

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4109123号

(P4109123)

(45) 発行日 平成20年7月2日(2008.7.2)

(24) 登録日 平成20年4月11日(2008.4.11)

(51) Int.Cl.

F 1

| | | | | | |
|----------------|---------------|------------------|---------|--------|---|
| C 0 7 K | 5/062 | (2006.01) | C O 7 K | 5/062 | |
| A 6 1 K | 47/48 | (2006.01) | A 6 1 K | 47/48 | |
| C 0 7 C | 323/59 | (2006.01) | C O 7 C | 323/59 | |
| C 1 2 N | 1/20 | (2006.01) | C 1 2 N | 1/20 | E |
| C 1 2 N | 9/99 | (2006.01) | C 1 2 N | 9/99 | |

請求項の数 12 (全 45 頁) 最終頁に続く

| | |
|---------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2002-586878 (P2002-586878) |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年5月9日(2002.5.9) |
| (65) 公表番号 | 特表2005-505502 (P2005-505502A) |
| (43) 公表日 | 平成17年2月24日(2005.2.24) |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2002/014500 |
| (87) 国際公開番号 | W02002/089739 |
| (87) 国際公開日 | 平成14年11月14日(2002.11.14) |
| 審査請求日 | 平成17年5月6日(2005.5.6) |
| (31) 優先権主張番号 | 60/290,099 |
| (32) 優先日 | 平成13年5月9日(2001.5.9) |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) |

| | |
|-----------|--|
| (73) 特許権者 | 503412023 |
| | セルメド オンコロジー (ユーエスエイ), インコーポレイテッド |
| | アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121-3829, サン ディエゴ, ディレクターズ プレイス 4939 |
| (74) 代理人 | 100078282 |
| | 弁理士 山本 秀策 |
| (74) 代理人 | 100062409 |
| | 弁理士 安村 高明 |
| (74) 代理人 | 100113413 |
| | 弁理士 森下 夏樹 |

最終頁に続く

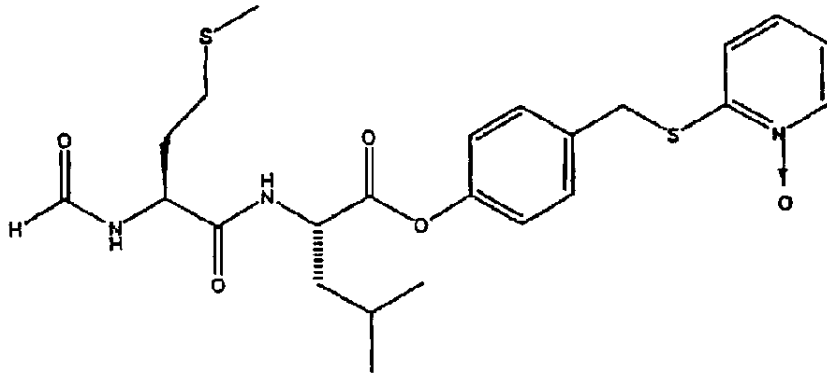
(54) 【発明の名称】 ペプチドデホルミラーゼ活性化プロドラッグ

(57) 【特許請求の範囲】

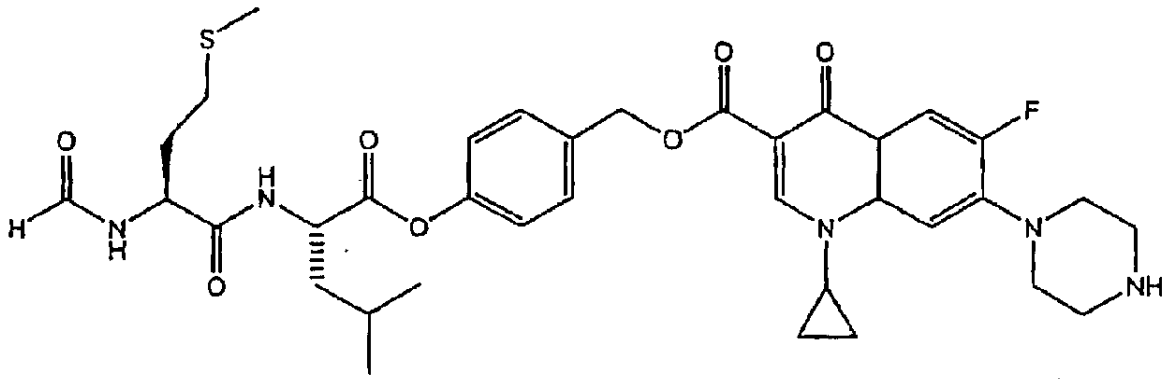
【請求項1】

以下の群から選択される構造を有する化合物：

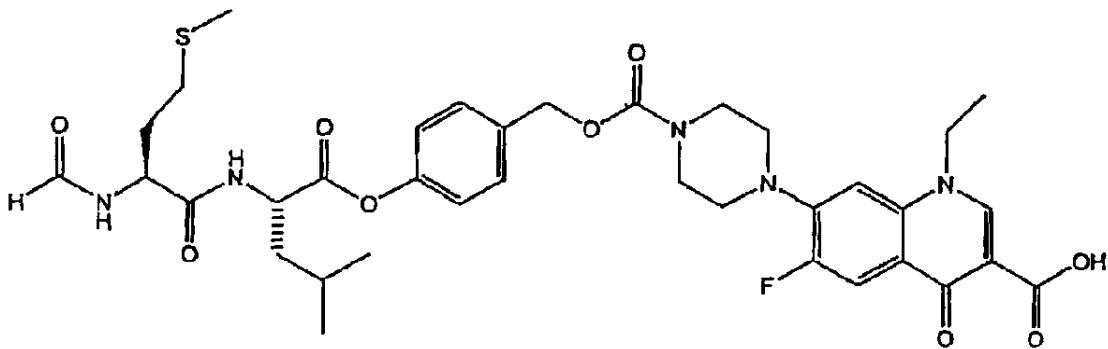
【化1】



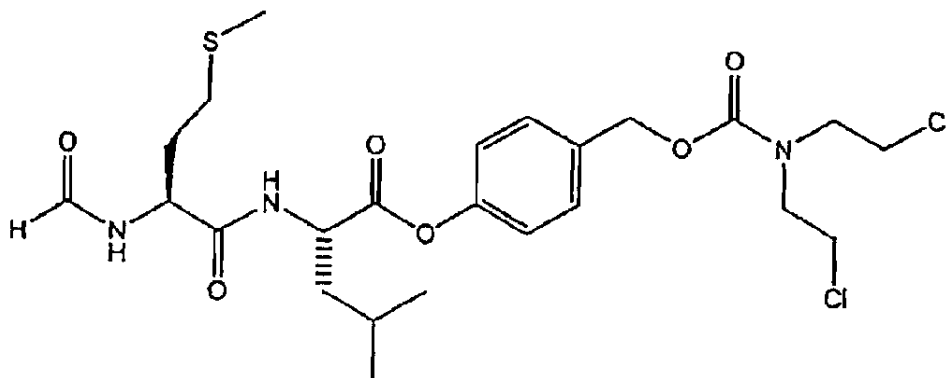
10



20



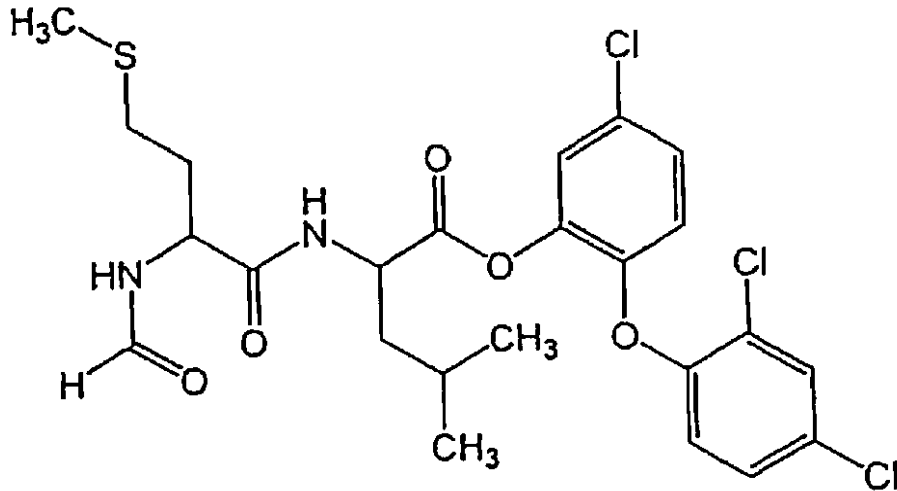
30



40

または

【化 4 9】

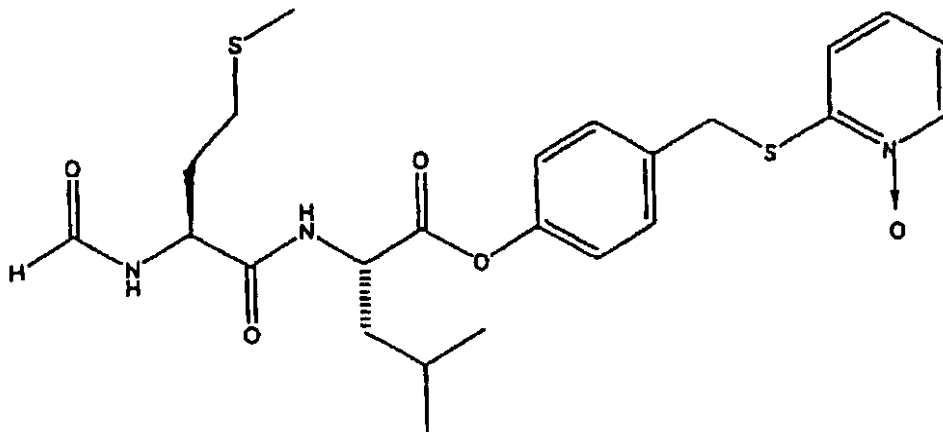


10

【請求項 2】

以下の構造：

【化 2】



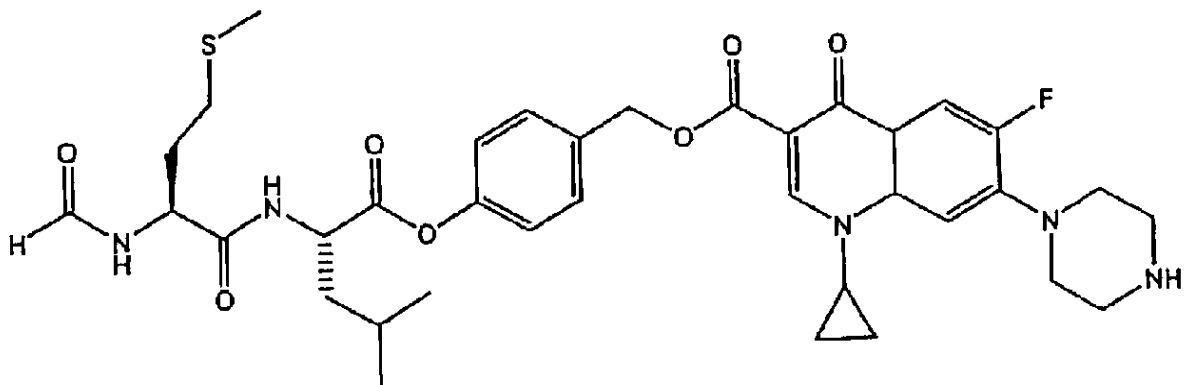
20

を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

以下の構造：

【化 3】



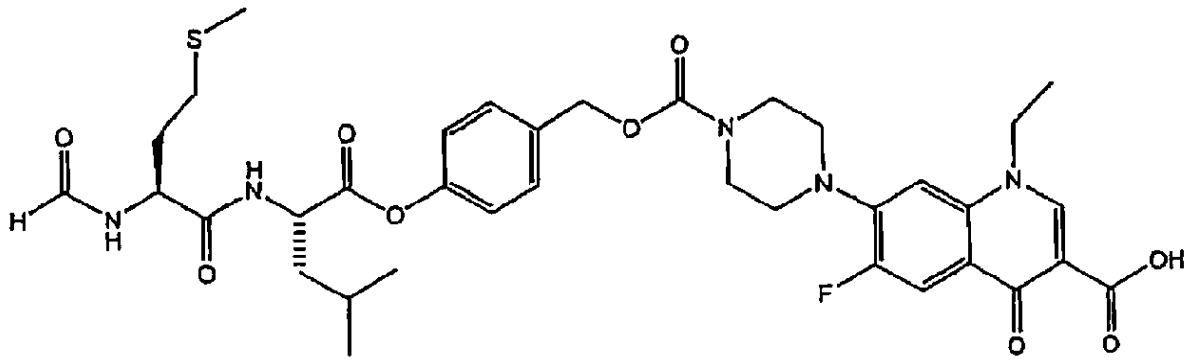
40

を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

以下の構造：

【化4】



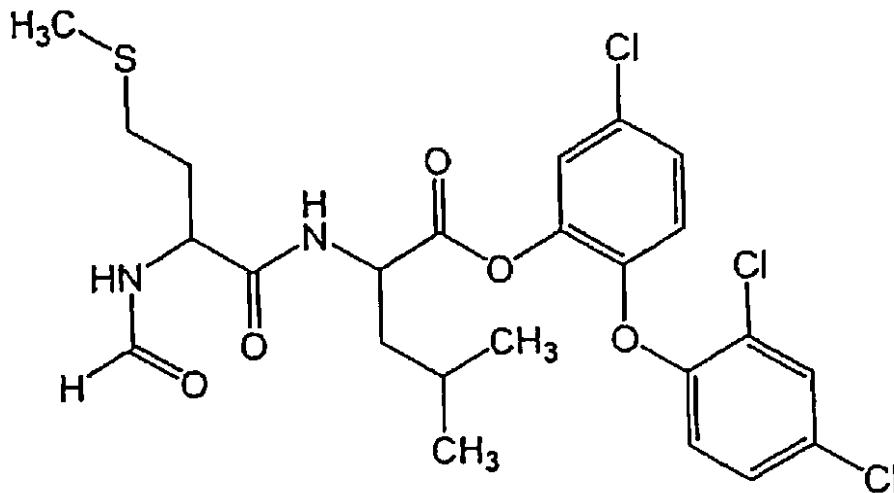
10

を有する、請求項1に記載の化合物。

【請求項5】

以下の構造：

【化5】



20

を有する、請求項1に記載の化合物。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物およびキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項7】

前記キャリアが、薬学的に受容可能なキャリアである、請求項6に記載の薬学的組成物。

【請求項8】

微生物の成長を阻害するためのエキソピボの方法であって、該微生物を、有効量の請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項9】

前記微生物が、ペプチドデホルミラーゼを発現する、請求項8に記載の方法。

40

【請求項10】

微生物の成長を阻害するための医薬の調製における請求項1～4のいずれか1項に記載の化合物の使用。

【請求項11】

潜在的な治療剤を同定するためのエキソピボの方法であって、以下：

(a) 微生物への請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物の取り込みに有利な条件下で、該化合物に該微生物を接触させる工程；および

(b) 該微生物の未処理のサンプルと比較して、該微生物の増殖の量についてアッセイする工程、

を包含する、方法。

50

【請求項 1 2】

前記微生物が、ペプチドデホルミラーゼを発現する、請求項 1 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の引用)

本願は、2001年5月9日出願の米国仮出願番号60/290,099(この内容は、本明細書中で参考として本発明の開示中に援用される)に対して、米国特許法119条第(e)項の下で利益を主張する。

【0002】

(技術分野)

本発明は、Enzyme Catalized Therapeutic Activation (ECTATM)治療に関し、そして特に、Peptide Deformylase(「PDF」)を発現する微生物に特異的なECTA治療に関する。

【背景技術】

【0003】

(背景)

本開示を通じて、種々の刊行物は、筆頭著者および日付によって、丸括弧内で特許番号または刊行物番号で参照される。完全な書誌参照は、本願の末尾にて示される。これらの参照の開示は、本願が属する分野の標準をより完全に説明するために、本開示中に参考として援用される。

【0004】

Enzyme Catalized Therapeutic Activation (ECTATM)治療は、標的酵素についての独自のプロドラッグ物質を提供する新規技術である。従来の治療とは異なり、ECTAプロドラッグは、標的酵素を阻害しも不可逆的に不活化もしない。米国特許第6,159,706号;同第6,245,750号;および同第6,339,151号B1。PCT/US98/16607;PCT/US99/01332;およびPCT/US00/20008もまた参照のこと。

【0005】

標的酵素は、標的細胞内、またはこの標的酵素が感染細胞のようなそれが存在しない環境と比較して発現される環境において、ECTAプロドラッグを優先的に毒素に転換する。これらの化合物は、標的化因子を必要としないので、局所的または全身的に直接利用され得る。

【0006】

ECTA分子は、ほとんどの場合細胞傷害性産物を(標的酵素活性化なしには)自然に生じない。これらは、非標的化酵素によって感知できるほどには活性化されず、これは、非疾患組織または非感染組織に対する毒性を生じ得る。表1は、ECTA分子および酵素アクチベータの特徴を概説する。

【0007】

(表1)

【0008】

10

20

30

40

【表 1】

| E C T A 標的酵素の特徴 | E C T A プロドラッグの特徴 |
|--|---|
| 感染症：標的細胞（疾患細胞、細菌、真菌などを含む）中にのみ存在しなければならない。この酵素は、継続する生存性または病原性のために必要であるべきである。 | （それ自体、またはプロドラッグとして）細胞中に進入することができなければならない。 |
| 天然の基質（E C T A 分子）と類似した分子を、細胞傷害性種へと処理しなければならない。この類似性は、酵素／基質相互作用の特異性、およびこの酵素が基質を細胞内で毒性種に処理する能力に関してのみ有意でなければならない。 | 酵素反応から形成される産物の少なくとも1つは、細胞傷害性でなければならない。しかし、E C T A は、標的酵素によって活性化されるまで、不活性形態のままである。この化合物は、標的化酵素についての高い特異性の程度を有さなければならないが、非標的化酵素による転換は、その産物が非細胞傷害性である場合には、受容可能である。 |
| E C T A 分子、中間体または反応産物によって不活化されるべきではない。 | 標的化酵素を阻害も失活もさせるべきではない。 |

植物、ヒトまたは農業的に重要な動物における細菌感染、ウイルス感染および真菌感染の場合、病原性生物中に存在するが宿主中には存在しない代謝経路は、強力な E C T A 標的酵素の供給源である。例えば、いくつかの経路およびそれに関与する酵素は、細菌、真菌および植物においては見出されるが、哺乳動物細胞においては見出されない。1つの例は、「必須」アミノ酸（動物が合成できず、そして食物で摂取する必要があるアミノ酸）の合成である。Nelson および Cox (1972)。

【0009】

別の例は、成長するポリペプチド鎖中の N 末端 N - ホルミルメチオニンの脱ホルミル化を触媒する、ペプチドデホルミラーゼ (Peptide Deformylase) (「PDF」、EC 3.5.1.31) である。Meinzel、1999。この酵素は、細菌中に存在し、かつ細菌中で活性であるが (Meinzelら、1993)、哺乳動物細胞中には存在しないことが報告されている。細菌 PDF 配列に対する配列ホモログが、最近哺乳動物において見出されたが、その正確な機能は未知である。Gigliano (2000a) および (2000b)。

【0010】

この酵素は、ヒトにおいては活性でないので、抗菌剤（主に PDF インヒビター）のための標的として使用されてきた。ジチオールは、スルフヒドリル基と活性部位金属イオンとの配位によって、非特異的 PDF インヒビターとして作用し得る。Rajagopalan (1997)。1, 2 - ジチオールまたは 1, 3 - ジチオールの場合、活性部位からの金属イオンのゆっくりとした抽出が生じる。それぞれ、安定な 5 員環または 6 員環の形成（各々、2 個の金属 - 硫黄結合を含む）が、この効果を説明する。

【0011】

合理的に設計されたコンビナトリアルライブラリーを使用して、一般構造 $\text{HS} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{R}_a) - \text{CONH} - \text{CH}(\text{R}_b) - \text{CONH} - \text{R}_c$ の、機構に基づく PDF イン

10

20

30

40

50

ヒビターを選択した。Weiら、(2000a)。このライブラリーから選択される最適なインヒビターは、 n -Bu基を保有し、 R_a 、 R_b は $-(CH_2)_3-NH-C(=NH)-NH_2$ であり、そして R_c は2-ナフタレンである。この化合物は、 15 nM の K_i を有する、競合的PDFインヒビターとして作用する。

【0012】

Jayasekeraら(2000)は、E. coli PDFを阻害するための、既知の抗コレステロール血症チロプロピック酸(thyropropic acid)に構造的に関連する一連の非ペプチド化合物を記載する。アクチノニン(actinonin)は、ナノモル濃度下の K_i 範囲の活性を有する、強力なPDFインヒビターであることが報告されている。Chen(2000)。

10

【0013】

Weiら(2000a)は、5-フルオロデオキシウリジンの5'-ジペプチジル誘導体が、PDF触媒された脱ホルミル化の際に、低分子(5-フルオロデオキシウリジン(5-F-dUrd))を放出することを記載している。5-F-dUrd形成は、精製PDFまたはE. coli粗製溶解物によって触媒される基質の反応においてモニタリングされた。この化合物は、E. coli細菌に適用された場合、僅かに細胞傷害性($IC_{50} > 100\text{ }\mu\text{M}$)であった。効力は、(PDF過剰発現株を使用した)細菌中のPDFの発現の増加によって、増加しなかった。この化合物は、グラム陽性微生物に対して僅かにより効果的であった($IC_{50} = 50\text{ }\mu\text{M}$)。

【0014】

20

さらなるインヒビターは、Apfelら(2000)、Apfelら(2001a)、Apfelら(2001b)、Clementsら(2001)、Durandら(1999)およびChenら(2000)に記載される。

【0015】

しかし、インヒビターではないが、毒素に対してPDFによってかなり選択的かつ効果的に活性化される化合物または薬剤は、記載されていない。本発明は、この必要性を満たし、そして関連の利点も提供する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0016】

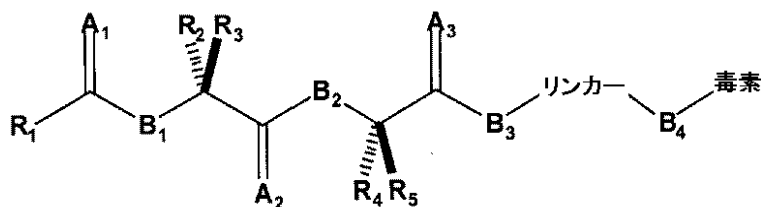
30

(本発明の開示)

本発明は、以下の構造：

【0017】

【化9】



40

を有するプロドラッグ化合物を提供し、

ここで R_1 、 R_2 、 R_4 、および R_5 は、独立して、同じかまたは異なり、そして水素、置換または無置換の $C_5 \sim C_{14}$ アリール基、および置換または無置換の、飽和または不飽和の $C_1 \sim C_6$ アルキル基からなる群から選択され；

ここで R_3 は、置換または無置換のアリール基および置換または無置換の、飽和または不飽和の $C_1 \sim C_6$ アルキル基ならびに $-CH_2-CH_2-X-CH_3$ からなる群から選択され、ここで X は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-NR_6-$ および $-CH_2-$ からなる群から選択され； R_6 は、低級アルキルであり；

50

ここで A_1 および A_3 は、独立して、同じかまたは異なり、 $=O$ 、 $=S$ 、 $=NH$ 、 $=N-OH$ 、または $=N-R_7$ からなる群から選択され、ここで R_7 は、水素または $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；

ここで A_2 は、存在しないか、または $=O$ 、 $=S$ 、 $=NH$ 、 $=N-OH$ 、 $=N-R_8$ もしくは $-C(R_9)(R_{10})-$ からなる群から選択され、ここで R_8 、 R_9 、および R_{10} は、独立して、同じかまたは異なり、そして水素または $C_1 \sim C_6$ アルキルからなる群から選択され；

ここで B_1 は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、または $-N(R_{11})-$ からなる群から選択され、ここで R_{11} は水素および $C_1 \sim C_6$ アルキルからなる群から選択され；

ここで B_2 は、存在しないか、または $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R_{12})-$ 、もしくは $-C(R_{13})(R_{14})-$ からなる群から選択され、ここで R_{12} 、 R_{13} 、および R_{14} は、独立して、同じかまたは異なり、水素または置換もしくは無置換の、飽和もしくは不飽和のアルキルからなる群から選択され；

ここでフラグメント $-B_2-C(R_4)(R_5)-C(=A_3)-$ は、それ全体で、天然に存在するアミノ酸（例えばプロリン）、そのアナログ、誘導体またはペプチド模倣物であり；

ここでフラグメント $-B_2-C(R_4)(R_5)-C(=A_3)-$ は、それ全体で、プロリン、そのアナログ、誘導体またはペプチド模倣物であり；

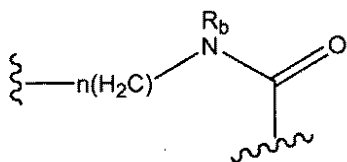
ここで B_3 は、存在しないかまたは $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、もしくは $-N(R_{15})-$ からなる群から選択され、ここで R_{15} は、水素および $C_1 \sim C_6$ アルキルからなる群から選択され；

ここで B_4 は、存在しないかまたは $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R_6)-$ 、および $-C(R_{16})(R_{17})-$ からなる群から選択され、ここで R_{16} および R_{17} は、独立して、同じかまたは異なり、そして水素または置換もしくは無置換の、飽和もしくは不飽和のアルキルからなる群から選択され；

ここで、リンカーは、存在しないかまたは無痕跡リンカーであり、リンカーは、制限しないが、 $-C_6H_4-CH_2-$ および $-C_6H_4-CH_2-X_1-C(=X_2)-$ および $-(CH_2)_n-NR_b-(C=O)-$ からなる群から選択され、ここで X_1 および X_2 は、独立して、同じかまたは異なり、 $-O-$ 、 $-S-$ および $-N(R_a)-$ からなる群から選択され、そしてここで R_a は水素または低級アルキルであり、そして $-(CH_2)_n-NR_b-(C=O)-$ は、以下の構造：

【0018】

【化10】



を有し；

ここで、 $n = 2$ または 3 であり、 R_b は、水素または低級アルキルであり；そして

ここで、毒素は、「活性化」酵素による放出の際に細胞に対して毒性である任意の因子を含むことを意図し、但し、この毒素は、5-フルオロデオキシウリジン（5-F-dUrd）である。

【0019】

1つの局面において、この化合物は、上記の通りであるが、 R_1 および R_2 が、ともに水素である。

【0020】

さらなる局面において、この化合物は、上記の通りであるが、 R_3 が、 $-CH_2CH_2-X-CH_3$ であり、ここで X が、酸素、イオウまたはメチレンからなる群より選択され

10

20

30

40

50

る。なおさらなる局面において、この化合物は、上記の通りであるが、Xがイオウである。

【0021】

1つの局面において、この化合物は、上記の通りであるが、A₁およびA₂が、ともに酸素である。

【0022】

さらなる局面において、この化合物は、上記の通りであるが、B₁が、-NH-である。

【0023】

さらなる局面において、この化合物は、上記の通りであるが、B₄が、存在しない。

10

【0024】

さらなる局面において、毒素は、2-メルカプトピリジン-N-オキシド、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、およびナイトロジェンマスタード、ならびにそれらの誘導体およびアナログからなる群より選択される。

【0025】

1つの局面において、この化合物は、上記の通りであるが、B₂が、-NHであり、B₃が-O-であり、R₄が、2-メチル-プロピルであり、そしてR₅が、水素である。

【0026】

1つの局面において、この化合物は、上記の通りであるが、R₄が、2-メチル-プロピルであり、そしてR₅が、水素である。

20

【0027】

PDFを発現する微生物に有効量の上記化合物を接触させることによって、この微生物の増殖を阻害するための方法もまた、本発明によって提供される。この方法は、例えば、S. aureus、S. epidermidis、K. pneumoniae、E. aerogenes、E. cloacae、M. catarrhalis、E. coli、E. faecalis、H. influenzaeおよびP. aeruginosaのグラム陽性微生物およびグラム陰性微生物の増殖を阻害する。この方法は、インビトロ、エキソピボ、およびインピボで実施され得る。被験体に有効量の上記化合物を投与または送達することによって、この被験体において、PDFを発現する微生物による感染の症状を軽減するための方法がさらに提供される。「被験体」は、本明細書中で規定され、そしてヒト被験体のような哺乳動物を含む。

30

【0028】

本発明はまた、上記プロドラッグ化合物（単独でまたは他の化合物もしくは他の薬剤（公知もしくは将来発見されるべき）とともに）およびキャリアを含む組成物を提供する。1つの局面において、このキャリアは、別の分子または不活性な物質（例えば、プレートまたはカラム）である。別の実施形態において、キャリアは、薬学的に受容可能なキャリアである。薬学的に受容可能なキャリアは、当該分野において公知であり、そして上記簡単に記載される。

【0029】

（本発明を実施するための形態）

40

本発明の実施は、他に示さない限り、有機化学、薬学、分子生物学（組換え技術を含む）、細胞生物学、生化学、および、免疫学の従来技術（これらは、当該分野の範囲内である）を使用する。このような技術は、以下のような文献に完全に説明される：「MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL」第2版（Sambrookら，1989）；「OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS」（M. J. Gait，編，1984）；「ANIMAL CELL CULTURE」（R. I. Freshney，編，1987）；the series「METHODS IN ENZYMOLOGY」（Academic Press，Inc.）；「HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY」（D. M. Weir & C. C. Blackwell，編）；「GENE TRANSFER V

50

ECTORS FOR MAMMALIAN CELLS」(J. M. Miller & MY. Calos, 編, 1987); 「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」(F. M. Ausubelら, 編, 1987, および定期的改訂); 「PCR: THE POLYMERASE CHAIN REACTION」(Mullisら, 編, 1994); 「CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY」(J. E. Coliganら, 編, 1991); J. March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY: REACTIONS, MECHANISMS AND STRUCTURE, 第4版(John Wiley & Sons, NY(1992))。

【0030】

本明細書中で使用される場合、特定の用語は、以下に規定される意味を有し得る。

【0031】

単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかにそうでないことを示さない限り、複数の参照を含む。例えば、用語「細胞(a cell)」は、複数の細胞(その混合物を含む)を含む。

【0032】

用語「含む(comprising)」は、この組成物および方法が、記載された要素を含み、他のものを排除しないことを意味することが意図される。組成物および方法を規定するために使用される場合、「から本質的になる」は、その組合せに対して、任意の本質的な重要な他の要素を排除することを意味する。従って、本明細書中に規定される要素から本質的になる組成物は、単離および精製方法ならびに薬学的に受容可能なキャリアからの微量の混入物(例えば、リン酸緩衝生理食塩水、保存剤など)を排除しない。「からなる」は、微量の要素より多い他の成分および本発明の組成物を投与するための実質的な方法の工程を排除することを意味する。これらの推移的(transition)用語のそれぞれによって規定される実施形態が、本発明の範囲内である。

【0033】

本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド模倣物」とは、天然の親ペプチドの生物学的作用を模倣し得るかまたは拮抗し得る、非ペプチド性構造要素を含む化合物をいう。

【0034】

本明細書中で使用される場合、用語「置換基」は、限定しないが、以下が挙げられる: ハロゲン原子およびハロメチル基(例えば、 CF_3 および CCl_3); 酸素含有基(例えば、オキシ、ヒドロキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシ、アルコイル、アルコイルオキシ、アリーロキシ、アリーロイル、およびアリーロイルオキシ); 窒素含有基(例えば、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、シアノ、アジドおよびニトロ); イオウ含有基(例えば、チオール、アルキルチオール、スルホニルおよびスルホキシド); ヘテロ環基(それら自体が置換され得る); アルキル基(それら自体が置換され得る); ならびにアリール基(それら自体が置換され得る)。

【0035】

用語「アルキル」とは、任意の分枝または非分枝、環式または非環式、飽和(アルキル)または不飽和(アルカイル(alkyl)、アルケニルまたはアルキニル)のヒドロカルビル基をいう。この用語は、一価のラジカルに限定されない。環式である場合、アルキル基は、 $C_3 \sim C_{12}$ である。非環式である場合、アルキル基は、 $C_1 \sim C_{16}$ である。用語「アルコキシ」および「アリーロキシ」とは、それぞれ、アルキル-Oおよびアリーロ-O基を意味する。「アルコイル」基および「アリーロイル(aryloyl)」基に対する参照は、アルキル-COおよびアリーロ-COをそれぞれ意味する。

【0036】

用語「アリール」とは、芳香族基(例えば、フェニルまたはナフチル)または1つ以上のヘテロ原子を含有するヘテロ原子基(例えば、ピリジル、ピロリル、フラニルおよびチオフェニル)をいう。この用語は、一価のラジカルに限定されない。この用語「芳香族」とは、少なくとも1つのベンゼン環の存在によって特徴付けられる任意の化合物をいう。

10

20

30

40

50

芳香族基の例としては、限定しないが、ベンゼンおよびナフタレンが挙げられる。

【0037】

アルキル基およびアール基は、置換されていても置換されなくてもよい。用語「脂肪族」とは、炭素原子の直鎖によって特徴付けられる水素および炭素の任意の全ての有機化合物をいう。「脂肪族」化合物のサブグループとしては、アルカン、アルケン、およびアルキンが挙げられる。脂肪族基は、置換されていても置換されなくてもよい。置換基の例について上記を参照のこと。

【0038】

用語「脂環式」とは、水素原子および炭素原子が結合して1つ以上の環を形成している、任意の全ての有機化合物をいい、そしてこれらの化合物を網羅する。脂環式基は、非置換であっても置換されていてもよい。置換基の例については、上記を参照のこと。

10

【0039】

「シクロアルキル」とは、飽和の環状基（例えば、シクロプロピル、シクロブチル、またはシクロペンチル）を意図し、そしてこれらの環を包含する。この用語は、一価の基に限定されない。シクロアルキル基は、非置換であっても置換されていてもよい。置換基の例については、上記を参照のこと。

【0040】

用語「アルケニル」とは、1つ以上の不飽和部位を有する、直鎖アルケニル基、分枝鎖アルケニル基、およびシクロアルケニル基をいう。「アルキニル」とは、直鎖または分枝鎖のいずれかの配置の炭化水素鎖、および1つ以上の三重結合（これは、この鎖に沿った任意の安定な位置に存在し得る）を含むことを意図し、例えば、エチニルおよびプロピニルである。これらの用語は、一価の基に限定されない。アルケニル基またはアルキニル基は、非置換であっても置換されていてもよい。置換基の例については、上記を参照のこと。

20

【0041】

「低級アルキル」とは、直鎖低級アルキル基の場合には1～6個の炭素、そして低級分枝鎖（例えば、2-メチル-プロパン）およびシクロアルキル基について適用可能である場合には、3～6個の炭素を有するアルキル基の、上記の広い定義を意味する。「低級アルケニル」とは、同様に、直鎖低級アルケニル基については2～6個の炭素、そして分枝鎖およびシクロ低級アルケニル基については3～6個の炭素を有すると定義される。「低級アルキニル」もまた、同様に、直鎖低級アルキニル基については2～6個の炭素、そして分枝鎖低級アルキニル基については4～6個の炭素を有すると定義される。低級アルキル基、低級アルケニル基および低級アルキニル基は、非置換であっても置換されていてもよい。置換基の例については、上記を参照のこと。

30

【0042】

「ハロアルキル」とは、特定の数の炭素原子を有し、1つ以上のハロゲンで置換されている、分枝鎖と直鎖との両方の、飽和脂肪族炭化水素基を包含することを意図する（例えば、 v が1～3であり、そして w が1～ $(2v+1)$ である、 $-C_vF_w$ ）。用語ハロアルキルは、一価の基に限定されない。「ハロゲン」としては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、およびアスタチンが挙げられる。ハロアルキルの例としては、トリフルオロメチル、トリクロロメチル、ペンタフルオロエチル、およびペンタクロロエチルが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0043】

用語「複素環式」とは、その環構造が1種より多い原子の組合せである、任意の化合物をいう。複素環式化合物の例としては、ピリジン、フランおよびピロールが挙げられるが、これらに限定されない。この用語は、一価の基に限定されない。複素環式基は、非置換であっても置換されていてもよい。置換基の例については、上記を参照のこと。

【0044】

本明細書中において使用される場合、用語「プロドラッグ」とは、薬学的に活性な薬剤または物質の、前駆体または誘導体の形態であって、薬物代謝物と比較して標的細胞に対

50

する細胞傷害性が低く、そして酵素的に活性化され得るかまたはより活性な形態に転換され得るものを意味する。

【0045】

「組成物」とは、活性薬剤と別の化合物または組成物（不活性（例えば、表面、塗料、検出可能な薬剤または標識、あるいは薬学的に受容可能なキャリア）または活性（例えば、アジュバントまたは消毒薬））との組み合わせを意味するように意図される。

【0046】

「薬学的組成物」とは、活性薬剤とキャリア（不活性または活性であり、組成物をインビトロ、インビボ、またはエキソビボでの診断的使用または治療的使用に適切にする）との組み合わせを包含することを意図する。

【0047】

用語「予防的有効量」とは、被験体または植物の外寄生において、感染を予防する際に有効な量をいう。

【0048】

用語「薬学的に受容可能なキャリア」および「生物学的に受容可能なキャリア」とは、宿主または患者に、本発明の化合物と共に投与され、そして有効量の化合物を送達するために十分な用量で投与される場合に、この化合物の薬理的活性を破壊せず、そして非毒性である、キャリアまたはアジュバントをいう。適切なキャリアの例としては、液相キャリア（例えば、滅菌溶液または水溶液）、ならびに以下に記載されるものが挙げられる。薬学的に受容可能なキャリアの例としては、任意の標準的な薬学的キャリア（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水、水、およびエマルジョン（例えば、水中油エマルジョンまたは油中水エマルジョン））、ならびに種々の型の湿潤剤が挙げられる。この組成物はまた、安定剤および防腐剤を含有し得る。キャリア、安定剤およびアジュバントの例については、Martin, REMINGTON'S PHARM. SCI., 第15版 (Mack Publ. Co., Easton (1975)) を参照のこと。

【0049】

用語「処置（する）」とは、以下のいずれかをいう：患者における特定の障害の症状の軽減；特定の障害に関連する確認可能な測定 of 改善；または微生物の数の減少。当業者は、宿主がいつ「処置された」かを、微生物負荷の減少または感染に関連する症状の軽減を記録することによって、決定し得る。

【0050】

用語「薬学的に受容可能な塩、プロドラッグまたは誘導体」とは、本発明の化合物の任意の薬学的に受容可能な塩、エステル、エーテル、エステルの塩、溶媒和物（例えば、エタノール和物 (ethanolate)）、または他の誘導体であって、レシipientへの投与の際に、本発明の化合物、またはその活性な代謝産物もしくは残基を（直接的にまたは間接的に）提供し得るものをいう。特に好ましい誘導体およびプロドラッグは、このような化合物が哺乳動物に投与される場合に、本発明の化合物のバイオアベイラビリティを増加させるもの（例えば、経口投与された化合物が血液中により容易に吸収されるようにすることによって）、または生物学的区画（例えば、脳またはリンパ系）への親化合物の送達を増強するものである。

【0051】

本発明の化合物の塩は、無機酸および無機塩基、または有機酸および有機塩基から誘導され得る。酸の例としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン-p-スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、およびベンゼンスルホン酸が挙げられる。他の酸（例えば、シュウ酸）は、それ自体は薬学的に受容可能ではないが、本発明の化合物およびその薬学的に受容可能な酸付加塩を得る際の間体として有用な塩の調製において、使用され得る。塩基の例としては、アルカリ金属（例えば、ナトリウム）の水酸化物、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）の水酸化物、アンモニア、式 NW_4^+ の化合物

10

20

30

40

50

(ここで、WはC₁ - 4アルキルである)、およびTHAM(2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール)が挙げられる。

【0052】

塩の例としては、以下が挙げられる：酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ショウノウ酸塩、ショウノウスルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、フルコヘプタン酸塩(flucoheptanoate)、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサ酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、パルモ酸塩(palmoate)、ペクチン酸塩、過硫酸塩、フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピルピン酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシル酸塩、およびウンデカン酸塩。塩の他の例としては、適切な陽イオン(例えば、Na⁺、Li⁺、NH₄⁺、およびNW₄⁺(ここで、Wは、C₁ - 4アルキル基である))と化合した、本発明の化合物の陰イオンが挙げられる。

10

【0053】

治療的使用のためには、本発明の化合物の塩は、薬学的に受容可能である。しかし、薬学的に受容可能ではない酸および塩基の塩もまた、例えば、薬学的に受容可能な化合物の調製または精製において、あるいは植物における微生物外寄生を減少させるために使用するために、用途を見出し得る。

20

【0054】

用語「無痕跡(traceless)リンカー」とは、分子の2つの部分間で特定の結合が切断される場合に、その分子の第二の部分に付着したままであるコネクターが、それ自体の痕跡を残すことを排除するような、単一の分子の2部分間のスペーサーまたはコネクターを示す。例えば、de Grootら(2000)を参照のこと。

【0055】

用語「有効量」とは、治療的または予防的に有効な量を包含する。この用語は、患者における感染、あるいは植物における外寄生の処置または予防において、単一治療(monotherapy)または他の薬剤との組合せのいずれかで有効な量をいう。

【0056】

微生物の「増殖を阻害する」とは、薬剤との接触によって、このような微生物の増殖速度を、この薬剤と接触していない同じ種のコントロール微生物と比較して減少させることを意味する。

30

【0057】

「被験体」とは、PDF発現微生物に対する直接的または間接的な宿主であるか、またはこのような宿主であり得る、任意の生存生物であり、植物および動物(例えば、魚類、鳥類、または哺乳動物であり、好ましくは、ヒト)が挙げられる。魚類としては、ペットおよび水産物が挙げられるが、これらに限定されない。鳥類としては、ペット、スポーツ動物および家畜が挙げられるが、これらに限定されない。哺乳動物としては、マウス、サル、ヒト、家畜、スポーツ動物、およびペットが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0058】

例としては、無脊椎動物、脊椎動物(例えば、鳥類または哺乳動物(例えば、ヒト患者))が挙げられるが、これらに限定されない。哺乳動物としては、マウス、サル、ヒト、家畜、スポーツ動物、およびペットが挙げられるが、これらに限定されない。

【0059】

PDFは、十分に研究された酵素である。その結晶学的構造は、公知である。Chanら(1997)。この酵素は、E. coli BL21(DE3)細胞において発現される(Rajagopalanら(1997))。この文献の著者は、E. coli def遺伝子を、PCRによって、この遺伝子の配列に基づく文献データに基づいて設計されたプライマーを使用して、単離した。精製された酵素は、大気中の酸素による触媒作用部

50

位 Fe^{2+} の迅速な酸化に起因して、不安定である。Rajagopalanら(1998)。不活化を回避するためのこの酵素の適切な取り扱いのための条件が、報告されている。Rajagopalanら(1997)。重要なことには、 Zn^{2+} および Ni^{2+} を含有するPDFは、安定であり、この酵素の触媒作用特性インビトロ評価を可能にする。PDFについての単純な連続比色定量アッセイが存在する。Weiら(1997)。この酵素は、N-ホルミルメチオニルロイシンp-ニトロアニリドを、基質として利用する。PDF反応に続く共役アミノペプチダーゼ反応は、p-ニトロアニリンを放出し、これは、405nmで分光光度的にモニタリングされ得る。

【0060】

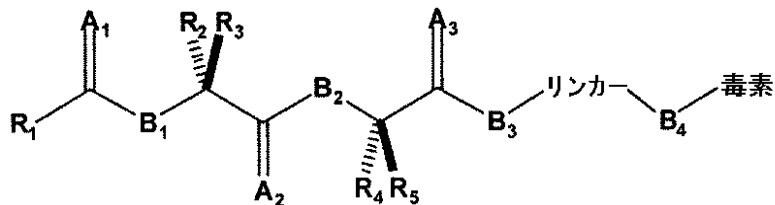
PDFは、完全なECTA標的酵素である。この酵素は、細菌中で活性であり、そしてヒト宿主において不活性である。この酵素は、広い基質特異性を有する。脱ホルミル化は、メチオニン(または基質の R_3 として許容される他のアミノ酸またはアミノ酸アナログ(例えば、ノルロイシン))の遊離アミノ基を放出し、これは、引き続き求核攻撃を起こし得る。合理的に設計されたジペプチドまたは基質の等価なペプチド模倣フラグメントを用いて、この遊離アミノ基は、基質の最適な位置のカルボニル基を攻撃し得、これによって、環状分子(例えば、ジケトピペラジン(DKP))を形成し、そして毒素を放出する。この基質は、環化を増強するように最適化され得る。ジペプチドに基づく基質を例示する、提唱される反応のスキームは、図1に与えられる。ここで、Xは、例えば、硫黄(メチオニン)または $-CH_2-$ (ノルロイシン)であり得る。 R_1 および R_2 は、公開されたPDFのSARデータに基づいて選択され得る脂肪族基である。Huら(1998)。

【0061】

従って、1つの局面において、本発明は、以下の構造：

【0062】

【化11】



を有するプロドラッグ化合物を提供し、

ここで、 R_1 、 R_2 、 R_4 および R_5 は、独立して、同じであるかまたは異なり、そして水素、置換または非置換の $C_5 \sim C_{14}$ アリール基、ヘテロアリール(例えば、フェニルメチレン、4-ヒドロキシプロピル、3-アミノプロピル、N-メチル-3-アミノエチル、2-メトキシメチルなど)、ならびに置換または非置換の、飽和または不飽和の $C_1 \sim C_6$ アルキル基(例えば、メチル、エチル、3-ヒドロキシプロピル、3-アミノプロピル、N-メチル-3-アミノエチル、2-メトキシメチルなど)からなる群より選択され；

ここで、 R_3 は、置換または非置換のアリール基(例えば、フェニルメチル、トリアゾールメチレン、チオフェンメチレンなど)、および置換または非置換の、飽和または不飽和の $C_1 \sim C_6$ アルキル基(例えば、エチル、プロピル、2-ヒドロキシエチルなど)、および $-CH_2-CH_2-X-CH_3$ からなる群より選択され、ここで、Xは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-NR_6-$ 、および $-CH_2-$ からなる群より選択され；ここで、 R_6 は、例えば、メチルまたはエチルのような低級アルキルであり；

ここで、 A_1 および A_3 は、独立して、同一かまたは異なり、そして $=O$ 、 $=S$ 、 $=NH$ 、 $=N-OH$ 、または $=N-R_7$ からなる群より選択され、ここで、 R_7 は、水素または $C_1 \sim C_6$ アルキル(例えば、メチル、エチル、またはメトキシメチル)であり；

ここで、 A_2 は、存在しないか、あるいは $=O$ 、 $=S$ 、 $=NH$ 、 $=N-OH$ 、 $=N-R_8$ 、または $-C(R_9)(R_{10})-$ からなる群より選択され、ここで、 R_8 、 R_9 およ

10

20

30

40

50

び R_{10} は、独立して、同一かまたは異なり、そして水素または $C_1 \sim C_6$ アルキル（例えば、メチル、エチル、またはメトキシメチル）からなる群より選択され；

ここで、 B_1 は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ または $-N(R_{11})-$ からなる群より選択され、ここで、 R_{11} は、水素および $C_1 \sim C_6$ アルキル（例えば、メチル、エチル、またはメトキシメチル）からなる群より選択され；

ここで、 B_2 は、存在しないか、あるいは $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R_{12})-$ 、または $-C(R_{13})(R_{14})-$ からなる群より選択され、ここで、 R_{12} 、 R_{13} および R_{14} は、独立して、同一かまたは異なり、そして水素、または置換もしくは非置換の、飽和もしくは不飽和のアルキル（例えば、メチル、エチル、またはメトキシメチル）からなる群より選択され；

ここで、フラグメント $-B_2-C(R_4)(R_5)-C(=A_3)-$ は、その全体が、20種の天然に存在するアミノ酸のうちの一つ（例えば、プロリン）、そのアナログ、誘導体またはペプチド模倣物であり；

ここで、フラグメント $-B_2-C(R_4)(R_5)-C(=A_3)-$ は、その全体が、プロリン、そのアナログ、誘導体またはペプチド模倣物であり；

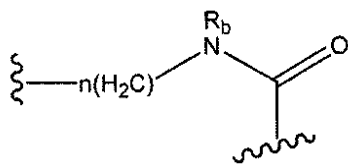
ここで、 B_3 は、存在しないか、あるいは $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、または $-N(R_{15})-$ からなる群より選択され、ここで、 R_{15} は、水素および $C_1 \sim C_6$ アルキル（例えば、メチル、エチル、またはメトキシメチル）からなる群より選択され；

ここで、 B_4 は、存在しないか、あるいは $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R_6)-$ 、または $-C(R_{16})(R_{17})-$ からなる群より選択され、ここで、 R_{16} および R_{17} は、独立して、同一かまたは異なり、そして水素、または置換もしくは非置換の、飽和もしくは不飽和のアルキル（例えば、メチル、エチル、またはメトキシメチル）からなる群より選択され；

ここで、リンカーは、存在しないか、または $-C_6H_4-CH_2-$ および $-C_6H_4-CH_2-X_1-C(=X_2)-$ 、および $-(CH_2)_n-NR_b-(C=O)-$ からなるがこれらに限定されない群より選択される、無痕跡リンカーであり、ここで、 X_1 および X_2 は、独立して、同一かまたは異なり、そして $-O-$ 、 $-S-$ 、および $-N(R_a)$ からなる群より選択され、ここで、 R_a は、水素または低級アルキルであり、そして $-(CH_2)_n-NR_b-(C=O)-$ は、以下の構造：

【0063】

【化12】



を有し、ここで、 n は、2または3であり、そして R_b は、水素または低級アルキルであり；

そしてここで、毒素は、細胞傷害性分子または抗生物質分子であり、これは、酵素による活性化の際に放出され、但し、この毒素は、5-F-dUr dではない。

【0064】

毒素の例としては、以下からなる群が挙げられるが、これらに限定されない：フルオロキノロン類、アミノグリコシド、マイトマイシン、CC-1065、ツカルマイシン (ducarmycin)、CBIアナログ、アントラサイクリン類、ピンカルカロイド類、マイトマイシン類、プレオマイシン類、ペニシリン類、セファロスポリン、オキサシリン、カルボペナム、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、マクロライド、シクロセリン、フルオロキノロン（シプロフロキサシンおよびノルフロキサシンが挙げられるが、これらに限定されない）、グリコペプチド、アミノグリコシド、ペプチド抗生物質、オキサゾリジノン、キノロン、スルホンアミド、細胞傷害性ヌクレオシド、プテリジンファミリー、ナイトロジェンマスタード、ポリハロゲン化ビアリアルエーテル、ジインエン類、

10

20

30

40

50

ポドフィロトキシン、タキソイド、ドキシソルピシン、カルミノマイシン、ダウノルピシン、アミノプテリン、メトトレキサート、メトプテリン、ジクロロメトトレキサート、マイトマイシンC、ポルフィロマイシン、6-メルカプトプリン、シトシンアラビノシド、ポドフィロトキシン、エトポシド、リン酸エトポシド、メルファラン、ピンデシン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ロイロシジン、リユーロシン (leurosine)、ビス-(2-クロロエチル)アミン、トリクロロカルバン、トリクロロカルバニリド、トリプロモサリチルアニリド、スルファメトキサゾール、クロラムフェニコール、シクロセリン、トリメトプリン、クロロヘキシジン、ヘキサクロロフェン、フェンチクロール、5-クロロ-2-(2,4-ジクロロフェノキシ)フェノール、4-クロロ-2-(2,4-ジクロロフェノキシ)フェノール、3-クロロ-2-(2,4-ジクロロフェノキシ)フェノール、6-クロロ-2-(2,4-ジクロロフェノキシ)フェノール、5-クロロ-2-(3,4-ジクロロフェノキシ)フェノール、5-クロロ-2-(2,5-ジクロロフェノキシ)フェノール、5-クロロ-2-(3,5-ジクロロフェノキシ)フェノール、2,2'-ジヒドロキシビフェニルエーテル、ハロゲン化2-ヒドロキシベンゾフェノン、2-メルカプトピリジン-N-オキシド、コンプレタスタチン、カンプトテシン、アポプトリデン、シスプラチン、エポチロン、ハリコンドリン、ヘミアステルリン、メチオプリム、タブシガルジン、クロロキン、4-ヒドロキシシクロホスファミド、エトポシド、コルヒチン、メルファラン、ケルセチン、ゲニステイン、エルブスタチン、N-(4-アミノブチル)-5-クロロ-2-ナフタレン-スルホンアミド、ピリジニルオキサゾール-2-オン、イソキノリルオキサゾロン-2-オン、ベラパミル、キニン、キニジン、およびクロロキン。

10

20

【0065】

さらなる局面において、この化合物は、上記の通りであるが、その毒素は、2-メルカプトピリジン-N-オキシド、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、およびナイトロジェンマスタード、ならびにそれらの誘導体およびアナログからなる群より選択される。

【0066】

1つの局面において、その化合物は、上記の通りであるが、 B_2 は-NHであり、 B_3 は-O-であり、 R_4 は2-メチルプロピルであり、そして R_5 は水素である。

【0067】

1つの局面において、フラグメント- B_2 -C(R_4)(R_5)-C(=A₃)-は、それ全体で、天然に存在するアミノ酸(例えば、プロリン)、その誘導体もしくはアナログ、またはそのペプチドミメティックである。

30

【0068】

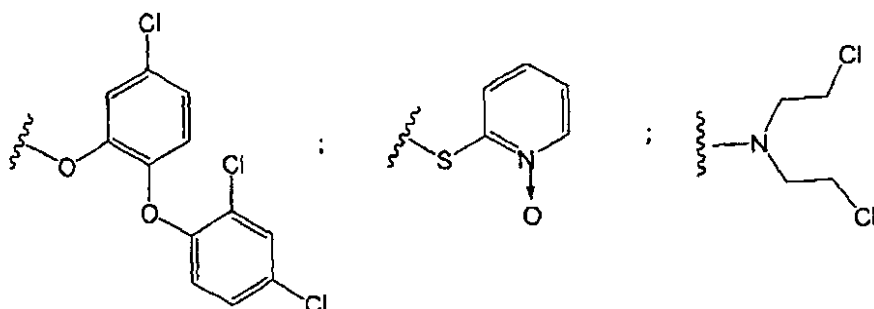
1つの局面において、フラグメント- B_2 -C(R_4)(R_5)-C(=A₃)-は、それ全体で、プロリン、その誘導体もしくはアナログ、またはそのペプチドミメティックである。

【0069】

1つの局面において、その化合物は、上記に示されるとおりの構造を有し、但し、その毒素は、以下からなる構造の群から選択される：

【0070】

【化13】

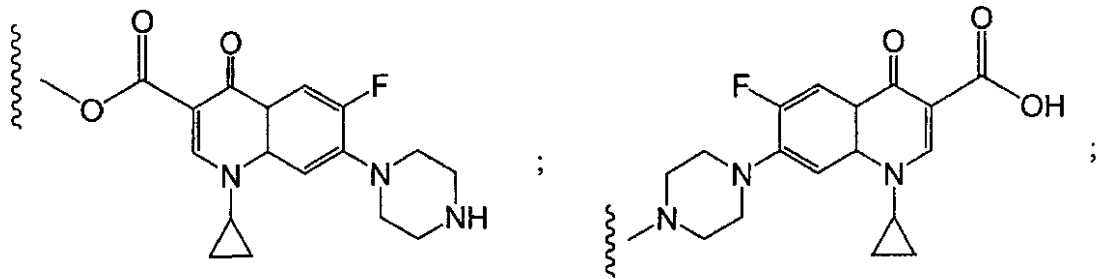


40

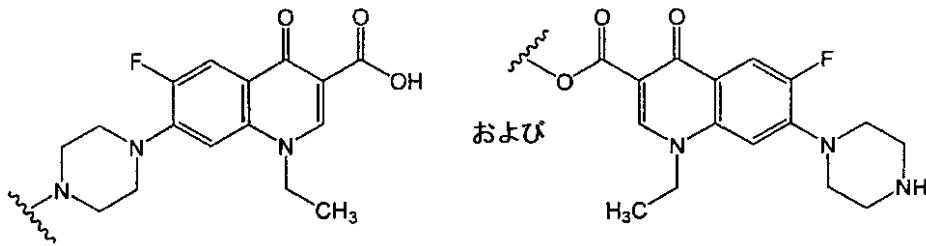
50

【0071】

【化14】



10



、ならびにそれらの誘導体、アナログ、および塩。上記の毒素に対する種々の改変が、感知可能な活性の喪失を伴うことなくなされ得ることが、理解される。

20

【0072】

1つの局面において、その化合物は、上記の通りであるが、 R_1 および R_2 が、両方とも水素である。

【0073】

さらなる局面において、その化合物は、上記の通りであるが、 R_3 が、 $-CH_2-CH_2-X-CH_3$ であり、ここで X が、酸素、硫黄またはメチルからなる群から選択される。さらなる局面において、 X が、硫黄である。

【0074】

さらなる局面において、その化合物は、上記の通りであるが、 A_1 および A_2 が、両方とも酸素である。

30

【0075】

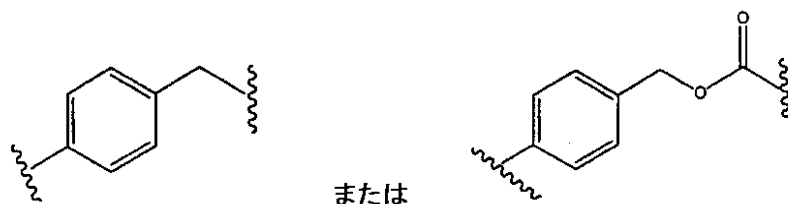
さらなる局面において、その化合物は、上記の通りであるが、 B_1 が、 $-NH-$ である。

【0076】

さらなる局面において、その化合物は、上記の通りであるが、そのリンカーが、以下の構造：

【0077】

【化15】



または

40

を有する。

【0078】

さらなる局面において、その化合物は、上記の通りであるが、 B_4 が存在しない。

【0079】

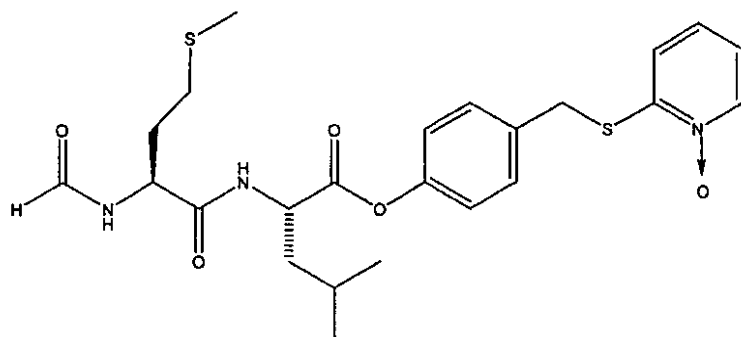
50

1つの局面において、その化合物は、2-(2-ホルミルアミノ-4-メチルスルファニル-ブチリルアミノ)-4-メチル-ペンタン酸4-(N-オキシド-ピリジン-2-イルスルファニルメチル)-フェニルエステル化合物であり、かつ以下の構造：

【0080】

【化16】

NB3024



10

を有する。

【0081】

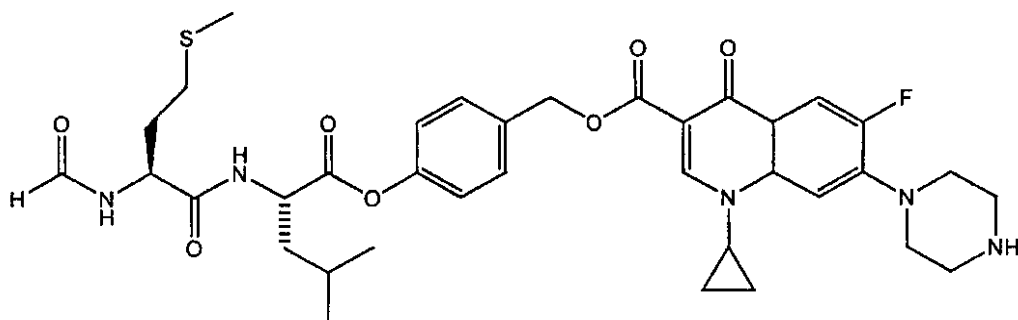
別の局面において、その化合物は、1-シクロプロピル-6-フルオロ-4-オキソ-7-ピペラジン-1-イル-1,4,4a,8a-テトラヒドロ-キノリン-3-カルボン酸4-[2-(2-ホルミルアミノ-4-メチルスルファニル-ブチリルアミノ)-4-メチル-ペンタノイルオキシ]-ベンジルエステルであり、かつ以下の構造：

20

【0082】

【化17】

NB3057



30

を有する。

【0083】

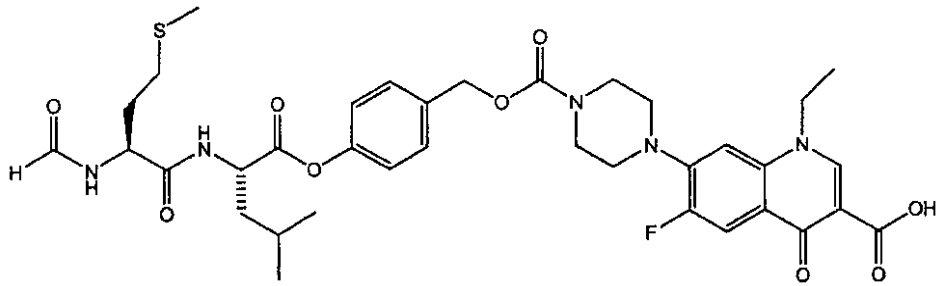
1つの局面において、その化合物は、1-エチル-6-フルオロ-7-(4-{4-[2-(2-ホルミルアミノ-4-メチルスルファニル-ブチリルアミノ)-4-メチル-ペンタノイルオキシ]-ベンジロキシカルボニル}-ピペラジン-1-イル)-4-オキソ-1,4-ジヒドロ-キノリン-3-カルボン酸であり、かつ以下の構造：

40

【0084】

【化18】

NB3068



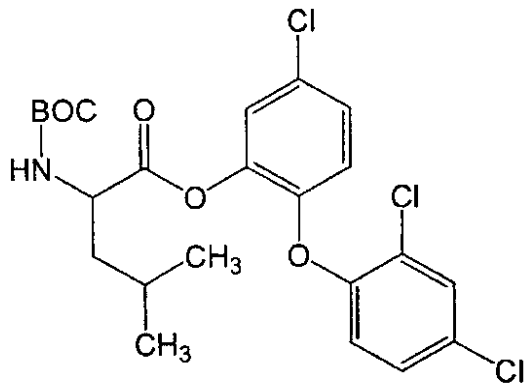
10

を有する。

さらなる局面において、その化合物は、tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-メチル-ペンタン酸5-クロロ-2-(2,4-ジクロロ-フェノキシ)-フェニルエステルであり、かつ以下の構造：

【0085】

【化19】



20

を有する。

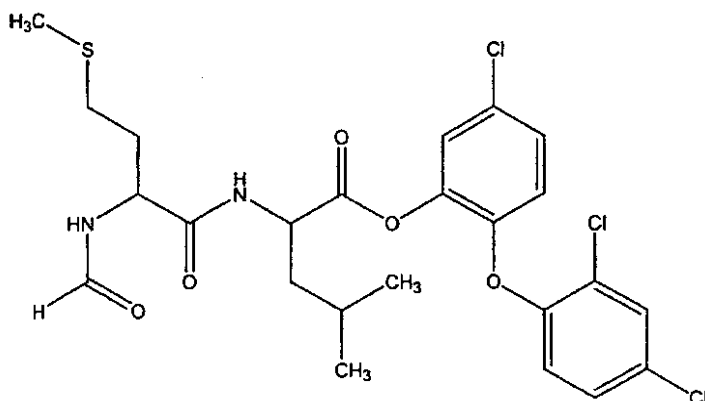
【0086】

別の局面において、その化合物は、2-(2-ホルミルアミノ-4-メチルスルファニル-ブチリルアミノ)-4-メチル-ペンタン酸5-クロロ-2-(2,4-ジクロロ-フェノキシ)-フェニルエステルであり、かつ以下の構造：

【0087】

【化20】

NB2046



40

50

を有する。

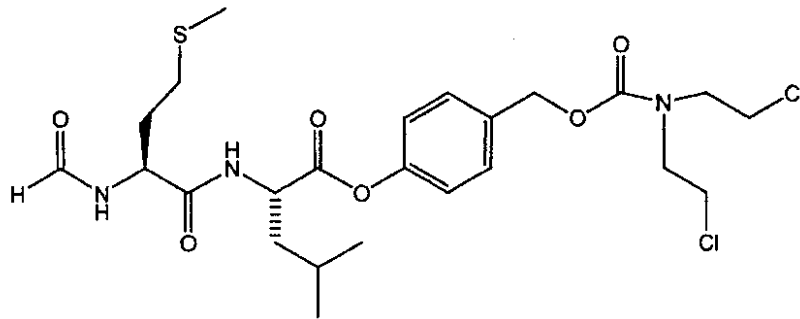
【0088】

1つの局面において、その化合物は、2-(2-ホルミルアミノ-4-メチルスルファニル-ブチリルアミノ)-4-メチル-ペンタン酸4-{[ビス-(2-クロロ-エチル)-カルバモイルオキシ]-メチル}-フェニルエステルであり、かつ以下の構造：

【0089】

【化21】

NB3103



10

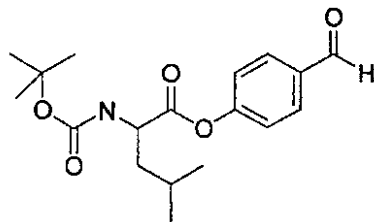
を有する。

【0090】

さらなる局面において、その化合物は、tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-メチル-ペンタン酸4-ホルミル-フェニルエステルであり、かつ以下の構造：

【0091】

【化22】



30

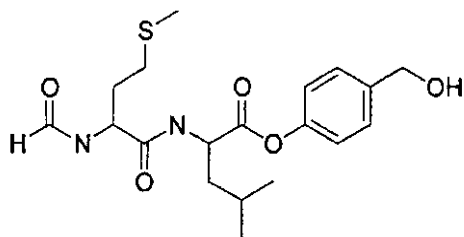
を有する。

【0092】

さらなる局面において、その化合物は、2-(2-ホルミルアミノ-4-メチルスルファニル-ブチリルアミノ)-4-メチル-ペンタン酸4-ヒドロキシメチル-フェニルエステルであり、かつ以下の構造：

【0093】

【化23】



40

を有する。

【0094】

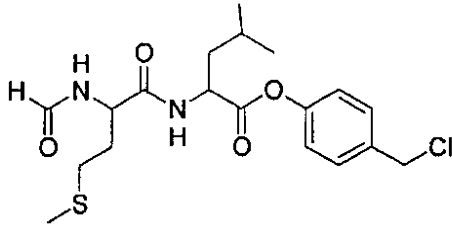
さらなる局面において、その化合物は、2-(2-ホルミルアミノ-4-メチルスルファニル-ブチリルアミノ)-4-メチル-ペンタン酸4-クロロメチル-フェニルエステ

50

ルであり、かつ以下の構造：

【0095】

【化24】



10

を有する。

【0096】

上記の化合物のいずれかは、キャリア（例えば、薬学的に受容可能なキャリア）またはさらなる有効な薬剤（例えば、抗生物質）と組合され得る。これらの化合物および組成物はまた、公知の治療剤および治療方法またはなお発見されるべき治療剤および治療方法と組み合わせて、その薬物の治療または効力を増強するために使用されるために有用である。

【0097】

また、本発明によって、PDF発現微生物の増殖を阻害するための方法が提供され、この方法は、その微生物を、有効量の上記のような化合物と接触させる工程による。PDF発現を検出するための方法は、当該分野で公知である。例えば、Weiら（1997）を参照のこと。この方法は、グラム陽性微生物およびグラム陰性微生物（例えば、*S. aureus*、*S. epidermidis*、*K. pneumoniae*、*E. aerogenes*、*E. cloacae*、*M. catarrhalis*、*E. coli*、*E. faecalis*、*H. influenzae*、および*P. aeruginosa*、ならびに下記表2において同定される微生物）の増殖を阻害する際に特に有用である。さらに、被験体における感染の症状を軽減するための方法が提供され、この方法において、その感染は、PDFを発現する微生物によって引き起こされ、この方法は、その被験体に、有効量の上記の化合物を投与または送達することによる。また、本発明によって、PDF発現微生物により引き起こされる感染を処置するための方法が提供され、この方法は、その被験体に、有効量の上記の化合物を投与または送達することによる。「被験体」とは、上記に規定されており、「被験体」とは、ヒト患者のような、哺乳動物を包含する。PDF発現微生物、ならびにこれらの微生物による感染により引き起こされる対応する疾患および症状の例が、下記の表2に提供される。

20

30

【0098】

【表 2 - 1】

Table 2

| PDF 発現微生物 | 感染により引き起こされる疾患または症状 |
|---|---|
| グラム陽性 | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 主要なヒト病原体、 菌血症、肺炎 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> および他の コアギユラーゼ陰性 <i>staphylococci</i> | 尿路感染、骨髄炎 菌血症 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 菌血症、リンパ組織炎 肺炎 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 肺炎、中耳炎、静脈洞炎 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 原発性菌血症、肺炎 心内膜炎、骨髄炎 |
| <i>Enterococcus species</i> | 尿路感染、菌血症、心内膜炎、 腹腔内感染および骨盤感染、 新生児敗血症 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 生殖器感染、肝周囲炎 |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> | 中耳炎、下気道感染、 肺炎、菌血症 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | 急性腸炎、急性大腸炎、 菌血症 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> を含む) | 腸感染、尿路感染、呼吸器感染 菌血症 |

10

20

【 0 0 9 9 】

【表 2 - 2】

| PDF発現微生物 | 感染により引き起こされる疾患 または症状 |
|-------------------------------|----------------------------|
| グラム陽性 | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 心内膜炎、呼吸器感染、菌血症、 中枢神経系感染 |
| <i>Acinetobacter species</i> | 気道感染、菌血症、 尿生殖器感染 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 髄膜炎、喉頭蓋炎、 肺炎、菌血症 |

30

本発明はまた、上記のようなプロドラッグ化合物（単独か、または公知もしくはなお発見されるべき、他の化合物もしくは他の薬剤と組み合わせて）と、キャリアとを含む組成物を提供する。1つの実施形態において、そのキャリアは、薬学的に受容可能なキャリアである。

40

【 0 1 0 0 】

そのプロドラッグの臨床的使用において、抗生物質は、十分に確立された指針におそらく従う。投薬量は、他のほとんどの抗生物質についてすでに使用されている投薬量とおそらく同様である。プロドラッグの用量は、100 μ g ~ 100 mg ~ 1 g の範囲であるか、または8時間毎に1回または1週間もしくは2週間の間1日1回であるか、または患者が感染性生物について陰性であると試験されるまで投与されると、推定される。

【 0 1 0 1 】

50

1つの局面において、本発明は、PDF発現微生物により引き起こされる感染から植物を処置または防御する方法を包含し、この方法は、有効量の基質プロドラッグを適用することによる。

【0102】

植物を処置するために使用される化合物の良好な分散および付着を達成するために、分散および不約を補助する成分とともに、その化合物を処方することが有利であり得る。適切な処方物は、当業者に公知である。

【0103】

本発明はまた、葉、根、または植物もしくは根の周辺の土壤に、有効量のこのプロドラッグ化合物を適用することによって、PDFを発現する微生物による感染から植物を処置または防御する方法を提供する。これらの単離された化合物は、公知の農薬または殺虫薬と組み合わせられ得る。

10

【0104】

本発明の化合物は、PDFを発現する微生物によって引き起こされる感染から植物を処置または防御するために使用される場合、水和剤、顆粒剤などとして処方され得るか、または適切な媒体などの中にマイクロカプセル化され得る。他の処方物の例としては、可溶性粉末、顆粒水和剤(wettable granule)、乾燥流動体(dry flowable)、水性流動体(aqueous flowable)、顆粒水和分散剤(wettable dispersible granule)、乳剤濃縮物、および水性懸濁物が挙げられるが、これらに限定されない。他の適切な処方物は、当業者に公知である。

20

【0105】

本発明はさらに、PDFを発現する微生物によって引き起こされる感染を予防するためかまたは処置するためのいずれかに有効な量で、魚類にこのプロドラッグ化合物を投与方法を提供する。この化合物は、魚類用の食餌中にこの化合物を取り込ませることによって投与され得る。あるいは、この化合物は、魚類が生存する水に添加され得るか、またはその水中に含まれる。最後に、この化合物は、適切な薬学的調製物として魚類に投与され得る。他の適切な処方物は、当業者に公知である。

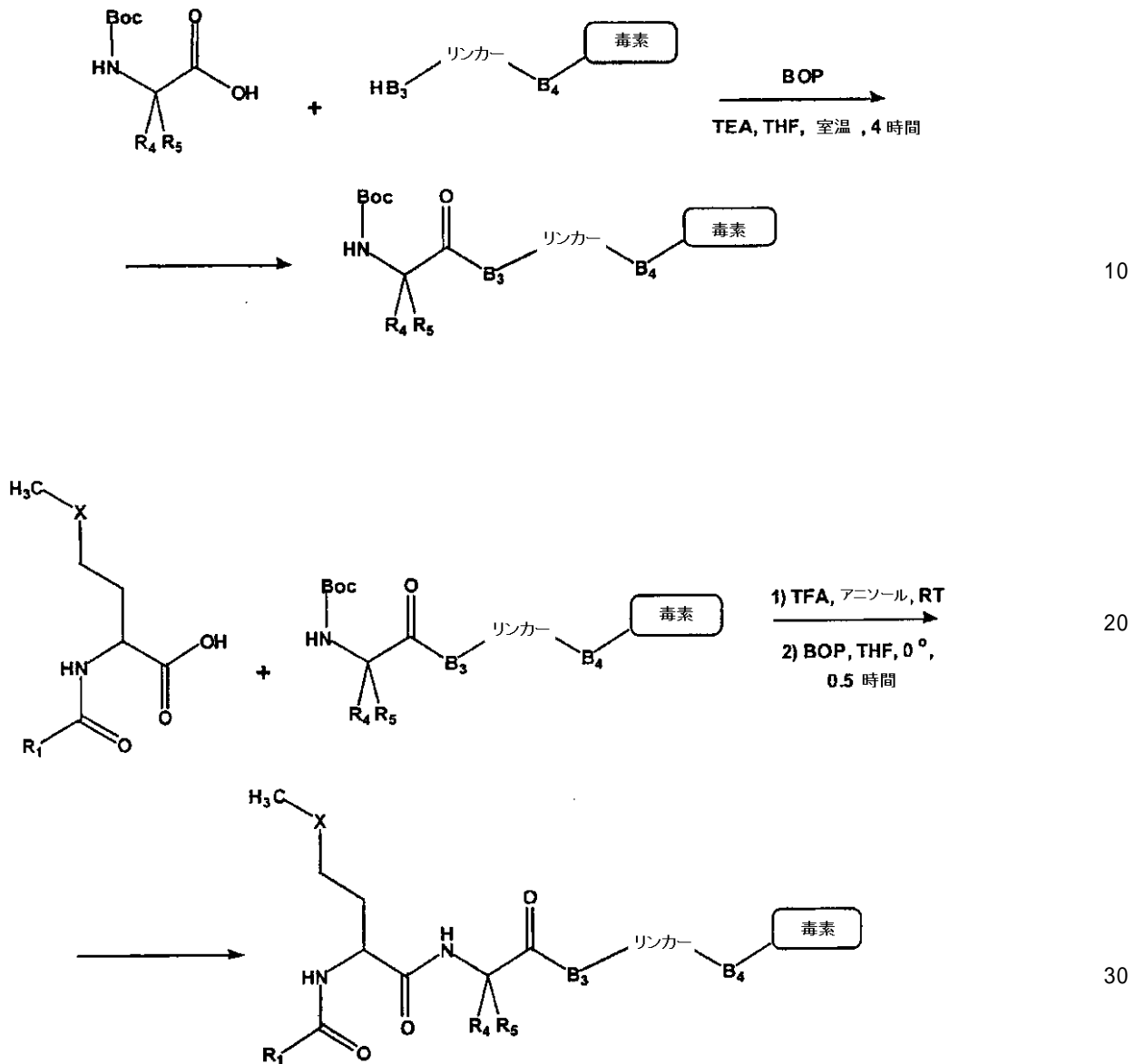
【0106】

さらに、本発明のプロドラッグを生成するプロセスが提供される。一般的に、このプロセスは、以下の工程を必要とする：

30

【0107】

【化25】



上記の図表に関して、Xは、硫黄（メチオニン）または $-CH_2-$ （ノルロイシン）であり得る。R₁～R₅およびB₁～B₃は、上記で規定された通りである。反応条件および省略形の正式名称は、下記の実験実施例において見出され得る。

【0108】

本発明は、PDFを発現する微生物を含むサンプルと、有効量の候補プロドラッグ化合物とを接触させることによって、PDFを発現する生物体の増殖を阻害する潜在的治療剤を同定する方法を提供する。別のサンプルにおいて、同じ微生物に、有効量の候補プロドラッグを接触させる。その薬剤が本明細書に記載されるプロドラッグと比較して同程度の抗増殖能を有する場合、その候補物は、PDFを発現する微生物の増殖を阻害するために有用であるか、またはPDFを発現する微生物を殺傷するために有用である。

40

【0109】

プロドラッグを、PDFによるプロドラッグの活性化に有利な条件下でサンプルと接触させ、次いで、そのサンプルの増殖阻害または微生物の死滅をアッセイする。あるいは、サンプルを、PDFの基質に対する反応の副生成物の存在について試験し得る。種々の量の基質を、PDFを発現する微生物と、PDFが細胞から毒素を放出させるために有効な量の時間にわたって接触させ、その細菌を溶解し、そして当該分野において周知の方法（例えば、高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」））を使用して分析物を分析し、反

50

応生成物を同定する。

【0110】

種々の濃度の潜在的薬剤をサンプルと接触させて、その薬剤の最適有効濃度を決定する。従って、1つの局面では、本発明は、PDFに対する選択的基質である薬剤の発見、およびその使用に関する。

【0111】

また、本明細書に記載されるプロドラッグと、スクリーニングを実施するために必要な指示書とを備えたキットが本発明により提供される。

【0112】

本発明の方法は、インビトロ、エキソビボまたはインビボで実施され得る。動物（例えば、ラットまたはマウス）において本発明をインビボで行うことにより、この治療剤またはプロドラッグの臨床試験前に使用され得る、好都合な動物モデル系が提供される。この系において、潜在的プロドラッグは、未処理の感染動物とそれぞれ比較して、微生物の負荷（load）が低減されるかまたは感染の症状が緩和される場合に、成功となる。感染されておらず、比較の基礎を与える別のネガティブコントロール群の細胞または動物を有することもまた有用であり得る。

10

【0113】

インビボで実施される場合、候補プロドラッグは、有効量で動物に投与または送達される。本明細書で使用される場合、インビボおよびエキソビボでの目的のための、用語「投与（する）」とは、微生物の負荷を低減させるために有効な候補プロドラッグの有効量を被験体に与えることを意味する。これらの場合において、薬剤またはプロドラッグは、薬学的に受容可能なキャリアと共に投与され得る。本発明の薬剤、プロドラッグおよび組成物は、医薬の製造において使用され得、そして、従来の手順に従って投与することによりヒトおよび他の動物を処置するために使用され得る（例えば、薬学的組成物における活性成分）。

20

【0114】

薬学的組成物を投与する方法は、当業者に周知であり、そしてこれには、マイクロインジェクション投与、静脈内投与または経口投与が挙げられるが、これらに限定されない。この組成物は、局所（topical）投与、経口投与または局部（local）投与、ならびに静脈内、皮下または筋内用に意図される。投与は、処置の経過全体を通して、連続的または断続的になされ得る。最も有効な投与手段および投与用量を決定する方法は、当業者に周知であり、そして治療に使用されるプロドラッグ、治療の目的、処置される微生物、感染の重篤度、および処置される被験体に応じて変動する。単回または複数回の投与が、処置する主治医によって選択された用量レベルおよびパターンで実施され得る。例えば、この組成物は、抗生物質耐性細菌による感染に既に罹患している被験体に投与され得る。この状況下では、組成物の有効な「治療量」を投与して、微生物の成長および増殖を持続的に妨げ、そして少なくとも部分的に停止させ、そして感染に関連する症状を改善する。

30

【0115】

しかし、このプロドラッグは、感染に対して過敏性であるかまたは感染を発症する危険性がある被験体または個体に投与され得る。これらの実施形態では、「予防的有効量」の組成物を投与して、感染前のレベルに近いレベルで、細胞の生存度および機能を維持させる。

40

【0116】

インビボでの投与は、処置の経過全体を通して、1回の投与でか、連続的にか、または断続的になされ得る。最も有効な投与手段および投与用量を決定する方法は、当業者に周知であり、そして治療に使用される組成物、治療の目的、処置される標的細胞、および処置される被験体に応じて変動する。単回または複数回の投与が、処置する主治医によって選択された用量レベルおよびパターンで実施され得る。適切な投薬処方物および薬剤を投与する方法は、下記に見出され得る。

50

【0117】

薬学的組成物は、経口投与、鼻腔内投与、非経口投与され得るか、または吸入治療によって投与され得、そして錠剤、トローチ剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、アンプル、坐剤またはエアロゾル形態の形態をとり得る。これらはまた、水性または非水性の希釈剤中における活性成分の懸濁液、溶液およびエマルジョンの形態、シロップ剤、顆粒剤、または散剤の形態をとり得る。本発明の薬剤に加えて、この薬学的組成物はまた、他の薬学的に活性な化合物または複数の本発明の化合物を含み得る。

【0118】

より詳細には、本明細書で活性成分としてもまた言及される本発明の薬剤は、任意の適切な経路（経口、直腸、鼻腔内、局所（経皮、エアロゾル、口腔内および舌下を含む）、
10 経膈、非経口（皮下、筋内、静脈内および皮内を含む）および肺を含む）によって、治療のために投与され得る。好ましい経路が、レシピエントの状態および年齢、ならびに処置される疾患に応じて変動することもまた理解される。

【0119】

理想的には、この薬剤は、疾患の部位で活性化合物のピーク濃度を達成するように投与されるべきである。これは、例えば、薬剤（必要に応じて、生理食塩水中にある）の静脈内注射によって達成され得るか、または、例えば、この活性成分を含む錠剤、カプセル剤、またはシロップ剤として経口投与され得る。薬剤の所望の血中濃度は、疾患組織内に治療量の活性成分を与えるための連続的注入によって維持され得る。有効な組み合わせの使用が、
20 各個々の治療的化合物または薬物を単独で用いる場合に必要とされ得る各成分剤のより低い総投薬量しか必要とせず、それにより副作用を減少させる治療的組み合わせを提供するために意図される。

【0120】

この薬剤が単独で投与されることは可能ではあるが、上記で規定されたような少なくとも1つの活性成分と共にそのための1つ以上の薬学的に受容可能なキャリアを含み、そして必要に応じて他の治療剤を含む、薬学的処方物として存在させることが好ましい。各キャリアは、処方物の他の成分と適合性であり、かつ患者に対して有害ではないという意味において「受容可能」でなければならない。

【0121】

処方物は、経口、直腸、鼻腔内、局所（経皮、口腔内および舌下を含む）、経膈、非経口（皮下、筋内、静脈内および皮内を含む）および肺での投与に適切なものを含む。処方物は、都合良くは、単位投薬形態として提示され得、そして薬学分野において周知の任意の方法により調製され得る。このような方法は、1つ以上の副成分を構成するキャリアと活性成分を結合させる工程を包含する。一般的には、この処方物は、液体キャリアもしくは微粉化固体キャリアまたはその両方と、活性成分を均一かつ緻密に結合させる工程、
30 次いで、必要に応じて、その生成物を成形する工程によって、調製される。

【0122】

経口投与に適切な本発明の処方物は、各々が予め決められた量の活性成分を含むカプセル剤、カシェ剤（c a c h e t）または錠剤のような個別の単位として；散剤または顆粒剤として；水性または非水性の液体中における溶液または懸濁液として；あるいは水中油の液体エマルジョンまたは油中水の液体エマルジョンとして、提示され得る。活性成分はまた、
40 ポーラス剤、舐剤またはペースト剤として提示され得る。

【0123】

錠剤は、必要に応じて1つ以上の副成分と共に、圧縮または成形されることによって作製され得る。圧縮錠剤は、必要に応じて結合剤（例えば、ポビドン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、滑沢剤、不活性希釈剤、防腐剤、錠剤分解物質（例えば、グリコール酸ナトリウムデンプン（s o d i u m s t a r c h g l y c o l a t e）、
50 架橋性ポビドン、架橋性カルボキシメチルセルロースナトリウム）、界面活性剤または分散剤と混合された、粉末または顆粒のような自由自在に流動可能な形態の活性成分を、適切な機械において圧縮することによって調製され得る。成形錠剤は、不活性な液体希

釈剤で湿らせた粉末化合物の混合物を、適切な機械において成形することによって作製され得る。錠剤は、必要に応じて、コーティングされ得るかまたは刻み目を入れられ得、そして、例えば、所望の放出プロフィールを与えるための種々の割合のヒドロキシプロピルメチルセルロースを使用して、その中で活性成分の緩やかな放出または制御された放出を与えるように処方され得る。錠剤は、必要に応じて、腸溶性コーティングを与えられて、胃ではなく腸の部分において放出を与え得る。

【0124】

口腔での局所投与のために適切な処方物としては、風味の付いた基剤（通常は、スクロース、およびアカシアまたはトラガカント）中に活性成分を含むトローチ剤（*lozenge*）；不活性な基剤（例えば、ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシア）中に活性成分を含むトローチ剤（*pastille*）；および適切な液体キャリア中に活性成分を含むうがい薬が挙げられる。

10

【0125】

本発明に従う局所投与のための薬学的組成物は、軟膏、クリーム、懸濁剤、ローション、粉末、溶液、ペースト（*paste*）、ジェル（*gel*）、スプレー、エアロゾルまたは油として処方され得る。あるいは、処方物は、活性成分と、必要に応じて1つ以上の賦形剤または希釈剤とをしみ込ませた包帯（*bandage*）または絆創膏のような、パッチまたは包帯（*dressings*）を含み得る。

【0126】

所望される場合には、クリーム基剤の水相は、例えば、少なくとも約30%（w/w）の多価アルコール（すなわち、2つ以上のヒドロキシル基を有するアルコール（例えば、プロピレングリコール、ブタン-1,3-ジオール、マンニトール、ソルビトール、グリセロールおよびポリエチレングリコール、ならびにそれらの混合物））を含み得る。局所処方物は、望ましくは、皮膚または他の罹患した領域を通じた薬剤の吸収または浸透を増強する化合物を含み得る。このような皮膚浸透増強剤の例としては、ジメチルスルホキシドおよび関連のアナログが挙げられる。

20

【0127】

本発明のエマルジョンの油相は、公知の様式で公知の成分から構成され得る。この相は、乳化剤（*emulsifier*）（他に、乳化剤（*emulgent*）としても公知）のみを含み得るが、好ましくは、脂質もしくは油との、または脂質および油の両方との、少なくとも1つの乳化剤の混合物を含む。好ましくは、親水性乳化剤は、安定化剤として作用する親油性乳化剤と共に含まれる。油および脂質の両方を含ませることもまた好ましい。まとめると、安定化剤を有するかまたは有さない乳化剤が、いわゆる乳化蠟を作り出し、そして油および/または脂質を共に有するこの蠟が、いわゆる乳化軟膏基剤を作り出し、この基剤がクリーム処方物の油性分散相を形成する。

30

【0128】

本発明の処方物において使用するために適切な乳化剤（*emulgent*）および乳化安定剤としては、*Tween 60*、*Span 80*、セトステアリルアルコール、ミリスチルアルコール、グリセリルモノステアレート、およびラウリル硫酸ナトリウムが挙げられ

40

【0129】

処方物のために適切な油または脂質の選択は、所望される美容特性の達成に基づく。なぜなら、薬学的エマルジョン処方物において使用される可能性が高い大半の油におけるこの活性化合物の可溶性は、非常に低いからである。従って、クリームは、好ましくは、チューブまたは他の容器からの漏出を回避するために適切な粘度を有する、脂っこくない非染色性の洗浄可能な生成物であるべきである。直鎖状または分枝鎖状の一塩基性または二塩基性のアルキルエステル（例えば、ジ-イソアジペート、イソセチルステアレート、ココナッツ脂肪酸のプロピレングリコールジエステル、イソプロピルミリステート、デシルオレエート、イソプロピルパルミテート、ブチルステアレート、2-エチルヘキシルパルミテート、または *Crodamol CAP* として公知の分枝鎖エステルの混合物；この

50

最後の3つが、好ましいエステルである)が使用され得る。これらは、必要とされる特性に依存して、単独または組み合わせて使用され得る。あるいは、白色軟パラフィンおよび/または液体パラフィンあるいは他の鉱油のような、高融点脂質が使用され得る。

【0130】

眼への局所投与のために適切な処方物はまた点眼薬を含み、ここで活性成分は、適切なキャリア(特に、薬剤についての水性溶媒)中に溶解または懸濁される。

【0131】

直腸投与のための処方物は、適切なベース(例えば、ココアバターまたはサリチラートを含む)を含む坐薬として提供され得る。

【0132】

膣投与のための適切な処方物は、薬剤に加えて、当該分野で適切であることが公知であるようなキャリアを含む、ベッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォームまたはスプレー処方物として提供され得る。

【0133】

経鼻投与のための適切な処方物(ここで、キャリアは固体である)は、例えば、約20ミクロン~約500ミクロンの範囲の粒径を有する粗砕粉末を含み、これは、乾燥粉末として投与されるか、または吸入デバイスによる迅速な吸入によって、密閉されたままの粉末の容器から鼻孔を通して鼻に投与される。適切な処方物(ここで、キャリアは、例えば、鼻噴霧、点鼻薬としての投与のための液体、または噴霧器によるエアロゾル投与のための液体である)としては、薬剤の水性溶液または油性溶液が挙げられる。

【0134】

非経口投与のために適切な処方物としては、水性等張性滅菌注射液および非水性等張性滅菌注射液が挙げられ、これらの注射液は、抗酸化剤、緩衝液、静菌薬、および処方物を意図されるレシピエントの血液と等張性にする溶質;ならびに水性滅菌懸濁液および非水性滅菌懸濁液を含み得、これらの懸濁液は、懸濁剤および濃厚剤、ならびに血液成分または1種以上の器官に対して化合物を標的するように設計される、リボソームまたは他の微小粒子系を含み得る。この処方物は、単回用量または多回用量でシールされた容器(例えば、アンプルおよびバイアル)中にて提供され得、そして例えば、使用の直前に滅菌液体キャリア(注射用水)の添加のみを必要とする凍結乾燥状態で保存され得る。即時注射液および即時注射懸濁液は、上記の種類滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製され得る。

【0135】

好ましい単位投薬処方物は、本明細書中で上記で引用されている、薬剤の1日の用量、または単位用量(1日の準用量(subdose))、あるいはその適切なフラクションを含む処方物である。

【0136】

特に上述の成分に加えて、本発明の処方物が、当該処方物の型に関する分野において通常の他の薬剤(例えば、甘味剤、濃厚剤および香味剤のようなさらなる薬剤を含み得る、経口投与のために適切な薬剤)を含み得ることを理解すべきである。本発明の薬剤、組成物および方法が、他の適切な組成物および治療と組み合わせられることがまた意図される。

【0137】

本発明のこれらの薬剤ならびに上記の化合物およびそれらの誘導体は、本明細書中に記載される方法における使用のための医薬の調製のために使用され得る。

【0138】

プロドラックの臨床的使用において、抗生物質が同様に十分に確立されたガイドラインに従う。投薬量も同様に、他のほとんどの抗生物質のために既に使用された投薬量に類似する。プロドラックの用量は、8時間おきに1回、または1日に1回、1週もしくは2週にわたって、または患者の感染生物に対する試験の結果がネガティブを示すまで、100mg~1gmの範囲であることが推定されている。

【0139】

以下の実施例は、本発明を例示するものであり、限定するものでないことを意図する。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0140】

(実施例1 - 合成スキーム)

特許請求される化合物の合成の以下の実施例は、本発明の合成の例示であり、本発明の合成を限定するものでないことを意味する。この化合物を合成するために使用される、例えば以下に示されるような合成方法は、有機化学および医療化学の当業者に周知である。有機化学および医療化学の当業者に周知である、本発明の化合物の合成において使用される、置換工程、改変工程、または付加工程は、予想される。例えば、J. March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY: REACTIONS, MECHANISMS AND STRUCTURE, 第4版 (John Wiley & Sons, NY (1992)) を参照のこと。

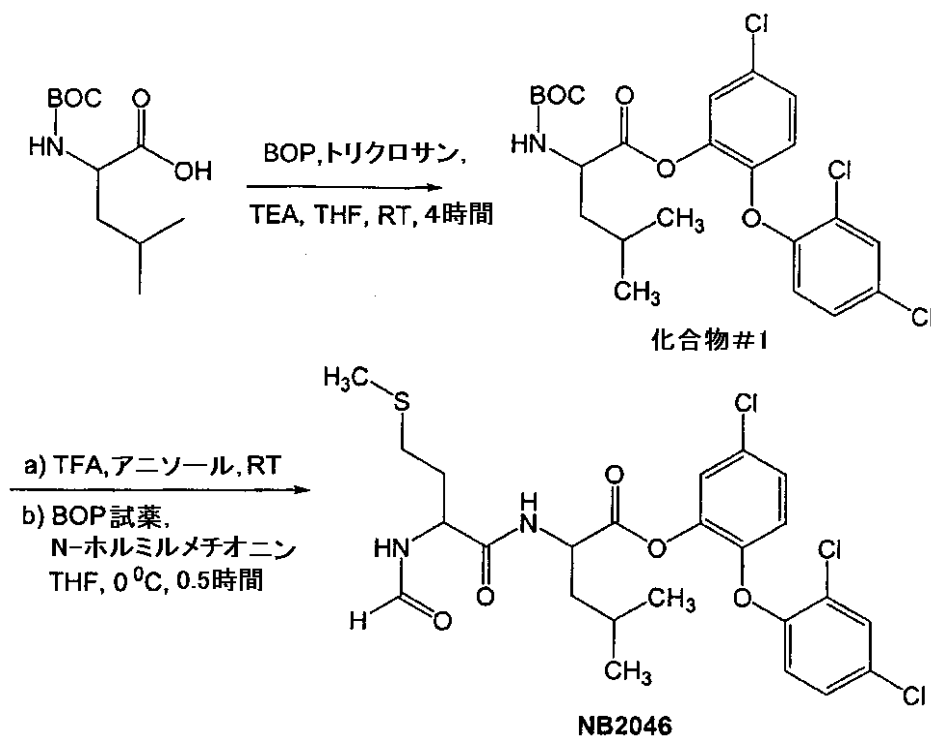
10

【0141】

(化合物#1およびNB2046の合成)

【0142】

【化26】



20

30

上記の合成スキームおよび以下の実施例において、以下の略語および定義が適用される：
 N-tert-ブトキシカルボニル (BOC)；ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (BOP)；-トリエチルアミン (TEA)；テトラヒドロフラン (THF)；室温 (RT)；トリフルオロ酢酸 (TFA)；水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4)；五塩化リン (PCl_5)；ジメチルホルムアミド (DMF)；N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセタミド (MSTFA)；ジイソプロピルエチルアミン (DIEA)；および1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデク-7-エン (DBU)。

40

【0143】

(化合物1の合成 - 化合物NB2046のための中間体)

BOCロイシン (1.0 g, 4.32 mmol)、トリクロサン (trichlorosan) (1.25 g, 4.32 mmol)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (1.91 g, 4.32 mmol)、およびトリエチルアミン (1.33 g, 12.9 mmol)の無水THF溶液 (25 ml)を、0、アルゴン雰囲気下で4時間攪拌した。水 (20 ml)を添加し、そし

50

て反応混合物を酢酸エチル (2 × 30 ml) を用いて抽出した。合わせた有機層を水、ブラインで洗浄し、そして Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒のエバポレーション、および溶出液として 2% 酢酸エチル (ヘキサン中) を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いた精製により、化合物 1 (1.66 g、75%) を無色のガム状物として得た。

【0144】

【化27】

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): 0.91 (d, 2H, J = Hz), 1.43 (s, 9H), 1.51-1.60 (m, 2H), 1.69-1.73 (m, 1H), 4.43-4.48 (m, 1H), 4.83 (d, 1H, J = Hz), 6.80 (d, 1H, J = Hz), 6.86 (d, 1H, J = Hz), 7.14-7.26 (m, 2H), 7.26 (s, 1H), 7.43 (d, 1H, J = Hz).

10

(化合物 NB2046 の合成)

化合物 - 1 (0.25 g、0.5 mmol) の無水アニソール溶液 (0.055 g、0.5 mmol) を、0 まで冷却し、そして TFA (0.56 g、5.0 mmol) を、15 分かけてゆっくり添加した。氷浴から取り出し、そしてさらに 3 時間攪拌し続けた。次いで、全ての揮発物を、減圧下で除去してガム状物を得た。無水 THF を添加し、そしてアルゴン雰囲気下で 0 まで冷却した。ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (0.25 g、0.57 mmol)、N - ホルミルメチオニン (0.1 g、0.57 mmol)、およびトリエチルアミン (0.21 g、2.1 mmol) を添加した。薄層クロマトグラフィーは、0 で 0.5 時間後に反応が完了したことを示した。この反応物を水、ブラインで洗浄し、そして Na_2SO_4 で乾燥した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーでの精製により、NB2046 を無色の濃厚なガム状物として得た。

20

【0145】

【化28】

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): 0.88 (d, 3H, J = Hz), 0.91 (d, J = Hz), 1.50 - 1.56 (m, 1H), 1.60 - 1.71 (m, 2H), 1.95-2.02 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.50 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 4.65-4.70 (m, 1H), 4.74 (q, 1H, J = Hz), 6.48 (d, 1H), 6.78-6.85 (m, 2H), 7.15-7.25 (m, 3H), 7.44 (s, 1H), 8.17 (s, 1H).

30

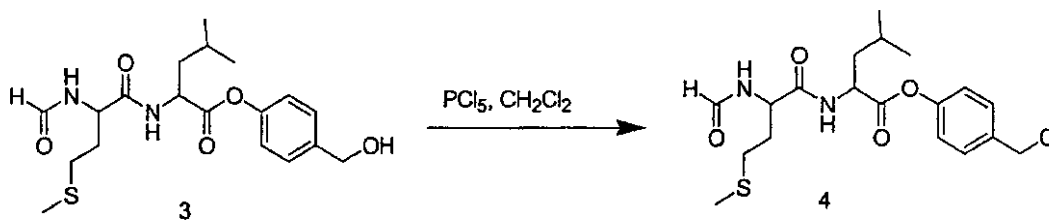
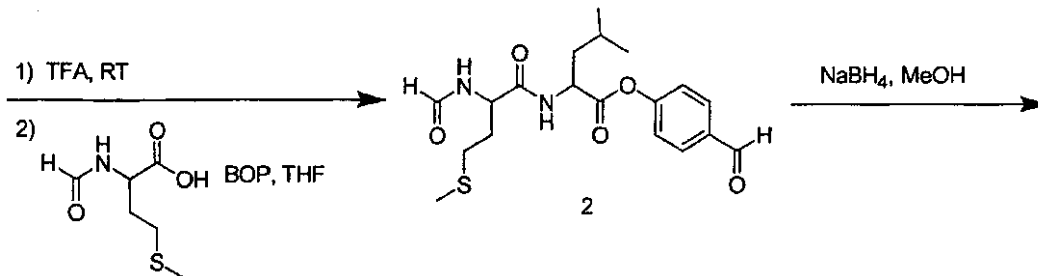
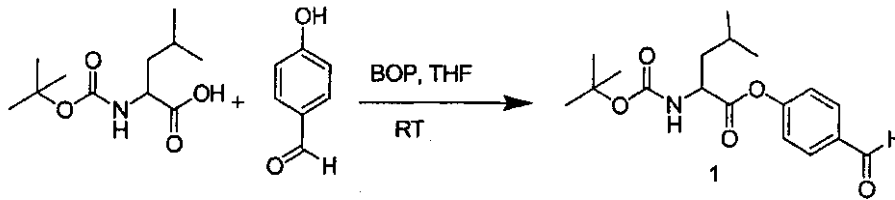
(化合物 NB3024、NB3057、NB3068 および NB3103 のための中間体 (化合物 3 および 4) の一般的な合成スキーム)

特許請求される化合物の合成の以下の実施例は、本発明の合成の例示であり、本発明の合成を限定するものでないことを意味する。この化合物を合成するために使用される、例えば以下に示されるような合成方法は、有機化学および医療化学の当業者に周知である。有機化学および医療化学の当業者に周知である、本発明の化合物の合成において使用される、置換工程、改変工程、または付加工程は、予想される。例えば、J. March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY: REACTIONS, MECHANISMS AND STRUCTURE, 第4版 (John Wiley & Sons, NY (1992)) を参照のこと。

40

【0146】

【化29】

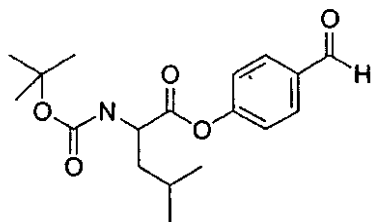


(中間体の合成スキームの詳細な説明)

(2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-4-メチル-ペンタン酸4-ホルミルフェニルエステル(化合物1)の合成)

【0147】

【化30】



BOP (13.0 mmol) を、N-tert-ブチルオキシカルボニル-L-ロイシン (10.9 mmol) および 4-ヒドロキシベンズアルデヒド (13.0 mmol) の乾燥 DMF 溶液 (12 mL) に添加し、そして溶解するまで攪拌した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (43.0 mmol) および 4-ジメチルアミノピリジン (1 mmol) を、攪拌しながら添加した。生じる溶液を、2.5 時間攪拌した。反応混合物を、ジクロロメタン (100 mL) で覆い、そして水、飽和重炭酸ナトリウム溶液、および飽和ブラインで洗浄した。このジクロロメタンを、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、そして減圧下で濃縮した。生じた赤色の油状物を、溶出液としてジクロロメタンを用いる、シリカゲルのカラムクロマトグラフィーによって精製した。

【0148】

10

20

30

40

【化31】

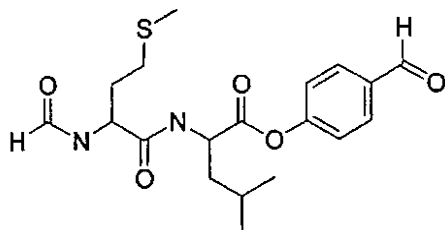
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): 1.01-1.02 (m, 6H), 1.46 (s, 9H), 1.64–1.68 (m, 1H), 1.76-1.83 (m, 2H), 4.52-4.54 (m, 1H), 4.92-4.94 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.28-7.29 (d, 2H, $J = 8.48$ Hz), 7.91-7.93 (d, 2H, $J = 8.48$ Hz), 9.99 (s, 1H).

(2-(2-ホルミルアミノ-4-メチルスルファニル-ブチリルアミノ)-4-メチル-ペンタン酸4-ホルミル-フェニルエステル(化合物2)の合成)

【0149】

【化32】

10



化合物1(10 mmol)のTFA溶液(100 mmol)を、不活性雰囲気下、RTで1時間攪拌した。次いで、揮発物の全てを減圧下で除去し、そして残渣をTHF(10 mL)中に溶解した。攪拌しながら、N-ホルミル-L-メチオニン(10 mmol)、BOP(13.0 mmol)を添加し、続いてN,N-ジイソプロピルエチルアミン(30.0 mmol)および4-ジメチルアミノピリジン(1 mmol)を添加した。反応の完了後、THFを減圧下で除去し、そしてジクロロメタン(25 mL)を添加した。この反応混合物を、水、飽和重炭酸ナトリウム水溶液、および飽和ブラインで洗浄した。ジクロロメタンを、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、そして減圧下で濃縮した。生じた濃厚な(think)ガム状物を、溶出液として0~5%のメタノール(ジクロロメタン中)を用いる、シリカゲルのカラムクロマトグラフィーによって精製した。

20

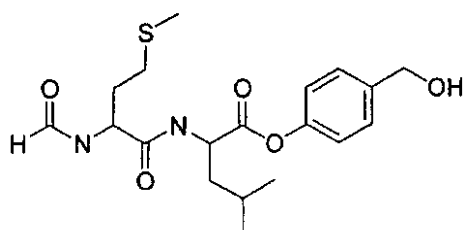
【0150】

(2-(2-ホルミルアミノ-4-メチルスルファニル-ブチリルアミノ)-4-メチル-ペンタン酸4-ヒドロキシメチル-フェニルエステル(化合物3)の合成)

30

【0151】

【化33】



40

上記の化合物を合成するために、化合物2(1.0 mmol)のメタノール溶液(10 mL)を、0℃まで冷却し、そして NaBH_4 (0.25 mmol)のメタノール溶液をゆっくりと添加した。5分後、0.1 NのHClを添加し、揮発物を減圧下で除去した。生じた混合物を、水と酢酸エチル(10 mL)との間に分配した。分離した酢酸エチル層を、ブラインで洗浄し、そして Na_2SO_4 で乾燥した。揮発物の除去により、化合物3を定量収率で淡黄色のガム状物として得た。

【0152】

【化34】

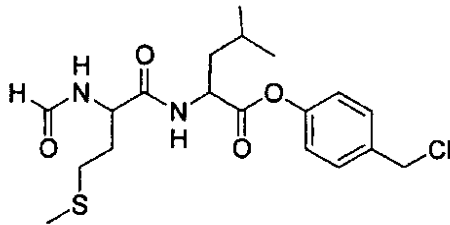
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) 0.99-1.03 (m, 6H), 1.71 – 1.87 (m, 3H), 2.02-2.15 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.53-2.66 (m, 2H), 4.68 (s, 2H), 4.76-4.79 (m, 2H), 6.46-6.47 (m, 1H), 6.70-6.74 (m, 1H), 7.06-7.08 (m, 2H), 7.36-7.39 (m, 2H), 8.19 (s, 1H).

(2 - (2 - ホルミルアミノ - 4 - メチルスルファニル - ブチリルアミノ) - 4 - メチル - ペンタン酸 4 - クロロメチル - フェニルエステル (化合物4) の合成)

【0153】

【化35】

10



化合物3 (0.2 g, 0.55 mmol) の無水ジクロロメタン溶液を氷浴中で冷却し、そして PCl_5 (0.11 g, 0.55 mmol) をアルゴン雰囲気下で添加した。反応の完了後、水性 NaHCO_3 を添加し、そして10分間攪拌した。有機層を分離し、水、ブラインで洗浄し、そして乾燥 (Na_2SO_4) した。揮発物をエバポレートすることによって、表題化合物を得、この表題化合物を、さらに精製することなく、次の反応のために使用した。

20

【0154】

【化36】

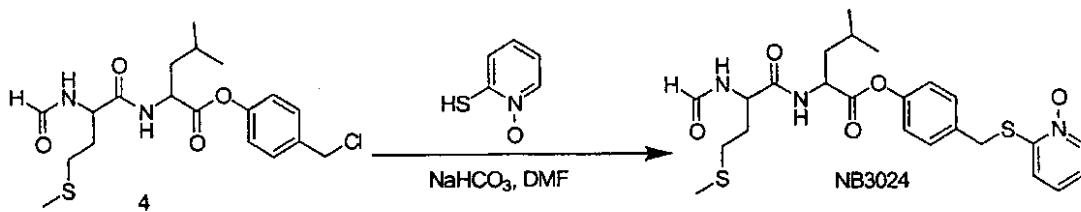
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): 1.00-1.03 (m, 6H), 1.72 – 1.86 (m, 3H), 2.02-2.15 (m, 2H), 2.1 (s, 3H), 2.53-2.66 (m, 2H), 4.57 (s, 2H), 4.75-4.81 (m, 2H), 6.46-6.47 (m, 1H), 6.73-6.77 (m, 1H), 7.07-7.10 (m, 2H), 7.38-7.41 (m, 2H), 8.20 (s, 1H).

30

(化合物NB3024の合成の合成スキーム)

【0155】

【化37】



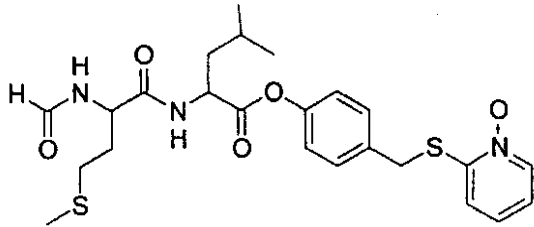
40

(化合物NB3024の合成の詳細な説明)

(2 - (2 - ホルミルアミノ - 4 - メチルスルファニル - ブチリルアミノ) - 4 - メチル - ペンタン酸 4 - (1 - ヒドロキシ - 1, 2 - ジヒドロ - ピリジン - 2 - イルスルファニルメチル) - フェニルエステル (NB3024))

【0156】

【化38】



化合物4 (1.0 mmol) の無水DMF溶液 (2 mL) に、重炭酸ナトリウム (2.5 mmol) およびピリチオン (pyrithione) (1.0 mmol) を添加し、
 10
 そして不活性雰囲気下で1時間攪拌した。次いで、反応混合物を濾過し、そしてDMFを減圧下で除去した。ショートシリカゲルカラムに通過させ、この粗生成物を精製した。

【0157】

【化39】

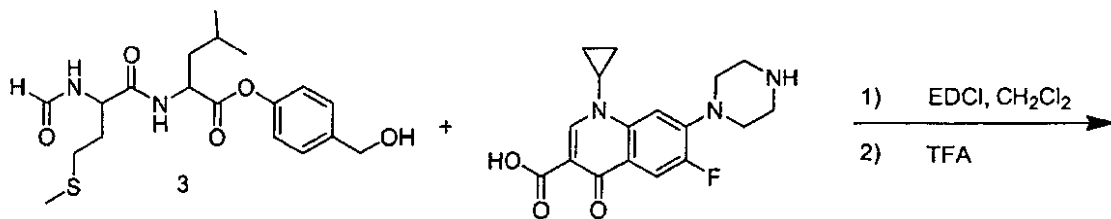
¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 0.98-1.02 (m, 6H), 1.71 - 1.84 (m, 3H), 2.02-2.21 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.60-2.66 (m, 2H), 4.15 (s, 2H), 4.75-4.78 (m, 2H), 6.48-6.50 (m, 1H), 6.70-6.74 (m, 1H), 7.06-7.08 (m, 3H), 7.12 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 7.21-7.24 (m, 1H) 7.36-7.39 (m, 2H), 8.19 (s, 1H), 8.26 (d, 1H, J = 6.36 Hz).

20

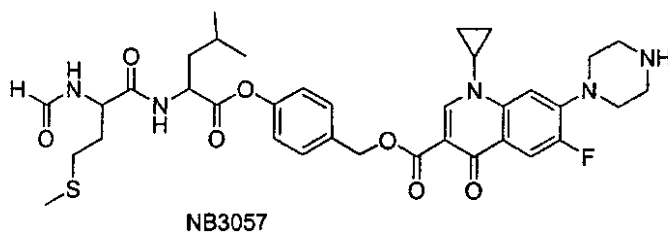
(化合物NB3057の合成の合成スキーム)

【0158】

【化40】



30



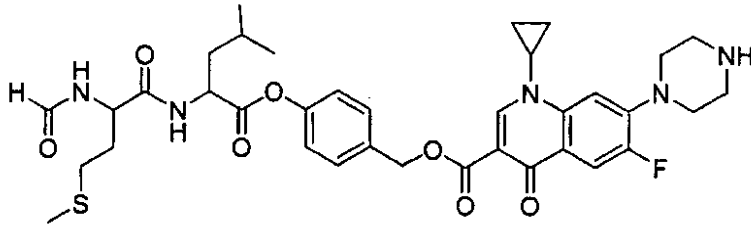
(化合物NB3057の合成の詳細な説明)

(1-シクロプロピル-6-フルオロ-4-オキソ-7-ピペラジン-1-イル-1,4-ジヒドロ-キノリン-3-カルボン酸 4-[2-(2-ホルミルアミノ-4-メチルスルファニル-ブチルアミノ)-4-メチル-ペンタノイルオキシ]-ベンジルエステル)

【0159】

40

【化41】



化合物3 (1.0 mmol) およびBOC-シプロフロキサシン (1.0 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (10 mL) に、EDCI (2.0 mmol) を添加した。RTで48時間後に、この粗生成物をシリカゲルカラムに充填し、そしてこの生成物を5%メタノール (ジクロロメタン中) を用いて溶出した。

【0160】

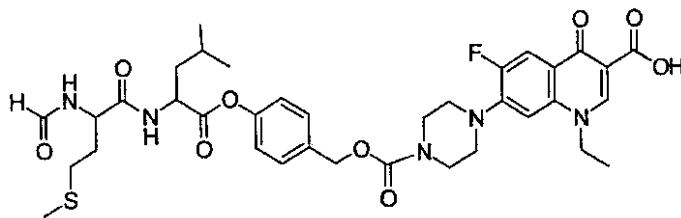
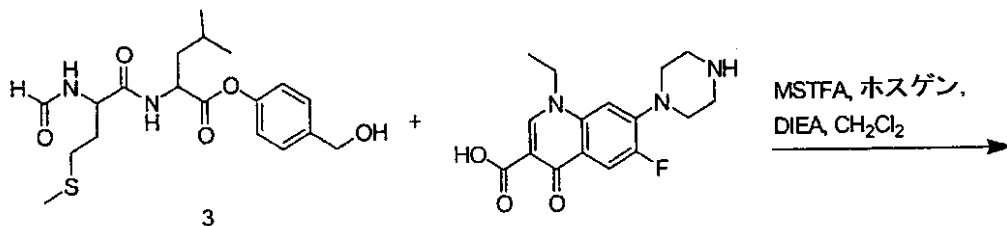
【化42】

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6), 500 MHz): 0.89-0.91 (m, 3H), 0.94-0.96 (m, 3H), 1.10-1.12 (m, 2H), 1.25-1.26 (m, 2H), 1.70-1.75 (m, 4H), 2.02-2.15 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 3.44 (brs, 4H), 3.78 (brs, 4H), 3.42-3.44 (m, 1H), 4.50-4.55 (m, 2H), 5.27 (s, 2H), 7.08-7.10 (m, 2H), 7.47-7.49 (m, 1H), 7.53-7.55 (m, 1H), 7.85 (d, 1H, $J=12\text{ Hz}$), 8.02 (s, 1H), 8.35 (t, 1H, $J=12.64\text{ Hz}$), 8.50 (s, 1H), 8.62-8.68 (m, 1H), 8.79 (s, 2H).

(化合物NB3068の合成の合成スキーム)

【0161】

【化43】



NB3068

(NB3068の合成の詳細な説明)

(1-エチル-6-フルオロ-7-(4-{4-[2-(2-ホルミルアミノ-4-メチルスルファニル-ブチルアミノ)-4-メチル-ペンタノイルオキシ]-ベンジルオキシカルボニル}-ピペラジン-1-イル)-4-オキソ-1,4-ジヒドロ-キノリン-3-カルボン酸 (NB3068))

【0162】

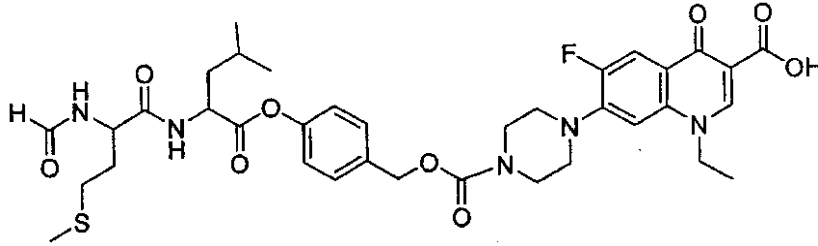
10

20

30

40

【化44】



無水ジクロロメタン (2 mL) 中のノルフロキサシン (84 mg、0.26 mmol) の混合物に MSTFA (100 mg、0.5 mmol) を添加し、そして室温で30分間攪拌した。その間、化合物3 (140 mg、0.35 mmol) および DIEA (70 mg、0.4 mmol) の溶液を別のフラスコに取り、そしてホスゲン (40 mg、0.4 mmol) を0 で加えた。次いで、この溶液に、ノルフロキサシンの溶液を添加し、そして室温で1時間攪拌した。反応混合物を0.1N HClで洗浄し、そしてNa₂SO₄で乾燥した。揮発性物質を除去し、そしてエーテル (5 mL) を加えた。次いで、沈殿した生成物を濾過した。

【0163】

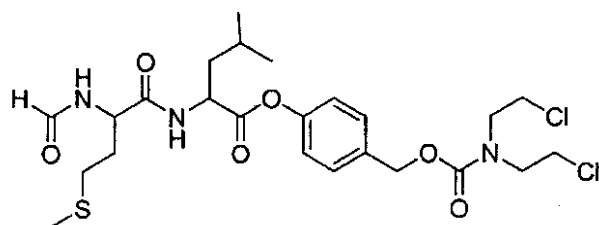
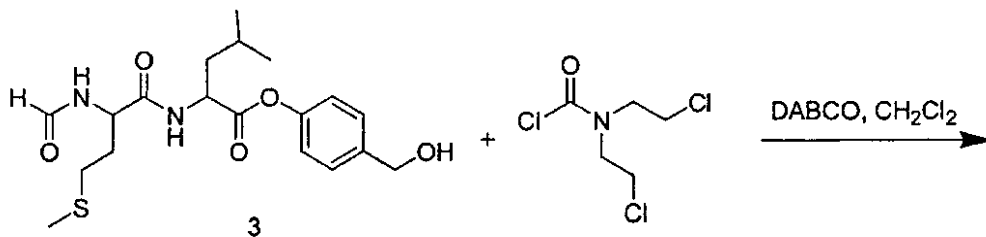
【化45】

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 0.99-1.03 (m, 6H), 1.55 (m, 3H), 1.71-1.87 (m, 3H), 2.02-2.15 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.53-2.66 (m, 2H), 3.27 (brs, 4H), 3.78 (brs, 4H), 4.30 (q, 2H, J = 7.19, 14.44 Hz), 4.75-4.80 (m, 2H), 5.15 (s, 2H), 6.46-6.47 (m, 1H), 6.71-6.72 (m, 1H), 6.83 (d, 1H, J = 6.87 Hz), 7.08-7.10 (m, 2H), 7.38-7.41 (m, 2H), 8.10 (d, 1H, J = 12.64 Hz), 8.21 (s, 1H), 8.68 (s, 1H).

(化合物 NB3103 の合成の合成スキーム)

【0164】

【化46】



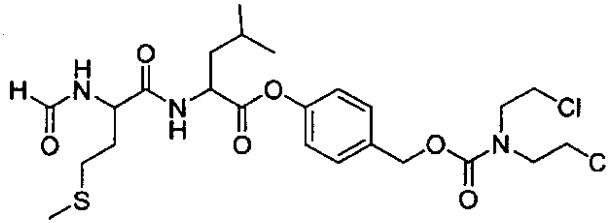
NB3103

(NB3103 の合成の詳細な説明)

(2 - (2 - ホルミルアミノ - 4 - メチルスルファニル - ブチリルアミノ) - 4 - メチル - ペンタン酸) 4 - { [ビス - (2 - クロロ - エチル) - カルバモイルオキシ] - メチル } - フェニルエステル (NB3103)

【0165】

【化47】



無水ジクロロメタン中の化合物3の溶液に、ビス - ジクロロエタンカルバモイルクロリドおよびDBUを、室温で添加した。15分後、反応混合物を、水(10 mL)で洗浄し、そしてシリカゲルカラムで精製した。

【0166】

【化48】

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 0.99-1.03 (m, 6H), 1.71 - 1.84 (m, 3H), 2.02-2.21 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.64-2.67 (m, 2H), 3.57-3.77 (m, 8H), 4.76-4.81 (m, 2H), 5.13 (s, 2H), 6.42-6.44 (m, 1H), 6.70 (d, 1H, J= 8.1 Hz), 7.08-7.13 (m, 2H), 7.35-7.38 (m, 2H) 8.20 (s, 1H).

(実施例2 - 感受性試験)

抗菌化合物のMICを決定するためのNCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 法を高スループットスクリーニングのために改変する。試験化合物の全てのストックを、溶解度に応じて、水またはDMSOのいずれか中で調製する。最も高い濃度で、DMSO含有量は、0.5%をこえるべきではない。簡単には、試験化合物の最も高い濃度から22倍の連続希釈物を、384ウェルマイクロタイタープレートに作製する。各ウェルに、ブロス中の試験微生物を、約1 ~ 1.5 × 10⁶ 細胞/mlの最終濃度まで播種する。細菌増殖を、マイクロプレートリーダー (Tecan SpectraFluor Plus) を用いて600 nmの光学密度の増加により決定した。MICを、細菌増殖(視覚的増殖に等しい)を、細菌増殖に必要なとされる適切な温度でのインキュベーションの16 ~ 18時間後に阻害した最も低い濃度として定義する。NB2046に関する結果を表3および4に示す。

【0167】

(表3)

【0168】

【表3】

| 生物 | ATCC# | MIC (µg/ml) | |
|------------------|--------|-------------|--------|
| | | 実験 #1 | 実験 #2 |
| <i>S. aureus</i> | 700260 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>S. aureus</i> | 700698 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>S. aureus</i> | 700699 | 16 | 8 |
| <i>S. aureus</i> | 13301 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>S. aureus</i> | 11632 | ≤0.125 | ≤0.125 |

10

20

30

40

50

| 生物 | ATCC# | MIC (µg/ml) | |
|-----------------------|--------|-------------|--------|
| | | 実験 #1 | 実験 #2 |
| <i>S. aureus</i> | 14154 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>S. aureus</i> | 700787 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>S. aureus</i> | 700788 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>S. aureus</i> | 700789 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>S. aureus</i> | 43300 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>S. aureus</i> | 33591 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>S. aureus</i> | 33592 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>S. aureus</i> | 33593 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| | | | |
| <i>S. epidermidis</i> | 27626 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>S. epidermidis</i> | 700565 | 2 | 2 |
| <i>S. epidermidis</i> | 700566 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>S. epidermidis</i> | 700578 | 0.5 | 0.25 |
| <i>S. epidermidis</i> | 700583 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| | | | |
| <i>K. pneumoniae</i> | 51503 | 8 | 8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 51504 | 1 | 2 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 700721 | 2 | 2 |
| | | | |
| <i>E. aerogenes</i> | 29751 | 2 | 1 |
| <i>E. cloacae</i> | 23355 | 0.5 | 0.5 |
| <i>E. aerogenes</i> | 29009 | 0.25 | ≤0.125 |
| <i>E. aerogenes</i> | 13048 | 1 | 1 |
| <i>E. aerogenes</i> | 35028 | 4 | 2 |
| | | | |
| <i>M. catarrhalis</i> | 49265 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>M. catarrhalis</i> | 51584 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>M. catarrhalis</i> | 43627 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| <i>M. catarrhalis</i> | 43628 | ≤0.125 | ≤0.125 |

(表4)
【0169】

10

20

30

40

【表4】

| 生物 | ATCC # | MIC (µg/ml) | |
|----------------------|--------|-------------|--------|
| | | 実験 #1 | 実験 #2 |
| <i>E. coli</i> | | 16 | 16 |
| <i>E. coli/Tem-1</i> | | 16 | 16 |
| MSSA | 700260 | ≤0.125 | 4 |
| MRSA | 700699 | 32 | 32 |
| MSSA | 33594 | ≤0.125 | ≤0.125 |
| MSSA | 11632 | 32 | 16 |
| <i>E. faecalis</i> | 49757 | 64 | 32 |
| <i>E. faecalis</i> | 700802 | 32 | 32 |
| <i>E. fecium</i> | | | |
| <i>E. fecium</i> | | | |
| <i>E. aerogenes</i> | 35028 | 32 | 16 |
| <i>E. cloacae</i> | 23355 | 16 | 1 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 700721 | 4 | 8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 51503 | 4 | 8 |
| <i>H. influenzae</i> | 33533 | 64 | ≥ 64 |
| <i>H. influenzae</i> | 43334 | | |
| <i>P. aeruginosa</i> | 21726 | > 64 | ≥ 64 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 29872 | > 64 | ≥ 64 |

E. coli / TEM - E. coli 発現 TEM - 1 - ラクタマーゼ ; MRSA - メチシリン耐性 S. Aureus ; MSSA - メチシリン感受性 S. Aureus

哺乳動物細胞を、上記のように NB 2046 で処理した。化合物は、曝露の 16 時間後、哺乳動物細胞に対して毒性ではない (約 30 µM の IC₅₀)。

【0170】

上で提供されるアッセイを用いて、NB 2046 の能力を、トリクロサンと比較した。結果を表 5 に示す。

【0171】

(表 5)

【0172】

10

20

30

40

【表 5】

| MSSA (ATCC ##) | NB2046 MIC, $\mu\text{g/ml}$ | トリクロサン MIC, $\mu\text{g/ml}$ |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 700260 | 0.000031 | 0.000244 |
| 13301 | 0.000015 | 0.000488 |
| 11632 | 0.000977 | 0.001953 |
| 14154 | 0.000977 | 0.001953 |
| 33592 | 0.000488 | 0.003906 |
| 43300 | 0.000977 | 0.001953 |
| 700698 | 0.003906 | 0.003906 |
| 700699 | ≥ 4 | ≥ 4 |
| 700787 | 0.007813 | 0.001953 |
| 700788 | 0.062500 | 0.031250 |
| 700789 | 0.015630 | 0.015630 |
| 33591 | 0.015630 | 0.007813 |
| 33593 | 0.000488 | 0.000977 |

10

(実施例 3)

個別の実験において、PDF ECTA化合物の無細胞反応を、Ragusa S.ら (2000) およびWeiら (2000b) に記載される手順に従って、PDF - 過剰発現 *E. coli* から精製したPDFを用いて研究した。NB3068 転換を、精製したPDFにより触媒されるPDF ECTA反応の例として用いた。これを、50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 中で室温にて実行した。NB3068 濃度を、2 ~ 250 μM の範囲であり、そして反応混合物中の酵素の濃度は、25 nMであった。転換をHPLCカラム (Adsorbosphere HS, C18, 5 μm , 4.6 mm x 150 mm, Alltech) への反応混合物の直接インジェクションによりモニターした。NB3068 濃度の減少およびシプロフロキサシン濃度の増加の両方をモニターし、そして反応の初速度を計算した。反応の動力学的パラメーターを決定して、ミカエリス-メンテンの式に対してデータを適合させた。基質濃度に対する反応の速度の依存性を、図2に与える。この依存性から、以下の、PDFが触媒したNB3068反応の動力学的パラメーターを得た： $k_{cat} = 2.07 \pm 0.14 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_m = 125 \pm 17 \mu\text{M}$ 、および $k_{cat} / K_m = 1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。

30

【0173】

あるいは、50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 中の20 ~ 100 μM の濃度の一連のPDF ECTA化合物を、25 nMの濃度の精製したPDFと接触させ、そしてこの化合物の消費を追跡した。化合物の消費を、指数方程式に適合させた。 K_m より低いまたは K_m に匹敵する基質濃度の条件下で、指数定数を、 $(k_{cat} / K_m) \times [E]$ と見積ることが出来る。多数の基質に対する相対的触媒効率パラメーター (k_{cat} / K_m) を決定した；NB3068についての k_{cat} / K_m 値を1とした (表6を参照のこと)。

40

【0174】

(表6 PDF ECTA化合物の特性)

【0175】

【表 6】

| 参照番号 | 触媒効率 | $t_{1/2}$ (時間)* | | | $t_{1/2}$ (分)* | |
|--------|------|-----------------|---------------|---------------|----------------|-------|
| | | PBS | HEPES | ブロス | マウス血漿 | ヒト血漿 |
| NB3024 | 1.47 | > 12 (81%) | > 12 (88%) | > 12 (82%) | n/d | n/d |
| NB3057 | 1.05 | > 12 (82%) | > 12 (81%) | 10 | 1.4 | < 0.5 |
| NB3068 | 1 | > 12 (75%) | > 12 (70%) | > 12 (70%) | 0.6 | 4.1 |
| NB3103 | 0.84 | > 12 (96%) | > 12 (95%) | > 12 (95%) | n/d | n/d |

* $t_{1/2}$ - 半減期 (括弧内 - 6 時間後に残っている化合物のパーセント)

** n/d - 測定せず

NB3068 形質転換を触媒する際の PDF の役割を確認するために、異なる酵素濃度での反応の速度を決定した (図 3 および 4)。理解されるように、反応の速度は、酵素濃度に比例する。

【0176】

PDF の役割をさらに確認するために、精製した PDF により触媒され NB3068 反応をアクチノニン (PDF 特異的インヒビター) の存在下で研究した。図 5 から理解されるように、反応混合物に対するアクチノニンの添加は、用量依存様式で反応を減速させた。

【0177】

(実施例 4 - 安定性)

PDF ECTA 化合物の安定性を、異なる培地 (PBS、pH 7.4 (Gibco Life Technologies)、50mM HEPES 緩衝液 (Sigma) pH 7.5、Mueller Hinton ブロス (Becton Dickinson)、マウス血漿およびヒト血漿 (Sigma)) で決定した。時間に対する化合物の濃度に依存性を、以下の指数方程式に適合させた：

$c = c_0 \times \exp(-k \times t)$ ここで、 c は化合物の実行濃度であり、 c_0 は、その初濃度であり、そして t は時間である。化合物の半減期を $t_{1/2} = 0.693 / k$ と決定した。

【0178】

(実施例 5 - 感受性試験)

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 法を抗菌化合物の MIC を決定するために用いた。試験化合物の全てのストックを、溶解度に基づいて、水または DMSO のいずれか中で調製した。試験化合物の最も高い濃度で、DMSO 含有量は、0.5% をこえるべきではない。簡単には、試験化合物の最も高い濃度から 2 倍の連続希釈物を、96 ウェルマイクロタイタープレートに作製した。各ウェルに、ブロス中の試験微生物を、約 5×10^5 CFU/ml の最終濃度まで播種した。細菌増殖を、マイクロプレートリーダー (Tecan SpectraFluor Plus) を用いて 600nm の光学密度の増加によりモニターした。MIC を、細菌増殖 (視覚的増殖に等しい) を、35 でのインキュベーションの 18 時間後に阻害した最も低い濃度として定義した。各化合物について得られた MIC 値を表 7 に与える。

【0179】

(表 7 PDF ECTA 化合物についての MIC 値)

【0180】

10

20

30

40

【表 7】

| 生物 | ATCC ## | | | | |
|-----------------------|------------|--------|--------|---------|--------|
| | | NB3024 | NB3057 | NB3068 | NB3103 |
| <i>E. coli</i> | 25922 | 16 | 0.0625 | < 0.004 | > 128 |
| <i>E. faecalis</i> | 29212 | 32 | 4 | 2 | > 128 |
| <i>S. aureus</i> (MS) | 29213 | 8 | 0.125 | 2 | > 128 |
| <i>S. aureus</i> (MR) | 33591 | n/d * | 0.5 | n/d * | n/d * |
| <i>P. aeruginosa</i> | 27853 | 128 | 2 | 0.5 | > 128 |

10

* n / d - 測定せず

本発明を上記実施形態と合わせて記載したが、上の記載および実施例は、例示を意図し、本発明の範囲を限定することを意図しないことが理解されるべきである。本発明の他の局面、利点および改変は、本発明が属する技術分野の当業者に理解される。

【 0 1 8 1 】

(参考文献)

【 0 1 8 2 】

【表 8】

- Apfel, C. et al. (2000) *J. Med. Chem.* **43**:2324-2331.
- Apfel et al. (2001a) *Anti. Agents and Chemo.* **45**(4):1053-1057.
- Apfel et al. (2001b) *Anti. Agents and Chemo.* **45**(4):1058-1064.
- Becker, A. et al. (1998) *Nat. Struct. Biol.* **5**(12): 1053-8.
- Chan, M.K. et al. (1997) *Biochemistry* **36**(45):13904-9.
- Chen, D.Z. et al. (2000) *Biochemistry* **39**(6):1256-62.
- Clements, J.M. et al. (2001) *Anti. Agents and Chemo.* **45**(2):563-570.
- de Groot, F.M.H. et al. (2000) *J. Med. Chem.* **43**:3093-3102.
- Durand et al. (1999) *Arch. Bio. And Biophysics.* **367**(2): 297-302.
- Gigliione, C. et al. (2000a) *Mol. Microbiol.* **36**:1197205.
- Gigliione, C. et al. (2000b) *EMBO J.* **19**(21):5916-5929.
- Hao, B. et al. (1999) *Biochemistry* **38**(15):4712-9.
- Hu, Y.J. et al. (1998) *Bioorg Med Chem Lett.* **8**(18):2479-82.
- Huntington, K.M. et al. (2000) *Biochemistry* **39**(15):4543-51.
- Jayasekera, M.M. et al. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* **381**(2):313-316.
- Meinzel, T. (1999) *Pathol. Biol.* **47**:780-783.
- Meinzel, T. et al. (1993) *Biochimie.* **75**(12):1061-75. Review.
- Nelson, D.L. et al. (2000) *Principles of Biochemistry.* 2000, ed. Lehninger,
- Ragusa S., et al. (2000) *J.Mol.Biol.*, **280**, 551-523.
- Rajagopalan, P.T. et al. (1997) *Biochemistry* **36**(45):13910-8.
- Rajagopalan, P.T. et al. (1998) *Biol Chem.* **273**(35):22305-10.
- Wei Y. et al. (1997) *Anal Biochem.* **250**(1):29-34.
- Wei, Y. et al. (2000) *J Comb Chem.* **2**(6):650-7.
- Wei, Y. et al. (2000b) *Bioorg Med Chem Lett.* **10**(10):1073-6.

20

30

40

【 図面の簡単な説明 】

50

【 0 1 8 3 】

【 図 1 】 図 1 は、本発明の化合物の P D F 活性についての提案される反応スキームである。

【 図 2 】 図 2 は、N B 3 0 6 8 濃度に対する、精製された P D F を発現によって触媒される N B 3 0 6 8 反応の速度の依存性を示す。

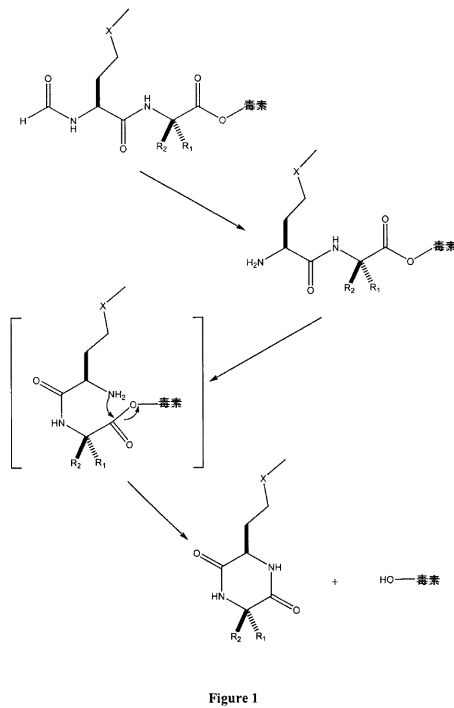
【 図 3 】 図 3 は、精製された P D F の異なる濃度によって触媒される反応における、N B 3 0 6 8 の濃度の時間依存性を示す。

【 図 4 】 図 4 は、P D F 濃度に対する、精製された P D F によって触媒される N B 3 0 6 8 反応の初期速度の依存性を示す。

【 図 5 】 図 5 は、アクチノニンの異なる濃度において、精製された P D F によって触媒される反応における、N B 3 0 6 8 の濃度の時間依存性を示す。

10

【 図 1 】



【 図 2 】

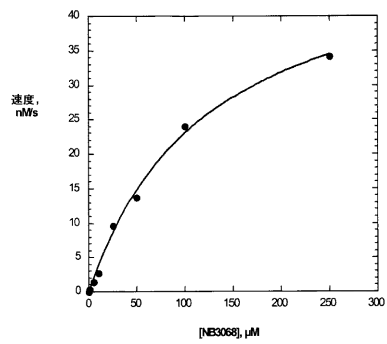


Figure 2

【 図 3 】

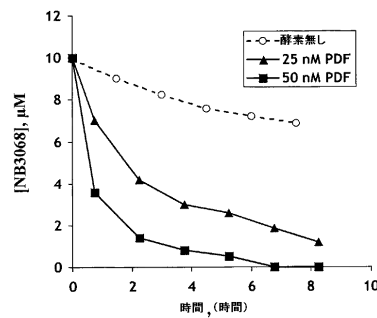


Figure 3

【 図 4 】

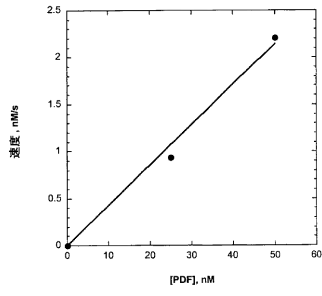


Figure 4

【 図 5 】

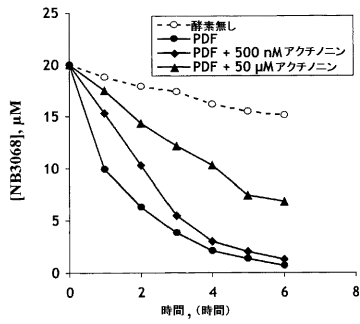


Figure 5

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/04 (2006.01) C 1 2 Q 1/04
C 0 7 M 7:00

(72)発明者 サーギーバ, マリア パラディマー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 0, サン ディエゴ, ウェスト サン ラファエル
ダーウィ 1 1 3 3 8

(72)発明者 ドッパラブディ, ベンカタ ラマナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 0, サン ディエゴ, ウェスト オーシャン エ
ア ドライブ 1 0 9 8 6, ナンバー 2 7 8

審査官 内藤 伸一

(56)参考文献 Analytical Biochemistry (1997), 250(1), 29-34
SUSAN BUDAVARIほか, 「THE MERCK INDEX」TWELFTH EDITION, MERCK & CO., INC., 1996年発行
, 6 6 8 5の欄
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2000), 10(10), 1073-1076
SUSAN BUDAVARIほか, 「THE MERCK INDEX」TWELFTH EDITION, MERCK & CO., INC., 1996年発行
, 2 3 7 4の欄
SUSAN BUDAVARIほか, 「THE MERCK INDEX」TWELFTH EDITION, MERCK & CO., INC., 1996年発行
, 5 8 1 5, 5 8 1 6の欄
SUSAN BUDAVARIほか, 「THE MERCK INDEX」TWELFTH EDITION, MERCK & CO., INC., 1996年発行
, 6 7 9 3の欄
SUSAN BUDAVARIほか, 「THE MERCK INDEX」TWELFTH EDITION, MERCK & CO., INC., 1996年発行
, 8 1 7 8の欄
SUSAN BUDAVARIほか, 「THE MERCK INDEX」TWELFTH EDITION, MERCK & CO., INC., 1996年発行
, 9 7 9 0の欄

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07K 5/062
A61K 38/00
A61K 47/48
CA(STN)
REGISTRY(STN)
WPIDS(STN)