物として用いることができる。したがって、真菌症などの疾患を完全に治療し再燃を防止する薬剤組成物ともなる。

【0039】

【実施例】

以下に実施例をあげてさらに詳しく本発明について説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0040】

菌液の調製とモルモット趾間型足白癬モデルの作成

ブレインハートインヒュージョン寒天培地 (日水製薬 (株) 製) 上にミリポアフィルター (HA、直径47mm、0.45 μ m、Millipore社製) を乗せ、その上にトリコフィトン メンタグロフィテス KD-04株 (Trichophyton mentagrophytes KD-04) の小分生子 10^6 個を塗抹したあと、17%CO₂

存在下、30℃で7日間培養した。培養後、フィルター上に0.05%ツイン80添加生理食塩水を適量滴下し、白金耳を用いて分節胞子を回収した。菌糸塊を滅菌ガーゼで除去後、分節胞子浮遊液中の分節胞子数を血球計算盤で算定し、 1×10^8 分節胞子/mlの濃度に調整し、接種菌液とした。

【0041】

有可らの方法 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 36:2523-2525, 1992) に準じてモルモット趾間型足白癬モデルを作成した。即ち、Hartley系7週齢雄性モルモットの後足2足の趾間部皮膚を軽くサンドペーパーで擦過したあと、趾間部に前記接種菌液に浸漬したペーパーディスク (Whatman社製のA Diskを8×4mmに切断) を挿入したあと、Self-adhering-Foam Pad (Restone1560M, 3M社製) および粘着性布伸縮包帯 (エラストポア、ニチバン (株) 製) で固定した。感染7日後にペーパーディスクおよび包帯を除去した。

【0042】

液剤の調製およびモルモット趾間型足白癬に対する塗布治療

被検体としては市販の1%ラノコナゾール液剤 (商品名; アスタット液) および科研製薬 (株) 開発研究所で合成したKP-103 ((2R, 3R)-2-(2, 4-ジフルオロフェニル)-3-(4-メチレンピペリジン-1-イル)-1-(1H-1, 2, 4-トリアゾール-1-イル) ブタン-2-オール, WO94/26734の実施例1に記載の化合物) をポリエチレングリコール#400:エタノール(75:25 v/v) 混液に1%濃度で溶解した液剤を用いた。感染10日後から1日1回、10日間、0.1mlを足裏皮膚に塗布治療した。

【0043】

比較例1

従来の薬効評価法

以下に、従来法を記述する。薬剤の塗布を行っていない感染対照群、KP-103治療群およびラノコナゾール治療群の各群につきモルモット (以下、動物という) 10匹とし、最終治療の2日後および30日後にそれぞれの群の動物を安

楽死させたあと後足2足を採取し酒精綿で十分に清拭したあと、足裏皮膚を切り出し、足底部から12個および足指部から3個の計15個の皮膚片に切り分けた。皮膚片をクロラムフェニコール（和光純薬工業（株）製）50 μ g/ml、ゲンタマイシン（シェーリング・プラウ）100 μ g/ml、5-フルオロシトシン（和光純薬工業（株）製）50 μ g/ml、シクロヘキシミド（ナカライテスグ（株）製）1mg/mlを含むサブローテキストロースアガー（Difco社製）培地（20ml）の上に乗せた。培地に添加した抗生物質は細菌を生育させない一方、真菌の生育には支障の無い条件で設定した。30℃で10日間培養したあと、全ての皮膚片に菌の発育が観察されない場合を菌陰性化とし菌陰性化足数を求めた。最終治療30日後の薬効評価においては、再感染防止のために最終治療の2日後に治療足を酒精綿で清拭したあと足を包帯で固定し、包帯を1週間毎に交換した。最終治療2日後と30日後のKP-103およびラノコナゾールの治療効果を表1に示す。

【0044】

【表1】

従来法での最終治療2日後および30日後の治療効果の比較

被検体	菌陰性化足数／全感染足数	
	最終治療2日後	最終治療30日後
感染対照	0／20	0／20
KP-103	20／20	16／20
ラノコナゾール	20／20	9／20

【0045】

表1からわかるように、KP-103治療群では最終治療2日後において全足で菌の陰性化が観察され、最終治療30日後においても20足中16足で菌の陰性化が観察された。一方、ラノコナゾール治療群では最終治療2日後においては全足で菌の陰性化が観察されたが、最終治療30日後では9足で菌の陰性化が観

察されたに過ぎなかった。ラノコナゾールは白癬菌に対して強力なインビトロ活性を有しており、本試験菌株に対するインビトロ抗真菌活性もKP-103と比較し8倍強く、15.6ng/mlで菌の発育を阻止するにもかかわらず、最終治療30日後での菌の陰性化足数が減少してしまうのは、最終治療2日後に認められたラノコナゾールの治療効果は治療後の皮膚に残留した薬剤が培養系に混入し皮膚中の菌の発育が阻止されたことによるものと推測し、残留薬剤の確認試験を行った。

【0046】

実施例1

従来法で最終治療5日後に評価したあとの皮膚における残留薬剤の確認

比較例1に準じてモデルを作成し、被検体のラノコナゾールはKP-103と同一の基剤を用いて1%液剤を調製し治療実験に供した。薬剤の塗布を行っていない感染対照群、KP-103治療群およびラノコナゾール治療群の各群につき動物20匹とし、最終治療5日後に比較例1と同様にして各動物から後足2足ずつを採取し、左足計20足を従来法での評価に用い、右足計20足を本評価法での評価に用いた。

【0047】

最終治療5日後に比較例1と同様に菌の生育を観察し薬効評価を行ったあとの左足の皮膚片を、トリコフィトン メンタグロフィテス KD-04株(2×10⁴個/ml)および比較例1に記載の抗生物質を含むサブローデキストロースアガー培地(20ml)上に移し、30℃で3日間培養した。培養後、皮膚の周囲に出現した菌の発育阻止円を観察し20足中10足について写真撮影を行った。図1は、前記条件で培養したあとの写真を電子化したものである。(a)は薬剤を塗布していない感染対照群、(b)はKP-103治療群、および(c)はラノコナゾール治療群を示す。(a)感染対照群の各動物それぞれに対応する10個のシャーレの内1つを代表して説明するが、図1中、Sは動物に由来する15個の足裏皮膚片の内の1つを、Mは前記培地を示す。(b)KP-103治療群および(c)ラノコナゾール治療群に記載のSおよびMも同様である。培地において白く見られる部分では菌の発育が生じており、一方、黒く見られる部分で

は菌の発育が阻止されている。

【0048】

図1からわかるように、薬剤を塗布していない感染対照群の皮膚片の周囲においては良好な菌の発育が見られた。KP-103治療群の皮膚片の周囲においては菌の発育は感染対照群と比較し若干阻害されたものの、全ての皮膚片において菌の増殖が観察された。一方、ラノコナゾール治療後の皮膚片の周囲において菌の発育は完全に阻止された。これらの結果から、表1で示した従来法でのラノコナゾールの治療効果は皮膚に残留した薬剤が培養系に混入し菌の発育を阻止し、見かけ上治療効果を示していたと考えられた。

【0049】

従って、従来法では薬効を正確に評価できないことが明らかとなった。

【0050】

実施例2

皮膚からの薬剤除去後における残留薬剤の確認

実施例1において最終治療5日後に各動物から右足20足を採取したあと、酒精綿で十分に清拭し足裏皮膚を切り取った。皮膚をハサミで十分に切り刻んだあとに、透析膜（分画分子量：12000～14000、セルロース製、VISKASE SALES社製）に入れ、蒸留水4mlを加え、蒸留水3L中で4℃で2日間透析した。透析水は1日2回合計4回交換した。内容物をガラスホモジナイザーに移し、4%ブタ膵臓由来トリプシン（BIOZYME社製）を含む2倍濃度のリン酸緩衝化生理食塩液4mlを加え、ホモジナイズした。37℃で1時間放置した。2枚重ねのガーゼでろ過し、ろ液を遠心分離した。上清を除去した沈澱物に2%トリプシンを含むリン酸緩衝化生理食塩液8mlを加え、さらに37℃で1時間振盪して反応させた。遠心分離後、上清を除去した沈澱物をリン酸緩衝化生理食塩液で遠心分離にて3回洗浄しトリプシンを除去した。沈澱物に同生理食塩液2mlを加え懸濁液とした。

【0051】

なお、本実施例で使用したのと同じ菌を用いて、透析操作およびトリプシン処理を実施したが、該菌の生存率に対しこれら操作による影響は全く見られなかつ

た。

【0052】

予め、トリコフィトン メンタグロフィテス KD-04株 (2×10^4 個/ml) および比較例1に記載の抗生物質を含むサブローデキストロースアガー培地 (20ml) の中央にウエルを作成した。ウエルの中に前記懸濁液100 μ lを添加し、30℃で3日間培養した。培養後、出現した菌の発育阻止円を観察したあと20足中10足について写真撮影を行った。図2は、前記条件で培養したあとの写真を電子化したものである。(a)は薬剤を塗布していない感染対照群、(b)はKP-103治療群、および(c)はラノコナゾール治療群を示す。

(a) 感染対照群の各動物それぞれに対応する10個のシャーレの内1つを代表して説明するが、図2中、Eは動物の足裏皮膚から調製した懸濁液を、Mは前記培地を示す。(b) KP-103治療群および(c) ラノコナゾール治療群に記載のEおよびMも同様である。培地全体において白く見られる部分では菌の発育が生じており、一方、ウエルの周辺の黒く見られる部分では菌の発育が阻止されている。

【0053】

図1において従来法ではラノコナゾール治療群の最終治療5日後の皮膚の周辺には菌の発育が全く見られず、皮膚における薬剤の残留が確認された。これに対して、図2ではラノコナゾール治療群の最終治療5日後の皮膚を本発明における透析処理による薬剤の除去を行ったのち得た懸濁液では10足中2足で菌の発育阻止円が若干観察されたものの、残り8足では菌の発育阻止円はほとんど観察されなかった。

【0054】

これより、本発明における透析処理により、治療後の皮膚に残留する薬剤は十分に除けることが明らかとなり、したがって薬剤の薬効評価の際には残留薬剤の影響を受けないことが確認できた。

【0055】

実施例3

皮膚内生存菌の検出および薬効評価

比較例1に記載の抗生物質を含むサブローデキストロースアガー培地（20 ml）2枚ずつに前記実施例2で得た各動物の右足1足の懸濁液をそれぞれ100 μ lずつ塗布し、30℃で10日間培養した。培養後、培地2枚に菌のコロニーが観察されない場合を菌陰性化とし（検出限界：10個/足）菌陰性化足数を求めた。一方、左足については比較例1と同様の方法により評価した。従来法と本評価法での治療効果の比較の結果を表2に示す。

【0056】

【表2】

最終治療5日後の治療効果の比較

被検体	菌陰性化足数/全感染足数	
	従来法	本評価法
感染対照	0/20	0/20
KP-103	19/20	17/20
ラノコナゾール	20/20	3/20

【0057】

表2に示すように、KP-103治療群では従来法および本評価法のいずれで評価しても菌陰性化足数に大きな差は認められず、本評価法での該薬剤の菌陰性化足の割合は85%であることがわかった。一方、ラノコナゾール治療群では従来法において全足で菌の陰性化が観察されたが、本評価法では3足で菌陰性化が観察されたに過ぎなかった。

【0058】

以上より、本評価法は治療後の残留薬剤の影響を受けず真の薬効を評価できることが明らかとなった。

【0059】

さらに、本評価法での結果は比較例1に記載の従来法での最終治療30日後に評価した時の結果と関連していたことから、本評価法では治療後の早い時期の評

価により抗微生物剤の再燃防止効果の予測が可能であることが明らかとなり、それゆえ、本評価法により、再燃を起こさない完治型の抗微生物剤を得ることが可能である。

【0060】

【発明の効果】

前記のとおり、最近開発されたラノコナゾールのような白癬菌に対して極めて強力なインビトロ活性を有する薬剤は従来法で評価すると治療後の皮膚に残留する薬剤により、皮膚内の菌の発育が阻止され、皮膚内に治療されなかった菌が存在しているにも関わらず菌陰性と判定されている。

【0061】

これに対して本発明は、治療後の皮膚などの動物または生体試料の微生物被感染部位を透析膜などを用いて透析することにより残留する抗微生物剤を除けるため、正確に抗微生物剤の薬効を評価することができる。さらには、従来法では抗真菌作用などの抗微生物作用の定量的な比較は困難であったが、本評価法では皮膚などの動物または生体試料の微生物被感染部位に生存する微生物数が正確に定量できるため抗微生物作用の定量的な比較も出来る。また、本評価法での治療効果は従来法での再燃の結果を反映しており、本評価法により治療後の早い時期の評価により再燃の防止効果を予測することができる。したがって、本評価法では、抗微生物剤の真の薬効を評価でき、さらには生体内での除菌効果に優れる抗微生物剤または再燃を起こさない完治型の抗微生物剤を選択することが可能となる。以上のことから、本評価法は抗微生物剤の評価法として非常に有用性が高い。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の抗微生物剤の検出法による従来法で最終治療5日後に評価したあとの皮膚における残留薬剤の確認のための写真を電子化したものである。(a)は感染対照群を、(b)はKP-103治療群を、(c)はラノコナゾール治療群を示す。

【図2】

本発明の抗微生物剤の検出法による最終治療5日後の皮膚からの薬剤除去後に

おける残留薬剤の確認のための写真を電子化したものである。(a)は感染対照群を、(b)はKP-103治療群を、(c)はラノコナゾール治療群を示す。

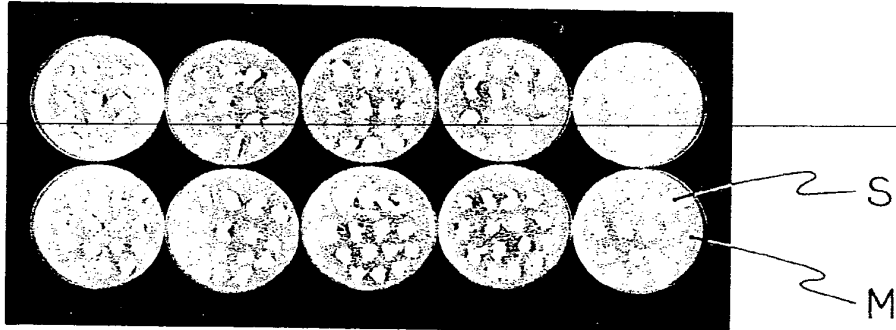
【符号の説明】

- S モルモットの足裏皮膚片
- E モルモットの足裏皮膚片から調製した懸濁液
- M トリコフィトン メンダグロフィテス KD-04株を含む
サブローデキストロースアガー培地

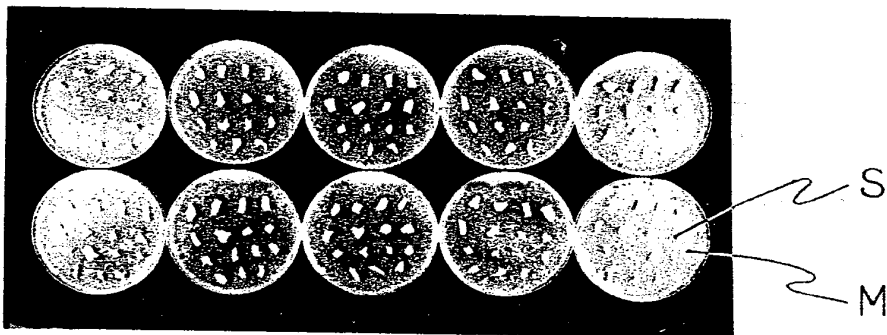
【書類名】 図面

【図 1】

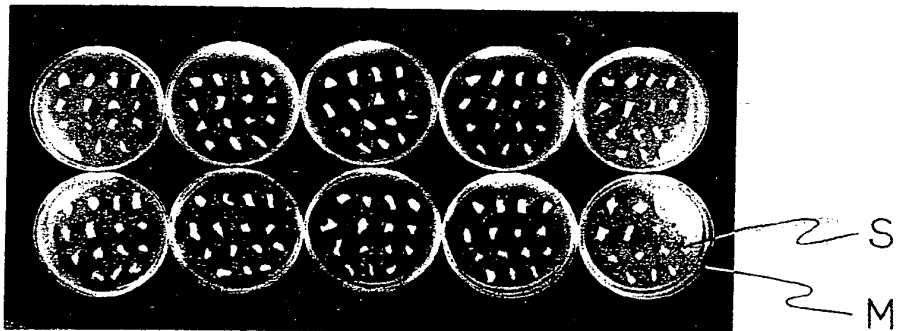
(a)



(b)

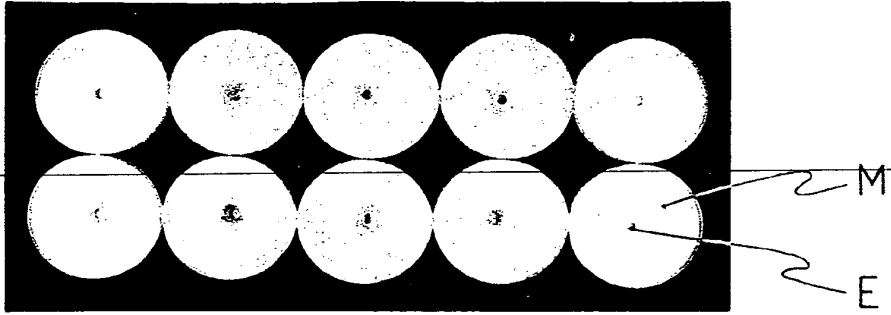


(c)

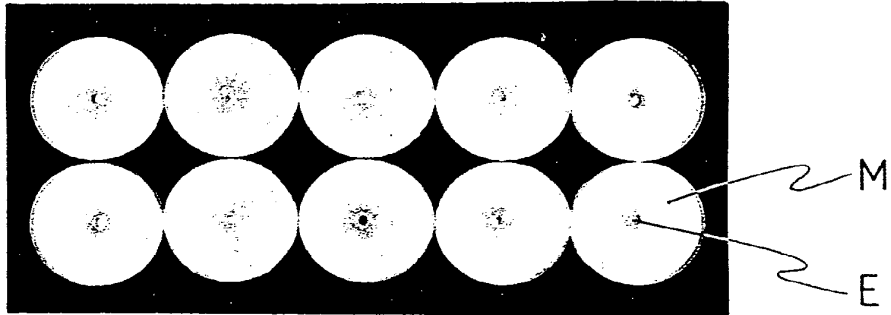


【図 2】

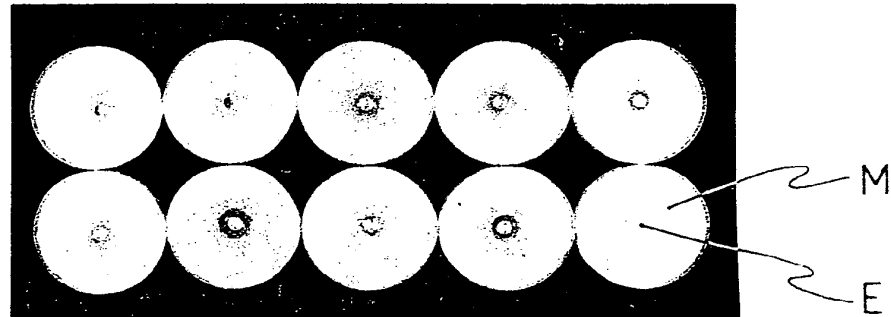
(a)



(b)



(c)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生体試料などに残留する抗微生物剤を除去することにより、残留する該抗微生物剤の影響を受けず正確に該抗微生物剤の薬効を評価できる抗微生物剤の新規な薬効評価法を提供する。

【解決手段】 動物または生体試料に病原微生物を感染させ、該感染の前または後に抗微生物剤を投与し、ついで前記抗微生物剤を除去したのち、病原微生物被感染部位に生存する病原微生物を検出することからなる抗微生物剤の薬効評価法を用いる。

【選択図】 なし

特平 11-214369

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000124269]

1. 変更年月日	1990年 8月10日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都文京区本駒込2丁目28番8号
氏 名	科研製薬株式会社

