

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6964600号
(P6964600)

(45) 発行日 令和3年11月10日 (2021. 11. 10)

(24) 登録日 令和3年10月21日 (2021. 10. 21)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 491/052 (2006. 01)

C O 7 D 491/052 C S P

C 1 2 P 17/18 (2006. 01)

C 1 2 P 17/18 Z N A C

C 1 2 N 1/20 (2006. 01)

C 1 2 N 1/20 A

A 6 1 K 31/4741 (2006. 01)

A 6 1 K 31/4741

A O 1 P 3/00 (2006. 01)

A O 1 P 3/00

請求項の数 16 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-555117 (P2018-555117)
 (86) (22) 出願日 平成29年4月21日 (2017. 4. 21)
 (65) 公表番号 特表2019-521078 (P2019-521078A)
 (43) 公表日 令和1年7月25日 (2019. 7. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/059521
 (87) 国際公開番号 W02017/182632
 (87) 国際公開日 平成29年10月26日 (2017. 10. 26)
 審査請求日 令和2年4月6日 (2020. 4. 6)
 (31) 優先権主張番号 20160680
 (32) 優先日 平成28年4月22日 (2016. 4. 22)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 ノルウェー (N0)

微生物の受託番号 DSMZ DSM 32287

(73) 特許権者 515330535
 シンテフ ティーティーオー アクティー
 ゼルスカブ
 ノルウェー王国 エヌー7465 トロン
 ヘイム スルッペン ポストボックス 47
 64
 (74) 代理人 110000556
 特許業務法人 有古特許事務所
 (72) 発明者 スレッタ, ホヴァール
 ノルウェー王国 エヌー7071 トロン
 ヘイム ウグラヴェーゲン 19

最終頁に続く

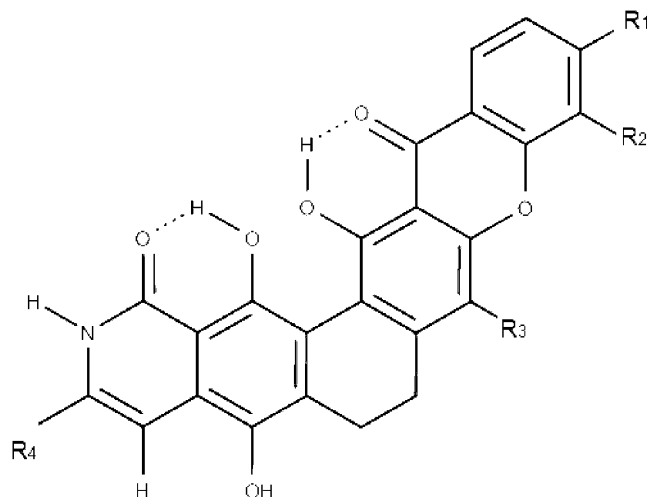
(54) 【発明の名称】 新たな抗菌化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I I の構造を有する化合物ならびにその塩および溶媒和物；

【化 1】



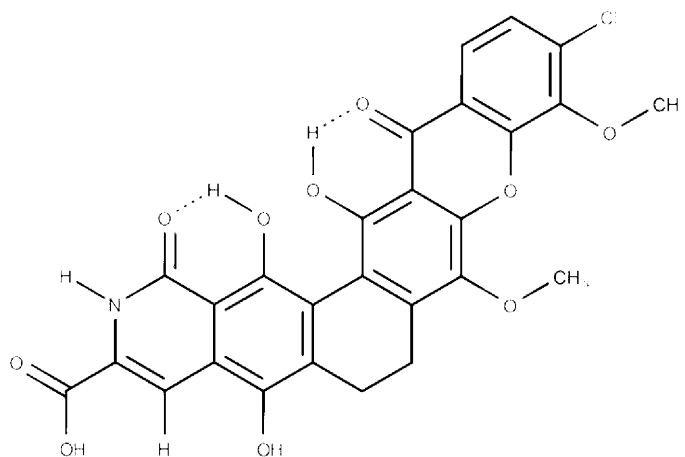
(I I)

ここで、 R_1 は、塩素、臭素およびヨウ素から選択されるハロゲン原子であり、
 R_2 および R_3 は、 $-O-CH_3$ であり、
 R_4 は、 $-COOH$ 、 $-C(O)OR_1$ および $-C(O)NR_1R_2$ であり、
 R_1 および R_2 は、独立して水素、 C_1-C_4 -アルキル基、 C_2-C_4 -アルケニル基、 C_2-C_4 -アルキニル基およびフェニル基である。

【請求項 2】

式 III の構造を有する化合物ならびにその塩および溶媒和物。

【化 2】



(III)

【請求項 3】

以下の工程を含む、請求項 1 または 2 に記載の化合物の產生方法：

- a) ブダペスト条約に基づいて寄託番号 D S M 3 2 2 8 7 で 2 0 1 6 年 4 月 7 日に D S M Z に寄託された細菌単離株を、海水を含む適切な培地中で培養する工程と；
- b) 前記培地から前記化合物を抽出する工程。

【請求項 4】

前記細菌が、そのゲノム中に配列番号 1 に示される 1 6 S r R N A の配列を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記工程 b) が、培養細菌を遠心分離して化合物を抽出する細胞ペレットを得る工程を含む、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記化合物が、ジメチルスルホキシド (D M S O) を用いて細胞ペレットから抽出される、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記培地が、P M 6 であり、人工海水を含む、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 または 2 に記載の化合物を產生するための単離された細菌の使用であって、前記細菌が、ブダペスト条約に基づいて寄託番号 D S M 3 2 2 8 7 で 2 0 1 6 年 4 月 7 日に D S M Z に寄託された細菌単離株である、使用。

【請求項 9】

前記細菌が、そのゲノム中に配列番号 1 に示される 1 6 S r R N A の配列を含む、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

請求項 1 または 2 に記載の化合物と、薬学的に許容される 1 つ以上の担体および / または賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 1 1】

治療に使用するための、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 1 2】

抗微生物剤としての使用のための、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 1 3】

前記使用が、患者における細菌感染症を治療するための使用であって、請求項 1 若しくは 2 に記載の化合物、または請求項 1 0 に記載の医薬組成物を前記患者に投与する工程を含む、請求項 1 1 または 1 2 に記載の化合物。

【請求項 1 4】

前記細菌感染症が多剤耐性細菌によって引き起こされる、請求項 1 3 に記載の化合物。

10

【請求項 1 5】

前記細菌感染症がグラム陽性および/またはグラム陰性細菌によって引き起こされる、請求項 1 4 に記載の化合物。

【請求項 1 6】

細菌を死滅させる、またはその増殖を阻害するための非医学的方法であって、請求項 1 若しくは 2 に記載の化合物、または請求項 1 0 に記載の組成物を、死滅または阻害すべき細菌と接触させる工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、新たな化合物、それを産生する方法、および抗菌剤としての使用を提供する。

【背景技術】

【0002】

天然産物は新たな抗菌剤の最も多量の供給源であり続けており、天然化合物の化学的多様性はいまだにコンビナトリアルケミストリーのアプローチ (Newman and Cragg, 2012) とは比べものにならない。後者はリード化合物の最適化にうまく適用されている一方、純粋に新たなファーマコフォアを特に抗菌剤の分野で産出することに基本的に失敗した。これは、主にコンビナトリアルライブラリーに代表される化合物の構造的多様性の限界のためである。現在、臨床で使用されている抗生物質の大半は、細菌および真菌から単離された化合物から開発されており、放線菌類のメンバーが主要な源である (Pelaez F, 2006)。薬剤に重要な放線菌類由来の抗生物質としては、アミノグリコシド、アントラサイクリン、クロラムフェニコール、マクロライド、テトラサイクリンなどが挙げられる。伝統的に、これらの抗菌剤の大半は、ストレプトミセス属の土壌由来の放線菌から単離されてきた。

30

【0003】

しかし、近年の単離戦略は、海洋資源などの未開拓の環境に向けられている。海洋生息地からの放線菌類の分離およびスクリーニングに焦点を当てた生物資源調査の努力は、放線菌目に新たな生物多様性を加え、潜在的な薬理学的価値のある一連の新規天然産物を明らかにした (Mincer, 2001)。その陸生の近縁種と生理的かつ系統的に異なる海洋放線菌類の存在は、現在、広く受け入れられており、海洋放線菌の新たな分類群が放線菌目の中で少なくとも 6 種の系統について記載されている (Fenicallら, 2006)。

40

【0004】

海洋単離株は、その陸生の近縁種と系統的に異なっていることは別として、海洋環境に対して (例えば、高い塩分/浸透圧および圧力に対して) 特定の生理学的適応があることが示されている。この生息地の広範な多様性とその不十分な開発は、それに向けて新規代謝産物産生者を発見するために研究者を引きつける根本的な理由である。海洋生態系には種々の珍しい属の発生があり、多くは新しく化学的に多様な二次代謝産物を産生することがわかった (非特許文献 18、非特許文献 22、(Manivasaganら, 2014

50

）。

【 0 0 0 5 】

ほとんどのストレプトミセス菌やその他の糸状放線菌は、二次代謝産物の生合成のための多数の遺伝子クラスターを所有しており（非特許文献3）、ゲノム配列の研究により、ゲノムの大部分が二次代謝産物の生合成に寄与していることが明らかにされている。既知のまたは予測された二次代謝産物をコードするいくつかの遺伝子クラスターが、種々のストレプトミセス菌株（非特許文献3）および海洋放線菌サリニスポラ（非特許文献5）のゲノムにおいて同定されている。抗菌薬や抗真菌薬を含む薬理学的に重要な多くの天然産物は、これらのマルチモジュール組立ラインによって合成され、二次代謝産物の遺伝子クラスターのゲノムマイニングは、新規生理活性化合物を産生する細菌の遺伝的能力を評価するための一般的なツールとなっている（非特許文献6）。

10

【 0 0 0 6 】

しかし、*Streptomyces coelicolor* A3(2)などのよく研究されたモデルの抗生物質産生菌についてさえ、一方では既知の代謝産物の数と他方ではゲノムデータから同定された経路の数との間の相違は非常に大きい（非特許文献3）。これらの相違は、二次代謝産物のほとんどの遺伝子クラスターが標準的な実験室培養条件下でサイレンシングされ、これらの経路の発現またはアップレギュレーションが、ある環境シグナルに応答してのみ引き起こされるという事実によってのみ説明することができる。一連の条件下で細菌を培養することによって、これらの「オフオン」生合成経路の多くの産物を得ることが可能であることが示されている（非特許文献5）。

20

【 0 0 0 7 】

非特許文献10では、分子分類学を用いて27種の海洋堆積物および海綿由来放線菌を属レベルで分類した。記載の通り、ポリケチドおよび非リボソームペプチド性抗生物質の合成に関与する遺伝子のPCRスクリーニングを、生理活性二次代謝産物を産生する可能性のある放線菌を分析するために使用した。

【 0 0 0 8 】

現在、臨床で使用されている抗生物質の大半は、50年以上前に発見された。最後の10年の間は、新たな作用機序を有する2種の新たな抗菌剤（合成オキサゾリジノン・リネゾリドおよび天然産物ベースのリボペプチド・ダプトマイシン）が承認されたにすぎない。出現する多剤耐性病原体による既存の薬剤の有効性の喪失は、新たな抗菌剤の開発を上回りそうである。すべての抗感染症薬の大部分は、天然産物に由来するか、または天然産物に誘発されている。したがって、ゲノミクス由来の標的ベースの研究もコンビナトリアルケミストリーも、いまのところ実際に市場に参入した医薬品を提供していないため、新たな抗生物質は天然産物ベースの研究から得られる可能性が最も高い。

30

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【非特許文献1】Behal, V. 著、“Bioactive products from *Streptomyces*”、*Advances in Applied Microbiology*、47巻、113-156頁(2000)

【非特許文献2】Bennett, J.W., and R. Bentley著、“Whats in a Name - Microbial Secondary Metabolism”、*Adv Appl Microbiol.*、34巻、1-28頁(1989)

40

【非特許文献3】Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill, and D. A. Hopwood. 著、“Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)”、*Nature*、417巻、141-147頁(2002)

50

【非特許文献 4】Berge SM, Bighley LD, Monkhouse DC. 著、 “ Pharmaceutical salts ”、 J Pharm Sci.、 66 卷、 1 号、 1-19 頁 (1977)1 月

【非特許文献 5】Bode, H. B., B. Bethe, R. Hofs, and A. Zeeck. 著、 “ Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity ”、 Chem biochem、 3 卷、 619-627 頁 (2002)

【非特許文献 6】Brautaset, Trygve; Borgos, Sven Even F.; Sletta, Havard; Ellingsen, Trond Erling; Zotchev, Sergey. 著、 “ Site-specific mutagenesis and domain substitutions in the loading module of the nystatin polyketide synthase, and their effects on nystatin synthesis in *Streptomyces noursei*. ” Journal of Biological Chemistry.、 278 卷 (2003)

10

【非特許文献 7】Cragg, G. M., P. G. Grothaus, and D. J. Newman. 著、 “ Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. ” Chem. Rev. 109 卷、 3012-3043 頁 (2009)

【非特許文献 8】Fenical, W., and P. R. Jensen. 著、 “ Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. ” Nat. Chem. Biol. 2 卷、 666-673 頁 (2006)

【非特許文献 9】Fischbach, M. A., and C. T. Walsh. 著、 “ Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. ” Chem. Rev. 106 卷、 3468-3496 頁 (2006)

【非特許文献 10】Engelhardt, K., K.F. Degnes, M. Kemmler, H. Bredholt, E. Fjaervik, G. Klinkenberg, H. Sletta, T.E. Ellingsen, and S.B. Zotchev. 著、 “ Production of a New Thiopeptide Antibiotic, TP-1161, by a Marine Nocardiosis Species. ” Appl Environ Microb. 76 卷、 4969-4976 頁 (2010)

20

【非特許文献 11】Illing, G.T., I.D. Normansell, and J.F. Peberdy. 著、 “ Protoplast isolation and regeneration in *Streptomyces clavuligerus*. ”、 J. Gen. Microbiol. 135 卷、 2289-2297 頁 (1989)

【非特許文献 12】Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK 著、 “ Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. ”、 Microbiol Res. 2014 Apr;169 卷、 4 号、 262-78 頁、 doi: 10.1016/j.micres.2013.07.014.

【非特許文献 13】Magarvey, N. A., J. M. Keller, V. Bernan, M. Dworkin, and D. H. Sherman. 著、 “ Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. ” Appl. Environ. Microbiol. 70 卷、 7520-7529 頁 (2004)

30

【非特許文献 14】Mincer, T. J., P. R. Jensen, C. A. Kauffman, and W. Fenical. 著、 “ Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. ” Appl. Environ. Microbiol. 68 卷、 5005-5011 頁 (2002)

【非特許文献 15】ela ´ez, F. 著、 “ The historical delivery of antibiotics from microbial natural products- can history repeat? ” Biochem. Pharmacol.、 71 卷、 981-990 頁 (2006)

【非特許文献 16】Newman, D. J., and G. M. Cragg. 著、 “ Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. ” J. Nat. Prod. 70 卷、 461-477 頁 (2007)

40

【非特許文献 17】Peak KK, Duncan KE, Luna VA, King DS, McCarthy PJ, Cannons AC. 著、 “ *Bacillus* Strains Most Closely Related to *Bacillus nealsonii* Are Not Effectively Circumscribed within the Taxonomic Species Definition. ” Int J Microbiol. 2011;2011:673136. doi: 10.1155/2011/673136. Epub 2011 Oct 20

【非特許文献 18】Riedlinger, J., A. Reicke, H. Zahner, B. Krismer, A. T. Bull, L. A. Maldonado, A. C. Ward, M. Goodfellow, B. Bister, D. Bischoff, R. D. Sussmuth, and H. P. Fiedler. 著、 “ Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucospora* strain AB-18-032. ” J. Antibiot. (Tokyo) 57 卷、 271-279 頁 (2004)

50

【非特許文献 1 9】Sekurova, O, Sletta H, T.E.E., Valla S, Zotchev S. 著、 “Molecular cloning and analysis of a pleiotropic regulatory gene locus from the nystatin producer *Streptomyces noursei* ATCC11455.” FEMS Microbiology Letters. 177巻、297-304頁(1999)

【非特許文献 2 0】Thompson, C.J., J.M. Ward, and D.A. Hopwood. 著、 “DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic-producing species.” Nature、286巻、525-527頁(1980)

【非特許文献 2 1】Wendt-Pienkowski, E., Y. Huang, J. Zhang, B. Li, H. Jiang, H. Kwon, C.R. Hutchinson, and B. Shen. 著、 “Cloning, sequencing, analysis, and heterologous expression of the fredericamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces griseus*.” J. Am. Chem. Soc. 127巻、16442-16452頁(2005)

10

【非特許文献 2 2】Zotchev, Sergey. 著、 “Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines.”、Journal of Biotechnology. vol.、158巻、4号 (2012)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

このように、微生物の多様性を掘り起こすことは、出現する多剤耐性の課題に立ち向かうために、新規かつ多様な抗菌剤のリードを得るための最も有望な源を示す。

【課題を解決するための手段】

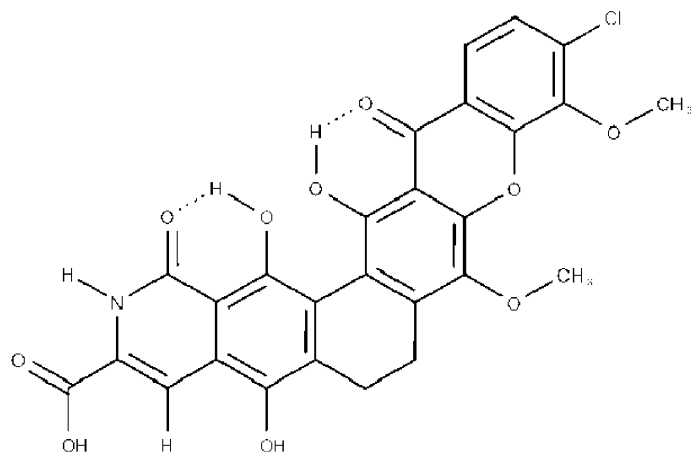
20

【0011】

本発明は、式 I I I による構造を有する新たな化合物ならびにその誘導体、塩および溶媒和物を提供する。

【0012】

【化 1】



(I I I)

30

【0013】

40

以下の工程を含む、本化合物を産生するための方法も提供される：

a) 以下からなる群から選択される細菌を、海水を含む適切な培地中で培養する工程：

i) ブダペスト条約に基づいて寄託番号 D S M 3 2 2 8 7 で 2 0 1 6 年 4 月 7 日に D S M Z に寄託された細菌単離株；および

i i) 単離された細菌と類似の遺伝子型および / または表現型特性を有する菌株などの i) の細菌単離株と密接に関連した細菌；

b) 培養液から請求項 1 に記載の化合物を抽出する工程。

【0014】

化合物を産生するための方法の一実施形態では、細菌は、そのゲノム中に、逆転写および第 2 鎖の合成によって配列番号 1 に示される配列と少なくとも 8 0 % 同一である配列を

50

提供する 16S rRNA を含む細菌である。

【0015】

さらに、本方法の工程 b) は、培養細菌を遠心分離して、化合物を抽出する細胞ペレットを得る工程と、ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて細胞ペレットから化合物を抽出する工程とを含むことができると明示される。

【0016】

一実施形態では、培地は PM6 であり、任意に人工海水を有する。

【0017】

請求項 1 に記載の化合物を産生するための単離された細菌の使用も提供され、細菌は、
i) ブダペスト条約に基づいて寄託番号 DSM 32287 で 2016 年 4 月 7 日に DS 10
MZ に寄託された細菌単離株；および

b) 単離された細菌と類似の遺伝子型および / または表現型特性を有する細菌などの a) の細菌単離株と密接に関連した細菌からなる群から選択される。

【0018】

密接に関連した細菌が、そのゲノム中に、逆転写および第 2 鎖の合成によって配列番号 1 に示される配列と少なくとも 80 % 同一である配列を提供する 16S rRNA を含むと明示される、単離された細菌の使用がさらに提供される。

【0019】

本発明の別の態様は、本発明の化合物と、薬学的に許容される 1 つ以上の担体および / または賦形剤と、抗微生物剤、より具体的には抗菌剤など、治療に使用するための化合物 20
とを含む医薬組成物である。

【0020】

本発明の別の実施形態は、本発明の化合物または医薬組成物を患者に投与する工程を含む、患者における細菌感染症を治療するための方法である。

【0021】

さらに別の実施形態によれば、細菌感染症は、グラム陽性および / またはグラム陰性細菌の多耐性細菌などの多剤耐性細菌によって引き起こされる。

【0022】

本発明のさらに別の態様は、本発明の化合物または医薬組成物を死滅または阻害すべき細菌と接触させる工程を含む、細菌を死滅させる、またはその増殖を阻害する方法である 30
。

【0023】

本発明は、抗菌剤としての化合物の非医学的使用も含む。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図 1】 HPLC で分画した MP127 - ig17 抽出物の活性画分の LC - DAD - イソプロット (上のスペクトル) および ESI + (中央) の MS スペクトルおよび ESI - (下) の MS スペクトルである。

【図 2】 構造を支持する重要な NMR および MS データを伴う MBL - AB01 の構造である。 40

【発明を実施するための形態】

【0025】

本発明は、新たな抗菌剤を提供する。本発明者らは、海洋堆積物由来の放線菌単離株を分析し、それによって、抗菌性二次代謝産物を産生することができる新たな細菌を同定した。

【0026】

マイクロウェル、振盪フラスコおよび発酵槽培養を使用することによって、本発明者らは、抗菌および抗真菌化合物の産生のための培養条件を同定することができた。本アプローチにより、新規抗菌化合物 MBL - AB01 を同定した。

【0027】

したがって、本発明は、MBL - A B 0 1 などの新規抗菌化合物を提供する。

【 0 0 2 8 】

MBL - A B 0 1 などの化合物は、二次代謝産物と呼ばれることが多い、微生物によって産生される化合物群に属する。

【 0 0 2 9 】

「二次代謝産物」とは、微生物が合成できる化合物を意味する。それらは、増殖および再生などの基本的な代謝過程に必須ではない。二次代謝産物は、抗癌および/または抗真菌および抗菌活性などの抗菌活性などの他の有用な特性を有し得る（非特許文献 1、非特許文献 2）。

【 0 0 3 0 】

化合物 MBL - A B 0 1 の構造解明は、化合物がキサントンの種類の化合物に属する新たな化合物であることを明らかにした。分子式は式 I に示す通りである：

【 0 0 3 1 】

【化 2】

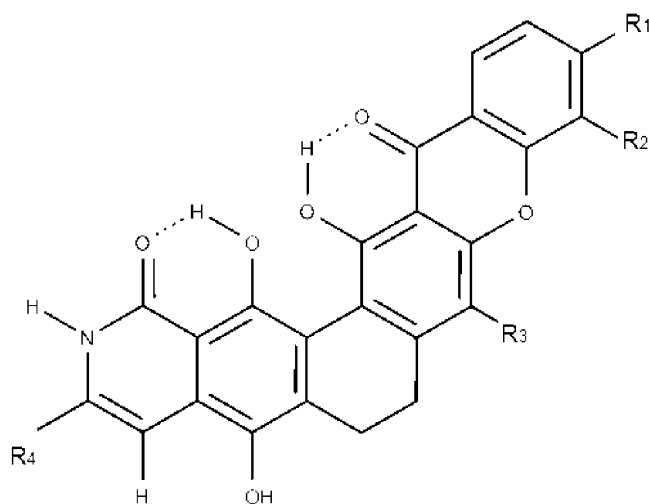


【 0 0 3 2 】

本化合物の一般的な分子構造を式 I I に示す：

【 0 0 3 3 】

【化 3】



(I I)

【 0 0 3 4 】

R_1 は、塩素、臭素およびヨウ素から選択されるハロゲン原子であり得、 R_2 および R_3 は、 $-O-CH_3$ であり得る。 R_4 は $-COOH$ 、 $-C(O)OR_1$ および $-C(O)NR_1$ R_2 であり、 R_1 および R_2 は、独立して水素、 $C_1 - C_4$ - アルキル基、 $C_2 - C_4$ - アルケニル基、 $C_2 - C_4$ アルキニル基およびフェニル基である。

【 0 0 3 5 】

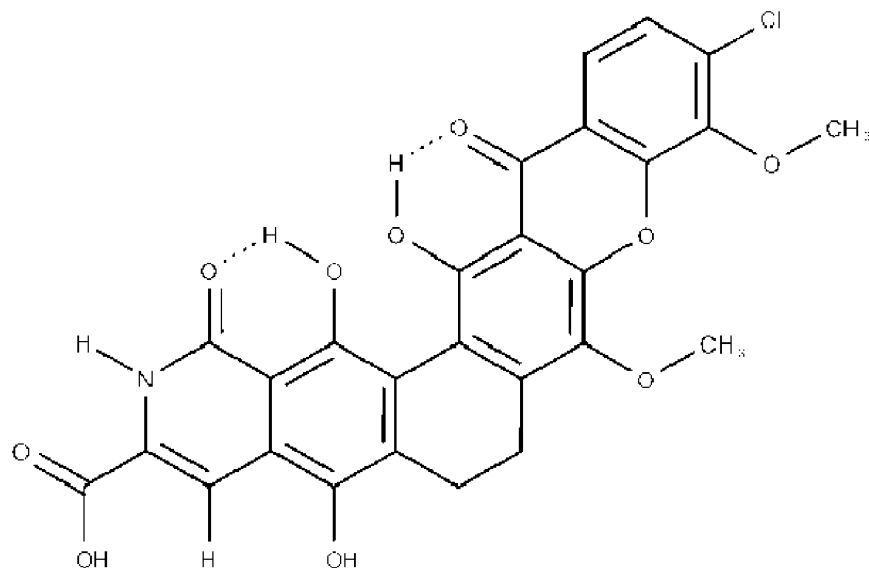
本発明による化合物は、一般構造式 I I を有するキサントン化合物である。

【 0 0 3 6 】

一実施形態では、本発明は分子式 I および式 I I I に示す構造、ならびにその誘導体、溶媒和物および/または水和物を有する。

【 0 0 3 7 】

【化 4】



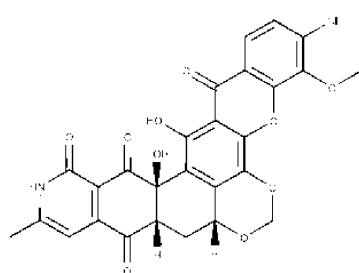
(I I I)

【 0 0 3 8 】

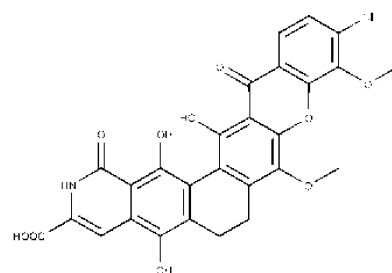
公知化合物であるキサントリピンは、式 I に示したのと同じ分子式を有する。しかし、構造の比較により、キサントリピン分子と本発明の MBL - A B 0 1 分子との間に有意差が明らかになった。以下、その差異について要約する。

【 0 0 3 9 】

【表 1】



キサントリピン



M B L - A B 0 1

不安定水素のナンバー

3

5

予測 log P

2 . 6

4 . 8

キラル中心

3

0

最低予測 p K A

9 . 0

2 . 9

【 0 0 4 0 】

本発明は、式 I I I に示される構造を有する化合物、およびその誘導体、溶媒和物および/または水和物である。本発明によって提供されるように、誘導体は式 I I に示される構造を有する化合物であり、式中、 R_1 は塩素、臭素およびヨウ素から選択されるハロゲン原子であり、 R_2 および R_3 は $-O-CH_3$ である。 R_4 は $-COOH$ 、 $-C(O)OR_1$ および $-C(O)NR_1R_2$ であり、 R_1 および R_2 は、独立して水素、 $C_1 - C_4$ - アルキル基、 $C_2 - C_4$ - アルケニル基、 $C_2 - C_4$ アルキニル基フェニル基である。

【 0 0 4 1 】

10

20

30

40

50

用語「溶媒和物」は、その固体構造に関連した１つ以上の溶媒分子を有する固体化合物を指す。溶媒和物は、固体化合物が溶媒から結晶化するとき形成し得、１つ以上の溶媒分子が固体結晶マトリックスの不可欠な部分になる。本明細書に記載の式の化合物は溶媒和物であり得る。別のタイプの溶媒和物は水和物である。「水和物」は、同様に、分子レベルでその固体または結晶構造に密接に関連した１つ以上の水分子を有する固体化合物を指す。水和物は特定のタイプの溶媒和物である。水和物は、化合物が水中で凝固または結晶化するとき形成し得、１つ以上の水分子が固体結晶マトリックスの不可欠な部分になる。本明細書に記載の式の化合物は水和物であり得る。

【 0 0 4 2 】

本発明による新たな抗菌化合物は、放線菌 (*Actinalloteichus*) 属の菌株などの放線菌によって産生される。特定の一実施形態では、本発明の抗菌化合物は、海洋堆積物由来細菌単離株 M P 1 2 7 - i g 1 7 または密接に関連した菌株の培養によって産生される。

【 0 0 4 3 】

「密接に関連した菌株」とは、単離された菌株と類似の遺伝子型および／または表現型の特性を共有する菌株を意味する。特に、この語句は、実質的に同じ機能活性を保持するわずかに改変された形態の菌株を包含する。したがって、例えば、いくつかのアミノ酸またはヌクレオチドの付加、欠失または変更は、ほとんど効果がない。存在する場合には、本発明による化合物を産生する機能的能力に依存する。「密接に関連した菌株」という用語の定義は、本明細書中で使用され得る P e a k らに提供される。

【 0 0 4 4 】

さらに、本発明は、放線菌 (*Actinalloteichus*) 属の菌株などの放線菌を培養する工程を含む、M B L - A B 0 1 などの抗菌剤を産生するための方法を提供する。特定の一実施形態では、化合物は、i) ブダペスト条約に基づいて寄託番号 D S M 3 2 2 8 7 で 2 0 1 6 年 4 月 7 日に D S M Z に寄託された細菌単離株；および ii) 単離された細菌と類似の遺伝子型および／または表現型特性を有する細菌などの i) の細菌単離株と密接に関連した細菌からなる群から選択された細菌によって産生される。

【 0 0 4 5 】

本明細書に記載の化合物産生細菌は、そのゲノム中に、逆転写および第 2 鎖の合成によって配列番号 1 に記載の配列と少なくとも 8 0 % 同一、例えば少なくとも 8 2 %、8 3 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 8 . 5 %、9 8 . 7 %、9 8 . 8 %、または 9 9 % 同一である配列を提供する 1 6 S r R N A を含む細菌であり得る。

【 0 0 4 6 】

当業者は、その全体構造、機能および特性を有意に変更することなく、配列番号 1 に定義された配列およびそのサブ配列にかなりの変更を導入することができると予想する。

【 0 0 4 7 】

「表現型特性」とは、本発明による二次代謝産物、すなわち式 I I および／または I I I のいずれか 1 つによる分子構造を有する化合物を産生する能力を意味する。

【 0 0 4 8 】

「遺伝子型特性」とは、例えば配列同一性として知られている 1 6 S r R N A 分子などの核酸およびアミノ酸などの遺伝分子の特徴を意味する。本明細書で「類似の遺伝子型特性を有する菌株」としては、逆転写および第 2 鎖の合成によって配列番号 1 に記載の配列と少なくとも 8 0 % 同一、例えば少なくとも 8 2 %、8 3 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 8 . 5 %、9 8 . 7 %、9 8 . 8 % または 9 8 . 9 % または 9 9 % 同一である配列を提供する 1 6 S r R N A を含む細菌が挙げられる。

【 0 0 4 9 】

「細菌単離物」という表現は、１つの細菌株の培養物を定義するために使用されることが多い。単離物は、当業者に公知の種々の手段によって精製および単離することができる。本明細書で使用する「細菌単離物」または「細菌株」は、精製されたサンプルを適切な

10

20

30

40

50

培地にプロットすることから典型的な誘導可能なコロニーへ戻って追跡可能な、遺伝子型および表現型の独特の微生物を指す。単離物、菌株および細菌の表現は互換的に使用される。

【 0 0 5 0 】

本発明の方法によれば、細菌は、当業者に公知の適切な培地を用いた微生物培養で培養される。一実施形態では、培地は海水を含む。

【 0 0 5 1 】

「微生物培養」または微生物培養は、制御された実験室条件下で所定の培養培地中で微生物を再生させることによって微生物を増殖させる方法である。「培養」という用語は、より一般的には、実験室で特定の微生物を細菌として「選択的に増殖させること」を指すために非公式に使用される。

10

【 0 0 5 2 】

本発明による化合物は、本明細書に記載の細菌培養物から得られる。

【 0 0 5 3 】

したがって、本発明は、本明細書に記載の細菌を適切な培地で培養することによって、式 I I I の化合物およびその誘導体、溶媒和物および/または水和物を産生するための方法を提供する。

【 0 0 5 4 】

一実施形態では、培地は、細菌を培養するために一般に使用される市販の増殖培地、例えばトリプトン大豆ブロス (O x o i d) である。別の実施形態では、培地は、ルリア - ベルターニ (L B) 培地などの標準培地である。さらに別の実施形態は、非特許文献 1 0 に記載の P M 6 などの放線菌による二次代謝産物の産生のために設計された複合培地である。さらに別の実施形態では、培地が人工海水で補充される。一実施形態では、化合物を産生する細菌株との接種培養物が、海水を伴うトリプトン大豆ブロス培地で充填されたフラスコ内で産生される。

20

【 0 0 5 5 】

培養された細菌を含む培養物は、任意に産生培養物であってもよい。産生培養物は、種培養物から接種することができる。産生培養物は、人工海水を伴う P M 6 培地などの適切な培地で充填されたフラスコ内で産生され得る。

【 0 0 5 6 】

30

「適切な培地」とは、問題の細菌を増殖させるのに適した当業者に公知の任意の培地を意味する。本明細書で使用される場合、表現「培地」または「発酵培地」または「細胞培養」は、増殖のために使用される栄養液を指し、単離株を培養する状況で使用されるすべての種類の培地を指す。典型的には、培地は、糖、デンプン、小麦粉または酵母の抽出物などの炭素源、タンパク質およびアミノ酸または硫酸アンモニウムを含む小麦粉などの窒素源、および無機塩などの無機物を含む。

【 0 0 5 7 】

培地は、M R 6 (非特許文献 1 1)、非特許文献 1 0 に記載の P M 4、P M 5 および P M 6 などの複合培地または I S P 2 などの標準培地など、化学的に定義することができる。抗生物質の化合物の産生のための培地の他の典型的な例は、R 2 Y E (非特許文献 2 0)、R 5 (非特許文献 1 1) および A M P (非特許文献 2 1) である。

40

【 0 0 5 8 】

本発明の方法は、培養物から抗菌化合物を単離する工程をさらに含む。培養された細菌からの化合物の単離は、当業者に周知の手段によって行うことができる。

【 0 0 5 9 】

化合物を得る 1 つの方法は、それを産生培養物および/または産生培養物の遠心分離によって集める細胞ペレットから抽出することによる。これは、培養物の遠心分離によって集めた乾燥物質を回収することによって行うことができる。任意に、乾燥物質をメタノールで洗浄して、活性化合物に関連しない化合物を抽出することができる。

【 0 0 6 0 】

50

化合物は、当業者に公知の適切な溶媒によって抽出することができる。

【0061】

特定の一実施形態では、産生培養物からの乾燥物質を遠心分離によって集め、任意に、例えば細胞ペレットを凍結乾燥させることによって、当業者によく知られた手段によって分画または溶解することができる。

【0062】

さらに、DMSOまたはトリフルオロ酢酸(TFA)0.1%まで添加DMSOなどの適切な溶媒によって化合物を抽出することができる。化合物は、アルコールおよびアルカンなどの他の有機溶媒によって抽出することもできる。任意に、濾過によって不溶解物質を除去する。一実施形態では、化合物は、HPLCなどのクロマトグラフィーによってさらに分離される。一実施形態では、分離は塩基性条件のHPLCによって行われる。

10

【0063】

任意に化合物の分解を回避するために、画分のpHを、例えば分画前にフラクションコレクターのバイアルの各々にpH=4の酢酸アンモニウム緩衝液のような緩衝液を添加することによって調整することができる。画分中の活性化化合物は、固相カラムにさらに結合され、任意にpH=4の酢酸アンモニウム緩衝液で酸性化されたメタノールのようなアルコールで調整される。化合物をカラムに結合させた後、メタノールなどの酸性化アルコールで不純物をカラムから洗い流す。

【0064】

化合物を、メタノールなどのアルコールを用いてカラムからさらに溶出させ、任意にpHをpH=8.0に調整した酢酸アンモニウム緩衝液も添加する。さらに、化合物を単離する方法は、化合物に水を添加して凍結乾燥する前に、アルコールまたは他の溶媒を真空遠心分離機によって除去する工程を含むことができる。

20

【0065】

本発明の化合物を同定するための方法は、HPLC-MSまたはHPLC-UVなどの高速液体クロマトグラフィー(HPLC)および高分解能質量分析(MS)の使用による。

【0066】

非特許文献10には、海洋放線菌の単離プロセスが記載されている。本研究は、27種の放線菌の分子分類学および系統発生分析を提供した。表1には、海綿由来のTSI127-17と呼ばれる1つの単離株が記載されている。16S rRNA遺伝子の配列分析は、TSI127-ig17が、遺伝子アクセッション番号DQ144222のActinalloteichus hymeni acidonis HPA177と98.97%の遺伝子類似性を有することを明らかにした。非特許文献10は、PKS/NRPS遺伝子についてのPCRスクリーニングを使用して、これらの放線菌単離株がポリケチドおよび非リボソーム性ペプチド由来二次代謝産物を合成する可能性を調べ、これらの放線菌単離株が二次代謝産物を合成する可能性を示した。

30

【0067】

ここで、寄託された細菌(DSM 32287)は、そのゲノム中に、配列番号1に示される配列を有する16S rRNA分子を含む。

40

【0068】

本発明の態様は、MBL-AB01として抗菌化合物を産生する放線菌の新規細菌単離株の使用である。

【0069】

したがって、本発明は、抗菌化合物MBL-AB01などの二次代謝産物を産生するActinalloteichus属の細菌の使用である。使用される細菌は、抗菌化合物産生菌株Actinalloteichus hymeni acidonisであってもよい。

【0070】

特定の実施形態では、本発明のこの態様による細菌は、MP127-ig17と命名さ

50

れた細菌単離株（DSM 32287）、または本明細書で定義される密接に関連した菌株である。別の特定の実施形態では、本発明は、i) ブダペスト条約に基づいて寄託番号 DSM 32287 で 2016 年 4 月 7 日に DSMZ に寄託された細菌単離株；および ii) MBL-AB01 と同じ機能的特性を有する、式 I および / または II および / または III のいずれか 1 つによる構造を有する化合物、ならびにそれらの誘導体、溶媒和物および / または水和物などの二次代謝産物を産生する、単離された細菌と類似の遺伝子型および / または表現型特性を有する細菌などの i) の細菌単離株と密接に関連した細菌からなる群から選択される細菌の使用である。

【0071】

本明細書に記載の化合物産生細菌は、そのゲノム中に、逆転写および第 2 鎖の合成によって配列番号 1 に示す配列と少なくとも 80 % 同一、例えば少なくとも 82 %、83 %、85 %、86 %、87 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、98.5 %、98.7 %、98.8 % または 98.9 % または 99 % 同一である配列を提供する 16S rRNA を含む細菌であり得る。新たな抗菌化合物である MBL-AB01 の構造および生物学的特徴が特徴づけられた。本発明の化合物は、多剤耐性細菌を含む種々の細菌株の増殖を阻害することが示された強力な抗菌剤であることが示された。

10

【0072】

実施例 5 に記載のようなインビトロの研究によって抗菌活性を測定した。

【0073】

20

実施例 6 に記載のように、MBL-AB01 は、キサントリピンなどの同等化合物よりも細胞傷害性が小さいことも *in vitro* で実証されている。したがって、MBL-AB01 は、種々の医薬組成物において有用な抗菌剤として非常に魅力的な候補である。

【0074】

したがって、本発明は、治療などの医療用途における本発明の化合物の使用も提供する。本発明は、治療、特に細菌感染症の治療に使用するための、式 I および / または II および / または III の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含む。

【0075】

用語「治療すること」、「治療する」および「治療」は、(i) 疾患、病的または医学的状态の発生を防ぐこと（例えば、予防）；(ii) 疾患、病的または医学的状态を阻害するか、またはその進展を阻止すること；(iii) 疾患、病的または医学的状态を緩和すること；および / または (iv) 疾患、病学的または医学的状态に関連した症状を減らすことを含む。したがって、用語「治療する」、「治療」および「治療すること」は、予防にまで及ぶことができ、治療される状態または症状の進行または重症度を防止する、防止、防止すること、低下させること、停止させること、または逆転させることを含むことができる。このように、「治療」という用語は、適宜、医学的、治療的および / または予防的投与を含むことができる。

30

【0076】

用語「阻害する」、「阻害すること」および「阻害」は、疾患、感染症、状態、または細胞群の増殖または進行を遅らせること、停止させること、または逆転させることを指す。阻害は、例えば、治療または接触がない場合に発生する増殖または進行と比べて、約 20 %、40 %、60 %、80 %、90 %、95 % または 99 % よりも大きくすることができる。

40

【0077】

本発明の化合物およびその薬学的に許容される塩または溶媒和物は、それ自体を使用することができるが、一般に、化合物 / 塩 / 溶媒和物（活性成分）が、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤または担体を伴っている医薬組成物の形態で投与することができる。このような医薬組成物が本発明によって提供される。

【0078】

50

本明細書に記載の化合物は、例えば、本化合物を薬学的に許容される希釈剤、賦形剤または担体と組み合わせることによって、治療的医薬組成物を調製するために使用することができる。本化合物は、塩または溶媒和物の形態で担体に添加することができる。例えば、化合物が安定な毒性のない酸または塩基塩を形成するのに十分に塩基性または酸性である場合、塩としての化合物の投与が適切であり得る。薬学的に許容される塩の例は、生理学的に許容されるアニオンを形成する酸、例えばトシレート、メタンスルホネート、アセテート、クエン酸塩、マロン酸塩、酒石酸塩、コハク酸塩、安息香酸塩、アスコルビン酸塩、 α -ケトグルタル酸塩およびO-グリセロリン酸塩から形成される有機酸付加塩である。塩酸塩、ハロゲン化物、硫酸塩、硝酸塩、重炭酸塩、および炭酸塩（非特許文献7）を含む適切な無機塩も形成され得る。

10

【0079】

したがって、本発明は、式Iおよび/またはIIおよび/またはIIIの化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含む医薬組成物を提供する。このような組成物は、種々の微生物感染症の治療に有用である。

【0080】

本発明はさらに、菌株、培養液、培地、接種物、抽出物、細胞ペレット、または式Iおよび/またはIIおよび/またはIIIの化合物およびそれらの塩を含む組成物、ならびに有害な微生物による感染症に対する保護のためのそれらの使用、および菌株、培養液、培地、接種物、抽出物、細胞ペレット、または式Iおよび/またはIIおよび/またはIIIの化合物およびそれらの塩を含む組成物の有効量で微生物感染症に対してヒトを含む動物を治療することを含む対応する方法に関する。

20

【0081】

本明細書中で使用される場合、本発明の産物（微生物菌株、薬剤、化合物または製剤）に関する「組成物」は、成分の組み合わせを指し、「処方すること」とは、製剤を形成するために添加する成分の組み合わせのための処方箋などの処方を使用するプロセスである。このような組成物は、製剤とも呼ばれ得る。菌株、培養液、培地、接種物、抽出物、細胞ペレット、または式Iおよび/またはIIおよび/またはIIIの化合物、および本発明の組成物は、それぞれ抗菌剤または抗生物質として適切である。

【0082】

本発明は、受託番号DSM32287を有する単離された細菌の培養物、菌株、培養液、培地、接種物、抽出物、細胞ペレット、または式Iおよび/またはIIおよび/またはIIIの化合物および本発明のそれらの塩を含むキットをさらに含む。単離された細菌の培養物、菌株、培養液、抽出物、無細胞抽出物、培地、接種物、または式Iおよび/またはIIおよび/またはIIIの化合物および本発明のそれらの塩を含むキットは、広域スペクトルの細菌の感染症を治療するために有用である。

30

【0083】

本発明は、式I、IIおよび/またはIIIのいずれか1つの化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を薬学的に許容される希釈剤、賦形剤または担体と混合することを含む、本発明の医薬組成物の調製のためのプロセスを尚さらに提供する。当業者は、投与経路に依存する適切な薬学的賦形剤を同定することができるであろう。

40

【0084】

抗微生物剤、より具体的には抗菌剤などの薬剤として使用するための化合物が提供される。

【0085】

本発明のin vitro抗菌活性を、細菌株のパネルに対して測定した。実施例に示されるように、本発明による化合物は、バンコマイシン耐性腸球菌属フェシウム菌を含む多耐性グラム陽性細菌に対して有効である。

【0086】

化合物を産生するための、寄託された細菌単離株または密接に関連した菌株などの細菌の使用も提供される。

50

【 0 0 8 7 】

本発明は、感染症を有する哺乳動物に有効量の本明細書に記載の化合物または組成物を投与することを含む、哺乳動物における感染症を治療する治療方法を提供する。哺乳類としては、霊長類、ヒト、げっ歯類、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ヤギなどが挙げられる。感染症は、細菌感染症、例えば、本明細書に記載の細菌によって引き起こされる感染症であり得る。本発明による化合物を死滅させる細菌と接触させる工程を含む、細菌の殺滅または増殖を阻害する方法も提供される。この方法は、細菌を本明細書に記載の医薬組成物と接触させる工程をさらに含むことができる。

【 0 0 8 8 】

細菌感染症を治療するための本発明の化合物の能力は、当該分野に周知のアッセイを使用することによって測定され得る。例えば、治療プロトコールの設計、毒性評価、データ分析、細胞死滅の定量、および抗菌スクリーニングの使用の生物学的意義が知られている。さらに、化合物が細菌感染症を治療する能力または細菌を死滅させる、または阻害する能力は、本明細書に記載のアッセイを用いて測定され得る。

【 0 0 8 9 】

「一実施形態」、「ある実施形態」などの明細書における言及は、記載された実施形態が特定の態様、特徴、構造、部分または特性を含むことができるが、必ずしもすべての実施形態がその態様、特徴、構造、部分または特性を含むとは限らない。さらに、このような語句は、必ずしもそうする必要はないが、本明細書の他の部分で言及された同じ実施形態に言及してもよい。さらに、特定の態様、特徴、構造、部分または特性がある実施形態に関連して記載されている場合、明示的に記載されているか否か問わず、このような態様、特徴、構造、部分または特性に影響を及ぼすか、または結びつけることは当業者の知識の範囲内である。

【 0 0 9 0 】

単数形「a」、「an」および「the」には、文脈上他に明確に指示されていない限り、複数形が含まれる。したがって、例えば、「化合物」への言及は複数のこのような化合物を含み、そのため化合物Xは複数の化合物Xを含む。さらに、任意のオプションの要素を除外するようにクレームを起草することができることに留意されたい。このように、この記載は、請求項の要素の列挙または「否定的」限定の使用に関連して、「専ら」、「単に」などの排他的な用語の使用の先行する基礎として役立つことを意図している。

【 0 0 9 1 】

「および/または」という用語は、項目のいずれか1つ、項目の任意の組み合わせ、またはこの用語が関連するすべての項目を意味する。

【 0 0 9 2 】

「約」という用語は、指定された値の $\pm 5\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 20\%$ 、または $\pm 25\%$ の変動を指すことができる。例えば、「約50パーセント」は、いくつかの実施形態では、45パーセントから55パーセントの変動を有することができる。

【 0 0 9 3 】

当業者には理解されるように、成分の量、分子量、反応条件などの性質を表すすべての数は近似値であり、すべての場合において任意に「約」という用語によって修飾されるものとして理解される。これらの値は、本明細書の記載の教示を利用する当業者によって得られることが求められる所望の性質に応じて変化し得る。このような値は、それぞれの試験の測定値に見られる標準偏差から必然的に生じる変動性を本質的に含むことも理解される。

【 0 0 9 4 】

[実施例]

実施例1：MP127-ig17の単離

MP127-ig17の分離および分類

Actinoalloteichus hymeniacidonis (TSI127-17) に属する細菌単離株の単離が以前に記載されている（非特許文献10）。

【0095】

まもなく、海綿サンプルを、60mの深さで、Tautra尾根(63°36'53"N、10°31'22"E、トロンハイム・フィヨルド、ノルウェー)から集めた。ホモジナイズした材料を種々の寒天培地に播種し、MP127-ig17と称する単離株を、0.5×天然海水と1ml/lビタミンB溶液(各5mg/lのチアミンHCl、リボフラビン、ナイアシン、ピリドキシン-HCl、イノシトール、Ca-パントテン酸塩、p-アミノ安息香酸、および2.5mg/lのビオチン)とで調製した寒天培地IM18:3g/lのカニ粉、2g/lの海藻粉、20g/lの寒天、pH8.0から単離した。MP127-ig17は、海水がない場合この培地上で増殖しなかった。

【0096】

16S rDNAのシーケンシングは、Actinallototychus hymeniacidonis HPA177と98.97%の遺伝子類似性を示した。

【0097】

MP127-ig17は、ブダペスト条約に基づいて寄託番号DSMZ32287で2016年4月7日にDSMZに寄託された。

【0098】

生理活性スクリーニング

海綿サンプルからの単離物を25で種々の産生培地で培養し、抽出物を以前に記載された寒天拡散アッセイを用いてスクリーニングした(Engelhardtら、2010)。MP127-ig17と命名された単離物を、25%の2×人工海水を伴うPM6培地(可溶性デンプン10g/l;酵母エキス2g/l;グルコース10g/l;グリセロール10g/l;コーンステープパウダー2.5g/l;ペプトン2.0g/l;CaCO₃3.0g/l)で培養した。2×人工海水は次のように調製した:1.34g/lのKCl、2.72g/lのCaCl₂・H₂O、12.58g/lのMgSO₄・7H₂O、9.32g/lのMgCl₂・6H₂O、0.36g/lの重炭酸ナトリウム、pH=7.8。溶液を濾過滅菌した。

【0099】

MP127-ig17の抽出物は、Micrococcus luteus ATCC 9341、Enterococcus faecium CCUG37832、Candida albicans ATCC10231およびCandida albicans CCUG39434の増殖を阻害することができることが示された。

【0100】

実施例2:生理活性化合物、MBL-AB01の同定

MP127-ig17の接種物を、0.5×人工海水を含む100mlのトリプトン大豆ブロス培地(Oxoid)で充填した500mlの振とうフラスコ中で産生した。培養物を30で5日間培養した。産生培養物を種培養物から接種した(3%、vol/vol)。産生は、0.5×人工海水を含むPM6培地125mlを充填した500mlの振盪フラスコ中で行った。培養物を25で12日間培養した。培養物を凍結乾燥させ、DMSOで抽出した。

【0101】

DMSO抽出物を、ダイオードアレイ検出器(DAD)およびフラクションコレクタシステムに接続されたZorbax Bonus-RPカラム(2.1×50mm、3.5μm)を備えたAgilent 1100シリーズ高速液体クロマトグラフィー(HPLC)システムで分画した。メタノールおよび10mM酢酸アンモニウム(pH4)を移動相として使用し、メタノール勾配を24分間10%から90%まで直線的に増大させた。全実行のために毎分画分を採取した。画分を真空遠心分離機で乾燥させ、DMSOに再溶解させた。

【0102】

本画分を、指標微生物としてMicrococcus luteus ATCC9341およびEnterococcus faecium CCUG37832を用いた口ボ

10

20

30

40

50

ット液体ベースバイオアッセイで活性について試験した。活性画分を、DADおよび飛行時間型(TOF)装置に接続されたZorbax Bonus-RPカラム(2.1×50mm、3.5μm)を備えたAgilent HPLCシステムで分析して、生理活性化合物の精密質量を測定した。10mM酢酸アンモニウム(pH7)およびアセトニトリルを移動相として使用し、エレクトロスプレーイオン化は陰性モードで行った。

【0103】

活性画分の395nmにおけるUV吸収ピークは、MBL-AB01の分子量と矛盾しない陽性および陰性のエレクトロスプレーイオン化を伴うLCMS Q-ToFクロマトグラムとのピークと相関した。正しい分子構造を得た後、分子量は551.061927と計算された。スペクトルを図1に示す。

10

【0104】

実施例3：活性化合物、MBL-AB01の特徴づけ

同位体標識および分子式の決定

MBL-AB01の分子式は、 ^{13}C 、 ^{15}N または ^{13}C および ^{15}N 標識化合物を含む培地中での産生によって決定した。シードは、2段階培養で産生された。まず、MP127-ig17を50%海水で補充したTSBプラスに接種し、4日間培養し、次いでシードを50%の海水で補充した ^{13}C 、 ^{15}N または $^{13}\text{C} + ^{15}\text{N}$ 標識(Silantes)を含む大腸菌-OD2培地に再接種し、6日間培養した。シードを以下の組成： ^{13}C 、 ^{15}N または $^{13}\text{C} + ^{15}\text{N}$ 標識(Silantes)を用いた大腸菌-OD2培地；537ml/l、非標識または ^{15}N 標識 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ；0.34g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；0.17g/l、 CaCO_3 ；2.1g/l、 KH_2PO_4 ；0.086g/l、非標識または ^{13}C 標識グルコース；10g/l、TMS1(Olga Sekurova Harvard Sletta 1999)；1.3ml/lを含む産生培地に移し、11日間培養した。培養物を凍結乾燥させ、DMSOで抽出し、上記のように分析した。非標識、 ^{13}C 標識、 ^{15}N 標識および ^{13}C かつ ^{15}N 標識MBL-AB01の陰性モードの質量は、それぞれ550.05、577.05、551.05および578.14であった。したがって、 ^{13}C および ^{15}N 標識化による増大した原子量は、MBL-AB01が27の炭素および1つの窒素有することを示す。

20

【0105】

FT-ICRを用いた分子式の決定と構造解明

30

MBL-AB01の特徴づけを、ESI源を備えたBruker Solarix12T FT-ICR MSへの直接注入によって行った。MSスペクトルを、陽性および陰性ESIモードで記録した。スペクトル中の最も豊富なイオンを単離し、CIDによって断片化した。質量較正を、NaTFA標準を用いて外部から行った。サンプルをメタノール/水で希釈した。

【0106】

Bruker Compassデータ解析ソフトウェアを使用して、検出されたイオンの可能な分子式組成を予測した。すべてのイオンについてC、H、N、Oの存在を考慮して予測を行った。さらに、同位体パターンがC、H、N、およびO以外の原子の存在を示唆する調査で、他の元素；S、Br、Cl、Pなどが含まれていた。示唆された分子式の理論同位体パターンをMSスペクトルの信号と比較した。d4-メタノール中のMBL-AB01のサンプルを希釈することによってHDX分析を行い、60、120分および240時間後にCIDスペクトルを記録した。

40

【0107】

同位体パターンはClの存在を示す。分子式を $\text{C}_{27}\text{H}_{18}\text{ClNO}_{10}$ として同定し、この式は、発酵標識実験と、LC-QTOFおよびFT-ICRの両方で観察された同位体分布の結果とは矛盾しない。断片化実験は、示唆された分子イオンからの CO_2 に続いて水の欠失を示す。HDX分析は、最大5つの交換可能なプロトンの存在を示す。

【0108】

NMRを用いた構造解明

50

本目的は、551.061927 Daの質量および $C_{27}H_{18}ClNO_{10}$ の化学式を有する、実施例2の活性化合物として同定された分子の化学構造を同定することであった。キサントリピンは、この化学式についてパブリック・ドメインとして開示されている唯一の分子であるが、データは、MBL-AB01がキサントリピンと同一ではないことを明確に示している。

【0109】

0.7ミリグラムの精製MP127-ig17のバイアルを得た。固体材料を、NMR実験が行われるまで-18で保存した。

【0110】

サンプルをバイアル中の120 μ lのDMSO-d6に溶解した。本溶液を3mmのNMRサンプルPN027-20-02に移した。追加の60 μ lのDMSO-d6を用いてバイアルをすすぎ、この洗浄液をNMRチューブに移した。キャップをはめる前にチューブを窒素ガスでフラッシュした。TCOクライオプローブ(^{13}C 内部コイル、すなわち炭素検出に最適化された)を備えた800MHz分光計でNMR実験を行った。

【0111】

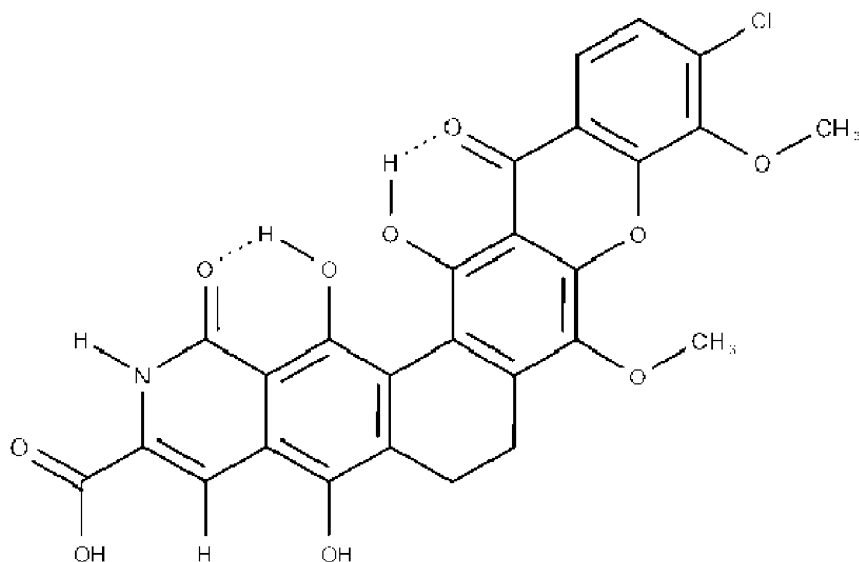
$1D^1H$ スペクトルにより、MBL-AB01の非常に純粋なサンプルが明らかになった。サンプルを多数の追加NMRスペクトルで分析した(図2参照)。

【0112】

MBL-AB01(式III参照)の提案された構造は、入手可能なすべてのNMRおよびMSデータによって支持され、矛盾しない。この構造はまた、関連する化合物(例えば、キサントリピン)の生合成経路についてのデータおよび刊行物に関して合理的ならびに一般的な有機化学の観点から完全に現実的であると考えられている。

【0113】

【化5】



(III)

【0114】

実施例4: 0.5 \times 人工海水を含む細菌培養物からの活性化合物の単離

MBL-AB01の産生のためのMP127-ig17の培養を、バッチ発酵(使用したPM6__MOD3培地の組成: 可溶性デンプン30 g/l; 酵母抽出物2 g/l; コーンステープリカー2.5 g/l; ペプトン2.0 g/l; $CaCO_3$ 3.0 g/l)で1.65リットルのPM6__MOD3培地を含む3リットルのApplicon発酵槽で行った。発酵は25で8日間、開始から0.25 vvmの通気(分あたりの単位液体体積あたりの気体体積流量)で行い、その後、培養および攪拌の残りの間、15 vvmに

減少させた。溶存酸素は30%超であった。発酵のための種培養物を、100mlのトリプトン大豆ブロス培地(Oxoid)を含む500mlのバッフル付き振とうフラスコ中で調製した。

【0115】

PM6__MOD3発酵ブロスからの乾燥物質を遠心分離によって集め、次いで凍結乾燥させた。次いで得られた粉末を50mlメタノール/g粉末で洗浄し、5および10mlのDMSO/g粉末でそれぞれ2回抽出した。2つのDMSO抽出物を混合し、次いで凍結乾燥させた。乾燥抽出物を少量のDMSOに再懸濁させ、不溶解物質を濾過によって除去した。

【0116】

この抽出物を、ダイオードアレイ検出器およびフラクションコレクターに接続されたZorbax eclipse XBD-C18、5μm、9.4×250mmカラムを備えたAgilent HPLCシステムで分離した。0.4%25%NH₃/l[A]およびメタノールを添加した20mM酢酸アンモニウムを移動相として使用した。HPLCを、最初の7.5分間76%均一濃度[B]で行った。7.6~9.0分で100%[B]を適用した。活性化合物は約5.5分で溶出した。化合物の分解を回避するために、0.01×画分容量の50g/lの酢酸アンモニウムpH=4を分画前にフラクションコレクターバイアルの各々に添加した。画分中の活性化合物を、100%メタノール、次いで0.1%の50g/l酢酸アンモニウムpH4を添加した76%メタノールで調整した固相カラム(60mg Oasis HLB)に結合させた。化合物をカラムに結合させた後、カラムを1.5mlの85%メタノールpH=4で、次いで5mlの76%メタノールpH=4で洗浄した。本化合物を、0.1%の50g/l酢酸アンモニウムpH=8を添加したメタノールでカラムから溶出させた。メタノールを真空遠心分離機で除去し、化合物に水を添加して凍結乾燥させた。

【0117】

実施例5:MBL-AB01のin vitro抗菌活性(MIC測定)、他の公知の抗菌化合物との比較

グラム陰性およびグラム陽性の病原体のパネルに対してMBL-AB01を試験した。Mueller-Hintonブロス(Acumedica)を用いた標準化された微量希釈試験によって、すべてのグラム陽性およびグラム陰性の細菌株のMICsを測定した。5×10⁵CFU/mlを含む細菌接種物を、Clinical and Laboratory Standards Instituteのプロトコルに従って種々の抗生物質濃度の存在下、35℃で19時間培養した。細菌株は、培養コレクションATCC(American Type Culture Collection)、NCTC(National Culture of Type Cultures)およびCCUG(培養コレクション、Gottborg大学、Sweden)から得た。

【0118】

ほとんどのグラム陽性株について、0.032~0.5μg/mlの範囲のMBL-AB01のMICは、参照抗生物質バンコマイシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシンおよびダプトマイシンのMICと同等または未満であった(表1)。MBL-AB01は、Enterococcus faecalis CCUG 37832およびE. faecium CTC 492によって代表されるバンコマイシン耐性細菌株の増殖もそれぞれ0.25および0.5μg/mlのMICで阻害した。

【0119】

10

20

30

40

【表 2】

	M I C $\mu\text{g}/\text{ml}$				
	MBL-AB (+) 01	Vanc omycin	Gent amicin	Stre ptomycin	Dapt omycin
E. faecium CCUG 37832 *	0.25	>16	16	>16	>16
E. faecium CTC 492	0.5	1	16	>16	>16
M. luteus、 ATCC 9341	0.063	1	4	8	0.5
S. aureus ATCC 29213	<0.032	2	4	16	4
S. aureus ATCC 43300 (MRSA)	0.032	2	16	16	4
S. aureus NCTC 6571	0.032	2	4	16	4

10

【0120】

20

実施例 6：IMR90 線維芽細胞についての MBL-AB01 およびキサントリピンのインビトロ細胞傷害性の測定

MBL-AB01 およびキサントリピンの細胞傷害性を、IMR90 ヒト肺線維芽細胞 (ATCC CCL-186) 細胞を用いたインビトロアッセイで評価した。上記の実施例 5 に記載のように MBL-AB01 を単離した。キサントリピンは Shaghai Jiao Tong 大学、China から得た。キサントリピンのストック溶液をメタノール中に設定し、化合物が 395 nm で類似の吸光係数を有すると仮定することによって、UV/vis 吸収に基づいてキサントリピンのストック溶液の濃度を MBL-AB01 と関連づけた。

【0121】

30

IMR90 細胞を、2 mM L-グルタミン、1% MEM NEAA (Sigma)、1 mM ビルビン酸ナトリウム、10 mM HEPES および 100 U/mL Pen-Strep で補充した DMEM 低グルコース (Sigma) 中で増殖させた。培養密度に応じて、1:2 ~ 1:8 の比率で細胞を週に 2 回または 3 回継代した。細胞の化合物への暴露の前日に、1 ml あたり 1.2×10^5 の IMR90 細胞を含む 30 μl の細胞懸濁液を、384 ウェルプレート (Corning Assay Plate、3712) に、ディスポーザブルチップ (Tecan MCA125 μl 、30051 808) を用いた MCA384 ピettings ユニットを備えた Tecan EVO ロボットワークステーションを用いて播種した。播種後、細胞懸濁液を含むマイクロプレートを振幅 2.5 mm でもって 1600 rpm (Bioshake) で 20 秒間振盪した。Tecan EVO 上に配置された 350 rpm で攪拌している滅菌磁気攪拌子 (15 x 4.5 mm、VWR 442-4522) を備えた攪拌リザーバ (リザーバ平底 300 mL 10723363) からマイクロプレートに移した。IMR90 細胞を含むマイクロプレートを 37、5% CO₂ 雰囲気下でインキュベートした。細胞の曝露の日に、MBL-AB01 およびキサントリピンの希釈系列を DMSO 中で作製した。化合物を有する希釈系列をさらに細胞培養培地に希釈し、アッセイウェルに移し、アッセイウェル中の全 DMSO 濃度を 0.6% とした。曝露後、IMR90 細胞を有するアッセイプレートをさらに 37、5% CO₂ 雰囲気下で 24 時間インキュベートした。インキュベーション後の細胞の生存率を、Promega Cell Titer - GLO 2.0 生存率アッセイを用いて測定した。MBL-AB01 およびキサントリピンの EC50 値は、類似の DMSO 濃度を有す

40

50

る増殖培地を添加した対照ウェルに対する曝露細胞の生存率に基づいて評価した。このアッセイにおいて、IMR90細胞について、MBL-AB01のEC50値は20 µg / mlと評価され、キサントリピンのEC50値は1 µg / mlと推定された。

【0122】

寄託とエキスパート・ソリューション

出願人は、ブダペスト条約に基づいて寄託番号DSMZ 2287で2016年4月7日にDSMZに寄託された寄託微生物のサンプルは、特許が付与される日まで、エキスパートのみが入手可能であることを要求する。

【図1】

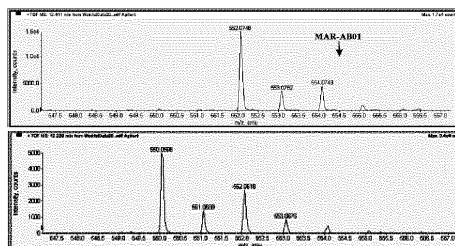


Figure 1: LC-DAD-isoplot (upper) and MS spectra at ESI+ (middle) and MS spectra of ESI- (bottom) of the active fraction of the MP127-ig17 extract fractionated on HPLC.

【図2】

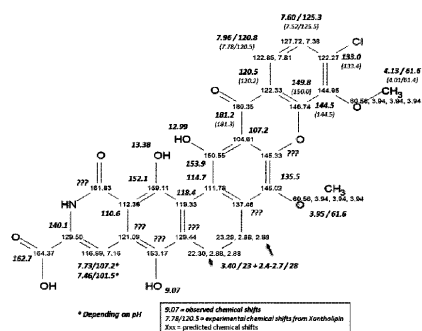


Figure 2: Key NMR and MS data supporting the structure of MBL-AB01.

【配列表】

0006964600000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 0 1 N 43/90 (2006.01) A 0 1 N 43/90 1 0 2

- (72)発明者 フレグスタッド, デグネス クリスティン
 ノルウェー王国 エヌ - 7 0 7 1 トロンヘイム イヴァル アアセン ヴェグ 2 0
- (72)発明者 エリングセン, トロント エルリン
 ノルウェー王国 エヌ - 7 0 5 4 ランヘイム マルカプラッセン 2 7 3
- (72)発明者 ノルトボルグ, アンナ
 ノルウェー王国 エヌ - 7 0 5 2 トロンヘイム チュホルト アレ 8
- (72)発明者 クリンケンバリ, ガイル
 ノルウェー王国 エヌ - 7 0 7 2 ヘイムダル ビョルンダレン 8 1
- (72)発明者 ハクボグ, シグリッド
 ノルウェー王国 エヌ - 7 0 6 7 トロンヘイム グルントヴィ ゲイト 4

審査官 玉井 真人

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 7 / 0 9 5 6 9 6 (W O , A 1)
 J. Org. Chem., 2013, Vol.78, pp.7617-7626

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
 C 0 7 D 1 / 0 0 - 5 2 1 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)