

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6316846号
(P6316846)

(45) 発行日 平成30年4月25日 (2018. 4. 25)

(24) 登録日 平成30年4月6日 (2018. 4. 6)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 38/08 (2006. 01)

A 6 1 K 38/08

A 6 1 P 31/04 (2006. 01)

A 6 1 P 31/04

請求項の数 12 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2015-552046 (P2015-552046)
 (86) (22) 出願日 平成26年1月9日 (2014. 1. 9)
 (65) 公表番号 特表2016-505007 (P2016-505007A)
 (43) 公表日 平成28年2月18日 (2016. 2. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/050320
 (87) 国際公開番号 W02014/108469
 (87) 国際公開日 平成26年7月17日 (2014. 7. 17)
 審査請求日 平成28年11月21日 (2016. 11. 21)
 (31) 優先権主張番号 61/751, 341
 (32) 優先日 平成25年1月11日 (2013. 1. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/904, 793
 (32) 優先日 平成25年11月15日 (2013. 11. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505371232
 クセリア ファーマシューティカルズ エ
 ービーエス
 Xellia Pharmaceutical
 als ApS
 デンマーク、ディーケー-2300 コペ
 ンハーゲン エス、ダルスランズガーデ
 11
 11 Dalslandsgade, DK
 -2300 Copenhagen S,
 DENMARK
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣

最終頁に続く

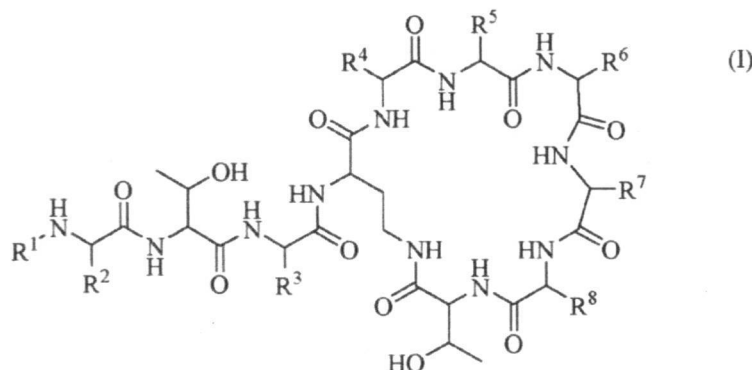
(54) 【発明の名称】 ポリミキシン含有組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I)

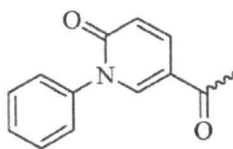
【化 1】



{ 式中、

R¹ は、脂肪族直鎖もしくは分岐鎖 C₆ ~ C₁₀ アシル基、または

【化 2】



であり；

R^5 は、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、または $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ であり；

R^6 は、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、または $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ であり；

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 および R^8 は $-(\text{CH}_2)_x\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M})_2$ であり；

ここで、 x は 0 または 1 であり；

M は 1 価のカチオンである；

で表される ポリミキシンまたはその塩を含む組成物。

【請求項 2】

R^1 がヘプタノイル、メチルヘプタノイル、オクタノイル、メチルオクタノイル、ノナノイル、メチルノナノイルまたはデシルである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

R^1 がヘプタノイル、(S)-6-メチルヘプタノイル、(S)-7-メチルヘプタノイル、オクタノイル、(S)-6-メチルオクタノイル、ノナノイル、(S)-6-メチルノナノイル、(S)-7-メチルノナノイル、(S)-8-メチルノナノイル、またはデカノイルである、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

M が Na^+ 、 K^+ 、 $\text{H}_m\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{アルキル})_n^+$ （式中、 m は 0 ~ 4 であり、 n は 0 ~ 4 であるが、但し $m + n = 4$ である）、またはこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 ポリミキシンまたはその塩が、UPLC で少なくとも 10%、UPLC で少なくとも 20%、UPLC で少なくとも 30%、UPLC で少なくとも 40%、UPLC で少なくとも 50%、UPLC で少なくとも 60%、UPLC で少なくとも 70%、UPLC で少なくとも 80%、UPLC で少なくとも 90%、UPLC で少なくとも 95%、UPLC で少なくとも 97%、UPLC で少なくとも 98%、または UPLC で少なくとも 99% の量で存在する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

x が 1 であり、 M が H^+ 、 Na^+ 、または K^+ である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 ポリミキシンまたはその塩が、UPLC で少なくとも 10%、UPLC で少なくとも 20%、UPLC で少なくとも 30%、UPLC で少なくとも 40%、UPLC で少なくとも 50%、UPLC で少なくとも 60%、UPLC で少なくとも 70%、UPLC で少なくとも 80%、UPLC で少なくとも 90%、UPLC で少なくとも 95%、UPLC で少なくとも 97%、UPLC で少なくとも 98%、または UPLC で少なくとも 99% の量で存在する、請求項 6 に記載の組成物。

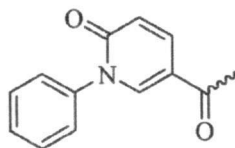
【請求項 8】

前記式 (I) で表される 前記 ポリミキシンまたはその塩が、(A) ~ (H)；

(A) R^1 が 6 - メチルオクタノイルであり; R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり; R^5 および R^6 がそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である;

(B) R^1 が

【化 3】



10

であり; R^2 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり; R^3 が $-CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり; R^5 が $-CH_2C_6H_5$ であり; R^6 が $-CH_2CH(CH_3)_2$ である;

(C) R^1 が 6 - メチルヘプタノイルであり; R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり; R^5 および R^6 がそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である;

(D) R^1 が 6 - メチルオクタノイルであり; R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり; R^5 が $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ であり; R^6 が $-CH_2CH(CH_3)_2$ である;

20

(E) R^1 が オクタノイルであり; R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり; R^5 および R^6 がそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である;

(F) R^1 が 7 - メチルオクタノイルであり; R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり; R^5 および R^6 がそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である;

(G) R^1 が 6 - メチルオクタノイルであり; R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり; R^5 が $-CH_2C_6H_5$ であり; R^6 が $-CH_2CH(CH_3)_2$ である;

30

(H) R^1 が 6 - メチルヘプタノイルであり; R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり; R^5 が $-CH_2C_6H_5$ であり; R^6 が $-CH_2CH(CH_3)_2$ である;

から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

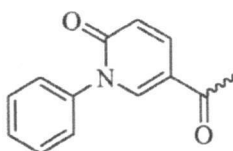
前記式 (I) で表される前記ポリミキシンまたはその塩が、(A) ~ (H) :

(A) R^1 が 6 - メチルオクタノイルであり; R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ であり; R^5 および R^6 がそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である;

40

(B) R^1 が

【化 4】



50

であり； R^2 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ であり； R^3 が $-CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ であり； R^5 が $-CH_2C_6H_5$ であり； R^6 が $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(C) R^1 が6-メチルヘプタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ であり； R^5 および R^6 がそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(D) R^1 が6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ であり； R^5 が $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ であり； R^6 が $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(E) R^1 がオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ であり； R^5 および R^6 がそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(F) R^1 が7-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ であり； R^5 および R^6 がそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(G) R^1 が6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ であり； R^5 が $-CH_2C_6H_5$ であり； R^6 が $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(H) R^1 が6-メチルヘプタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 がそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ であり； R^5 が $-CH_2C_6H_5$ であり； R^6 が $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項10】

請求項1～9のいずれか一項に記載の組成物の治療有効量と、任意選択により薬学的に許容される医薬品添加物とを含む医薬組成物。

【請求項11】

グラム陰性菌感染の治療に使用される、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項12】

前記感染が、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、アシネトバクター・バウマンニイ (*Acinetobacter baumannii*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、またはこれらの組み合わせにより引き起こされる、請求項11に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩を含む組成物を本明細書に開示する。

【背景技術】

【0002】

ポリミキシンは、ポリミキサ菌 (*Bacillus polymyxa*) によって産生される抗生物質として1947年に発見された。ポリミキシンは、ヘプタペプチド環と、N末端にアミド結合した脂肪酸とを含有する抗生物質作用のあるデカペプチドである。現在、市販の2種類のポリミキシン混合物；ポリミキシンBとポリミキシンE（コリスチン）が臨床使用されている。これらの混合物は共に、ゲバルツ (Goevaerts) ら（2002年）およびファン・デン・ボッシェ (Van den Bossche) ら（2011年）により記載されているように種々の成分を含む。欧州薬局方によれば、コリスチンはポリミキシンE1、E2、E3、E1-iおよびE1-7MOAを77%超含まなければならないが、微量成分であるポリミキシンE3、E1-iおよびE1-MOAはそれぞれ10%未満でなければならない。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

コリスチンに関する毒性のため、混合物は 1 9 5 0 年代にスルホメチル化により改良された。スルホメチル化コリスチンはコリスチメタートナトリウム (C M S) と称され、これはコリスチンのプロドラッグであると見なされている。C M S は依然として、緑膿菌 (シュードモナス・エルギノーサ : *Pseudomonas aeruginosa*)、アシネトバクター・バウマンニイ (*Acinetobacter baumannii*)、肺炎桿菌 (クレブシエラ・ニューモニエ : *Klebsiella pneumonia*)、および他のグラム陰性病原体などの多剤耐性生物に対する最後の治療選択肢として臨床使用されている。長年にわたり、C M S の溶液も緑膿菌 (*P. aeruginosa*) によって引き起こされる定着または感染をコントロールするために、嚢胞性線維症 (C F) 患者の肺に噴霧化により投与されてきた。

10

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 4 】

市販の C M S 製品は様々なポリミキシンの誘導体の複雑な混合物を含有することから、幾つかの結果を招く。これらの最たるものは、市販されている製品の治療効果に関する。体内に注入または吸入されると C M S はコリスチンリザーバとみなすことができるため、排泄される前に適量の C M S がコリスチンに変換されることが重要である。そのように変換されない場合、血清コリスチン濃度は標的とする病原菌を死滅させるまたはその増殖を防止するのに十分高い濃度に到達することができない。従って、置換基の量を制御した C M S を混合物としてまたは一成分として製造できることにより、過少投与または過量投与の防止により治療能力が向上する。それはまた、C M S の加水分解速度 (C M S のコリスチンへの生体内変換速度) に影響を及ぼすことにより、分子のプロドラッグ特性も向上させることができる。

20

【 課題を解決するための手段 】

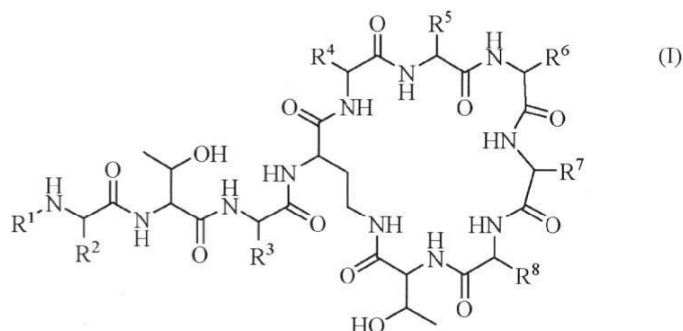
【 0 0 0 5 】

式 (I)

【 0 0 0 6 】

【 化 1 】

30



40

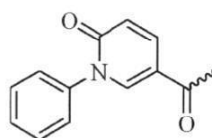
【 0 0 0 7 】

{ 式中、

R¹ は、脂肪族直鎖もしくは分岐鎖 C₆ ~ C₁₀ アシル基、または

【 0 0 0 8 】

【化 2】



【0009】

であり；

10

R^5 は、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、または $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ であり；

R^6 は、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、または $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ であり；

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 および R^8 はそれぞれ $-(\text{CH}_2)_x\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、または $-(\text{CH}_2)_x\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M})_2$ のいずれかであり；

ここで、 x は 0 または 1 であり；

M は 1 価のカチオンであり；

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 および R^8 の少なくとも 3 つは、 $-(\text{CH}_2)_x\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M})_2$ である } 20

で表される少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩を含む組成物。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図 1】 $\text{PE}1 - (\text{SM})_{10}^{1, 3, 5, 8, 9}$ の構造。

【図 2】 $\text{PE}1 - (\text{SM})_8^{1, 5, 8, 9}$ の構造。

【図 3】 $\text{PE}1 - (\text{SM})_6^{1, 5, 9}$ の構造。

【図 4】本明細書に記載の幾つかのスルホメチル化ポリミキシンの一般的な化学構造（表 1 参照）。

【図 5】3 位に DAP 残基を含有するデカスルホメチル化ポリミキシンの構造。

【図 6】 $\text{PE}1 - (\text{SM})_{10}^{1, 3, 5, 8, 9}$ （図 1、上）および CMS 実用標準物質（下）の UHPLC クロマトグラム。 30

【図 7】 $\text{PE}2 - (\text{SM})_{10}^{1, 3, 5, 8, 9}$ の構造。

【図 8】 $\text{PE}1 - i - (\text{SM})_{10}^{1, 3, 5, 8, 9}$ の構造。

【図 9】実施例 4 に記載の $\text{PE} - (\text{SM})_{10}^{1, 3, 5, 8, 9}$ 組成物中のポリミキシン成分の構造。

【図 10】実施例 5 に記載の $\text{PB} - (\text{SM})_{10}^{1, 3, 5, 8, 9}$ 組成物中のポリミキシン成分の構造。

【図 11】コリスチン（Sigma、C4461）の存在下での HK-2 細胞の細胞溶解率。

【図 12】ペンタ（ N^Y -ビス-スルホメチル）DAB $^{1, 3, 5, 8, 9}$ ポリミキシン E1 の存在下での HK-2 細胞の細胞溶解率。 40

【図 13】ペンタ（ N^Y -ビス-スルホメチル）DAB $^{1, 3, 5, 8, 9}$ ポリミキシン E2 の存在下での HK-2 細胞の細胞溶解率。

【図 14】ペンタ（ N^Y -ビス-スルホメチル）DAB $^{1, 3, 5, 8, 9}$ ポリミキシン E1-i の存在下での HK-2 細胞の細胞溶解率。

【図 15】ペンタ（ N^Y -ビス-スルホメチル）DAB $^{1, 3, 5, 8, 9}$ ポリミキシン B の存在下での HK-2 細胞の細胞溶解率。

【発明を実施するための形態】

【0011】

定義

50

本明細書で使用する「1つの(a)」または「1つの(an)」要素という語句は、その要素の1つ以上を指し；例えば、1種の化合物は、1種以上の化合物または少なくとも1種の化合物を指す。このようなものとして、「1つの(a)」(もしくは「1つの(an)」)、「1つ以上」、および「少なくとも1つ」という用語は、本明細書では互換的に使用することができる。

【0012】

本明細書で使用する「任意選択の」または「任意選択により」という用語は、その後に記載されている事象または状況が起こり得るが、必ずしも起こる必要はなく、この記載が、その事象または状況が起こる場合と、起こらない場合とを含むことを意味する。例えば、「任意選択の結合」は、結合が存在しても、または存在しなくてもよく、この記載が単結合、二重結合、または三重結合を含むことを意味する。

10

【0013】

「立体異性体」という用語は、普通の一般的な意味を有する。

式(I)で表されるポリミキシンまたはその塩は、天然(L-)および非天然(D-)アミノ酸残基の立体化学名を有し得る、炭素をベースにする幾つかの立体中心を含有する。 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ 部分および $-CH(OH)CH_3$ 部分は、L-イソロイシンおよびL-トレオニンに見られる基と同じ立体化学を有する炭素をベースにする立体中心を含有することが理解されるだろう。

【0014】

本明細書に記載の「脂肪族直鎖または分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基」という表現はカルボニル部分と非カルボニル部分と含有する置換基を指し、それには、ヘプタノイル、メチルヘプタノイル((S)-6-メチルヘプタノイルを含む)、オクタノイル、メチルオクタノイル((S)-6-メチルオクタノイル、(S)-7-メチルオクタノイルを含む)、ノナノイル、メチルノナノイル((S)-6-メチルノナノイル、(S)-7-メチルノナノイル、および(S)-8-メチルノナノイルを含む)ならびにデカノイルを含むがこれらに限定されるものではない既知のポリミキシン化合物に見られるアシル基が含まれる。

20

【0015】

本明細書に記載の「塩」または「その塩」という用語は、カチオンとアニオンとを含む化合物を指し、これは当業者に既知の任意の方法で、例えば、プロトン受容部分のプロトン化および/またはプロトン供与部分の脱プロトン化により製造することができる。あるいは、塩は、カチオン/アニオンメタセシス、またはカチオン/アニオン交換反応のいずれかにより製造することができる。

30

【0016】

「 $-CH_2CH_2NH_2$ 」という表現は、媒体のpHに応じて、 $-CH_2CH_2NH_2$ または $-CH_2CH_2NH_3^+$ のいずれかを包含するものと理解される。

本明細書に記載の「Mは1価のカチオンである」という用語は、価数1の正電荷を含有するカチオン性種を指し、その例としては、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 $H_mN(C_{1 \sim 4}アルキル)_n^+$ (式中、mは0~4であり、nは0~4であるが、但し $m+n=4$ である)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0017】

本明細書に記載の「 $C_{1 \sim 4}$ アルキル」という用語は、炭素数1~4の直鎖または分岐鎖アルキル基を指す。 $C_{1 \sim 4}$ アルキル基の例としては、メチル、エチル、プロピル、i-プロピル、およびn-ブチルが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0018】

本明細書に記載の「DAB」という用語は、カルボニル炭素に隣接する炭素原子(即ち、 α -炭素)がL型と称される立体化学を有する、2,4-ジアミノ酪酸から誘導される基を指す。あるいは、L-DABは、文献ではL-DBUとも称される。

【0019】

本明細書に記載の「DAB残基」という用語は、少なくとも1個のアミノ酸にアミド結

50

合した 2, 4 - ジアミノブチレート化合物を指す。天然のポリミキシンは、通常、6 個の DAB 残基を含み、そのうち 5 個は遊離 γ - アミノ基を有する。

【0020】

本明細書に記載の「スルホメチル」という用語は、 $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M}$ 部分（式中、M は前述の通りである）を指す。スルホネート（ $-\text{SO}_3$ ）部分は酸の形態であってもよいが、生理学的環境（生体内）ではそれは負電荷を有し、M などのカチオンが結合している。

【0021】

本明細書に記載の「DAP」という用語は、化合物、2, 3 ジアミノプロピオネートを指す。

本明細書に記載の「DAP 残基」という用語は、少なくとも 1 個のアミノ酸にアミド結合した 2, 3 - ジアミノプロピオネート化合物を指す。

【0022】

本明細書に記載の「FA」という用語は、「脂肪酸アシル」という表現の略称であり、式（I）で表される少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩に関する「脂肪族直鎖または分岐鎖 $\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アシル基」という表現に包含される。

【0023】

本明細書に記載の「UPLC で少なくとも X % の量で」という用語は、本願の材料および方法の部に記載の UPLC 法により得られるクロマトグラム中の関連するピークの相対積分面積と理解されたい。

【0024】

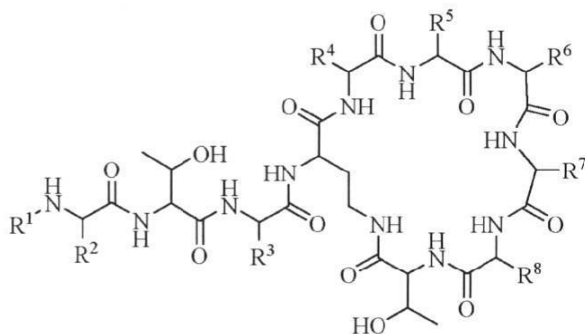
「UPLC クロマトグラムによる純度が Y % 超である」という用語は、本願の材料および方法の部に記載の UPLC 法により得られるクロマトグラム中の関連するピークの相対積分面積と理解されたい。

【0025】

第 1 の実施形態は、式（I）

【0026】

【化 3】



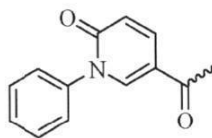
【0027】

{ 式中、

R^1 は、脂肪族直鎖もしくは分岐鎖 $\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アシル基、または

【0028】

【化 4】



10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

であり；

R^5 は、 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、または $-CH_2C_6H_5$ であり；

R^6 は、 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、または $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ であり；

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 および R^8 はそれぞれ、 $-(CH_2)_xCH_2NH_2$ 、または $-(CH_2)_xCH_2N(CH_2SO_3M)_2$ のいずれかであり；

ここで、 x は 0 または 1 であり；

M は 1 価のカチオンであり；

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 および R^8 の少なくとも 3 つは、 $-(CH_2)_xCH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である }

で表される少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩を含む組成物に関する。

【 0 0 3 0 】

第 1 の実施形態の第 1 の態様では、 R^1 は、ヘプタノイル、メチルヘプタノイル、オクタノイル、メチルオクタノイル、ノナノイル、メチルノナノイルまたはデシルである。

第 1 の実施形態の第 2 の態様では、 R^1 は、ヘプタノイル、(S)-6-メチルヘプタノイル、オクタノイル、(S)-6-メチルオクタノイル、(S)-7-メチルオクタノイル、ノナノイル、(S)-6-メチルノナノイル、(S)-7-メチルノナノイル、(S)-8-メチルノナノイルまたはデカノイルである。

【 0 0 3 1 】

第 1 の実施形態の第 3 の態様では、前述の組成物は、 M が Na^+ 、 K^+ 、 $H_mN(C_{1-4}アルキル)_n^+$ 、またはこれらの組み合わせからなる群から選択され、 m は 0 ~ 4 であり、 n は 0 ~ 4 であるが、但し $m + n = 4$ であることを特徴とする。

【 0 0 3 2 】

第 1 の実施形態の第 4 の態様では、 x は 1 であり、 M は H^+ 、 Na^+ または K^+ である。

第 1 の実施形態の第 5 の態様では、 x は 1 であり、 M は H^+ 、 Na^+ または K^+ であり、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 および R^8 のうちの 3 つは $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

【 0 0 3 3 】

第 1 の実施形態の第 6 の態様では、 x は 1 であり、 M は H^+ 、 Na^+ または K^+ であり、 R^2 、 R^4 および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

第 1 の実施形態の第 7 の態様では、 x は 1 であり、 M は H^+ 、 Na^+ または K^+ であり、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 および R^8 のうちの 4 つは $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

【 0 0 3 4 】

第 1 の実施形態の第 8 の態様では、 x は 1 であり、 M は H^+ 、 Na^+ または K^+ であり、 R^2 、 R^4 、 R^7 および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

【 0 0 3 5 】

第 1 の実施形態の第 9 の態様では、 x は 1 であり、 M は H^+ 、 Na^+ または K^+ であり、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である；

第 1 の実施形態の第 10 の態様では、第 1 の実施形態の第 2 の態様 ~ 第 9 の態様のいずれか 1 つに記載の組成物は、少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩が、UHP LC で少なくとも 10 %、UHP LC で少なくとも 20 %、UHP LC で少なくとも 30 %、UHP LC で少なくとも 40 %、UHP LC で少なくとも 50 %、UHP LC で少なくとも 60 %、UHP LC で少なくとも 70 %、UHP LC で少なくとも 80 %、UHP LC で少なくとも 90 %、UHP LC で少なくとも 95 %、UHP LC で少なくとも 97 %、

10

20

30

40

50

U H P L Cで少なくとも98%、またはU H P L Cで少なくとも99%の量で存在することを特徴とする。

【0036】

第1の実施形態の第11の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、5個よりも多いスルホメチル基を含む。

第1の実施形態の第12の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、D A B残基の γ -アミノ基に結合したスルホメチル基を6~10個含む。

【0037】

第1の実施形態の第13の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、D A B残基の γ -アミノ基に結合したスルホメチル基を6個、8個、または10個含む。

10

【0038】

第1の実施形態の第14の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、D A B残基の γ -アミノ基に結合したスルホメチル基を10個含む。

第1の実施形態の第15の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、D A B残基の γ -アミノ基に結合したスルホメチル基を8個含む。

【0039】

第1の実施形態の第16の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、D A B残基の γ -アミノ基に結合したスルホメチル基を6個含む。

20

第1の実施形態の第17の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、ポリミキシンのD A B残基の γ -アミノ基5個のそれぞれに2個ずつ結合したスルホメチル基を含む。このようなポリミキシンはデカスルホメチル化されている。

【0040】

第1の実施形態の第18の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、ポリミキシンのD A B残基の γ -アミノ基のうちの4個に2個結合したスルホメチル基を含む。このようなポリミキシンは、オクタスルホメチル化されている。

【0041】

第1の実施形態の第19の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、ポリミキシンのD A B残基の γ -アミノ基のうちの3個に2個結合したスルホメチル基を含む。このようなポリミキシンは、ヘキサスルホメチル化されている。

30

【0042】

第1の実施形態の第20の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、通常のポリミキシン番号付け方式(図4)を用いたD A B残基1、3、5、8および9の γ -アミノ基に2個結合したスルホメチル基を含む。前記ポリミキシン化合物は、本明細書では、ペンタ(N^Y -ビス-スルホメチル)D A B^{1, 3, 5, 8, 9}ポリミキシンと称される。デカスルホメチル化ポリミキシンE1の構造を図1に示し、それに略称P E 1 - (S M)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9}を与える。

40

【0043】

第1の実施形態の第21の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、通常のポリミキシン番号付け方式(図4)を用いたD A B残基1、5、8および9の γ -アミノ基に2個結合したスルホメチル基を含む。前記ポリミキシン化合物の一例は、本明細書では、テトラ(N^Y -ビス-スルホメチル)D A B^{1, 5, 8, 9}ポリミキシンE1と称される。このような化合物の一例を図2に示す。この化合物の略称はP E 1 - (S M)₈^{1, 5, 8, 9}である。

【0044】

オクタスルホメチル化ポリミキシンの他の例としては、テトラ(N^Y -ビス-スルホメ

50

チル) DAB^{1, 3, 5, 8} ポリミキシン E 1、テトラ(N^γ-ビス-スルホメチル) DAB^{1, 3, 8, 9} ポリミキシン E 1、テトラ(N^γ-ビス-スルホメチル) DAB^{1, 3, 5, 9} ポリミキシン E 1、テトラ(N^γ-ビス-スルホメチル) DAB^{3, 5, 8, 9} ポリミキシン E 1 がある。

【0045】

第1の実施形態の第22の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、DAB残基1、5、および9のγ-アミノ基に2個結合したスルホメチル基を含む。前記ポリミキシンの一例は、本明細書では、トリ(N^γ-ビス-スルホメチル) DAB^{1, 5, 9} ポリミキシン E 1と称され、その構造を図3に示す。この化合物の略称はPE1-(SM)₆^{1, 5, 9}である。ヘキサスルホメチル化ポリミキシンの他の例を表1に示す。

【0046】

表1：ペンタ、テトラおよびトリN^γ-ビス-スルホメチル化されているポリミキシンの例

【0047】

【表1】

		DABの位置				
		1	3	5	8	9
(N ^γ -ビス-スルホメチル)	ペンタ	X	X	X	X	X
	テトラ(5種の異なるもの)	X	X	X	X	
		X	X	X		X
		X	X		X	X
		X		X	X	X
			X	X	X	X
	トリ(10種の異なるもの)	X	X	X		
		X	X			X
		X			X	X
				X	X	X
			X	X	X	
			X		X	X
		X		X		X
		X	X		X	
			X	X		X
		X		X	X	

各xは、ビス-スルホメチル化DAB γ-アミンを表す。

【0048】

第1の実施形態の第23の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、ポリミキシン E の DAB 残基 1、3、5、8 および 9 の γ - アミノ基に結合したスルホメチル基を含む。

【0049】

第1の実施形態の第24の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、ポリミキシン E の DAB 残基 1、5、8 および 9 の γ - アミノ基に2

個結合したスルホメチル基を含む。

【0050】

第1の実施形態の第25の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、ポリミキシンEのDAB残基1、5、および9のγ-アミノ基に2個結合したスルホメチル基を含む。

【0051】

第1の実施形態の第26の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、ポリミキシンEまたはその塩である。

第1の実施形態の第27の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、ポリミキシンBまたはその塩である。

10

【0052】

第1の実施形態の第28の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、UPLCクロマトグラムによる純度が10%超である。

第1の実施形態の第29の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、UPLCクロマトグラムによる純度が20%超である。

【0053】

第1の実施形態の第30の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、UPLCクロマトグラムによる純度が30%超である。

第1の実施形態の第31の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、UPLCクロマトグラムによる純度が40%超である。

20

【0054】

第1の実施形態の第32の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、UPLCクロマトグラムによる純度が50%超である。

第1の実施形態の第33の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、UPLCクロマトグラムによる純度が60%超である。

【0055】

第1の実施形態の第34の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、UPLCクロマトグラムによる純度が70%超である。

第1の実施形態の第35の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、UPLCクロマトグラムによる純度が80%超である。

30

【0056】

第1の実施形態の第36の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、UPLCクロマトグラムによる純度が90%超である。

第1の実施形態の第37の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、UPLCクロマトグラムによる純度が95%超である。

【0057】

第1の実施形態の第38の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、6~10個のスルホメチル基を含む少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩を少なくとも10%w/w含む。

【0058】

第1の実施形態の第39の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、6~10個のスルホメチル基を含む少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩を少なくとも20%w/w含む。

40

【0059】

第1の実施形態の第40の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、6~10個のスルホメチル基を含む少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩を少なくとも30%w/w含む。

【0060】

第1の実施形態の第41の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、6~10個のスルホメチル基を含む少なくとも1種のポリミキシンま

50

たはその塩を少なくとも 40 % w / w 含む。

【 0 0 6 1 】

第 1 の実施形態の第 4 2 の態様では、式 (I) で表される少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩は、6 ~ 10 個のスルホメチル基を含む少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩を少なくとも 50 % w / w 含む。

【 0 0 6 2 】

第 1 の実施形態の第 4 3 の態様では、式 (I) で表される少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩は、6 ~ 10 個のスルホメチル基を含む少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩を少なくとも 60 % w / w 含む。

【 0 0 6 3 】

第 1 の実施形態の第 4 4 の態様では、式 (I) で表される少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩は、6 ~ 10 個のスルホメチル基を含む少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩を少なくとも 70 % w / w 含む。

【 0 0 6 4 】

第 1 の実施形態の第 4 5 の態様では、式 (I) で表される少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩は、6 ~ 10 個のスルホメチル基を含む少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩を少なくとも 80 % w / w 含む。

【 0 0 6 5 】

第 1 の実施形態の第 4 6 の態様では、式 (I) で表される少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩は、6 ~ 10 個のスルホメチル基を含む少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩を少なくとも 90 % w / w 含む。

【 0 0 6 6 】

第 1 の実施形態の第 4 7 の態様では、式 (I) で表される少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩は、6 ~ 10 個のスルホメチル基を含む少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩を少なくとも 95 % w / w 含む。

【 0 0 6 7 】

第 1 の実施形態の第 4 8 の態様では、式 (I) で表される少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩は、(A) ~ (J)、

(A) R^1 は 6 - メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

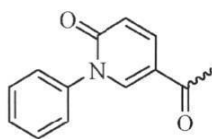
(B) R^1 は 6 - メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^3 は $-CH_2CH_2NH_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(C) R^1 は 6 - メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^4 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^3 および R^7 はそれぞれ $-CH_2CH_2NH_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(D) R^1 は

【 0 0 6 8 】

【 化 5 】



【 0 0 6 9 】

であり； R^2 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^3 は $-CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^5 は $-CH_2C_6H_5$ であ

10

20

30

40

50

り； R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(E) R^1 は6-メチルヘプタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(F) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^5 は $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ であり； R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(G)

(1) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(2) R^1 は6-メチルヘプタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(3) R^1 はオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(4) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^5 は $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ であり； R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(5) R^1 は7-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(H)

(1) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^5 は $-CH_2C_6H_5$ であり； R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(2) R^1 は6-メチルヘプタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^5 は $-CH_2C_6H_5$ であり； R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(I) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^3 は $-CH_2CH_2NH_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(J) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^4 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ であり； R^3 および R^7 はそれぞれ $-CH_2CH_2NH_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

のいずれか1つを含む。

【0070】

第1の実施形態の第49の態様では、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンまたはその塩は、(A)～(J)、

(A) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

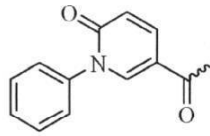
(B) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ であり； R^3 は $-CH_2CH_2NH_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(C) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^4 、および R^8 はそれぞれ $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ であり； R^3 および R^7 はそれぞれ $-CH_2CH_2NH_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-CH_2CH(CH_3)_2$ である；

(D) R^1 は

【 0 0 7 1 】

【 化 6 】



【 0 0 7 2 】

10

であり； R^2 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$ であり； R^3 は $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$ であり； R^5 は $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ であり； R^6 は $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ である；

(E) R^1 は6-メチルヘプタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ である；

(F) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$ であり； R^5 は $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ であり； R^6 は $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ である；

(G)

20

(1) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ である；

(2) R^1 は6-メチルヘプタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ である；

(3) R^1 はオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ である；

(4) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$ であり； R^5 は $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ であり； R^6 は $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ である；

30

(5) R^1 は7-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ である；

(H)

(1) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$ であり； R^5 は $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ であり； R^6 は $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ である；

(2) R^1 は6-メチルヘプタノイルであり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$ であり； R^5 は $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ であり； R^6 は $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ である；

40

(I) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^4 、 R^7 、および R^8 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$ であり； R^3 は $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ である；

(J) R^1 は6-メチルオクタノイルであり； R^2 、 R^4 、および R^8 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$ であり； R^3 および R^7 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ であり； R^5 および R^6 はそれぞれ $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ である；

のいずれか1つを含む。

【 0 0 7 3 】

50

第 1 の実施形態の第 5 0 の態様では、少なくとも 1 種のポリミキシンは、図 1、図 2、図 3、図 5、図 7 または図 8 に示す構造で表される。

第 1 の実施形態の第 5 1 の態様では、組成物は、図 9 または図 1 0 に示す構造で表されるポリミキシンを含む。

【 0 0 7 4 】

ポリミキシンは、ヘプタペプチド環と、N 末端にアミド結合した脂肪酸とを含有する抗生物質作用のあるデカペプチドである。幾つかのポリミキシンは、ポリミキサ菌 (*Bacillus polymyxa*) により天然に産生される。ポリミキシンの構造および歴史は既知であり、例えば、ベルコフ (*Velkov*) ら著、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (*J. Med. Chem.*) 2 0 1 0 年、第 5 3 巻 (5) : 1 8 9 8 ~ 1 9 1 6 頁に記載されている。

10

【 0 0 7 5 】

本明細書に記載のポリミキシンは、置換基の数およびそれらの位置に関して多くの分子種を包含する。例えば、水溶液中では、電荷は pH に依存する。本明細書に記載のポリミキシン化合物は、薬学的に許容される塩およびそのイオンを全て包含する。このようなポリミキシンにはもちろん、六ナトリウム塩、八ナトリウム塩、および十ナトリウム塩もある。他の薬学的に許容される塩、例えば、カリウム塩、リチウム塩、およびアンモニウム塩 ($H_m N (C_{1-4} \text{アルキル})_n^+$ [式中、 m は 0 ~ 4 であり、 n は 0 ~ 4 であるが、但し $m + n = 4$ である] など)、またはこれらの組み合わせも含まれる。

【 0 0 7 6 】

20

本明細書に記載のポリミキシンは、D A B 残基の γ - アミノ基に結合した 6 ~ 1 0 個のスルホメチル基を有する任意のポリミキシン化合物を含む。

ポリミキシン中の残基の番号付けは、ベルコフ (*Velkov*) らに準拠し、例えば、図 4 を参照されたい。天然のポリミキシンでは、N 末端アミノ酸残基 1 に脂肪酸が結合しており、アミノ酸残基 (1 0) がアミノ酸残基 (4) とラリアット (*lariat*) 構造を形成する。換言すれば、いくつかの天然のポリミキシンでは、L - D A B 残基 (1) に脂肪酸アシル基 (6 - メチルヘプタン酸または 6 - メチルオクタン酸など) がアミド結合しているとともに、L - D A B 残基 (4) にトレオニン残基 (1 0) がアミド結合している。

【 0 0 7 7 】

30

ポリミキシン B とポリミキシン E (コリスチン) との唯一の構造の違いは、アミノ酸成分にある。ポリミキシンは、トリペプチド側鎖を有する環状ヘプタペプチド環として配列された L - アミノ酸を主に含有し、この側鎖は脂肪酸に共有結合している。(例えば、図 4 参照。) ポリミキシン B とポリミキシン E との違いは残基 6 にある。ポリミキシン B では残基 (6) は D - フェニルアラニンであり、ポリミキシン E では残基 (6) は D - ロイシンであり、これらは共に残基 (7) に L - ロイシンを含有する。

【 0 0 7 8 】

図 4 に識別されている立体化学表記は、式 (I) で表される少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩に存在する、炭素をベースにする立体中心の可能性のある立体化学表記を限定しようとするものではないことを理解されたい。

40

【 0 0 7 9 】

表 2 : スルホメチル化ポリミキシンの例

【 0 0 8 0 】

【表 2】

スルホメチル化ポリミキシン	Abbr.	FA	Dab 1 (N ¹)	Dab 3 (N ³)	Dab 5 (N ⁵)	X 6	Y 7	Dab 8 (N ⁸)	Dab 9 (N ⁹)
ペンタ(N ⁷ -ビス-スルホメチル)DAB ^{1, 3, 5, 8, 9} ポリミキシンE1	PE1-(SM) ₁₀ ^{1,3,5,8,9}	6-MOA	2SM	2SM	2SM	Leu	Leu	2SM	2SM
ペンタ(N ⁷ -ビス-スルホメチル)DAB ^{1, 3, 5, 8, 9} ポリミキシンE2	PE2-(SM) ₁₀ ^{1,3,5,8,9}	6-MHA	2SM	2SM	2SM	Leu	Leu	2SM	2SM
ペンタ(N ⁷ -ビス-スルホメチル)DAB ^{1, 3, 5, 8, 9} ポリミキシンE1-i	PE1-i-(SM) ₁₀ ^{1,3,5,8,9}	6-MOA	2SM	2SM	2SM	Leu	Ile	2SM	2SM
ペンタ(N ⁷ -ビス-スルホメチル)DAB ^{1, 3, 5, 8, 9} ポリミキシンE1-i コリスチン	PE-(SM) ₁₀ ^{1,3,5,8,9}	6-MOA/ 6-MHA/ 6-OCT	2SM	2SM	2SM	Leu	Leu/Ile	2SM	2SM
ペンタ(N ⁷ -ビス-スルホメチル)DAB ^{1, 3, 5, 8, 9} ポリミキシンB	PB-(SM) ₁₀ ^{1,3,5,8,9}	6-MOA/ 6-MHA/ 6-OCT	2SM	2SM	2SM	Phe	Leu	2SM	2SM
テトラ(N ⁷ -ビス-スルホメチル)DAB ^{1, 5, 8, 9} ポリミキシンE1	PE1-(SM) ₈ ^{1,5,8,9}	6-MOA	2SM	2H	2SM	Leu	Leu	2SM	2SM
トリ(N ⁷ -ビス-スルホメチル)DAB ^{1, 5, 9} ポリミキシンE1	PE1-(SM) ₆ ^{1,5,9}	6-MOA	2SM	2H	2SM	Leu	Leu	2H	2SM

(FA=脂肪酸アシド、6-MOA=6-メチルオクタノイル、6-MHA=6-メチルヘプタノイル、6-OCT=オクタノイル、2SM=ビス-スルホメチル、Leu=ロイシン残基、Ile=イソロイシン残基、Phe=フェニルアラニン残基、DAB1=DAB残基番号1、等)

【0081】

天然のポリミキシンの多くは、アミド結合によりペプチドに結合した6-メチルヘプタン酸または6-メチルオクタノ酸を含む。従来技術では、天然脂肪酸を合成脂肪酸と交換した多数のポリミキシンが製造されてきた。本発明のポリミキシンは、このような半合成ポリミキシンが他の点では特許請求の範囲の特徴を満たす場合、それらも包含するものとする。例えば、多くの半合成ポリミキシンが文献に記載されており、例えば、マギー(Magee)ら著、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー(J. Med. Chem.)、2013年、第56巻：5079～5093頁を参照されたい。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 2 】

本明細書に記載の「C M S」という用語は、スルホメチル化ポリミキシン E 1 およびスルホメチル化ポリミキシン E 2 を含む組成物を指す。ケミカルアブストラクトは、このような組成物に C M S のための番号 8 0 6 8 - 2 8 - 8 を割り当てた。

【 0 0 8 3 】

本明細書に記載の「コリスチン」という用語は、ポリミキシン E 1 およびポリミキシン E 2 を含む組成物を指す。ケミカルアブストラクトは、コリスチンのための番号 1 0 6 6 - 1 7 - 7 を割り当てた。欧州薬局方によれば、コリスチンはポリミキシン E 1、E 2、E 3、E 1 i および E 1 - 7 M O A を 7 7 % 超含まなければならないが、微量成分であるポリミキシン E 3、E 1 - i および E 1 - M O A はそれぞれ 1 0 % 未満でなければならない。

10

【 0 0 8 4 】

本明細書に記載の「ポリミキシン E」という用語は、「コリスチン」と互換的に使用される。

本明細書に記載の「ポリミキシン E 1」という用語は、C A S 番号 7 7 2 2 - 4 4 - 3 を有する化合物を指す。ポリミキシン E 1 はコリスチン A と互換的に使用される。

【 0 0 8 5 】

本明細書に記載の「ポリミキシン E 2」という用語は、C A S 番号 7 2 3 9 - 4 8 - 7 3 を有する化合物を指す。ポリミキシン E 2 は、コリスチン B と互換的に使用される。

本明細書に記載の「スルホメチル化ポリミキシン」という表現は、L - D A B 残基の γ - アミノ基に結合したスルホメチル基を少なくとも 1 個含むポリミキシンを指す。

20

【 0 0 8 6 】

式 (I) で表される少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩に包含される特定のポリミキシン誘導体としては、米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 3 1 6 1 0 5 号明細書に対応する国際公開第 2 0 1 2 / 1 6 8 8 2 0 号に記載の L - D A B 残基の γ - アミノ基または L - D A P 残基の β - アミノ基に結合したスルホメチル基を 6 ~ 1 0 個含む少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩が挙げられる。前記文献では、化合物は 6 ~ 1 0 個のスルホメチル基を含有していない。式 (I) で表される少なくとも 1 種のポリミキシンまたはその塩の一例としては、次の構造を有する化合物が挙げられる。

【 0 0 8 7 】

第 2 の実施形態は、第 1 の実施形態の多数の態様に記載の組成物のいずれか 1 つを有効量含む医薬組成物に関する。

30

第 2 の実施形態の第 1 の態様では、医薬組成物は薬学的に許容される医薬品添加物をさらに含む。薬学的に許容される医薬品添加物としては、保存剤、緩衝液、抗酸化剤、または賦形剤を挙げることができる。好適な賦形剤としては、賦形剤、すなわち、注射用水、0.9% N a C l、0.9% N a C l に溶解した 5 % ブドウ糖溶液、5 % ブドウ糖水溶液、0.45% N a C l に溶解した 5 % ブドウ糖溶液、0.225% N a C l に溶解した 5 % ブドウ糖溶液、および乳酸加リンゲル液が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 8 8 】

医薬組成物は、注射経路で投与（例えば、非経口投与もしくは静脈内投与）するのに好適な賦形剤、または、例えば、ネブライザもしくは他のこのような吸入デバイスを用いる吸入により投与するのに好適な賦形剤を用いて再構成できる凍結乾燥品であってもよい。

40

【 0 0 8 9 】

本明細書で使用する「有効量」という用語は、対象における細菌感染、例えば、グラム陰性菌感染、例えば、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、アシネトバクター・バウマンニイ (*Acinetobacter baumannii*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) 等による感染症状を軽減するために必要な量を意味する。用量は、各特

50

定の症例における個々の要求に応じて調節される。その投与量は、治療される疾患の重症度、患者の年齢および全身的健康状態、患者の治療に用いられている他の医薬、投与経路および形態、ならびに、関与する開業医の好みおよび経験などの多数の要因に応じて、広い範囲内で変わり得る。

【0090】

第3の実施形態は、グラム陰性菌感染の治療における、第1の実施形態の多数の態様に記載の組成物のいずれか1つを有効量含む医薬組成物の使用に関する。

第3の実施形態の第1の態様では、用法は、市販のポリミキシン医薬品、例えば、米国薬局方、注射用コリスチンメタンスルホン酸塩などと同じである。

【0091】

第3の実施形態の第2の態様では、使用は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、アシネトバクター・バウマンニイ (*Acinetobacter baumannii*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、またはこれらの組み合わせによって引き起こされるまたは媒介される感染を治療するための使用である。

【0092】

第4の実施形態は、感染患者のグラム陰性菌感染の治療方法であって、患者に第1の実施形態の多数の態様に記載の組成物のいずれか1つを有効量含む医薬組成物を投与する工程を含む方法に関する。

【0093】

第4の実施形態の第1の態様では、治療方法は、市販のポリミキシン医薬品、例えば、米国薬局方、注射用コリスチンメタンスルホン酸塩などについて示されている用法と実質的に同じである。

【0094】

第4の実施形態の第2の態様では、グラム陰性菌感染は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、アシネトバクター・バウマンニイ (*Acinetobacter baumannii*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、またはこれらの組み合わせによって引き起こされるまたは媒介される。

【0095】

第5の実施形態は、感染患者のグラム陰性菌感染の治療方法であって、患者に第1の実施形態の多数の態様に記載の組成物のいずれか1つを有効量含む医薬組成物を、別の抗菌剤と併用投与する工程を含む方法に関する。

【0096】

第5の実施形態の第1の態様では、本医薬組成物と別の抗菌剤との投与は、同時に、または択一的に投与順不同で行われる。

第5の実施形態の第2の態様では、グラム陰性菌感染は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、アシネトバクター・バウマンニイ (*Acinetobacter baumannii*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、またはこれらの組み合わせによって引き起こされるまたは媒介される。

【0097】

第6の実施形態は、第1の実施形態の多数の態様に記載の組成物のいずれか1つの製造方法であって：

式II、

【0098】

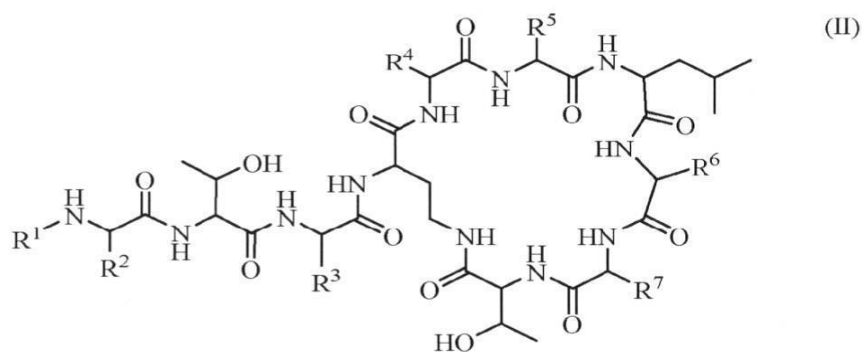
10

20

30

40

【化 7】



10

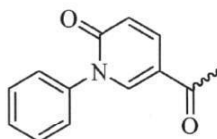
【 0 0 9 9 】

{ 式中、

 R^1 は、脂肪族直鎖もしくは分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基、または

【 0 1 0 0 】

【化 8】



20

【 0 1 0 1 】

であり；

 R^5 は、 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、または $-CH_2C_6H_5$ であり； R^6 は、 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、または $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ であり； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 および R^8 はそれぞれ $-(CH_2)_xCH_2NH_2$ であり；ここで、 x は 0 または 1 である } 30

の化合物またはその塩をメチルスルホン化試薬と反応させる工程、
を含む方法に関する。

【 0 1 0 2 】

第 7 の実施形態は、第 5 の実施形態に記載の方法で得られる生成物に関する。

材料および方法

超高压液体クロマトグラフィー (UHPLC)：

使用した UHPLC 法は、クォータナリポンプシステムと UV 検出器とを備えたウォーターズ・アクイティ (Waters Acquity) システムであった。使用したカラムは、30 に保持したウォーターズ・アクイティ (Waters Acquity) UPLC CSH C18、 $1.7 \mu m$ 、 $150 \times 2.1 mm$ であった。エンパワー (Empower) 2 を用いて全てのクロマトグラムを記録した。流速は $0.30 mL / 分$ であり、注入量は $2 \mu L$ であった。移動相は、A) $0.05 M$ リン酸緩衝液 pH 6.5 およびアセトニトリル (MeCN)、比率 95 : 5 v / v B) $0.05 M$ リン酸緩衝液 pH 6.5 および MeCN、比率 50 : 50 v / v で構成された。溶媒および化学物質は全て、分析用のものであり、使用前に $0.2 \mu m$ フィルタで濾過した。使用した勾配は；当初、20 % B；0 ~ 10 分、32 % B まで直線勾配；10 ~ 35 分、47 % B まで直線勾配；35 ~ 36 分、20 % B まで直線勾配；36 分 ~ 44 分、20 % B であった。クロマトグラムは全て、 $210 nm$ で記録した。溶媒および化学物質は全て、独国のメルク (Mer 40 50

c k) から購入し、分析用のものまたは分析に適した (p r o a n a l y s i s) (P A) ものであった。

【 0 1 0 3 】

U H P L C および M S 用の試験試料溶液の調製

試料は、C M S 実用標準物質を水に溶解した直後にメタノール (M e O H) で希釈することにより調製し、試料の最終濃度が 2 m g / m L となり、含水率が 5 % となるようにした。これは、スルホメチル化合物の加水分解を低減することにより試料の安定性を向上させる。個々の成分の同定は、単離された成分を純メタノールに約 1 m g / m L の濃度となるように溶解することにより行った。使用前、試料は全て、2 ~ 8 の冷蔵庫またはオートサンプラー内で貯蔵した。

10

【 0 1 0 4 】

質量分析 (M S)

試料は全て、ネガティブモードのエレクトロスプレー注入飛行時間型質量分析装置 (E S I - T O F M S) (ブルカー・マイクロ T O F (B r u k e r m i c r o T O F)) で分析した。試料を、濃度が 0 . 5 m g / m L になるようにメタノールに溶解し、30 分間超音波浴にかけた。試料を流速 2 5 0 μ L / 時間で約 30 秒間注入した。M S 設定は ; エンド・プレート・オフセット (E n d P l a t e O f f s e t) - 5 0 0 V 、キャピラリ 3 5 0 0 V 、ネブライザ 3 . 0 バール、ドライガス、2 5 0 で 4 . 0 m L / 分、キャピラリ出口、- 8 0 V から 1 2 0 V まで変化、一般値 - 1 0 0 . 0 V 、スキマー 1 - 3 3 . 3 V 、六重極 1 - 2 3 . 5 V 、六重極 R F 3 0 0 . 0 V p p 、スキマー 2、- 2 2 3 . 5 V であった。キャピラリ出口は、成分のフラグメンテーションに著しい影響を及ぼす。従って、個々の成分についてこのパラメータを最適化することが必要であった。一部の化合物では、依然として幾らかのフラグメンテーションが見られた。イオン源分解産物中の種々雑多な塩、および他の成分が存在するため、M S スペクトルは純粋ではなく、その他のシグナルを含有する可能性がある。しかし、各成分は一成分として単離された (U H P L C により確認) ため、得られる最高質量はインタクトな分子であり、比較的低い質量を有する他の全ての質量はフラグメントであることが予測された。これはまた、キャピラリ出口エネルギーを変えることにより確認された。

20

【 0 1 0 5 】

N M R : 実験結果は、ブルカー (B r u k e r) 6 0 0 M H z 分光器を用いて、1 D および 2 D N M R 実験用の標準的パルスシーケンスで得た。データは、C D ₃ O H 中、2 9 8 K で記録した。化学シフトは、C H D ₂ O H (δ _H 3 . 3 0 p p m) および C D ₃ O H (δ _C 4 9 . 0 p p m に対する p p m で報告する。以下の N M R 実験結果を取得した : ¹ H、¹³ C、D E P T、C O S Y、H M B C、H S Q C、T O C S Y および N O E S Y 。¹⁵ N ケミカルシフトは、ウィシャート (W i s h a r t) ら著、ジャーナル・オブ・バイオモレキュラー・N M R (J . B i o m o l . N M R) 1 9 9 5 年、第 6 巻 : 1 3 5 ~ 1 4 0 頁) に記載されている周波数比を用いて参照した。

30

【 0 1 0 6 】

(実施例)

以下の実施例は、本明細書に開示する対象の理解を深める役割を果たすものであって、例により本発明を限定するものではない。

40

【 0 1 0 7 】

実施例 1

ペンタ (N^y - ビス - スルホメチル) D A B ^{1, 3, 5, 8, 9} ポリミキシン E 1 (P E 1 - (S M) ₁₀ ^{1, 3, 5, 8, 9} (図 1)) の製造

単離した硫酸ポリミキシン E 1 (3 . 5 g) と、ホルムアルデヒド重亜硫酸ナトリウム (1 1 . 3 g) 付加物の 4 5 % w / w 水溶液とを混合し、攪拌しつつ 6 0 に加熱した。次いで、2 M N a O H を数回添加することにより p H を 7 . 0 ~ 7 . 5 に保持した。1 8 時間後、混合物を周囲温度に冷却し、メタノール / アセトニトリル (1 / 1 v / v) 2 0 0 m L 中で沈殿させることにより、粗生成物を白色固体として得た。

50

【0108】

生成物を次の手順で脱塩精製した：C18カラム 6 μ 、例えば、フェノメネックスXブリッジ・プレップ・シールド (Phenomenex X Bridge Prep Shield) 10 $\times$ 250 mmまたは類似のものを、5 % MeCN (塩非含有) で洗浄し、平衡化させた。カラムを、最大流量150 mL / 分のウォーターズ・デルタ・プレップ (Waters Delta Prep) HPLCシステムに装着した。検出器は、280 nmに調節したウォーターズ (Waters) 2487であった。230 mgのPE1 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9}の5 % MeCN溶液9 mLと、1 mLの2 M NaClとの混合物をカラムにロードし、流量は6 ~ 8 mL / 分とした。

【0109】

5 % MeCNを用いて6 ~ 8 mL / 分で溶出および脱塩を行い、PE1 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9}画分を回収する。このプロセス中にカラム上で幾らかの分解が起こったが、ヘッド部分 (頭部) とテイル部分 (尾部) とを切り離すことにより、高純度が維持される。ヘッド画分 (Head fraction) の約35 mLを回収して100 % MeCN 450 mLに直接入れ、100 % MeCNをさらに550 mL添加した後、2 L梨形蒸発フラスコ内のMeCN : H₂O (97 : 3) 溶液を減圧蒸発させた。蒸留プロセスはビュッヒ・ロタベーパー (Buechi Rotavapor) で行った。94 : 6の共沸混合物を留去すると、2 L減圧蒸留フラスコ内に、水を含まないPE1 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} 残渣が得られる。この残渣を3 $\times$ 8 mLの100 % MeOH (無水) で取り出し、50 mL減圧蒸発フラスコに注ぎ、MeOH - PE1 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} 懸濁液が1 ~ 2 mLになるまで減圧蒸発させた。15 mLの100 % MeCNを添加し、水浴温度35 $^{\circ}$ Cで溶液 / 懸濁液をさらに減圧下で蒸発乾固した。このプロセス中に、圧力を9333 ~ 7999 Pa (70 ~ 60 Torr) から2666 ~ 2000 Pa (20 ~ 15 Torr) に減圧させた。減圧を維持したまま35 $^{\circ}$ Cの水浴中で低速回転しながら、さらなる減圧乾燥を30分間行った。収量は、PE1 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} という物質150 mgであった。実験を数回行って990 mgのバッチを得、相対クロマトグラフィー純度は90 %より高かった。

【0110】

逆相 (C₁₈SH C18、1.7 μ m、150 $\times$ 2.1 mm) で勾配を用いたUHPLCは、PE1 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9}、C₆₃H₁₁₀N₁₆Na₁₀O₄₃S₁₀に関して単一のピークを示した。カラム溶離液を210 nmで監視すると、純度は93 %であった - 図6参照。分析はまた、単離成分を直接注入することによりESI - TOF MS (ネガティブモード) を用いて行った：C₆₃H₁₁₀N₁₆Na₁₀O₄₃S₁₀ [M] の m/z 計算値 = 2328.3。[M + 8 Na]⁻² : m/z 実測値 1141.2、および [M + 7 Na]⁻³ m/z 実測値 753.1。生成物の同定は、¹H -、¹³C、および ¹⁵N - NMR分光法で行った (データ不掲載)。

【0111】

実施例 2

ペンタ (N^y - ビス - スルホメチル) DAB^{1, 3, 5, 8, 9} ポリミキシン E2 (PE2 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} (図7)) の製造

硫酸ポリミキシン E2 (3.5 g) とホルムアルデヒド重亜硫酸ナトリウム (11.3 g) 付加物の4.5 % w/w水溶液とを混合し、攪拌しつつ60 $^{\circ}$ Cに加熱した。次いで、2 M NaOHを数回添加することによりpHを7.0 ~ 7.5に保持した。18時間後、混合物を周囲温度に冷却し、メタノール / アセトニトリル (1 / 1 v/v) 200 mL中で沈殿させることにより、粗生成物を白色固体として得た。生成物をさらに、実施例1に記載のように脱塩精製した。

【0112】

逆相 (C₁₈SH C18、1.7 μ m、150 $\times$ 2.1 mm) で勾配を用いたUHPLCは、PE2 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9}、C₆₂H₁₀₈N₁₆Na₁₀O₄₃S₁₀に関して単一のピークを示した。カラム溶離液を210 nmで監視すると、純度は8

10

20

30

40

50

1%であった。分析はまた、単離成分を直接注入することによりESI-TOF MS (ネガティブモード)を用いて行った： $C_{62}H_{108}N_{16}Na_{10}O_{43}S_{10}$ [M]の m/z 計算値 = 2314.5。 $[M+8Na]^{-2}$ ： m/z 実測値1135.2、および $[M+7Na]^{-3}$ ： m/z 実測値748.5。生成物の同定はNMR分光法で行った。

【0113】

実施例3

ペンタ(N^V-ビス-スルホメチル)DAB^{1,3,5,8,9}ポリミキシンE1-i (PE1-i-(SM)₁₀^{1,3,5,8,9}(図8))の製造

硫酸ポリミキシンE1-i (3.5g)と、ホルムアルデヒド重亜硫酸ナトリウム(11.3g)付加物の45%w/w水溶液とを混合し、撹拌しつつ60℃に加熱した。次いで、2M NaOHを数回添加することによりpHを7.0~7.5に保持した。18時間後、混合物を周囲温度に冷却し、メタノール/アセトニトリル(1/1 v/v)200mL中で沈殿させることにより、粗生成物を白色固体として得た。生成物をさらに、実施例1に記載のように脱塩精製した。

【0114】

逆相(CSH C18、1.7μm、150×2.1mm)で勾配を用いたUHPLCは、PE1-i-(SM)₁₀、 $C_{63}H_{110}N_{16}Na_{10}O_{43}S_{10}$ に関して単一のピークを示した。カラム溶離液を210nmで監視すると、純度は95%であった。分析はまた、単離成分を直接注入することによりESI-TOF MS (ネガティブモード)を用いて行った： $[M+8Na]^{-2}$ ： m/z 実測値1141.2、および $[M+7Na]^{-3}$ ： m/z 実測値753.1。

【0115】

実施例4

ペンタ(N^V-ビス-スルホメチル)DAB^{1,3,5,8,9}ポリミキシンE (PE-(SM)₁₀)^{1,3,5,8,9}(図9)の製造

硫酸コリスチン混合物(3.5g)と、ホルムアルデヒド重亜硫酸ナトリウム(11.3g)付加物の45%w/w水溶液とを混合し、撹拌しつつ60℃に加熱した。次いで、2M NaOHを数回添加することによりpHを7.0~7.5に保持した。18時間後、混合物を周囲温度に冷却し、メタノール/アセトニトリル(1/1 v/v)200mL中で沈殿させることにより、粗生成物を白色固体として得た。生成物；PE-(SM)₁₀^{1,3,5,8,9}(図9)をさらに、実施例1に記載のように脱塩精製した。

【0116】

逆相(CSH C18、1.7μm、150×2.1mm)で勾配を用いたUHPLCは、ポリミキシン、略称PE-(SM)₁₀^{1,3,5,8,9}の各主要成分について単一のピークを示した。カラム溶離液を210nmで監視すると、5つの主要なポリミキシンピークの全相対純度は83%であった。分析はまた、PE-(SM)₁₀^{1,3,5,8,9}混合物を直接注入することにより、ネガティブモードのESI-TOF MSを用いて行い、主成分について算出した。E1： $C_{63}H_{110}N_{16}Na_{10}O_{43}S_{10}$ [M]の m/z 計算値 = 2328.3、およびE2： $C_{62}H_{108}N_{16}Na_{10}O_{43}S_{10}$ [M]の m/z 計算値 = 2314.5。それぞれ、 $[M+8Na]^{-2}$ ： m/z 実測値1141.2 + 1135.1、および $[M+7Na]^{-3}$ ： m/z 実測値748.5および753.1。

【0117】

実施例5

ペンタ(N^V-ビス-スルホメチル)DAB^{1,3,5,8,9}ポリミキシンB (PB-(SM)₁₀)^{1,3,5,8,9}(図10)の製造

硫酸ポリミキシンB (3.5g)と、ホルムアルデヒド重亜硫酸ナトリウム(11.3g)付加物の45%w/w水溶液とを混合し、撹拌しつつ60℃に加熱した。次いで、2M NaOHを数回添加することによりpHを7.0~7.5に保持した。18時間後、

混合物を周囲温度に冷却し、メタノール/アセトニトリル(1/1 v/v) 200 mL 中で沈殿させることにより、粗生成物を白色固体として得た。生成物; PB-(SM)_{101, 3, 5, 8, 9}(図10)をさらに、実施例1に記載のように脱塩精製した。

【0118】

逆相(CSH C18、1.7 μm、150×2.1 mm)で勾配を用いたUHPLCは、PB-(SM)_{101, 3, 5, 8, 9}を示した。分析はまた、PMB-(SM)_{101, 3, 5, 8, 9}混合物を直接注入することにより、ESI-TOF MS(ネガティブモード)を用いて行い、主成分について算出した。B1:C₆₆H₁₁₀N₁₆Na₁₀O₄₃S₁₀[M]のm/z計算値=2362.3、およびB2:C₆₅H₁₀₆N₁₆Na₁₀O₄₃S₁₀[M]のm/z計算値=2348.3。主成分(各実測質量についてポリミキシンB成分の混合物)として、M⁻²:m/z実測値1158.2+1151.2、およびM⁻³:m/z実測値764.4および759.8。

10

【0119】

実施例6

アシネトバクター・バウマンニイ(*Acinetobacter baumannii*)、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumonia*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)および大腸菌(*Escherichia coli*)に対するデカスルホメチル化ポリミキシンの抗菌活性。

【0120】

EUCASTにより液体培地希釈法を用いて最小発育阻止濃度(MIC)を求めることにより、デカスルホメチル化ポリミキシンの抗菌活性を試験した。4種類の細菌指標生物、例えば、アシネトバクター・バウマンニイ(*Acinetobacter baumannii*)コリスチン感受性、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumonia*)#3010、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)ATCC27853、大腸菌(*Escherichia coli*)ATCC25922、および大腸菌(*Escherichia coli*)DSA443を使用した。試験は、デンマーク、コペンハーゲン、国立血清学研究所、微生物学および感染対策部(Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark department for Microbiology and Infection Control)で行った。

20

30

【0121】

使用した濃度範囲は0.125~128 μg/mLであった。ゲンタマイシンは、陽性品質対照として含まれた。ゲンタマイシンの調製:1000 μg/mL保存溶液:Hexamycinの40 mg/mL溶液0.125 mL+滅菌水4.875 mL。128 μg/mL:「1000 μg/mL保存溶液」0.640 mL+ミューラー・ヒントン液体培地(MHB)4.36 mL。

【0122】

本明細書に開示する化合物の調製:5 mg/mL保存溶液:5 mgのバイアル1本を滅菌水1.0 mLに添加した。512 μg/mL溶液:「5 mg/mL保存溶液」0.205 mL+MHB1.795 mL

40

接種物の調製:5%馬血液寒天平板からの新鮮な終夜培養コロニーを濁度0.5マックファランド(McFarland)に懸濁し、ミューラー・ヒントン液体培地で1×10⁶ CFU/mLにさらに希釈した。合計50 μLの希釈細菌懸濁液(ミューラー・ヒントンBBL II-液体培地、SSI)を、本明細書に記載の2倍化合物(two fold compounds)またはゲンタマイシン希釈液50 μLを含有するウェルに添加した。化合物は全て、トリプリケートで試験した。プレートは35℃で16~20時間インキュベートした。

【0123】

結果を表3に示す。陽性対照ゲンタマイシンのMICは、緑膿菌(*P. aeruginosa*)ATCC27853(0.5~2 μg/mL)および大腸菌(*E. coli*)A

50

TCC25922 (0.25 ~ 1 µg/mL) の範囲内であり、手順が適切であったことを示した。

【0124】

アシネトバクター・バウマンニイ (A. baumannii) コリスチン感受性菌株を除く全ての菌株に対して、対照物質CMSはデカスルホメチル化ポリミキシンより低いMIC値を有した。アシネトバクター・バウマンニイ (A. baumannii) コリスチン感受性菌株に対しては、5種のデカスルホメチル化ポリミキシンのうち3種はCMS対照と同等の活性を示した。MICデータは、全てのデカスルホメチル化ポリミキシン物質についての抗菌活性を示しているが、一般に、CMS対照と比較して活性が低い。

【0125】

表3. デカスルホメチル化ポリミキシンのMIC (µg/mL) 結果

【0126】

【表3】

細菌株	大腸菌		緑膿菌	アシネトバクター・バウマンニイ	肺炎桿菌
実施例	ATCC 25922	DSA 443	ATCC 27853	コリスチンS	#3010
1 (PE1-(SM) ₁₀ ^{1,3,5,8,9})	8	16	8	4	16
2 (PE2-(SM) ₁₀ ^{1,3,5,8,9})	8	16	8	4	16
3 (PE1- <i>i</i> -(SM) ₁₀ ^{1,3,5,8,9})	8	16	8	4	16
4 (PE-(SM) ₁₀ ^{1,3,5,8,9})	8	16	8	8	16
5 (PB-(SM) ₁₀ ^{1,3,5,8,9})	16	16	8	8	16
CMS	2	4	4	4	4
ゲンタマイシン	1	>32	1	>32	0.125

【0127】

実施例7

テトラ (N^y-ピス-スルホメチル) DAB^{1,5,8,9} ポリミキシンE1 (PE1-(SM)₈^{1,5,8,9} (図2)) の製造

重亜硫酸ナトリウムホルムアルデヒド付加物 (9.80 g、68.5 mmol) を水 (100 mL) に溶解し、37% HCl (1.75 g、17.7 mmol) を添加した。次いで、ポリミキシンE1 (11.7 g、10.0 mmol) を攪拌溶液にゆっくり添加した。次いで、得られた分散液を40℃に10時間加熱し、その後、凍結乾燥して白色固体を得た。

【0128】

400 mg のスルホメチル化ポリミキシンE1を20 mLの50%メタノールに溶解し、ウォーターズ・プレップLCユニバーサル・ベース (Waters Prep LC Universal Base) に装着したウォーターズ・ノバ・パック (Waters Nova Pak) C18、6 µm、6 × 10⁻⁹ m (60 Å)、40 × 310 mmに20 mL/分の流量でロードした。物質溶液を供する前に、カラムをA-溶離液で平衡化した。

【0129】

A-溶離液は、CH₃CN : 10 mM トリエチルアミン : 40 mM NaCl 緩衝液、1 : 9 であった。

B-溶離液は、CH₃CN : 10 mM トリエチルアミン : 40 mM NaCl 緩衝液、4 : 6 であった。

【0130】

溶離系は、アイソクラティックの0～5分はA - 溶離液100%であり、20分間でA100%からA50%に直線勾配で変化させた。

最初の5つの主要ピークを回収し、解析した。RT12分の最初の主要ピークはPE1-(SM)₈^{1,5,8,9}であった。この画分を、さらにワークアップする前に-80の冷凍庫で貯蔵した。PE1-(SM)₈^{1,5,8,9}(図11)を含む、依然として低温の融解速度の速い画分50～100mLを100%CH₃CNで希釈し、CH₃CN中に約4%の水が含まれるようにした。純度75～85%のPE1-(SM)₈15～30mgを含有する希釈画分を減圧下で蒸発乾固し、100%メタノールに再溶解し、-20の冷凍庫で回収して、150～300mgの物質を得た。

【0131】

物質を分取HPLCで上記と同様に再処理し、最後に、実施例1のように脱塩精製した。生成物の同定は、¹H-、¹³C-、および¹⁵N-NMR分光法で行った。

精製したPE1-(SM)₈^{1,5,8,9}の、逆相(CSH C18、1.7μm、150×2.1mm)で勾配を用いたUHPLCは、オクタスルホメチル化ポリミキシンに関して単一のピークを示した。カラム溶離液を210nmで監視すると、PE1-(SM)₈^{1,5,8,9}の純度は94%であった。分析はまた、オクタおよびヘキサスルホン化コリスチン混合物を直接注入することにより、ESI-TOF MS(ネガティブモード)を用いて行った：C₆₁H₁₀₈N₁₆Na₈O₃₇S₈[M]のm/z計算値=2096.4。PE1-(SM)₈^{1,5,8,9}[M+8Na]⁻² m/zの実測値1025.2、および[M+7Na]⁻³ m/zの実測値675.8。

【0132】

表4. オクタスルホメチル化ポリミキシンE1のMIC(μg/mL)結果

【0133】

【表4】

細菌株	大腸菌 ATCC 25922	緑膿菌 ATCC27853	アシネトバクター・ バウマンニイ	肺炎桿菌
PE1-(SM) ₈ ^{1,5,8,9}	8	8	4	16

【0134】

実施例8

トリ(N^v-ビス-スルホメチル)DAB^{1,5,9}ポリミキシンE1(略称：PE1-(SM)₆^{1,5,9}(図3))の製造

重亜硫酸ナトリウムホルムアルデヒド付加物(9.80g、68.5ミリモル)を水(100mL)に溶解し、37%HCl(1.75g、17.7mmol)を添加した。次いで、ポリミキシンE1(11.7g、10.0mmol)を攪拌溶液にゆっくり添加した。次いで、得られた分散液を40に10時間加熱し、その後、凍結乾燥して白色固体を得た。

【0135】

400mgのスルホメチル化ポリミキシンE1を20mLの50%メタノールに溶解し、ウォーターズ・プレップLCユニバーサル・ベース(Waters Prep LC Universal Base)に装着したウォーターズ・ノバ・パック(Waters Nova Pak)C18、6μm、6×10⁻⁹m(60)、40×310mmに20mL/分の流量でロードした。物質溶液を供する前に、カラムをA - 溶離液で平衡化した。

【0136】

A - 溶離液は、CH₃CN：10mMトリエチルアミン 40mM NaCl緩衝液、

1 : 9 であった。

B - 溶離液は、 CH_3CN : 10 mM トリエチルアミン 40 mM NaCl 緩衝液、4 : 6 であった。

【0137】

溶離系は、アイソクラティックの0～5分はA - 溶離液 100 % であり、および20分間でA 100 % からA 50 % に直線勾配で変化させた。

最初の5つの主要ピークを回収し、解析した。22分の最後の主要ピークはPE1 - (SM)₆^{1,5,9} であった(図3)。この画分を、さらにワークアップする前に、-80の冷凍庫で貯蔵した。PE1 - (SM)₆^{1,5,9} を含む、依然として低温の融解速度の速い画分50～100 mL を100 % CH_3CN で希釈し、 CH_3CN 中に約4 % 10
の水が含まれるようにした。純度75～85 % のPE1 - (SM)₆^{1,5,9} 15～30 mg を含有する希釈画分を減圧下で蒸発乾固し、100 % メタノールに再溶解し、-20の冷凍庫で回収して、150～300 mg の物質を得た。

【0138】

物質を上記と同様に分取HPLCで再処理し、最後に、実施例1のように脱塩精製した。生成物の同定はNMR分光法で行った。

逆相(CSH C18、1.7 μm、150 × 2.1 mm)で勾配を用いたUHPLCは、PE1 - (SM)₆^{1,5,9} に関して単一のピークを示した。カラム溶離液を210 nmで監視すると、PE1 - (SM)₆^{1,5,9} の純度は87 % であった。分析はまた、オクタおよびヘキサスルホメチル化ポリミキシンE1を直接注入することにより、E
ESI-TOF MS (ネガティブモード)を用いて行った： $\text{C}_{59}\text{H}_{106}\text{N}_{16}\text{Na}_6\text{O}_{31}\text{S}_6$ [M] のm/z 計算値 = 1864.5。PE1 - (SM)₆^{1,5,9} [M + 8 Na]⁻² m/z の実測値909.3、および[M + 7 Na]⁻³ m/z の実測値
598.5。 20

【0139】

表5. ヘキサスルホメチル化ポリミキシンE1のMIC (μg/mL) 結果

【0140】

【表5】

細菌株	大腸菌 ATCC 25922	緑膿菌 ATCC27853
PE1-(SM) ₆ ^{1,5,9}	8	8

30

【0141】

実施例9

In vitro 毒性試験

HK-2細胞(腎臓ネフロン近位尿細管由来のヒトパピローマウイルス16形質転換細胞株)を96ウェルプレートに播種し、0.05 mg/mL ウシ下垂体抽出物および5
ng/mL EGFを含むケラチノサイト血清非含有培地で24時間培養した。損傷した細胞膜しか透過しないシントックス・グリーン(Sytox Green)の存在下、指
定された化合物で細胞を処理した。 40

【0142】

細胞溶解した細胞のパーセンテージを示す、2時間毎に1画像のタイムラプス撮影を行った。結果は図11～15で視覚化されており、それらは、in vitroでHK-2細胞を溶解する能力に関するコリスチンとデカスルホメチル化ポリミキシンとの相違を示している。この差は100 μg/mLを超える濃度において明らかであり、治療の最初の24時間で最も顕著である。

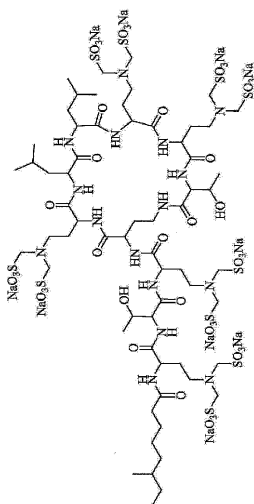
【0143】

50

十分且つ完全な説明が本明細書に記載されているものとするが、一定の特許文献および非特許文献は一定の本質的な主題を含み得る。これらの特許文献および非特許文献が本質的な主題について記載している場合、これらの文献はそれらの内容全体が参照により本明細書に援用される。援用される主題の意味は、本明細書に開示される対象の意味に準ずることが理解される。

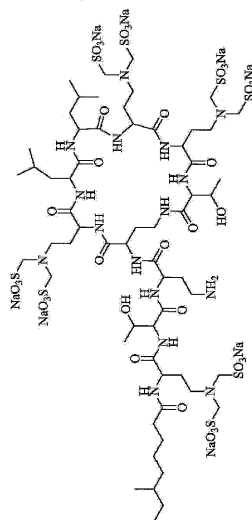
【 図 1 】

Fig. 1



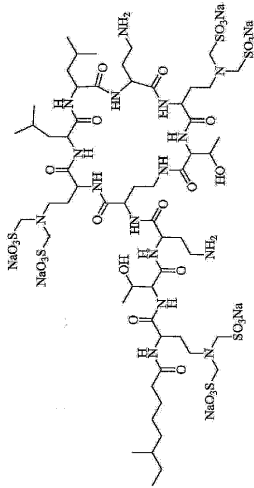
【 図 2 】

Fig. 2



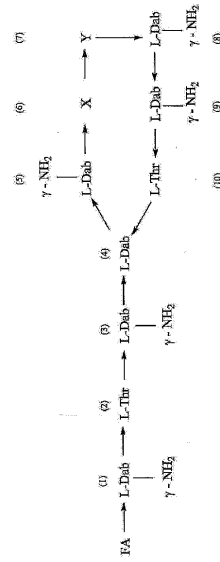
【 図 3 】

Fig. 3



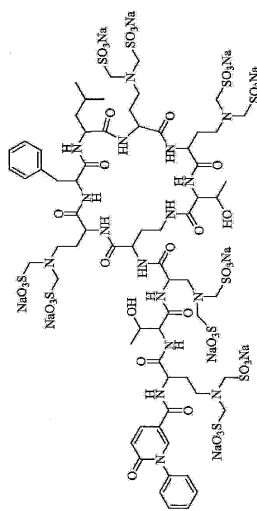
【 図 4 】

Fig. 4

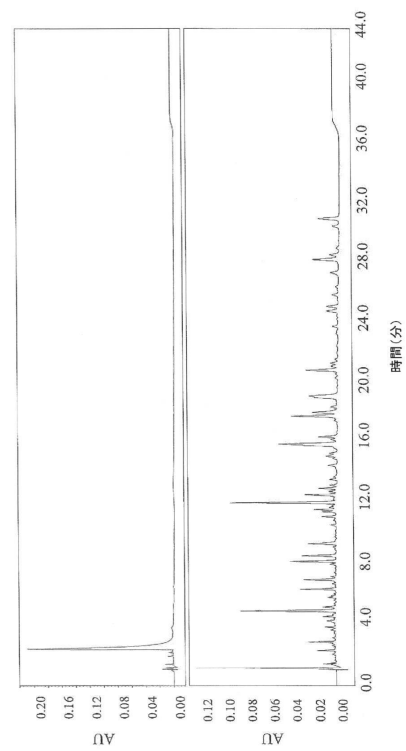


【 図 5 】

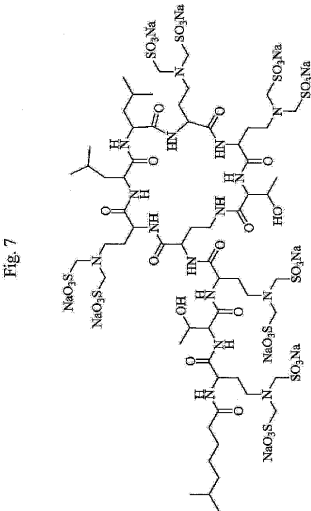
Fig. 5



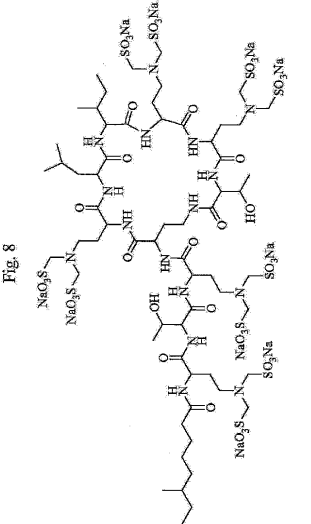
【 図 6 】



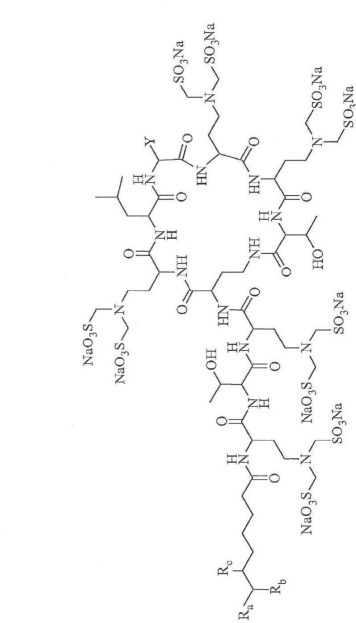
【 図 7 】



【 図 8 】

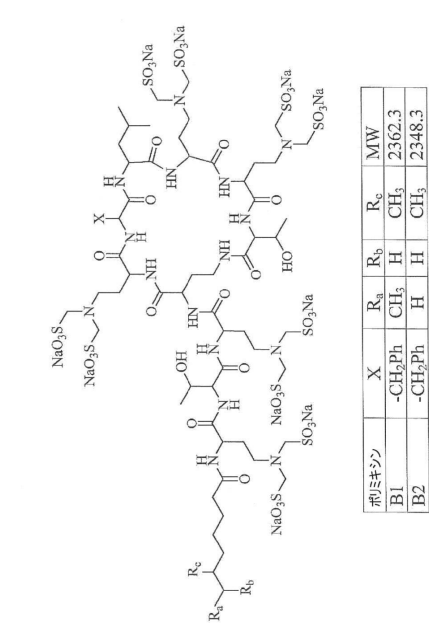


【 図 9 】



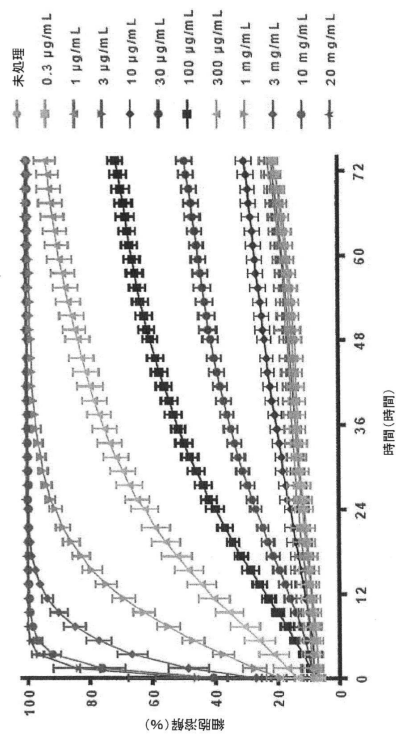
側鎖名	Y	R _a	R _b	R _c	MW
E1	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	H	CH ₃	2328.3
E2	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	H	CH ₃	2314.3
E3	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	H	H	2314.3
E1-i	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	2328.3
E1-7MOA	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	H	2328.3

【 図 10 】

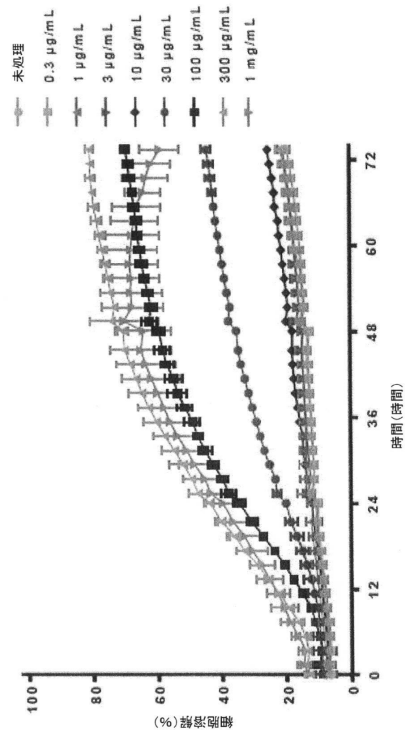


側鎖名	X	R _a	R _b	R _c	MW
B1	-CH ₂ Ph	CH ₃	H	CH ₃	2362.3
B2	-CH ₂ Ph	H	H	CH ₃	2348.3

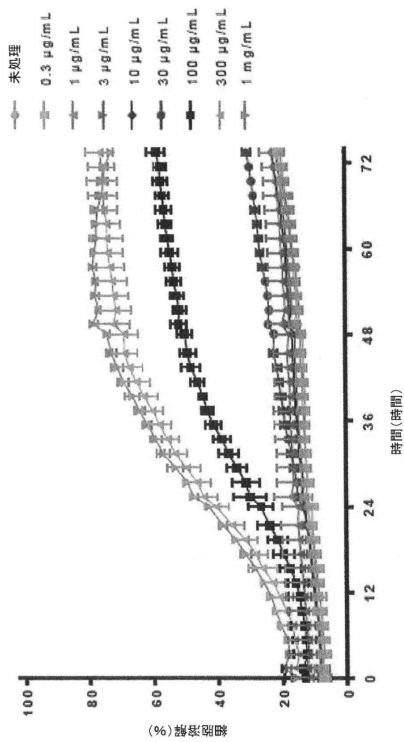
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】

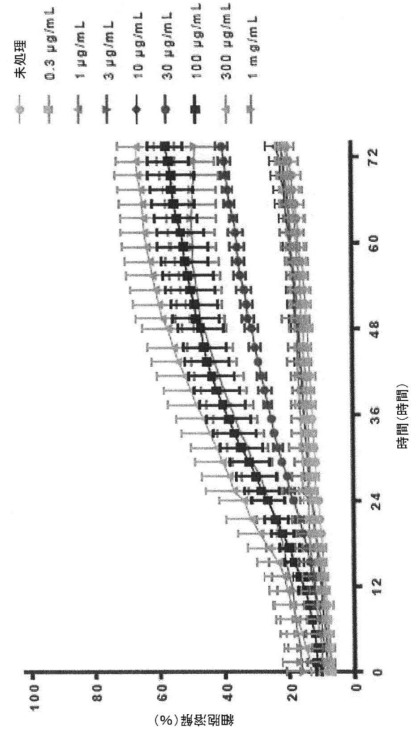


Figure 1 is a line graph showing the percentage of cells in the G2/M phase of the cell cycle over time (0 to 72 hours) for various concentrations of 1-β-D-glucopyranosyl-3-O-β-D-glucopyranosyl-2-O-β-D-glucopyranosyl-4-O-β-D-glucopyranosyl-6-O-β-D-glucopyranosyl-α-D-glucopyranoside. The y-axis represents the percentage of cells in G2/M phase (0-100%), and the x-axis represents time in hours (0-72). The legend indicates concentrations: 0.3 μg/mL, 1 μg/mL, 3 μg/mL, 10 μg/mL, 30 μg/mL, 100 μg/mL, 300 μg/mL, 1 mg/mL, and 3 mg/mL. A control group is labeled '未処理' (untreated). The graph shows that the percentage of cells in G2/M phase increases over time for all groups, with higher concentrations generally leading to a faster increase and higher plateauing values.

フロントページの続き

(74)代理人 100142907

弁理士 本田 淳

(72)発明者 グンネス、セルヴィ

ノルウェー国 N - 1 3 5 0 ロンメダレン スラロムヴェイエン 8 0 ペー

(72)発明者 ビョルンスタッド、ヴィダル

ノルウェー国 N - 1 1 5 5 オスロ グリンマーヴェイエン 1 4

(72)発明者 コッホ、トーベン

デンマーク国 DK - 2 4 0 0 コペンハーゲン エヌヴェ レズキルデヴァイ 6 2

(72)発明者 メランダー、クラス

スウェーデン国 S - 2 1 7 5 2 マルメ ノルドリンズヴェーグ 8 7 ペー

(72)発明者 モンソン、マルティン

ノルウェー国 N - 1 1 8 7 オスロ エネバクヴェイエン 2 3 0 デー

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 特公昭46 - 010862 (JP, B1)

特表平02 - 504003 (JP, A)

Brit. J. Pharmacol, 1964年, Vol.23, p.552-574

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/08

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)