

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-523953

(P2017-523953A)

(43) 公表日 平成29年8月24日(2017.8.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 5/12 (2006.01)	C 0 7 K 5/12	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/12 (2006.01)	A 6 1 K 38/12	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2016-570088 (P2016-570088)	(71) 出願人	505371232
(86) (22) 出願日	平成27年6月29日 (2015. 6. 29)		クセリア ファーマシューティカルズ エービーエス
(85) 翻訳文提出日	平成28年11月29日 (2016. 11. 29)		Xellia Pharmaceuticals ApS
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/064764		デンマーク、ディーケー-2300 コペンハーゲン エス、ダルスランズガーデ
(87) 国際公開番号	W02016/005223		11
(87) 国際公開日	平成28年1月14日 (2016. 1. 14)		11 Dalslandsgade, DK
(31) 優先権主張番号	62/022, 399		-2300 Copenhagen S,
(32) 優先日	平成26年7月9日 (2014. 7. 9)		DENMARK
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100105957
			弁理士 恩田 誠
		(74) 代理人	100068755
			弁理士 恩田 博宣

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低置換度ポリミキシン及びその組成物

(57) 【要約】

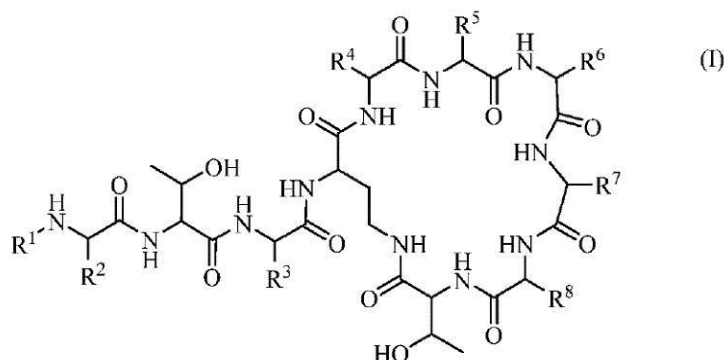
本発明は、新規な低置換度ポリミキシン及びその組成物に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) によって表されるポリミキシンであって、

【化 1】

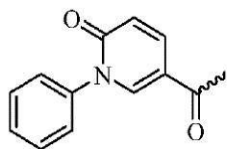


10

式中、

R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基、又は

【化 2】



20

であり、

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

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

30

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々は $-(CH_2)_xCH_2NH_2$ 又は $-(CH_2)_xCH_2N(CH_2SO_3M)_2$ のいずれかであり、

x は 0 又は 1 であり、

M はカチオンであり、かつ

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 のうちの 1 つのみが $-(CH_2)_xCH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である、ポリミキシン。

【請求項 2】

R^1 が脂肪族直鎖又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基である、請求項 1 に記載のポリミキシン。

40

【請求項 3】

R^1 がヘプタノイル、6-メチルヘプタノイル、オクタノイル、(S)-6-メチルオクタノイル、3-ヒドロキシ-6-メチルオクタノイル、7-メチルオクタノイル、ノナノイル、8-メチルノナノイル又はデカノイルである、請求項 2 に記載のポリミキシン。

【請求項 4】

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々が $-CH_2CH_2NH_2$ 又は $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ のいずれかであり、 M がカチオンであり、かつ R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 のうちの 1 つのみが $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリミキシン。

【請求項 5】

50

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々が $-CH_2CH_2NH_2$ 又は $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ のいずれかであり、 M が薬学的に許容される一価のカチオンであり、かつ R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 のうちの 1 つのみが $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリミキシン。

【請求項 6】

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々が $-CH_2CH_2NH_2$ 又は $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ のいずれかであり、 M が Na^+ であり、かつ R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 のうちの 1 つのみが $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリミキシン。

【請求項 7】

HPLC で測定して 50 % を超える請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のポリミキシンを含む組成物。

【請求項 8】

HPLC で測定して 80 % を超える請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のポリミキシンを含む組成物。

【請求項 9】

HPLC で測定して 90 % を超える請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のポリミキシンを含む組成物。

【請求項 10】

グラム陰性菌に起因する感染症の治療に用いるための、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な低置換度ポリミキシン及びその組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

ポリミキシンは、バチルス・ポリミクサ (*Bacillus polymyxa*) によって産生される抗生物質として 1947 年に発見された。ポリミキシンは、ヘプタペプチド環及び N - 末端アミド結合脂肪酸を含む抗菌性のデカペプチドである。今日、ポリミキシン B 及びポリミキシン E (コリスチン) という 2 種類の市販ポリミキシン混合物が臨床で使用されている。どちらの混合物も、Goevaerts らによって非特許文献 1 に説明されているような、及び Van den Bossche らによって非特許文献 2 に説明されているような種々の成分を含む。欧州薬局方によれば、コリスチンは 77 % を超えるポリミキシン E 1、E 2、E 3、E 1 - i 及び E 1 - 7 MOA を含む必要があり、但し副成分のポリミキシン E 3、E 1 - i 及び E 1 - 7 MOA の各々は 10 % 未満でなければならない。

【0003】

コリスチンに付随する毒性のため、上記混合物は 1950 年代にスルホメチル化によって改善された。スルホメチル化されたコリスチンは、コリスチメタン酸ナトリウム (*Colistimethate sodium*: CMS) と呼ばれ、コリスチンのプロドラッグであると考えられてきた。CMS は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、アシネトバクター・バウマニ (*Acinetobacter baumannii*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumonia*)、及び他のグラム陰性病原体等の多剤耐性生物に対する最終選択治療として今でも臨床で使用されている。長年にわたり、CMS の溶液はまた、緑膿菌に起因するコロニー形成や感染症に対処するため、嚢胞性線維症 (CF) の患者の肺に噴霧により投与されてきた。

【0004】

今日、抗生物質耐性病原体に起因する感染症の問題が増してきており、その結果、コリ

スチン等の製品の使用が増加している。

市販のＣＭＳ製品が様々なポリミキシンの誘導体の複雑な混合物を含有するという事実は、いくつかの不幸な結果を招く。その最たるものは、市販品の治療効果に関係する。ＣＭＳはひとたび体内に注入又は吸入されると、抗生物質のリザーバとみなされ得るため、腎クリアランスや代謝クリアランスの前に活性化化合物の治療レベルが達成されることが重要である。したがって、２つのスルホメチル置換基のみを有するスルホメチル化ポリミキシンは、分子量及び電荷に関して明確な製品をもたらす。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００５】

10

【非特許文献１】J Chromatogr A. 2002 Nov 8; 976 (1-2): 65-78

【非特許文献２】Talanta 2011 Feb 15; 83 (5): 1521-9

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

そのため、本発明の目的は、抗菌薬として有用な、改善されたポリミキシン化合物を提供すること、及び、従来技術の製品の不都合な点を克服するか、又は少なくとも軽減することにある。

【課題を解決するための手段】

20

【０００７】

本発明は、ポリミキシンのポリペプチド部分におけるＤＡＢ残基又はＤＡＰ残基のγ-アミノ基に結合した合計２つのスルホメチル基を有するポリミキシンに関する。これらの化合物及びその組成物は細菌感染症の治療に用いることができる。

【０００８】

一態様において、本発明は、ポリミキシンＥ及びポリミキシンＢよりも水溶性が高い新規なポリミキシンを提供する。更に別の態様において、本発明は市販ＣＭＳよりも水溶液中での安定性が高いスルホメチル化ポリミキシンを提供する。更に別の態様において、本発明は市販のＣＭＳよりも均質なスルホメチル化ポリミキシンの混合物を提供する。最後に、本化合物、又は混合物あるいはそれらの組成物は、従来技術の、これまでのところ明確に定義されていないポリミキシン組成物よりも、改善されたポリミキシン投薬及び療法を提供する。

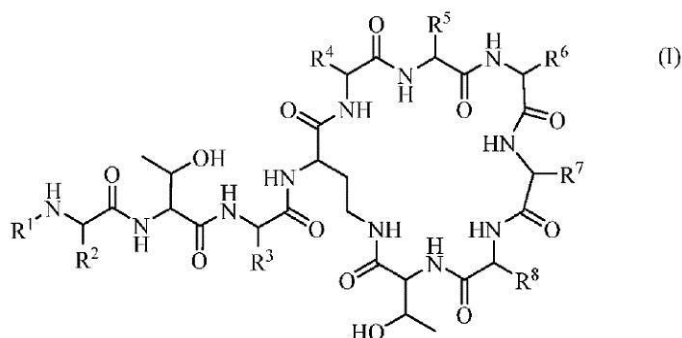
30

【０００９】

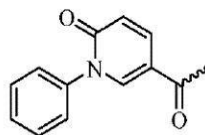
したがって、本発明は式（Ⅰ）によって表される新規なポリミキシンを提供し、

【００１０】

【化１】



【化 2】



【0013】

であり、

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

10

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

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々は $-(\text{CH}_2)_x\text{CH}_2\text{NH}_2$ 又は $-(\text{CH}_2)_x\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M})_2$ のいずれかであり、

x は 0 又は 1 であり、

M はカチオンであり、かつ

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 のうちの 1 つが $-(\text{CH}_2)_x\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M})_2$ である。

【0014】

本発明の一実施形態によれば、式 (I) で表されるポリミキシンが提供され、式中、2 つのスルホメチル基は同じ γ -アミノ基に結合している。

20

本発明の更に別の実施形態によれば、式 (I) で表されるポリミキシンが提供され、式中、 R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アシル基であり、

R^5 及び R^6 は $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ であり、

R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々は $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ であり、かつ

R^2 は $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M})_2$ である。

【0015】

ここで、 M は一価のカチオンである。

本発明の更に別の実施形態によれば、式 (I) で表されるポリミキシンが提供され、式中、 R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アシル基であり、

30

R^5 及び R^6 は $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ であり、

R^2 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々は $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ であり、かつ

R^3 は $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M})_2$ である。

【0016】

ここで、 M は一価のカチオンである。

本発明の更に別の実施形態によれば、式 (I) で表されるポリミキシンが提供され、式中、 R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アシル基であり、

R^5 及び R^6 は $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ であり、

R^2 、 R^3 、 R^7 及び R^8 の各々は $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ であり、かつ

R^4 は $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M})_2$ である。

40

【0017】

ここで、 M は一価のカチオンである。

本発明の更に別の実施形態によれば、式 (I) で表されるポリミキシンが提供され、式中、 R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アシル基であり、

R^5 及び R^6 は $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ であり、

R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^8 の各々は $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ であり、かつ

R^7 は $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M})_2$ である。

【0018】

ここで、 M は一価のカチオンである。

本発明の更に別の実施形態によれば、式 (I) で表されるポリミキシンが提供され、式

50

中、 R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基であり、
 R^5 及び R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ であり、
 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^7 の各々は $-CH_2CH_2NH_2$ であり、かつ
 R^8 は $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

【0019】

ここで、Mは一価のカチオンである。

本発明の更に別の実施形態によれば、式(I)で表されるポリミキシンが提供され、式
 中、 R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基であり、
 R^5 及び R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ 又は $CH_2C_6H_5$ のいずれかであり、
 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々は $-CH_2CH_2NH_2$ であり、かつ
 R^2 は $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

10

【0020】

ここで、Mは一価のカチオンである。

本発明の更に別の実施形態によれば、式(I)で表されるポリミキシンが提供され、式
 中、 R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基であり、
 R^5 及び R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ 又は $CH_2C_6H_5$ のいずれかであり、
 R^2 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々は $-CH_2CH_2NH_2$ であり、かつ
 R^3 は $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

【0021】

ここで、Mは一価のカチオンである。

本発明の更に別の実施形態によれば、式(I)で表されるポリミキシンが提供され、式
 中、 R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基であり、
 R^5 及び R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ 又は $CH_2C_6H_5$ のいずれかであり、
 R^2 、 R^3 、 R^7 及び R^8 の各々は $-CH_2CH_2NH_2$ であり、かつ
 R^4 は $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

20

【0022】

ここで、Mは一価のカチオンである。

本発明の更に別の実施形態によれば、式(I)で表されるポリミキシンが提供され、式
 中、 R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基であり、
 R^5 及び R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ 又は $CH_2C_6H_5$ のいずれかであり、
 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^8 の各々は $-CH_2CH_2NH_2$ であり、かつ
 R^7 は $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

30

【0023】

ここで、Mは一価のカチオンである。

本発明の更に別の実施形態によれば、式(I)で表されるポリミキシンが提供され、式
 中、 R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基であり、
 R^5 及び R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ 又は $CH_2C_6H_5$ のいずれかであり、
 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^7 の各々は $-CH_2CH_2NH_2$ であり、かつ
 R^8 は $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

40

【0024】

ここで、Mは一価のカチオンである。

本発明の上記実施形態の別の態様によれば、 R^1 は6-メチルオクタノイルである。

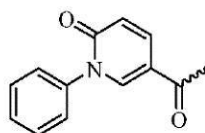
本発明の上記実施形態の別の態様によれば、 R^1 は6-メチル-ヘプタノイルである。

【0025】

本発明の更に別の実施形態によれば、式(I)のポリミキシンが提供され、式中、 R^1
 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基であるか、又は

【0026】

【化 3】



【 0 0 2 7 】

であり、

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

10

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

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々は $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 又は $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M})_2$ のいずれかであり、

M はカチオンであり、かつ

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 のうちの 1 つが $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M})_2$ である。

【 0 0 2 8 】

本発明は更に、本発明による 1 種又は複数種のポリミキシンを含む医薬組成物を提供する。

20

本発明による組成物は、1 種又は複数種の薬学的に許容される賦形剤を更に含んでもよい。

【 0 0 2 9 】

一実施形態によれば、本発明による医薬組成物は、HPLC で測定して 50 % を超える本発明によるポリミキシンを含む。

更に別の実施形態によれば、本発明による医薬組成物は、HPLC で測定して 50 % を超える式 (I) で表されるポリミキシンを含む。

【 0 0 3 0 】

更に別の実施形態によれば、本発明による医薬組成物は、HPLC で測定して 80 % を超える式 (I) で表されるポリミキシンを含む。

30

更に別の実施形態によれば、本発明による医薬組成物は、HPLC で測定して 90 % を超える式 (I) で表されるポリミキシンを含む。

【 0 0 3 1 】

更に別の実施形態によれば、本組成物は、HPLC で測定して 50 % を超える図 1 ~ 5 の式で表される 1 種又は複数種のポリミキシンを含む。

更に別の実施形態によれば、本組成物は、HPLC で測定して 80 % を超える図 1 ~ 5 の式で表される 1 種又は複数種のポリミキシンを含む。

【 0 0 3 2 】

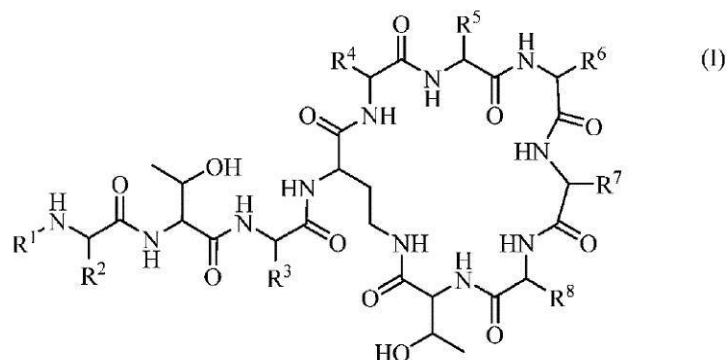
更に別の実施形態によれば、本組成物は、HPLC で測定して 90 % を超える図 1 ~ 5 の式で表される 1 種又は複数種のポリミキシンを含む。

40

第 1 実施形態は、式 (I) で表されるポリミキシンを対象とし、

【 0 0 3 3 】

【化 4】



10

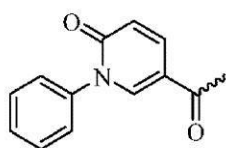
【 0 0 3 4 】

式中、

 R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基、又は

【 0 0 3 5 】

【化 5】



20

【 0 0 3 6 】

であり、

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

 R^6 は $-CH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ 又は $-CH_2CH_2CH_3$ であり、

 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々は $-(CH_2)_xCH_2NH_2$ 又は $-(CH_2)_xCH_2N(CH_2SO_3M)_2$ のいずれかであり、

30

 x は 0 又は 1 であり、

 M はカチオンであり、かつ

 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 のうちの 1 つが $-(CH_2)_xCH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

【 0 0 3 7 】

 第 1 実施形態の第 1 の態様において、 R^1 はヘプタノイル、メチルヘプタノイル、オクタノイル、メチルオクタノイル、ノナノイル、メチルノナノイル又はデカノイルである。

 第 1 実施形態の第 2 の態様において、 R^1 はヘプタノイル、6 - メチルヘプタノイル、オクタノイル、(S) - 6 - メチルオクタノイル、7 - メチルオクタノイル、3 - ヒドロキシ - 6 - メチルオクタノイル、ノナノイル、(8 - メチルノナノイル又はデカノイルである。

40

【 0 0 3 8 】

 第 1 実施形態の第 3 の態様において、上述したポリミキシンは、 M が Na^+ 、 K^+ 、 $1/2 Mg^{2+}$ 、 $H_mN(C_{1-4}アルキル)_n^+$ 、及びそれらの組合せからなる群から選択され、ここで、 m は 0 ~ 4 であり、 n は 0 ~ 4 であり、但し $m + n = 4$ であることを特徴とする。

【 0 0 3 9 】

 第 1 実施形態の第 4 の態様において、 x は 1 であり、 M は H^+ 、 Na^+ 又は K^+ である。

50

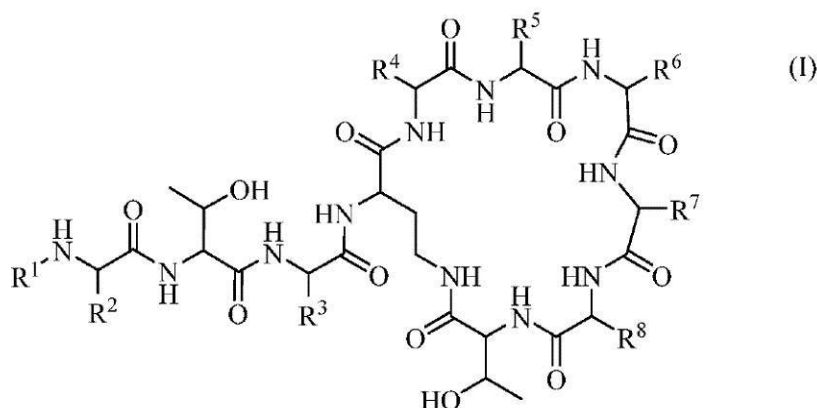
 第 1 実施形態の第 5 の態様において、 x は 1 であり、 M は Na^+ 又は K^+ である。

【 0 0 4 0 】

第 2 実施形態は、式 (I) で表される少なくとも 1 種のポリミキシンを含む組成物を対象とし、

【 0 0 4 1 】

【 化 6 】



10

【 0 0 4 2 】

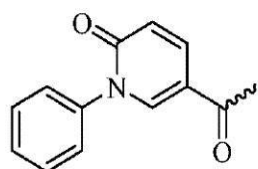
式中、

R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基、又は

20

【 0 0 4 3 】

【 化 7 】



【 0 0 4 4 】

であり、

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

R^6 は $-CH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、又は $-CH_2CH_2CH_3$ であり、

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々は $-(CH_2)_xCH_2NH_2$ 又は $-(CH_2)_xCH_2N(CH_2SO_3M)_2$ のいずれかであり、

x は 0 又は 1 であり、

M はカチオンであり、かつ

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 のうちの 1 つが $-(CH_2)_xCH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

40

【 0 0 4 5 】

第 2 実施形態の第 1 の態様において、 R^1 はヘプタノイル、メチルヘプタノイル、オクタノイル、メチルオクタノイル、3 - ヒドロキシ - 6 - メチルオクタノイル、ノナノイル、メチルノナノイル又はデカノイルである。

【 0 0 4 6 】

第 2 実施形態の第 2 の態様において、 R^1 はヘプタノイル、6 - メチルヘプタノイル、オクタノイル、(S) - 6 - メチルオクタノイル、3 - ヒドロキシ - 6 - メチルオクタノイル、7 - メチルオクタノイル、ノナノイル、8 - メチルノナノイル又はデカノイルである。

【 0 0 4 7 】

第 2 実施形態の第 3 の態様において、上述したポリミキシンは、 M が Na^+ 、 K^+ 、 H

50

$m N(C_{1-4} \text{ アルキル})_n^+$ 、 $1/2 Mg^{2+}$ 及びそれらの組合せからなる群から選択され、ここで、 m は 0 ~ 4 であり、 n は 0 ~ 4 であり、但し $m + n = 4$ であることを特徴とする。

【0048】

第2実施形態の第4の態様において、 x は 1 であり、 M は H^+ 、 Na^+ 又は K^+ である。

第2実施形態の第5の態様において、 x は 1 であり、 M は Na^+ 又は K^+ である。

【0049】

第2実施形態の第6の態様において、上記医薬組成物は、HPLCで測定して50%を超える式(I)で表されるポリミキシンを含む。

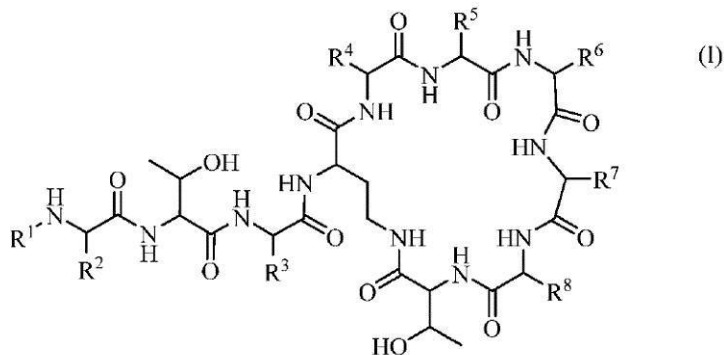
第2実施形態の第7の態様において、上記医薬組成物は、HPLCで測定して50%を超える式(I)で表されるポリミキシンを含み、 x は 1 であり、 M は Na^+ 又は K^+ である。

【0050】

第3実施形態は、式(I)で表されるポリミキシンを対象とし、

【0051】

【化8】



【0052】

式中、

R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基であり、

R^5 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ 又は $-CH_2C_6H_5$ であり、

R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ であり、

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々は $-CH_2CH_2NH_2$ 又は $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ のいずれかであり、

M はカチオンであり、かつ

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 のうちの1つのみが $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

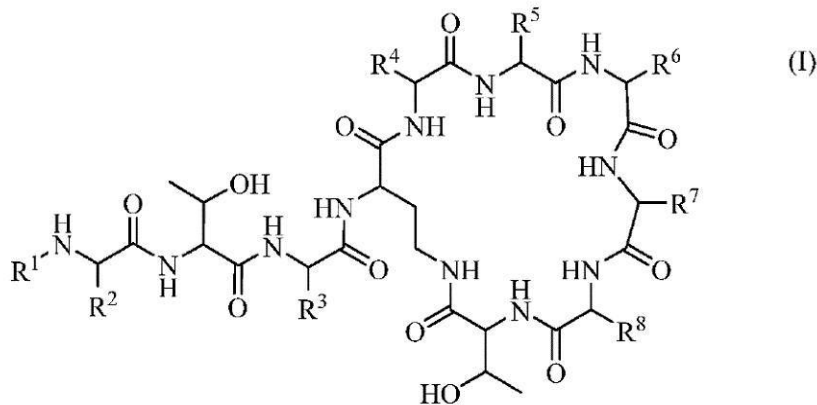
【0053】

第3実施形態の第1の態様において、脂肪族 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基は、任意にヒドロキシ基を含む。

第4実施形態は、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンを含む組成物を対象とし、

【0054】

【化 9】



10

【0055】

式中、

R^1 は脂肪族直鎖又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基であり、

R^5 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ 又は $-CH_2C_6H_5$ であり、

R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ であり、

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々は $-CH_2CH_2NH_2$ 又は $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ のいずれかであり、

20

M はカチオンであり、かつ

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 のうちの1つのみが $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3M)_2$ である。

【0056】

第4実施形態の第1の態様において、上記医薬組成物は、HPLCで測定して50%を超える式(I)で表されるポリミキシンを含む。

第4実施形態の第2の態様において、上記医薬組成物は、HPLCで測定して80%を超える式(I)で表されるポリミキシンを含む。

【0057】

第4実施形態の第3の態様において、上記医薬組成物は、HPLCで測定して50%を超える式(I)で表されるポリミキシンを含み、グラム陰性菌に起因する感染症の治療に用いられる。

30

【0058】

第4実施形態の第4の態様において、上記医薬組成物は、HPLCで測定して50%を超える式(I)で表されるポリミキシンを含み、Mは薬学的に許容されるカチオンから選択される。

【0059】

第4実施形態の第5の態様において、上記医薬組成物は、HPLCで測定して50%を超える式(I)で表されるポリミキシンを含み、Mは薬学的に許容される一価のカチオンから選択される。

40

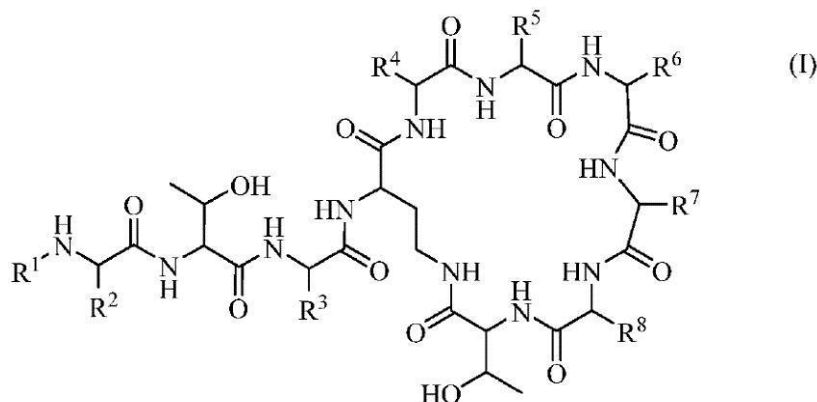
【0060】

第4実施形態の第6の態様において、脂肪族 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基又は分岐鎖 $C_6 \sim C_{10}$ アシル基は、任意にヒドロキシ基を含む。

第5実施形態は、式(I)で表される少なくとも1種のポリミキシンを含む組成物を対象とし、

【0061】

【化 1 0】



10

【 0 0 6 2】

式中、

R^1 は 6 - メチルオクタノイル、6 - メチルヘプタノイル又はオクタノイルであり、
 R^5 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、又は $-CH_2C_6H_5$ であり、
 R^6 は $-CH_2CH(CH_3)_2$ であり、
 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 の各々は $-CH_2CH_2NH_2$ 又は $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ のいずれかであり、
 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 及び R^8 のうちの 1 つのみが $-CH_2CH_2N(CH_2SO_3Na)_2$ である。

20

【 0 0 6 3】

第 5 実施形態の第 1 の態様において、上記医薬組成物は、HPLC で測定して 50 % を超える式 (I) で表されるポリミキシンを含む。

第 5 実施形態の第 2 の態様において、上記医薬組成物は、HPLC で測定して 80 % を超える式 (I) で表されるポリミキシンを含む。

【 0 0 6 4】

第 5 実施形態の第 3 の態様において、上記医薬組成物は、HPLC で測定して 50 % を超える式 (I) で表されるポリミキシンを含み、グラム陰性菌に起因する感染症の治療に用いられる。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 5】

【図 1】PE1 - (SM)₂¹ の二ナトリウム塩の構造を示す。

【図 2】PE1 - (SM)₂³ の二ナトリウム塩の構造を示す。

【図 3】PE1 - (SM)₂⁵ の二ナトリウム塩の構造を示す。

【図 4】PE1 - (SM)₂⁸ の二ナトリウム塩の構造を示す。

【図 5】PE1 - (SM)₂⁹ の二ナトリウム塩の構造を示す。

【図 6】PE1 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} のクラマトグラムを示す。

【図 7】90 分後、pH 9 の非平衡条件下における PE1 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} の分解を示す。

40

【図 8】3 日後、pH 8.0 の非平衡条件下における PE1 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} の分解を示す。

【図 9】3 日後、pH 7.0 の非平衡条件下における PE1 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} の分解を示す。

【図 10】3 日後、pH 6.5 の非平衡条件下における PE1 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} の分解を示す。

【図 11】3 日後、pH 6.0 の非平衡条件下における PE1 - (SM)₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} の分解を示す。

【図 12】二置換ポリミキシン E1 について得られた MS スペクトルを示す。m/z 67

50

7.3 [-2] 及び 1355.5 [-1] がネガティブモードで得られた。

【図13】(上)2つのスルホメチル基を有する5つの個々のポリミキシン成分の存在を示すクロマトグラムを示す(215nmのUVシグナル)。(下)モノ(ビス-スルホメチル化)ポリミキシンE1に一致する質量に対する抽出イオン電流(extracted ion current: EIC)を示す(677.62、1356.2、1378.06のm/z)。

【図14】モノ(ビス-スルホメチル化)ポリミキシンE1の質量スペクトルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0066】

定義

本明細書及び添付の特許請求の範囲全体にわたり用いられる下記の用語は、下記の意味を有する：

本願で記述される用語「ポリミキシン」は、脂肪酸部分にアミド結合したペプチド部分を含む抗菌性化合物を指す。

【0067】

本願で記述される用語「Dab残基」は、少なくとも1つのアミノ酸にアミド結合した2,4-ジアミノ酪酸化合物を指す。天然のポリミキシンは通常、6つのDab残基を含み、そのうち5つは遊離γ-アミノ基を含む。

【0068】

本願で記述される用語「Dab」は、2,4-ジアミノブタン酸に由来するラジカルを指す。ここで、カルボニル炭素(すなわちα-炭素)に隣接する炭素原子はL体として表される立体化学を有する。L-Dabは、文献ではL-Dbuとも称される。

【0069】

式(I)で表されるポリミキシンの6位にあるアミノ酸はD体を有する。すなわち、R⁵が結合するアミノ酸残基である。

本願で記述される用語「DAP残基」は、少なくとも1つのアミノ酸にアミド結合した2,3-ジアミノプロピオン酸化合物を指す。

【0070】

本願で記述される用語「DAP」は、2,3-ジアミノプロピオン酸化合物を指す。

本願で記述される用語「スルホメチル」は、-CH₂SO₃M部分を指し、ここで、Mは下記に定義されるとおりである。スルホン酸(-SO₃)部分は酸性形態にあり得るが、生理環境(in vivo)では負の電荷を有することになり、M等の結合カチオンを有することになる。

【0071】

本願で記述される用語「CMS」は、スルホメチル化コリスチンを含む組成物を指す。ケミカル・アブストラクツはそのような組成物に、CMSの番号8068-28-8を割り当てている。

【0072】

本願で記述される用語「CMS E1」は、比較的純粋なポリミキシンE1(HPLCで80%超の純度)のスルホメチル化により形成された組成物を指す。

本願で記述される用語「コリスチン」は、ポリミキシンE1及びポリミキシンE2を含む組成物を指す。ケミカル・アブストラクツは、コリスチン用に番号1066-17-7を割り当てている。欧州薬局方によれば、コリスチンは77%を超えるポリミキシンE1、E2、E3、E1i及びE1-7MOAを含む必要があり、但し副成分のポリミキシンE3、E1-i及びE1-7MOAの各々は10%未満でなければならない。

【0073】

本願で記述される用語「ポリミキシンE」は、「コリスチン」と互換的に使用される。

本願で記述される用語「ポリミキシンE1」は、CAS番号7722-44-3を有する化合物を指す。ポリミキシンE1はコリスチンAと互換的に使用される。

【0074】

10

20

30

40

50

本願で記述される用語「ポリミキシン E 2」は、C A S 番号 7 2 3 9 - 4 8 - 7 を有する化合物を指す。ポリミキシン E 2 はコリスチン B と互換的に使用される。

本願で記述される用語「スルホメチル化ポリミキシン」は、L - D A B 残基の γ - アミノ基に結合した少なくとも 1 つのスルホメチル基を有するポリミキシンを指す。

【 0 0 7 5 】

用語「M」はカチオンであり、1 又は 2 の正の荷電を含むカチオン種を指す。その例には、限定するものではないが、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 $1/2 \text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{H}_m\text{N}(\text{C}_1 - \text{アルキル})_n^+$ が挙げられ、ここで、m は 0 ~ 4 であり、n は 0 ~ 4 であり、但し $m + n = 4$ である。

【 0 0 7 6 】

本願で記述される表現「脂肪族直鎖又は分岐鎖 C 6 ~ C 1 0 アシル基」は、合計で 6 ~ 1 0 個の炭素原子を含む、カルボニル部分及び非カルボニル部分を有する置換基を指す。これは既知のポリミキシン化合物に見られるアシル基を含む。また、これはヘプタノイル、メチルヘプタノイル ((S) - 6 - メチルヘプタノイルを含む)、オクタノイル、メチルオクタノイル ((S) - 6 - メチルオクタノイル、7 - メチルオクタノイルを含む)、ノナノイル、メチルノナノイル及びデカノイルを含むがこれらに限定するものではない。

【 0 0 7 7 】

本願で記述される用語「塩」又は「その塩」は、当業者に知られている任意の工程、例えばプロトン受容部分のプロトン化及び / 又はプロトン供与部分の脱プロトン化によって調製可能な、カチオン及びアニオンを有する化合物を指す。あるいは、塩はカチオン / アニオンメタセシス又はカチオン / アニオン交換反応のいずれかによって調製可能である。

【 0 0 7 8 】

本願で記述される用語「H P L C で測定して X % を超える」は、本願の実施例に記載されているか、あるいは W O 2 0 1 4 1 9 5 4 0 5 A 1 に記載されている H P L C 法により得られるクロマトグラムにおける、関連するピークの相対積分面積として理解されるものとする。

【 0 0 7 9 】

本発明によれば、遊離 γ - アミンを有する上記の構造の D a b 残基のいずれか、すなわち D a b 残基 D a b 1、D a b 3、D a b 5、D a b 8 又は D a b 9 のいずれかに結合した 2 つのスルホメチル基を有する新規なポリミキシンが提供される。よって、式 (I) はモノ (ビス - スルホメチル化) ポリミキシンを包含するが、トリ - 、テトラ - 又はペンタ (ビス - スルホメチル化) ポリミキシンは包含しないことが意図される。

【 0 0 8 0 】

新規なポリミキシンの一例は、本願ではモノ (N^γ - ビス - スルホメチル) D a b ⁹ ポリミキシン E 1 と称される。すなわち、式 I の置換基が 6 - メチルオクタノイルである R ¹ で表され、R ⁵ 及び R ⁶ が $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ であり、R ²、R ³、R ⁴、及び R ⁷ の各々が $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ であり、R ⁸ が $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M})_2$ であり、M が Na^+ である。そのような化合物の一例が図 5 に示されている。この化合物の略称は P E 1 - (S M) ₂ ⁹ である。

【 0 0 8 1 】

モノビス - スルホメチル化ポリミキシンの他の例は、モノ (N^γ - ビス - スルホメチル) D a b ¹ ポリミキシン E 1、モノ (N^γ - ビス - スルホメチル) D a b ³ ポリミキシン E 1、モノ (N^γ - ビス - スルホメチル) D a b ⁵ ポリミキシン E 1、モノ (N^γ - ビス - スルホメチル) D a b ⁸ ポリミキシン E 1 であり、それぞれ、その二ナトリウム構造が図 1 ~ 4 に示されている。

【 0 0 8 2 】

「 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 」という表現は、媒体の pH に応じて $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 又は $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ を包含するものとして理解される。

「 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 」という表現は、媒体の pH に応じて $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 又は $-\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ を包含するものとして理解される。

10

20

30

40

50

【0083】

本願に記載のポリミキシンは、多くの分子種を包含する。例えば水溶液中では、電荷はpHに依存する。本願に記載のポリミキシン化合物は全ての薬学的に許容される塩及びそのイオンを包含する。それらのポリミキシンの中にはもちろん二ナトリウム塩がある。他の薬学的に許容される塩には、例えばカリウム塩、リチウム塩、及びアンモニウム塩（例えば $H_mN(C_{1-4}アルキル)_n^+$ 、ここでmは0～4であり、nは0～4であり、但し $m+n=4$ である）、又はそれらの組合せも含まれる。

【0084】

本願に記載のポリミキシンは、感染性疾患の、特にグラム陰性菌に起因する感染症の治療又は予防に用いられてもよく、上記グラム陰性菌は、限定するものではないが、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、クレムシエラ・ニューモニエ（*Klebsiella pneumoniae*）、及びアシネトバクター・バウマニ（*Acinetobacter baumannii*）、大腸菌（*Escherichia coli*）、及びエンテロバクター・アエロゲネス（*Enterobacter aerogenes*）等である。一態様によれば、本発明はグラム陰性菌感染症の治療における、有効量の本願に記載の任意の組成物を含む医薬組成物の使用を含む。

10

【0085】

本化合物は、治療上有効量で投与され得る。「治療上有効量」は、その化合物が感染症を治療するのに十分な量を意味する。当業者は、特定の患者の適切な1日投与量は、治療される疾患及びその重症度、採用する組成物、その患者の年齢、体重、性別及び食事、ならびに関与する医師の好みや経験などの要因によって変動し得ることを認識するであろう。

20

【0086】

本発明による組成物は、ヒトでの使用のために投与されてもよいし、動物薬として投与されてもよい。本願に記載の組成物は、それを必要とする患者に、皮下、吸入、経口、非経口又は局所経路などの様々な経路で投与することができる。組成物は当業者に周知の任意の形態とすることができ、これらには例えば錠剤、カプセル、粉末、顆粒、トローチ剤、クリーム、又は滅菌注射液や懸濁液などの液体製剤が含まれる。

【0087】

一態様において、上記組成物は静脈内点滴又は注射による投与に有用である。静脈内用又は注射用製剤は、当業者に周知の方法に従って調製され得る。例えば、本願に記載の化合物を注射用水に溶解し、次に濾過滅菌し、さらに上記濾過済み組成物を適切なバイアルに移すことができる。

30

【0088】

一態様によれば、上記組成物は凍結乾燥される。凍結乾燥粉末は、使用前に、例えば注射による投与前に、又は（例えばネブライザーや他の適切な吸入器を用いた）吸入による投与前に、例えば注射用水で再構成される。そのため、別の態様によれば、上記組成物は吸入による投与用に製剤化される。本願に記載の化合物は、保存剤、緩衝剤、及び抗酸化剤、又は希釈剤を含むがこれらに限定されない1種又は複数種の薬学的に許容される賦形剤を含んでいてもよい。好適な希釈剤には、例えば注射用水、0.9% NaCl、0.9% NaCl中5%のデキストロース、水中5%のデキストロース、0.45% NaCl中5%のデキストロース、0.225% NaCl中5%のデキストロース、及び乳酸加リンガー液が挙げられる。

40

【0089】

本願に記載の化合物はさらに、1種又は複数種の追加の抗菌薬と共に投与されてもよい。本願に記載の化合物は、別の抗菌薬と併用される時、その1種又は複数種の他の抗菌薬と同時に、別々に、又は連続的に投与されてもよい。

【0090】

本発明は、例示の目的で下記において更に説明される。本発明の範囲は下記の実施例の範囲によって何らかの形で限定されることが理解されるものとする。

50

実施例

本開示は下記の実験の部によりサポートされ、裏付けられるが、それらに限定されるものではない。

【0091】

実施例 1 :

出発材料。

単離ポリミキシン E 1 硫酸塩 (3 . 5 g) 及びヒドロキシメタンスルホン酸ナトリウム (11 . 3 g) の 45 % w / w 水溶液を混合し、攪拌しながら 60 に加温した。続いて、2 M NaOH を何度か添加することにより pH を 7 . 0 ~ 7 . 5 に維持した。18 時間後、混合物を周囲温度まで冷却し、200 mL のメタノール / アセトニトリル 1 / 1 v / v 中での沈殿により、粗生成物を白色固体として得た。

10

【0092】

上記生成物を脱塩し、下記の手順により精製した : C18 カラム 6 μ 例えば Phenomenex (登録商標) X Bridge Prep Shield 10 $\times$ 250 mm 又は同様のものを洗浄し、5 % MeCN (無塩) で平衡化した。そのカラムを Waters Delta Prep HPLC システム、150 mL / 分最大流に装着した。検出器は、280 nm に調整された 5a Waters 2487 であった。230 mg PE1 - (SM) ₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} の 9 mL 5 % MeCN 溶液と 1 mL 2 M NaCl の混合物をカラムに装填し、流量は 6 ~ 8 mL / 分とした。

20

【0093】

カラムを溶出させ、6 ~ 8 mL / 分の 5 % MeCN で脱塩させて、PE1 - (SM) ₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} 画分を回収した。この手順の間、いくらかの分解がカラム上で生じたが、最初と最後を除外することで高純度が維持される。最初の画分 (Head Fraction)、約 (ca.) 35 mL を、450 mL の 100 % MeCN 中に直接回収し、更に 550 mL の 100 % MeCN を加えてから、2 L 洋梨型蒸発フラスコ内で 97 : 3 の MeCN : H₂O の溶液を真空蒸発させた。

【0094】

蒸留プロセスはビュッヒ (Buechi) 15 Rotavapor (登録商標) で実施した。94 : 6 共沸混合物が蒸留除去され、2 L 真空蒸留フラスコ内に水非含有 PE1 - (SM) ₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} 残留物が形成された。この残留物を 3 $\times$ 8 mL 100 % MeOH (無水) で取り出し、50 mL 真空蒸発フラスコに注いで 1 ~ 2 mL の MeOH - PE1 - (SM) ₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} 懸濁液となるまで真空蒸発させた。15 mL の 100 % MeCN を加え、20 溶液 / 懸濁液を 35 のウォーターバスで真空蒸発させて更に乾燥させた。この手順の間、圧力は 70 ~ 60 Torr (9330 ~ 8000 Pa) から 20 ~ 15 Torr (2670 ~ 2000 Pa) まで低下させた。真空を維持したまま、35 ウォーターバス中でゆっくりと回転させながら、更なる真空乾燥を 30 分間行った。PE1 - (SM) ₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} 物質の収量は 150 mg であった。

30

【0095】

実施例 2

モノ (N^y - ビス - スルホメチル) ポリミキシン E 1 を含む混合物の製造。

40

スルホメチル化ポリミキシンがコリスチンに分解すると、ヒドロキシメタンスルホン酸塩が遊離する。ヒドロキシメタンスルホン酸塩は容易に元のスルホメチル化分子を再生成するため、この工程は可逆性である。

【0096】

この研究の目的は、ナノ濾過を用いてヒドロキシメタンスルホン酸塩を継続的に除去することによる非平衡条件下でのスルホメチル化ポリミキシンの分解を調べることであった。

【0097】

実験は、2 L の RO 水中 10 mM PE1 - (SM) ₁₀^{1, 3, 5, 8, 9} で設定し、この溶液の体積は、RO 水を頻繁に添加することにより濾過ユニット内で一定に保った

50

。ナノ濾過ユニットは3 bar (300 kPa) の圧力下、40℃で毎日のキャンペーンで運転し、毎回約5 lの廃液を除去した。pHは0.1 M HClで8.0、7.0、6.5及び6.0に安定するまで調整した。結果を図6～11に示す。

【0098】

ポリミキシンのジ-スルホメチル化はMSデータで確認される。図12は、ネガティブモードで得られたMSスペクトル、 m/z 677.3 [-2] 及び1355.5 [-1]を示す。

【0099】

実施例3：低置換度コリスチンの合成。

硫酸コリスチン(1.0 g、0.71 mmol)を20 mlの水に溶解させた。45%ヒドロキシメタンスルホン酸ナトリウム(0.847 g、2.841 mmol)及びNaHCO₃(0.12 g、1.40 mmol)を加えた。この透明な溶液を25℃で12時間撹拌した。100 mlのアセトニトリル及びメタノール(50:50)をゆっくり添加することにより生成物を沈殿させた。生成物を白色粉末として単離した。

10

【0100】

実施例4a：低置換度ポリミキシンE1の合成。

ポリミキシンE1(1.0 g、0.71 mmol)を20 mlの水に溶解させた。45%ヒドロキシメタンスルホン酸ナトリウム(0.847 g、2.841 mmol)及びNaHCO₃(0.12 g、1.40 mmol)を加えた。この透明な溶液を25℃で12時間撹拌した。100 mlのアセトニトリル及びメタノール(50:50)をゆっくり添加することにより生成物を沈殿させた。生成物を白色粉末として単離した。

20

【0101】

実施例4b：低置換度ポリミキシンE1のクロマトグラフィー及びMS。

実施例4aで製造したモノ(ビス-スルホメチル化)ポリミキシンE1を質量分析(ネガティブモードのMS)及びUVコンパチブル法で分析した。ここで、分離はpH 6.6で行った。図13の上は、2つのスルホメチル基を有する5つの個々のポリミキシン成分の存在を示すクロマトグラムを示す(215 nmのUVシグナル)。図13の下は、モノ(ビス-スルホメチル化)ポリミキシンE1に一致する質量に対する抽出イオン電流(EIC)を示す(677.62、1356.2、1378.06の m/z)。

30

【0102】

図14は、モノ(ビス-スルホメチル化)ポリミキシンE1の個々の質量スペクトルを示す。677の m/z はモノ(ビス-スルホメチル化)ポリミキシンE1の[M+2H]²⁺に一致し、1356は[M+H]⁺に一致し、1378は[M+Na]⁺に一致する。

【0103】

実施例5：MIC

約93%のモノ(N^Y-ビス-スルホメチル)ポリミキシンE1を含む試料を、気管支敗血症菌(*Bordetella bronchiseptica*)、ATCC 4617に対するMIC分析に供した。微生物力価は611 µg/gであることが測定された。

40

【0104】

MICアッセイ

試験生物を振とうフラスコ内で約16時間、250 rpmで、緑膿菌については34、クレブシエラ・バウマニ(*Klebsiella baumannii*)及びアシネトバクター・バウマニについては37℃で培養した。これらを後期対数まで再培養し、使用濃度に希釈し、グリセロールと共に-75℃で凍結させた。使用した培地はミューラー・ヒントンブロスであった。

【0105】

試料は、5 mgの化合物を1 mlのミューラー・ヒントンブロスに溶解させることにより調製した。試料を希釈してウェルに添加し、試験生物を添加して、クレブシエラ・バウマニ及びアシネトバクター・バウマニについては振とうしながら37℃で、緑膿菌につい

50

ては振とうせずに34で、約16時間インキュベーションした後、増殖の阻害をOD₆₀₀によって測定した。結果を表1に示す。

【0106】

【表1】

表1

試料	緑膿菌	K.ニューモニエ	A.バウムニ
モノ(N ^γ -ビス-スルホメチル)ポリミキシンE1	4 μg/ml	8 μg/ml	4 μg/ml
コリスチン	2 μg/ml	4 μg/ml	0.5 μg/ml
CMS	4 μg/ml	8 μg/ml	4 μg/ml

10

【0107】

実施例6：本発明の化合物の毒性

KIM-1(腎臓損傷分子-1)を急性尿細管壊死のバイオマーカーとして用いて、腎臓毒性を測定した。

【0108】

93%モノ(N^γ-ビス-スルホメチル)ポリミキシンE1又はCMSを含む混合物でマウスを5日間処置し、毒性の臨床兆候及びKIM-1の尿中濃度をモニタリングした。5日間の処置中にマウスは毒性の臨床兆候を示さなかった。尿中のKIM-1レベルはビヒクル処置と比較して僅かな増加を示した。マウスの尿中のKIM-1の正常な範囲は456~8048pg/mlであることが、ELISAキットの説明書に記載されている。

20

【0109】

この混合物を乾燥粉末として受け取り、注射直前にバイアル中で滅菌生理食塩水に溶解させ、表1に記載の濃度にした。

5日間にわたって1日1回、表1に示す用量に一致する0.2ml量でマウスを頸部において皮下処置した。投薬は28gの平均体重を基準とした。

【0110】

2回目の投薬から24時間後及び5回目の投薬から4時間後に尿試料を採取した。試料は、KIM-1濃度について解析されるまで-80で保管された。

尿試料を解凍し、2000gで5分間遠心し、50倍に希釈してから、Quantikine ELISAマウスTIM-1/KIM-1/HAVCRイムノアッセイキットの説明書に従ってELISAを行った。

30

【0111】

【表 2】

表 1. 処置計画

処置：用量	投薬溶液の濃度	マウスの数
93%モノ（N ^γ -ビス-スルホメチル）ポリミキシン E1 を含む 混合物：25 mg/kg	3.5 mg/ml	5
93%モノ（N ^γ -ビス-スルホメチル）ポリミキシン E1 を含む 混合物：30 mg/kg	4.3 mg/ml	5
CMS：32 mg/kg	4.7 mg/ml	5
ゲンタマイシン：80 mg/kg	12 mg/ml	5
ビヒクル		5

10

【 0 1 1 2 】

試験した混合物は全て、体重及び臨床スコアで決定したように、マウスでの忍容性が良好であった。93%モノ（N^γ-ビス-スルホメチル）ポリミキシン E1 を含む混合物を注射したマウスの群では、注射部位の皮膚で厚化が見られた。しかし、観察された尿中 KIM-1 レベルの増加は極僅かであり、有意ではなかった。

20

【 0 1 1 3 】

【表 3】

表 2. 5回投薬後の尿中 KIM-1 濃度

処置	マウス id	KIM-1 (pg/ml)
93%モノ (N'-ビス-スルホメチル) ポリミキシン E1 を含む混合物 25 mg/kg	31	5400
	32	4700
	33	1600
	34	9500
	35	7350
93%モノ (N'-ビス-スルホメチル) ポリミキシン E1 を含む混合物 30 mg/kg	36	6800
	37	3200
	38	8900
	40	5500
CMS 32 mg/kg	41	12700
	42	4350
	43	1950
	44	3800
	45	3800
ゲンタマイシン 80 mg/kg	46	12850
	47	5900
	48	5750
ビヒクル	51	6950
	52	5400
	54	2500

10

20

30

【0114】

実施例 6：モノビス - スルホメチル化ポリミキシン E 1 の *in vivo* 活性
 緑膿菌 (PAX 11045 株) の肺感染のマウスモデルを、ポリミキシン E 1、CMS
 E 1 及びモノビス - スルホメチル化ポリミキシン E 1 の腹膜投与で処置した。CFU は
 、非処置群のマウスを除く 22 時間後の肺組織におけるコロニー形成単位の算出数である。
 臨床スコアは表 3 に示すように、各時点での観察に基づく。

【0115】

【表 4】

表 3 :

処置	log10 CFU 肺	平均 log10 CFU	T=19 での 臨床スコア	T=22 での 臨床スコア
なし T=4	6.00 6.08 6.06 6.19 6.15	6.10		
ポリミキシン E1 (用量 : 10 mg/kg)	5.65 4.08 6.06 4.05 3.78 3.70 3.72	4.43	3 2 3 3 3 3 3	4 2 4 3 3 3 3
モノ (Ny-ビス-ス ルホメチル) ポリ キシン E1 を含む 混合物 (用量 : 51 mg/kg)	6.67 7.17 6.13 5.14 4.63 3.83	5.60	4 4 4 3 3 3	 3 3 3
CMS E1 (用量 : 41 mg/kg)	3.95 5.40 3.98 4.60 4.65 4.60	4.53	2 4 3 3 3 3	2 3 3 3 3
ビヒクル	7.05 7.15 7.13 6.35 6.57 6.05 7.30	6.80	3 3 3 3 3 3 3	5 5 5 4 4 4 4

スコア 0

健康

スコア 1

皮膚における立毛、苦悶及び引きこもり等の、感染及び炎症の軽度な臨床兆候

スコア 2

体位の変化、行動パターンの変化、好奇心の欠乏又は活動性の変化等の、感染の中程度の兆候

スコア 3

強張った動き、強制換気等の、感染の重度の徴候

スコア 4

重度の疼痛。苦痛を最小限にするため、マウスを直ちに屠殺した。

スコア 5

マウスは死亡した。

10

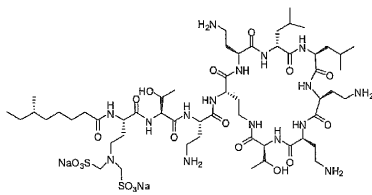
20

30

40

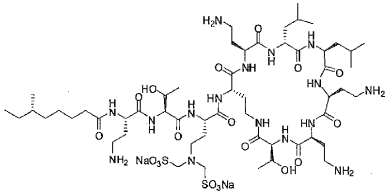
【 図 1 】

Figure 1:

PE1-(SM)₂¹

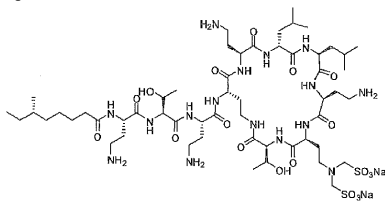
【 図 2 】

Figure 2:

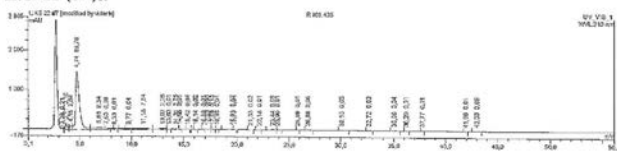
PE1-(SM)₂³

【 図 5 】

Figure 5:

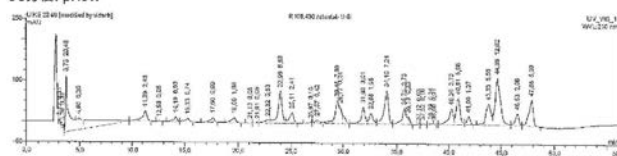
PE1-(SM)₂⁹

【 図 6 】

出発 PE1-(SM)₁₀^{1,3,5,8,9}

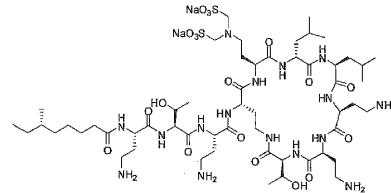
【 図 7 】

90分後、pH9.:



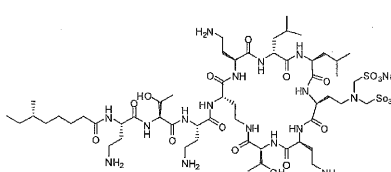
【 図 3 】

Figure 3:

PE1-(SM)₂⁵

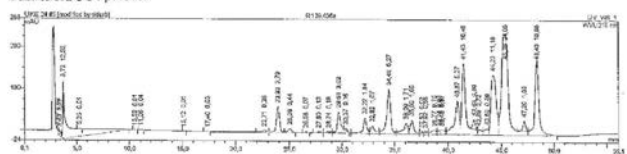
【 図 4 】

Figure 4:

PE1-(SM)₂⁸

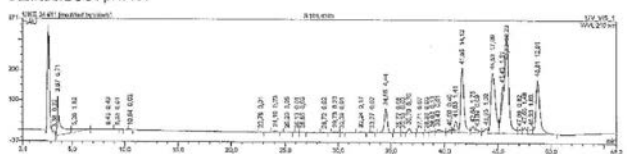
【 図 8 】

3日間変化なし、pH8.0:



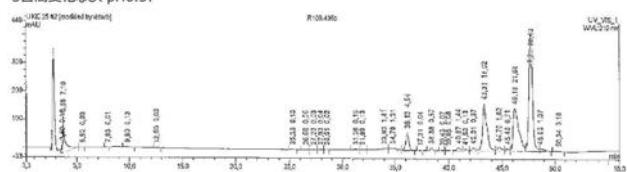
【 図 9 】

3日間変化なし、pH7.0:



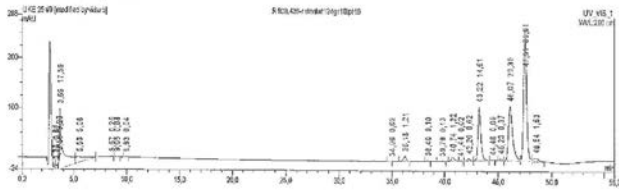
【 図 10 】

3日間変化なし、pH6.5:



【図 1 1】

3日間変化なし、pH6.0:



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/064764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K7/62
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCMILLAN F H ET AL: "Sodium colistimethate. I. Dissociations of aminomethanesulfonates in aqueous solution.", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES JUN 1969, vol. 58, no. 6, June 1969 (1969-06), pages 730-737, XP002744109, ISSN: 0022-3549 page 736 - page 737; figures 7-9 ----- -/--	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 September 2015

Date of mailing of the international search report

25/09/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pinheiro Vieira, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/064764

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LI J ET AL: "Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria", INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS, ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL, vol. 25, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 11-25, XP027807891, ISSN: 0924-8579 [retrieved on 2005-01-01] page 13 -----	1-10
Y	J. LI ET AL: "Stability of Colistin and Colistin Methanesulfonate in Aqueous Media and Plasma as Determined by High-Performance Liquid Chromatography", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 47, no. 4, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 1364-1370, XP055211621, ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.47.4.1364-1370.2003 page 1368; figure 3 -----	1-10
X,P	European Medicines Agency: "Review under Article 5(3) of Regulation EC(No) 726/2004; Polymyxin-based products", 26 February 2015 (2015-02-26), 26 February 2015 (2015-02-26), XP002744110, Retrieved from the Internet: URL:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2015/05/WC500187326.pdf [retrieved on 2015-09-07] the whole document -----	1-10
Y,P	WO 2014/108469 A1 (XELLIA PHARMACEUTICALS APS [DK]) 17 July 2014 (2014-07-17) the whole document -----	1-10
Y,P	WO 2014/195405 A1 (XELLIA PHARMACEUTICALS APS [DK]) 11 December 2014 (2014-12-11) cited in the application the whole document -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/064764

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014108469 A1	17-07-2014	AU 2014204873 A1 CA 2895910 A1 TW 201429995 A WO 2014108469 A1	09-07-2015 17-07-2014 01-08-2014 17-07-2014
WO 2014195405 A1	11-12-2014	TW 201522364 A WO 2014195405 A1	16-06-2015 11-12-2014

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100142907

弁理士 本田 淳

(74)代理人 100152489

弁理士 中村 美樹

(72)発明者 ビョルンスタッド、ヴィダル

ノルウェー国 N - 1 1 5 5 オスロ グリンマーヴェイエン 1 4

(72)発明者 グンネス、セルヴィ

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

(72)発明者 コッホ、トーベン

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

(72)発明者 メランダー、クラス

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

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA17 BA24 CA04 CA59 NA02 NA03

NA14 ZB351

4H045 AA10 AA30 BA30 EA29 FA10