

(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2018-500387

(P2018-500387A)

(43) 公表日 平成30年1月11日(2018.1.11)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
A61K 31/609 (2006.01)	A 61 K 31/609	Z N A	4 C 084
A61K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00		4 C 086
A61P 31/04 (2006.01)	A 61 P 31/04		
A61P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 1 1	
A61K 38/05 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 2 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-545516 (P2017-545516)	(71) 出願人	509061863 ヴィクトリア・リンク・リミティド ニュージーランド国、ウェリントン 61 40, ケルバーン, ケルバーン パレード , ランキン ブラウン ビルディング, ア ールビー 905
(86) (22) 出願日	平成27年11月17日 (2015.11.17)	(74) 代理人	110001508 特許業務法人 津国
(85) 翻訳文提出日	平成29年6月27日 (2017.6.27)	(72) 発明者	コップ, ジャニン・ナオミ ニュージーランド国、ネルソン 7005 、ルビー・ペイ、パイン・ヒル・ロード 77
(86) 國際出願番号	PCT/NZ2015/050192		
(87) 國際公開番号	W02016/080846		
(87) 國際公開日	平成28年5月26日 (2016.5.26)		
(31) 優先権主張番号	702001		
(32) 優先日	平成26年11月17日 (2014.11.17)		
(33) 優先権主張国	ニュージーランド (NZ)		

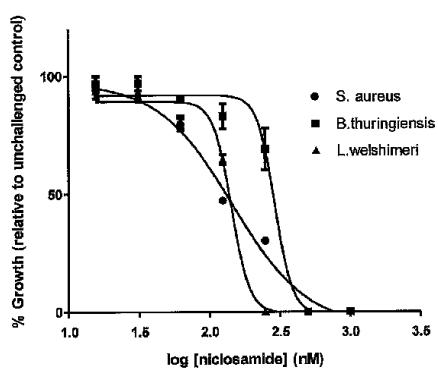
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗菌化合物

(57) 【要約】

本発明は、細菌の成長を標的にするのに有効なサリチルアミド化合物及びその組成物に関する。本発明の化合物及び組成物は、例えば、細菌感染症の予防又は治療、及びバイオフィルム形成の予防、低減又は排除に、特に有用である。

Figure 20



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

グラム陽性菌感染症を治療又は予防するための方法であって、処置を必要とする患者にサリチルアミド化合物を患者におけるグラム陽性菌感染症を治療又は予防するのに十分な量で投与することを含む、方法。

【請求項 2】

グラム陽性菌を含む細菌バイオフィルムの形成を低減又は排除するための方法であって、サリチルアミド化合物を該バイオフィルムの形成を予防、低減又は排除するのに十分な量で投与することを含む、方法。

【請求項 3】

サリチルアミド化合物が、ニクロサミド又はニタゾキサニドである、請求項 1 又は請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

グラム陽性菌が、スタフィロコッカス (Staphylococcus)、リステリア (Listeria) 及びバチルス (Bacillus) からなる 1 以上の属から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

以下における使用のためのサリチルアミド化合物であって：

(i) 患者における細菌感染症を治療若しくは予防すること；又は

(ii) 細菌バイオフィルムの形成を予防、低減若しくは排除すること、

該細菌が引き起こす感染症又はバイオフィルム形成がグラム陽性菌を含む、サリチルアミド化合物。

【請求項 6】

患者における細菌感染症を治療若しくは予防することにおける使用のための又は細菌バイオフィルムを低減若しくは排除するための、サリチルアミド化合物を許容し得る賦形剤又は担体と一緒に含む医薬組成物又は生物学的組成物（ここで、該細菌が引き起こす感染症又はバイオフィルム形成は、グラム陽性菌を含む）。

【請求項 7】

サリチルアミド化合物が、ニクロサミド若しくはその類似体、又はニタゾキサニド若しくはその類似体である、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物及び少なくとも 1 つの排出ポンプ阻害化合物を含む、併用剤、相乘的併用物、抗菌剤、組成物又は医薬組成物。

【請求項 9】

少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物及び少なくとも 1 つの排出ポンプ阻害化合物の併用物又は組成物の医薬としての使用。

【請求項 10】

細菌感染症を治療又は予防するための方法であって、処置を必要とする患者に少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物及び少なくとも 1 つの排出ポンプ阻害化合物を患者における細菌感染症（ここで、該細菌が引き起こす感染症は、グラム陰性菌を含む）を治療又は予防するのに十分な量で投与することを含む、方法。

【請求項 11】

少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物による毒性から細菌細胞を保護するための方法（ここで、該サリチルアミド化合物は、1 以上のニトロ基を含む）であって、細胞中の少なくとも 1 つのニトロレダクターゼ酵素の発現及び／又は活性をサリチルアミド化合物による毒性から保護するのに十分な量で増加させることを含む、方法。

【請求項 12】

患者における細菌感染症を治療若しくは予防するための又は細菌バイオフィルムの形成を予防、低減若しくは排除するための方法（ここで、該細菌は、ニトロ - プロドラッグ抗生物質での処置に耐性を持つようになっている）であって、少なくとも 1 つのサリチルア

10

20

30

40

50

ミド化合物（ここで、該サリチルアミド化合物は、1以上のニトロ基を含む）を、感染症を治療若しくは予防するのに又はバイオフィルムの形成を予防、低減若しくは排除するのに十分な量で投与することを含む、方法。

【請求項 1 3】

患者における細菌感染症を治療若しくは予防するための又は細菌バイオフィルムの形成を予防、低減若しくは排除するための方法（ここで、該細菌は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物又は少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の併用物での処置に耐性を持つようになっており、ここで、該サリチルアミド化合物は、1以上のニトロ基を含む）であって、ニトロ-プロドラッグ抗生物質を、感染症を治療若しくは予防するのに又はバイオフィルムの形成を予防、低減若しくは排除するのに十分な量で投与することを含む、方法。

10

【請求項 1 4】

抗生物質的に有効な量の以下：
(i) サリチルアミド化合物又はその薬学的に許容し得る塩；及び
(ii) 排出ポンプ阻害化合物又はその薬学的に許容し得る塩；
を含む組成物であって、化合物(i)及び(ii)が相乗的な抗生物質効果をもたらすのに十分な割合で用いられる、組成物。

【請求項 1 5】

サリチルアミド化合物が、ニクロサミド又はニタゾキサニドである、請求項8～14のいずれか一項に請求されるとおりの併用剤、併用物、組成物、使用、抗菌剤又は方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グラム陽性菌によって引き起こされる細菌感染症の予防又は治療に有効なサリチルアミド化合物及びその組成物に関する。本発明はさらに、グラム陰性菌によって引き起こされる細菌感染症の予防又は治療に有効な、排出ポンプ阻害剤と併せたサリチルアミド化合物、並びにその組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

多剤耐性菌の台頭は、21世紀におけるヒトが直面する最大の健康問題であろうと広く想定されている（Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B. and Bartlett, J. (2009). Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 48(1): 1-12; Piddock, L.J. (2012). The crisis of no new antibiotics--what is the way forward? *Lancet Infect Dis.* 12(3):249-53）。臨床医は、抗生物質耐性の症例にすでに日頃から直面しており、感染症を処置するのに以前は簡単であったことが、より困難になってきており、いくつかの症例では処置することが不可能になっている。ほぼ全てのクラスの抗生物質は、1970年以前に発見されており、過去30年間新しい主要クラスの抗生物質が開発されていない。大半の進歩は、最近では、公知の抗生物質の類似体の開発を通じた抗生物質クラスの範囲内であった。しかしながら、ある種の細菌に対して現在の抗生物質クラス全体が無効であるような耐性機序が発生している。

30

【0003】

抗生物質耐性率を減少させるために、抗生物質の適正な使用の教育及び感染症の発生を促進する形でのそれらの使用を制限することと共に、感染症の蔓延及び出現を最初の段階で制限するために、より一層の対策が講じられている。しかしながら、依然として、新しい抗生物質、特に、感染性疾患負荷のかなりの割合を占めるグラム陰性病原体に対して有効な抗生物質に対するニーズが存在する。

40

【0004】

50

ニクロサミド (N-(2'-クロロ-4'-ニトロフェニル)-5-クロロサリチルアミド) は、サリチルアニリド化合物である。サリチルアニリド類は、1950年代、マキガイ綱 *Biomphalaria glabrata* に対する 20,000 個の化合物のスクリーニング及び構造最適化の後、巻貝を殺すのに有用なものとして同定された (Goennert, R. (1961). Results of laboratory and field trials with the molluscicide Bayer 73)。Sun 及び Zhang (Sun, Z. and Zhang, Y. (1999). Antituberculosis activity of certain antifungal and antihelmintic drugs. *Tubercle and Lung Disease* 79(5): 319-320) は、グラム陽性菌とグラム陰性菌の両方の「抗酸 (acid fast)」細胞壁特性を持つがグラム陽性菌として大別されているマイコバクテリウム・ツベルクローシス (結核菌) (*Mycobacterium tuberculosis*) に対する活性について抗真菌薬及び抗蠕虫薬を調査した。彼らは、ニクロサミドが結核菌 (*M. tuberculosis*) に対して $0.5 \sim 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ の MIC で非常に活性であることを見いだした。ニクロサミドは、低酸素条件で成長させた非複製結核菌に対して活性であり、これは現在のところ結核菌感染症の長期処置の役目を負っている。この著者等は、組織培養で成長させたマクロファージに対する毒性を観察した。ニクロサミドのサリチルアニリド類似体は、結核菌処置でのそれらの使用をさらに調査するためにスクリーニングされている (Kratky, M., Vinsova, J., Buchta, V., Horvati, K., Boesze, S. and Stolarikova, J. (2010). New amino acid esters of salicylanilides active against MDR-TB and other microbes. *European journal of medicinal chemistry* 45(12): 6106-6113; Kratky, M., Vinsova, J., Novotna, E., Mandikova, J., Wsol, V., Trejtnar, F., Ullmann, V., Stolarikova, J., Fernandes, S. and Bhat, S. (2012). Salicylanilide derivatives block *Mycobacterium tuberculosis* through inhibition of isocitrate lyase and methionine aminopeptidase. *Tuberculosis* 92(5): 434-439)。

10

20

30

40

50

【0005】

また、de Carvalho et. al は、結核菌に対する有効性についてニクロサミド及び構造類似体のニタゾキサニドを調査した (de Carvalho, L. P. S., Darby, C. M., Rhee, K. Y. and Nathan, C. (2011). Nitazoxanide disrupts membrane potential and intrabacterial pH homeostasis of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS medicinal chemistry letters* 2(11): 849-854)。彼らは、ニクロサミド及びニタゾキサニドが結核菌の膜電位を脱共役させたが対照のリファンピシンはそのようにしなかったことを示した。

【0006】

グラム陰性病原性の間接的阻害剤としてのニクロサミドの可能性は、最近 Imperi et al. によって研究されており、彼らは、FDA 承認薬をスクリーニングして、シュードモナス・エルギノーサ (緑膿菌) (*Pseudomonas aeruginosa*) におけるクオラムセンシングシステムの任意の阻害剤を同定した (Imperi, F., Massai, F., Ramachandran Pillai, C., Longo, F., Zennaro, E., Rampioni, G., Visca, P. and Leoni, L. (2013). New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Antimicrob Agents Chemother* 57(2): 996-1005)。試験した薬物の中で、ニクロサミドが最も高い抗クオラムセンシング活性を示した。さらなる分析は、ニクロサミドがシグナル分子の合成よりはむしろクオラムセンシングシグナルへの応答を阻害できることを決定した。しかしながら、著者等は、ニクロサミドの直接的に毒性である役割も、ニクロサミドから細胞を防御する潜在的な薬剤排出の役割も考慮しなかったし、そして、著者等のデータによれば、ニクロサミドはマイクロモル濃度以上でのみクオラムセンシングの阻害において有効であると思われ、このことは、該薬物が実際には細胞の外に輸送されていたことを示唆している。

【0007】

多剤排出ポンプは、抗生素質のファミリー全体に対する耐性を付与することができる。排出ポンプは、グラム陰性菌とグラム陽性菌の両方において発現されるが、グラム陰性菌においてより強力な耐性機序である。これは、細胞質内への薬物透過性を低下させる二重細胞膜に起因し、そして、薬物が細胞質に達する前にペリプラズムから細胞外へ直ちに排出されるからである。5つの公知の多剤排出トランスポーターファミリーがある：小型多

剤耐性タンパク質ファミリー (small multidrug resistance protein family)、多剤・毒性化合物排出タンパク質ファミリー (multidrug and toxic compound extrusion protein family)、主要ファシリテーターファミリー (major facilitator family)、ATP結合力セットファミリー (ATP-binding cassette family) 及び耐性ノジュレーション細胞分裂ファミリー (resistance nodulation cell division family) (Paulsen, I. T., Chen, J., Nelson, K. E. and Saier Jr, M. H. (2001). Comparative genomics of microbial drug efflux systems. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 3 (2): 145-150)。最後の3つのファミリーは、グラム陰性群の内膜に位置していることが多く、そして、TolC等の外膜排出タンパク質、及び内膜トランスポーターと外膜トランスポーターとの間の相互作用を可能にするペリプラズム排出タンパク質と一緒に働く (Johnson, J. M. and Church, G. M. (1999). Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *Journal of Molecular Biology* 287(3): 695-715)。

10

20

30

【0008】
排出ポンプ阻害剤を抗生物質と一緒に送達することが、耐性であると同定されている菌株に対しても抗生物質の効力を増加させることができることは、公知である。フェニルアラニン-アルギニン-N-ナフチルアミド (PA-N) は、広域な宿主及び抗生物質範囲を有する排出ポンプ阻害剤である。Lomovskaya et al. (Lomovskaya, O., Warren, M. S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H. and Lee, V. J. (2001). Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(1): 105-116) は、臨床分離株においてフルオロキノロン類に対する耐性を付与することが公知である3つの排出ポンプを過剰発現した緑膿菌 (*P. aeruginosa*) 株を生成した。彼らは、抗生物質レボフロキサシンの存在下で成長阻害を測定することによって、合成及び天然の化合物ライブラリーをスクリーニングした。PA-N は、該排出ポンプの各々に対して活性であり、また大腸菌 (*E. coli*) における *AcrrAB-TolC* に対しても活性であった。この著者等は、排出ポンプ阻害剤を含めることが、フルオロキノロン類に対する感受性を増加させ、フルオロキノロン類に対する耐性を反転させ、かつ耐性が発生する頻度を減少させることを実証した。

30

【0009】
抗生物質耐性がヒト及び動物の健康に与える重大なリスクを考慮すると、感染症を治療及び予防するための新規な薬物 / 抗菌アプローチを開発するニーズが存在する。本発明は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を含む併用剤を提供することによってこのニーズに取り組むこと、又は少なくとも現行の抗菌薬の有用な代替物を提供することに努める。

40

【0010】
本明細書における先行技術文献へのいかなる言及も、そのような先行技術が広く公知であること又は当分野における共通する一般的な知識の一部を形成することの承認として見なされるべきではない。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】
1つの態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療又は予防することにおける使用のためのサリチルアミド化合物を提供する (ここで、該細菌が引き起こす感染症は、グラム陽性菌を含む)。

50

【0012】
別の態様において、本発明は、細菌バイオフィルムの形成を予防、低減又は排除することにおける使用のためのサリチルアミド化合物を提供する (ここで、該細菌が引き起こす

バイオフィルム形成は、グラム陽性菌を含む)。

【0013】

さらなる態様において、本発明は、患者における細菌感染症を処置することにおける使用のための又は細菌バイオフィルムの形成を予防、低減若しくは排除することにおける使用のための、サリチルアミド化合物を許容し得る賦形剤、担体又は塩と一緒に含む医薬組成物又は生物学的組成物を提供する(ここで、該細菌が引き起こす感染症又はバイオフィルム形成は、グラム陽性菌を含む)。

【0014】

別の態様において、本発明は、処置を必要とする患者に少なくとも1つのサリチルアミド化合物を患者における細菌感染症を治療又は予防するのに十分な量で投与することを含む、グラム陽性菌感染症を治療又は予防するための方法を提供する。

10

【0015】

なおさらなる態様において、本発明は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物をバイオフィルムの形成を低減又は排除するのに十分な量で投与することを含む、グラム陽性菌を含む細菌バイオフィルムの形成を低減又は排除するための方法を提供する。

【0016】

別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を処置することにおける又は細菌バイオフィルムの形成を予防、低減若しくは排除するための、サリチルアミド化合物の使用を提供する(ここで、該細菌が引き起こす感染症又はバイオフィルム形成は、グラム陽性菌を含む)。

20

【0017】

さらなる態様において、本発明は、患者における細菌感染症を処置するための又は細菌バイオフィルムの形成を予防、低減若しくは排除することにおける使用のための医薬の製造における、サリチルアミド化合物の使用を提供する(ここで、該細菌が引き起こす感染症又はバイオフィルム形成は、グラム陽性菌を含む)。

【0018】

本発明の上記態様に係るある例では、サリチルアミド化合物は、ニクロサミド若しくはその類似体、ニタゾキサニド若しくはその類似体、又はその任意の併用物である。

【0019】

本発明の上記態様に係る別の例では、グラム陽性菌は、スタフィロコッカス(*Staphylococcus*)、リステリア(*Listeria*)及びバチルス(*Bacillus*)からなる1以上の属から選択される。

30

【0020】

別の態様において、本発明は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を含む併用剤を提供する。

【0021】

なお別の態様において、本発明は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の相乘的併用物を提供する。

【0022】

別の態様において、本発明は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を含む組成物を提供する。ある例では、該組成物は、相乗的に有効な量のサリチルアミド化合物及び排出ポンプ阻害化合物を含む。

40

【0023】

さらなる態様において、本発明は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を許容し得る賦形剤、担体又は塩と一緒に含む医薬組成物又は生物学的組成物を提供する。

【0024】

本発明に係る併用剤又は組成物は、患者における細菌感染症を治療若しくは予防するために使用され得るか、又は、細菌バイオフィルムの形成を予防、低減若しくは排除するために使用され得る(ここで、該感染症又はバイオフィルムは、グラム陰性菌を含む)。本

50

発明に係る併用剤又は組成物は、1以上の殺菌剤又は静菌剤をさらに含み得る。

【0025】

したがって、別の態様において、本発明は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の併用物の医薬としての使用、又は少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を含む組成物の医薬としての使用を提供する。

【0026】

別の態様において、本発明は、医薬組成物の調製における使用のための、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の併用物を提供する。

10

【0027】

なお別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療又は予防するための、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の併用物の使用を提供する。

【0028】

別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療又は予防するための、薬学的に有効な量の少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を含む医薬組成物の使用を提供する（ここで、該感染症は、グラム陰性菌を含む）。

20

【0029】

さらなる態様において、本発明は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を含む抗菌剤を提供する。抗菌剤は、患者における細菌感染症を治療若しくは予防するために使用され得るか、又は、細菌バイオフィルムの形成を予防、低減若しくは排除するために使用され得る（ここで、該感染症又はバイオフィルムには、グラム陰性菌が存在する）。

【0030】

ある例では、バイオフィルムは、創傷及び／若しくは火傷内に感染症を引き起こすか又は留置医療機器上若しくは内部に感染症を引き起こし、あるいは、バイオフィルムは、食品業界用の調製用機械（preparative machinery）内部、食品業界によって使用される包装上、水若しくは他の液体に使用される貯蔵タンク内部、又は水処理プラントにおける機械内部に生じる。

30

【0031】

別の態様において、本発明は、医薬の製造における、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の使用を提供する。

【0032】

なお別の態様において、本発明は、医薬の製造における使用のための、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の併用物を提供する。

【0033】

なお別の態様において、本発明は、別個の単位剤形の少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を使用説明書と一緒に含むキットオブ・パーツ（kit of parts）を提供する。

40

【0034】

別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療又は予防するための、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を含む医薬組成物を提供する（ここで、該感染症は、グラム陰性菌を含む）。

【0035】

なお別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療又は予防するための医薬の製造における、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の使用を提供する（ここで、該感染症は、グラム陰性菌を含む）。

50

【0036】

なお別の態様において、本発明は、細菌感染症を治療又は予防する方法であって、処置を必要とする患者に少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を患者における細菌感染症を治療又は予防するのに十分な量で投与することを含む方法を提供する（ここで、該感染症は、グラム陰性菌を含む）。

【0037】

なお別の態様において、本発明は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物による毒性から細菌細胞を保護するための方法（ここで、該サリチルアミド化合物は、1以上のニトロ基を含む）であって、細胞中の少なくとも1つのニトロレダクターゼ酵素の発現及び/又は活性をサリチルアミド化合物による毒性から保護するのに十分な量で増加させることを含む方法を提供する。

10

【0038】

なお別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療又は予防するための方法（ここで、該細菌は、ニトロ-プロドラッグ抗生物質での処置に耐性を持つようになっている）であって、該患者に少なくとも1つのサリチルアミド化合物（ここで、該サリチルアミド化合物は、1以上のニトロ基を含む）を、感染症を治療又は予防するのに十分な量で投与することを含む方法を提供する。場合により、該方法は、少なくとも1つの排出ポンプ阻害剤を投与することをさらに含む。

【0039】

なお別の態様において、本発明は、細菌バイオフィルムの形成を予防、低減又は排除するための方法（ここで、該細菌は、ニトロ-プロドラッグ抗生物質での処置に耐性を持つようになっている）であって、少なくとも1つのサリチルアミド化合物（ここで、該サリチルアミド化合物は、1以上のニトロ基を含む）を該バイオフィルムの形成を予防、低減又は排除するのに十分な量で投与することを含む方法を提供する。場合により、該方法は、少なくとも1つの排出ポンプ阻害剤を投与することをさらに含む。

20

【0040】

なお別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療又は予防するための方法（ここで、該細菌は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物又は少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の併用物での処置に耐性を持つようになっており、ここで、該サリチルアミド化合物は、1以上のニトロ基を含む）であって、該患者にニトロ-プロドラッグ抗生物質を、感染症を治療又は予防するのに十分な量で投与することを含む方法を提供する。

30

【0041】

なお別の態様において、本発明は、細菌バイオフィルムの形成を予防、低減又は排除するための方法（ここで、該細菌は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物又は少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の併用物での処置に耐性を持つようになっており、ここで、該サリチルアミド化合物は、1以上のニトロ基を含む）であって、ニトロ-プロドラッグ抗生物質を該バイオフィルムの形成を予防、低減又は排除するのに十分な量で投与することを含む方法を提供する。

40

【0042】

本発明はまた、プロドラッグ耐性菌並びにプロドラッグ感受性菌を同時に標的化するために、ニトロ-プロドラッグとニクロサミドの同時投与も検討する。

【0043】

したがって、なお別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療若しくは予防するための又は細菌バイオフィルムの形成を予防、低減若しくは排除するための方法であって、ニトロ-プロドラッグ抗生物質及びニクロサミドを、該感染症を治療若しくは予防するのに又は該バイオフィルムの形成を予防、低減若しくは排除するのに十分な量で投与することを含む方法を提供する。

【0044】

ある例では、ニトロ-プロドラッグ抗生物質は、ニトロフラントイン、ニトロフラゾン

50

、メトロニダゾール、チニダゾール、フラゾリドン、ミソニダゾール、エタニダゾール、ニフルチモックス、オルニダゾール、ベンズニダゾール、ジメトリダゾール、ロニダゾール、R S U - 1 0 6 9 、 R B - 6 1 4 5 、 C B 1 9 5 4 、 E F 3 、 E F 5 、 H X 4 及びフッ化ミソニダゾールからなる群より選択される。

【0045】

なお別の態様において、本発明は、新規ニトロレダクターゼ酵素を同定するスクリーニング法であって、以下の工程を含む方法を提供する：

(i) 存在するニトロレダクターゼ遺伝子の標的又はランダム突然変異誘発を実施し、それによってニトロレダクターゼバリアント遺伝子ライブラリーを作製する工程；

(ii) 該バリアント遺伝子ライブラリーを、t o l C 遺伝子が欠失している又はt o l C 発現産物が阻害されているグラム陰性菌に形質転換し、そして、遺伝子バリアントが発現されるように該細胞を培養する工程；

(iii) 少なくとも1つのサリチルアミド化合物を形質転換された細菌細胞に投与する工程；

(iv) サリチルアミド毒性に対する感受性を欠いている細胞をスクリーニングし、それによって新規形態のニトロレダクターゼ酵素を発現する細胞を同定する工程；及び

(v) 場合により、該ニトロレダクターゼ酵素を精製する工程。

【0046】

ある例では、グラム陰性菌の内因性ニトロレダクターゼ遺伝子はノックアウトされているか、又は、グラム陰性菌におけるニトロレダクターゼ活性は低減若しくは排除されている。

【0047】

なお別の態様において、本発明は、環境を起源とするDNAの調製物から新規ニトロレダクターゼ酵素を同定するスクリーニング法であって、以下の工程を含む方法を提供する：

(i) その環境を起源とするDNAから細菌遺伝子ライブラリーを作製する工程；

(ii) 該遺伝子ライブラリーを、t o l C 遺伝子が欠失している又はt o l C 発現産物が阻害されているグラム陰性菌に形質転換し、そして、遺伝子ライブラリーが発現されるように該細胞を培養する工程；

(iii) 少なくとも1つのサリチルアミド化合物を形質転換された細菌細胞に投与する工程；

(iv) サリチルアミドに対する感受性を欠いている細胞をスクリーニングし、それによって新規形態のニトロレダクターゼ酵素を発現する細胞を同定する工程；及び

(v) 場合により、該ニトロレダクターゼ酵素を精製する工程。

【0048】

ある例では、グラム陰性菌の内因性ニトロレダクターゼ遺伝子はノックアウトされているか、又は、グラム陰性菌におけるニトロレダクターゼ活性は低減若しくは排除されている。

【0049】

別の例では、環境を起源とするDNAは、土壤を起源とする。

【0050】

なお別の態様において、本発明は、T o l C の新規阻害剤を同定するスクリーニング法であって、以下の工程を含む方法を提供する：

(i) T o l C を発現するグラム陰性菌を少なくとも1つのサリチルアミド化合物及びT o l C の候補阻害剤の存在下で培養する工程；並びに

(ii) サリチルアミド毒性に感受性である細胞をスクリーニングし、それによってT o l C の新規阻害剤を同定する工程。

【0051】

ある例では、サリチルアミド化合物及び排出ポンプ阻害化合物は、相乗的な抗菌効果を提供する。

10

20

30

40

50

【0052】

別の態様において、本発明は、抗生物質的に有効な量の以下：
 (i) サリチルアミド化合物又はその薬学的に許容し得る塩；及び
 (ii) 排出ポンプ阻害化合物又はその薬学的に許容し得る塩；
 を含む組成物であって、化合物(i)及び(ii)が相乗的な抗生物質効果をもたらすのに十分な割合で用いられる、組成物を提供する。

【0053】

ある例では、細菌感染症は、1以上のグラム陰性菌によって引き起こされる細菌感染症である。

【0054】

別の例では、細菌感染症は、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、バークホルデリア・マルチボランス(*Burkholderia multivorans*)、シュードモナス・シリンガエ・p v. アクチニディア(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) (Psa-V)、ナイセリア・ゴノレア(淋菌)(*Neisseria gonorrhoeae*)、アシネットバクター・バウマニ(*Acinetobacter baumannii*)、赤痢菌種(*Shigella species*)、サルモネラ種(*Salmonella species*)又はエンテロバクター種(*Enterobacter species*)によって引き起こされる。

10

【0055】

さらなる例では、サリチルアミド化合物は、1以上のニトロ基を含む。

20

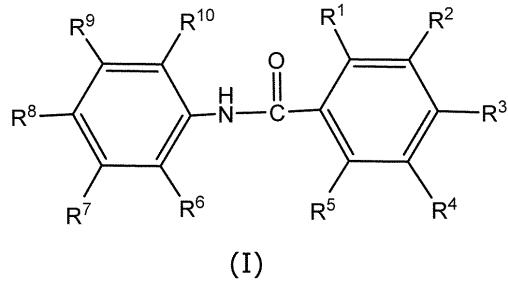
【0056】

ある例では、サリチルアミド化合物は、サリチルアニリド化合物であり、かつ1以上のニトロ基で置換されていてよい。

【0057】

別の例では、サリチルアニリド化合物は、式(I)：

【化1】



30

[式中、

R¹、R²、R³、R⁴及びR⁵は、各々独立して、水素、ヒドロキシ及びハロゲンからなる群より選択されるが、但し、R¹、R²、R³、R⁴及びR⁵の少なくとも1つはハロゲンであり、そして、R¹、R²、R³、R⁴及びR⁵の少なくとも1つはヒドロキシであり；

R⁶、R⁷、R⁸、R⁹及びR¹⁰は、各々独立して、水素、ニトロ及びハロゲンからなる群より選択されるが、但し、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹及びR¹⁰の少なくとも1つはハロゲンであり、そして、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹及びR¹⁰の少なくとも1つはニトロである]

40

で示される化合物又はその薬学的に許容し得る塩である。

【0058】

特定の例では、式(I)中の任意のハロゲンは、クロロ、フルオロ及びブロモからなる群より選択される。より好ましくは、式(I)中の少なくとも1つのハロゲンは、クロロである。

【0059】

ある例では、式(I)中のR⁸はニトロである。代替的に、R⁹はニトロである。代替

50

的に、R¹～R⁷はニトロである。代替的に、R⁷はニトロである。

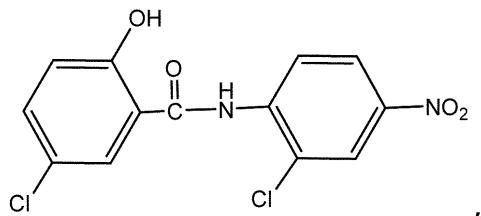
【0060】

関連する例では、サリチルアニリド化合物は、以下の表1から選択される化合物である。

【0061】

さらなる関連する例では、サリチルアニリド化合物は、以下の構造を有するニクロサミド又はその薬学的に許容し得る塩である：

【化2】



10

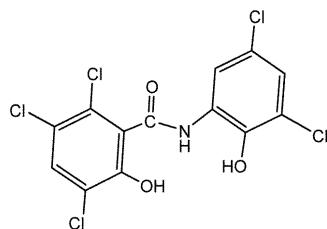
【0062】

ある例では、薬学的に許容し得る塩は、エタノールアミン塩又はピペリジン塩である。

【0063】

代替的に、サリチルアミド化合物は、以下の構造を有するクロサンテル；

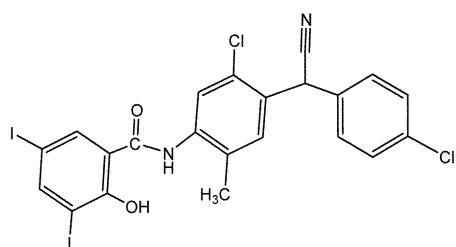
【化3】



20

以下の構造を有するオキシクロナジド (oxyclonazide)；

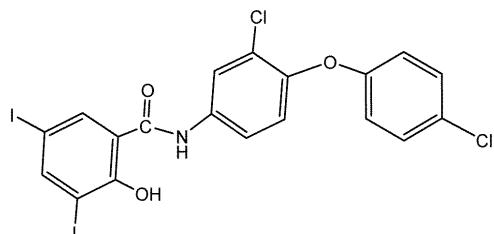
【化4】



30

以下の構造を有するラフォキサニド；

【化5】

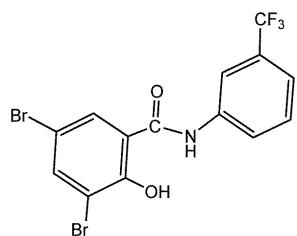


40

以下の構造を有するフルサラン；

50

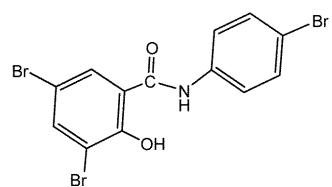
【化6】



以下の構造を有するトリブロムサラン；

10

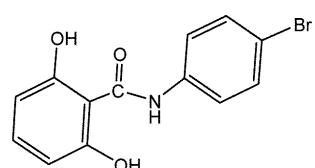
【化7】



以下の構造を有するレソランテル；

20

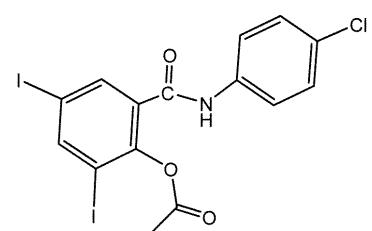
【化8】



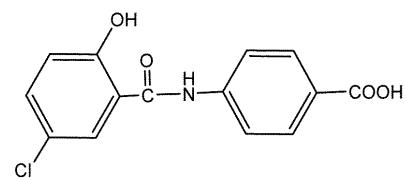
以下の構造を有するクリオキサニド；

30

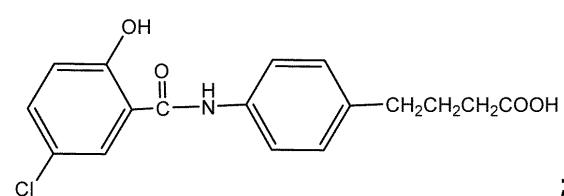
【化9】



【化10】



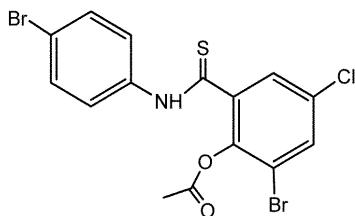
40



及び

50

以下の構造を有するプロチアニド；
【化11】



10

からなる群、又はそのエステル形態若しくはその薬学的に許容し得る塩より選択される。

【0064】

代替的に、サリチルアニリド化合物は、ニタゾキサニド（2 - アセチルオキシ - N - (5 - ニトロ - 2 - チアゾリル) ベンズアミド）又はその薬学的に許容し得る塩である。

【0065】

ある例では、排出ポンプ阻害化合物は、グラム陰性菌排出ポンプの阻害剤、例えば、大腸菌 *A c r A B - T o 1 C* 排出ポンプの同族体である。

【0066】

ある例では、排出ポンプ阻害剤は、フェニルアラニン - アルギニン - ナフチルアミド (PAN) 又は 2 - 3ジプロモマレイミドである。

20

【0067】

別の例では、サリチルアミド化合物と排出ポンプ阻害化合物のモル比は、約 1 : 500 ~ 約 1 : 7 である。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】図1は、*t o 1 C* 遺伝子の欠失が大腸菌をニクロサミドに対して強く感受性にすることを示す。大腸菌 *7 K O* 又は *7 K O - t o 1 C* 菌株の一晩培養物を使用して LB 培地の新鮮アリコートに植菌し、これを次いで 30 、 200 rpm で 2.5 時間インキュベートする。その後、各培養物のアリコート 40 μ L を、384 ウェルマイクロプレート内の、2 × 所望のニクロサミド終濃度（すなわち、5 μ M ~ 20 nM の最終 2 倍希釈系列をもたらす）又は 0 μ M 対照を含有する LB 培地 40 μ L に加える。プレートを、30 、 200 rpm で 4 時間インキュベートする。菌株毎に 0 μ M 対照に相対的な成長百分率を計算するために、培養物濁度を 600 nm での光学密度によってモニタリングする。データは、少なくとも 2 つの独立した実験の平均 \pm SEM である。

30

【図2】図2は、*T o 1 C* 阻害剤 PAN が大腸菌をニクロサミドに対して感受性にできることを示す。大腸菌 *7 K O* の一晩培養物を使用して LB 培地の新鮮アリコートに植菌し、これを次いで 30 、 200 rpm で 2.5 時間インキュベートする。その後、各培養物のアリコート 40 μ L を、384 ウェルマイクロプレート内の、2 × 所望のニクロサミド終濃度（すなわち、10 μ M ~ 160 nM の最終 2 倍希釈系列をもたらす）又は 0 μ M 対照、並びに 0 μ M、25 μ M 又は 50 μ M PAN のいずれかを含有する LB 培地 40 μ L に加える。*7 K O - t o 1 C* の一晩培養物を、PAN を添加することなしに同様に処理する。384 ウェルプレートを 30 、 200 rpm で 4 時間インキュベートする。各系列について 0 μ M ニクロサミド対照に相対的な成長百分率を計算するために、培養物濁度を 600 nm での光学密度によってモニタリングする。データは、3 反復の平均 \pm 1 標準偏差である。

40

【図3】図3は、ニクロサミド曝露に対する大腸菌株 *7 K O* 及び *D H 5* の相対感受性を示す。大腸菌 *7 K O* 又は *D H 5* の一晩培養物を使用して LB 培地の新鮮アリコートに植菌し、これを 30 、 200 rpm で 2.5 時間インキュベートする。その後、各培養物のアリコート 40 μ L を、384 ウェルマイクロプレート内の、2 × 所望のニクロサミド終濃度（すなわち、40 μ M ~ 20 nM の最終 2 倍希釈系列をもたらす）又は 0 μ M 対照を含

50

有する L B 培地 40 μ Lに加える。プレートを 30 、 200 rpmで 4 時間インキュベートする。菌株毎に 0 μ M 対照に相対的な成長百分率を計算するために、培養物濁度を 600 nmでの光学密度によってモニタリングする。データは、少なくとも 2 つの独立した実験の平均 \pm SEM である。

【図 4】図 4 は、異なる天然のニトロレダクターゼ候補を過剰発現する大腸菌 7KO_to1C 菌株のニクロサミド成長阻害を示す。表示のとおりの異なるニトロレダクターゼ候補遺伝子を過剰発現する大腸菌 7KO_to1C 菌株の一晩培養物を使用して L B 培地の新鮮アリコートに植菌し、これを 30 、 200 rpmで 2.5 時間インキュベートする。その後、各培養物のアリコート 40 μ Lを、384 ウェルマイクロプレート内の、2 × 所望のニクロサミド終濃度（すなわち、4 μ M～16 nMの最終 2 倍希釈系列をもたらす）又は 0 μ M 対照を含有する L B 培地 40 μ Lに加える。プレートを 30 、 200 rpmで 4 時間インキュベートする。菌株毎に 0 μ M 対照に相対的な成長百分率を計算するために、培養物濁度を 600 nmでの光学密度によってモニタリングする。データは、少なくとも 3 つの独立した実験の平均 \pm SEM である。

【図 5】図 5 は、2.5 μ M ニクロサミドでの曝露に対する異なるニトロレダクターゼ候補の防御能を示す。オキシドレダクターゼを過剰発現する大腸菌 7KO_to1C 菌株（各オキシドレダクターゼの起源及び命名法は、W O 2 0 1 2 / 0 0 8 8 6 0 号及びProsser, G.A., Copp, J.N., Mowday, A.M., Guise, C.P., Syddall, S.P., Williams, E.M., Horvat, C.N., Swe, P.S., Ashoorzadeh, A., Denny, W.A., Smaill, J.B., Patterson, A.V. and Ackerley, D.F. (2013). Creation and screening of a multi-family bacteria I oxidoreductase library to discover novel nitroreductases that efficiently activate the bioreductive prodrugs CB1954 and PR-104A. Biochemical Pharmacology 85:1 091-1103 に記載のとおり）の一晩培養物を使用してアッセイ培地（100 μ g · mL⁻¹ アンピシリン、0.4 %w/v グルコース及び 50 μ M IPTG を補充した L B 培地）の新鮮アリコートに植菌し、これをその後 30 、 200 rpmで 2.5 時間インキュベートする。次いで、各培養物のアリコート 40 μ Lを、384 ウェルマイクロプレート内の、2 × 所望のニクロサミド終濃度（5 μ M）を含有するアッセイ培地又は培地のみの対照のアリコート 40 μ Lに加える。次いで、プレートを 30 、 200 rpmで 4 時間インキュベートする。菌株毎に 0 μ M 対照（すなわち、100 % 成長）に相対的な成長阻害百分率を計算するために、培養物濁度を 600 nmでの光学密度によってモニタリングする。データは、3 つの独立した実験の平均 \pm SEM である。

【図 6】図 6 は、ニクロサミド事前選択がニトロ - プロドラッグ抗生物質メトロニダゾールを生体内還元的に活性化できる機能性ニトロレダクターゼを強く富化することを示す。大腸菌 n f s A についてのバリアント遺伝子ライブラリーを 7 つの活性部位コドン位置でのコドンランダム化によって生み出し、プラスミド pUCX にクローニングし、そして大腸菌 SOS - R 4 細胞に形質転換する。A. L B 寒天；又は B. 500 nM ニクロサミドを含有する L B 寒天のいずれかから 57 個のクローンをランダムに選択する。次いで、57 個の選択されたクローン（標準 96 ウェルプレート上の位置に従って命名される）の各々を、50 μ M メトロニダゾール（構造を差し込む）の存在下での成長阻害について試験する（ここで、値が大きいほど、成長阻害レベルが高いこと、したがってそのクローンによるメトロニダゾール活性化レベルが高いことを示す）。また、各プレート上に野生型 n f s A (n f s A_Ec)、空プラスミド (pUCX)、及び培地のみの対照（参照目的のためのみ）も含める。相当多くの数のメトロニダゾール活性クローンがニクロサミド事前選択コホート中に存在する。成長阻害データは、3 つの独立した実験の平均 \pm SEM である。

【図 7】図 7 は、ニクロサミド事前選択がニトロ - プロドラッグ抗生物質チニダゾールを生体内還元的に活性化できる機能性ニトロレダクターゼを強く富化することを示す。大腸菌 n f s A についてのバリアント遺伝子ライブラリーを 7 つの活性部位コドン位置でのコドンランダム化によって生み出し、プラスミド pUCX にクローニングし、そして大腸菌 SOS - R 4 細胞に形質転換する。A. L B 寒天；又は B. 500 nM ニクロサミドを含

10

20

30

40

50

有する L B 寒天のいずれかから 5 7 個のクローンをランダムに選択する。次いで、5 7 個の選択されたクローン（標準 9 6 ウェルプレート上の位置に従って命名される）の各々を、5 0 μ M チニダゾール（構造を差し込む）の存在下での成長阻害について試験する（ここで、値が大きいほど、成長阻害レベルが高いこと、したがってそのクローンによるチニダゾール活性化レベルが高いことを示す）。また、各プレート上に野生型 n f s A (n f s A _ E c)、空プラスミド (p U C X)、及び培地のみの対照（参照目的のためのみ）も含める。相当多くの数のチニダゾール活性クローンがニクロサミド事前選択コホート中に存在する。成長阻害データは、3 つの独立した実験の平均 \pm S E M である。

【図 8】図 8 は、 - ラクタム耐性肺炎桿菌に対するニクロサミド / P A N 相乗効果のヒートマップを示す。この図は、0 . 1M Mg SO₄ 並びに表示のとおりのニクロサミド及び P A N で修正された L B 中の、 - ラクタム耐性肺炎桿菌 (Klebsiella pneumonia) (NZ 分離株 N I L 0 5 / 2 6) の非曝露対照に相対的な成長百分率を示す。データは、3 つの独立した反復の平均である。

【図 9】図 9 は、 - ラクタム耐性大腸菌に対するニクロサミド / P A N 相乗効果のヒートマップを示す。この図は、0 . 1M Mg SO₄ 並びに表示のとおりのニクロサミド及び P A N で修正された L B 中の、 - ラクタム耐性大腸菌 (NZ 分離株 A R L 0 6 / 6 2 4) の非曝露対照に相対的な成長百分率を示す。データは、3 つの独立した反復の平均である。

【図 10】図 10 は、セフタジジム / ピペラシリン耐性緑膿菌に対するニクロサミド / P A N 相乗効果のヒートマップを示す。この図は、0 . 1M Mg SO₄ 並びに表示のとおりのニクロサミド及び P A N で修正された L B 中の、セフタジジム / ピペラシリン耐性緑膿菌 (NZ 分離株 A R 0 0 / 5 3 7) の非曝露対照に相対的な成長百分率を示す。データは、3 つの独立した反復の平均である。

【図 11】図 11 は、セフタジジム / シプロフロキサシン / コリスチン / メロペネム / ピペラシリン / トブラマイシン耐性バークホルデリア・マルチボランスに対するニクロサミド / P A N 相乗効果のヒートマップを示す。この図は、0 . 1M Mg SO₄ 並びに表示のとおりのニクロサミド及び P A N で修正された L B 中の、セフタジジム / シプロフロキサシン / コリスチン / メロペネム / ピペラシリン / トブラマイシン耐性バークホルデリア・マルチボランス (NZ 分離株 A R L 0 3 / 4 5 2) の非曝露対照に相対的な成長百分率を示す。データは、3 つの独立した反復の平均である。

【図 12】図 12 は、大腸菌実験室株 W 3 1 1 0 に対するニクロサミド / P A N 相乗効果のヒートマップを示す。この図は、0 . 1M Mg SO₄ 並びに表示のとおりのニクロサミド及び P A N で修正された L B 中の、大腸菌実験室株 W 3 1 1 0 の非曝露対照（左端から 2 番目の列の 7 K O t o 1 C ニクロサミドのみの対照からのデータ）に相対的な成長百分率を示す。データは、3 つの独立した反復の平均である。

【図 13】図 13 は、緑膿菌実験室株 P A O 1 に対するニクロサミド / P A N 相乗効果のヒートマップを示す。この図は、0 . 1M Mg SO₄ 並びに表示のとおりのニクロサミド及び P A N で修正された L B 中の、緑膿菌実験室株 P A O 1 の非曝露対照に相対的な成長百分率を示す。データは、3 つの独立した反復の平均である。

【図 14】図 14 は、病毒性シュードモナス・シリンガエ・ p v . アクチニディア (P s a - V) の野生分離株に対するニクロサミド / P A N 相乗効果のヒートマップを示す。この図は、0 . 1M Mg SO₄ 並びに表示のとおりのニクロサミド及び P A N で修正された L B 中の、 P s a - V (L a n d c a r e 分離株 I C M P 1 8 8 0 0) の非曝露対照に相対的な成長百分率を示す。データは、3 つの独立した反復の平均である。

【図 15】図 15 は、ニクロサミド及び 2 - クロロ - 4 - ニトロアニリンに対する大腸菌株 7 K O t o 1 C の相対感受性を示す。大腸菌 7 K O t o 1 C の一晩培養物を使用して L B 培地の新鮮アリコートに植菌し、これを 3 0 、 2 0 0 rpm で 2 . 5 時間インキュベートする。次いで、各培養物のアリコート 4 0 μ L を、 3 8 4 ウェルマイクロプレート内の、 2 \times 所望の終濃度のニクロサミド若しくは 2 - クロロ - 4 - ニトロアニリン（すなわち、各化合物について 1 0 μ M ~ 1 6 0 nM の最終 2 倍希釈系列をもたらす）を含有する

10

20

30

40

50

L B 培地又は 0 μ M 培地のみの対照のアリコート 40 μ Lに加える。プレートを、30、200 rpmで4時間インキュベートする。菌株毎に 0 μ M 対照に相対的な成長百分率を計算するために、培養物濁度を 600 nmでの光学密度によってモニタリングする。データは、少なくとも2つの独立した実験の平均 \pm SEMである。

【図16】図16は、異なる天然のニトロレダクターゼ候補を過剰発現する大腸菌7KO_{to1C}菌株のニタゾキサニド成長阻害を示す。大腸菌NfsA (NfsA_Ec)、大腸菌NfsB (NfsB_Ec)のいずれかを過剰発現する又はプラスミドのみ (pET28) 対照を含有する大腸菌7KO_{to1C} (DE3) 菌株の一晩培養物を使用してアッセイ培地 (50 μ g · mL⁻¹ カナマイシン及び 50 μ M IPTGを補充したL B 培地) の新鮮アリコートに植菌し、これを30、200 rpmで2.5時間インキュベートする。次いで、各培養物のアリコート 40 μ Lを、2 × 所望の終濃度のニタゾキサニド (すなわち、20 ~ 2.5 μ Mの最終2倍希釈系列をもたらす) を含有するアッセイ培地又は0 μ M 培地のみの対照のアリコート 40 μ Lに加える。次いで、プレートを30、200 rpmで4時間インキュベートする。菌株毎に 0 μ M 対照に相対的な成長百分率を計算するために、培養物濁度を 600 nmでの光学密度によってモニタリングする。データは、少なくとも2つの独立した実験の平均 \pm SEMである。ニタゾキサニドの構造を差し込む。

【図17】図17は、大腸菌染色体由来の候補ニトロレダクターゼ遺伝子及び_{to1C} 遺伝子のインフレーム欠失に使用されるプライマーを示す。Redリコンビナーゼを使用したインフレーム欠失によって遺伝子ノックアウトを実施する (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA 97:6640-6645)。簡潔に述べると、プラスミド pKD4 を鋳型として使用して、f1p - リコンビナーゼ認識部位のいずれかの側に隣接するカナマイシン耐性遺伝子を PCR 増幅する。增幅用のプライマーは、pKD4 からのプライミング及び增幅のために 3' 端に 15 ~ 20 bp の配列を含有する。該プライマーの 5' 端の残りの約 40 bp は、欠失のために標的化されたゲノム領域のいずれかの端に相同である。場合によりノックアウト効率を改善するために、鋳型としての第一の PCR 産物及び增幅用のノックアウト伸長プライマーを使用して、PCR 増幅されたカナマイシンカセットの各端のゲノム相同領域を第二の PCR を介して伸ばす。プライマーは、ノックアウト (KO) されるべき遺伝子に従って命名され、ここで、接尾辞 FW はフォワードプライマー、RV はリバースプライマー、そして EXT は伸長プライマーを示す (例えば、NfsA_KO_FW は、遺伝子 nfsA のノックアウト用のフォワードプライマーである)。

【図18】図18は、様々なニクロサミド及びPA-Nの濃度にわたる、4反復の成長阻害の「ヒートマップ」測定についての 384 ウェルプレートフォーマットを示す。ニクロサミド及びPA-Nの終濃度がウェル毎に示される。この例では、H行、1列及び3列についての培養培地は、後続の細菌培養物での 1/2 希釈を考慮して 40 μ M ニクロサミド及び 150 μ M PA-N を含有するだろう。

【図19】図19は、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (黄色ブドウ球菌) (*Staphylococcus aureus*) (MRSA) に及ぼす併用又は個々のニクロサミド処置及びPA-N 処置の効果のヒートマップを示す。この図は、0.1M MgSO₄ 並びに表示のとおりのニクロサミド及びPA-N で修正された L B 中の、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA; ATCC 43300) の非曝露対照に相対的な成長百分率を示す。データは、3つの独立した反復の平均である。

【図20】図20は、グラム陽性菌が_{to1C} 阻害剤の同時投与の必要性なしにニクロサミドに対して直接感受性であることを示す。様々なニクロサミドの濃度にわたるグラム陽性菌株である黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) ATCC 43300、リステリア・ウェルシメリ (*L. welshimeri*) ATCC 35897 及びバチルス・チューリングンシス (*B. thuringiensis*) P1.1.PS-80 serovar israelensisについての菌株毎の非曝露対照に相対的な成長阻害%曲線が示される。データは、2つの独立した反復 (独立実験毎に2反復の技術的反復を使用する) の平均であり、エラーバーは平均の標準誤差を示す。これらの曲線か

10

20

30

40

50

ら計算された $I C_{50}$ 値は、表 1 に提示される。

【図 21】図 21 は、グラム陽性菌が $T_{01}C$ 阻害剤の同時投与の必要性なしにニタゾキサニドに対して直接感受性であることを示す。様々なニタゾキサニド濃度にわたるグラム陽性菌株である黄色ブドウ球菌 ATCC43300、リステリア・ウェルシメリ ATCC35897 及びバチルス・チューリングエンシス P.1. IPS-80 serovar israelensis についての菌株毎の非曝露対照に相対的な成長阻害 % 曲線が示される。データは、2 つの技術的反復の平均である。これらの曲線から計算された $I C_{50}$ 値は、表 1 に提示される。

【発明を実施するための形態】

【0069】

詳細な説明

本発明は、サリチルアミド化合物がグラム陽性菌の直接成長阻害を呈するという驚くべきかつ予想外の発見に基づくものである。したがって、本発明は、サリチルアミド化合物が関与する、細菌感染症の予防若しくは治療、及び／又はバイオフィルム形成の予防、低減若しくは排除に有効な組成物及び方法に関する。

【0070】

グラム陽性菌のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA; ATCC43300) の臨床分離株を試験した。図 19 を参照されたい。驚くべきことに、この菌株は、マイクロモルレベルの P_a N に対して感受性であり、ニクロサミドに対してはナノモル濃度で感受性である。 $T_{01}C$ 排出機序を欠いているグラム陽性菌と一致して、ニクロサミドが P_a N の非存在下で有効であり；及びニクロサミド処置と P_a N 処置の併用効果が相乗的というよりむしろ相加的であるように見える (図 19)。

【0071】

これらのデータは、グラム陽性菌に及ぼすサリチルアミド化合物の直接成長阻害効果をさらに調査するように本出願人を駆り立てた。図 20 及び 21 を参照して、表 2 に提示されるデータと併せて読んだ場合 (以下の実施例を参照されたい)、ニクロサミド及びニタゾキサニドは、黄色ブドウ球菌、リステリア・ウェルシメリ (Listeria welshimeri) 及びバチルス・チューリングエンシス (Bacillus thuringiensis) に対して、nM範囲の $I C_{50}$ 値の直接成長阻害活性を実証する。これは、重要な知見を表しており、細菌感染症の原因となる及び／又は細菌バイオフィルム (一部) を形成するグラム陽性菌の成長阻害にサリチルアミド化合物が有用であることを実証する。

【0072】

したがって、本発明の 1 つの態様において、患者における細菌感染症を処置することにおける使用のためのサリチルアミド化合物が提供される (ここで、該細菌が引き起こす感染症は、グラム陽性菌を含む)。

【0073】

別の態様において、本発明は、細菌バイオフィルムの形成を予防、低減又は排除することにおける使用のためのサリチルアミド化合物を提供する (ここで、該細菌が引き起こすバイオフィルム形成は、グラム陽性菌を含む)。

【0074】

サリチルアミド化合物は、許容し得る賦形剤又は担体と一緒に医薬組成物又は生物学的組成物として製剤化され得る。サリチルアミド化合物はまた、薬学的塩としても製剤化され得る。

【0075】

本発明は、グラム陽性菌を含む細菌感染症を治療若しくは予防するための又はグラム陽性菌を含むバイオフィルム形成を予防、低減若しくは排除するための本発明に係るサリチルアミド化合物を含む方法及び使用をさらに提供する。

【0076】

本明細書において、用語「患者」は、例えば、感染症を伴う又は感染症のリスクを有する傾向にある患者、並びに、感染症を伴う又は感染症を獲得するリスクを有する傾向にある患者の処置のために 1 以上の活性物質を投与する医療従事者を含み得る。例えば、本発

10

20

30

40

50

明は、手術前に外科医が使用するための手指消毒剤として製剤化される、サリチルアミド化合物を場合により排出ポンプ阻害剤と併せて含む生物学的組成物を提供し得る。追加的又は代替的に、例えば、本発明は、感染症を有する患者を処置するか又は手術中の1以上の細菌による感染症の獲得から患者を予防するかのいずれかのために、手術中の患者への投与のための、サリチルアミド化合物を場合により排出ポンプ阻害剤と併せて含む医薬組成物を提供し得る。

【0077】

本発明はまた、グラム陰性菌の成長阻害が、排出ポンプ阻害剤と併せてサリチルアミド化合物を使用して達成され得るという驚くべきかつ予想外の発見に基づくものである。

【0078】

本発明の併用物及び組成物は、それ故、他の適用の中でも、感染症（特にヒトにおける）の治療又は予防に、及びバイオフィルム形成の予防、低減又は排除に有用である。

【0079】

いくつかの例では、サリチルアミド化合物と排出ポンプ阻害化合物のモル比は、約1：500～約1：7、例えば約1：400～約1：7、例えば約1：350～約1：7、例えば約1：300～約1：7、例えば約1：250～約1：7、例えば約1：200～約1：7、例えば約1：150～約1：7、例えば約1：100～約1：7、例えば約1：50～約1：7、例えば約1：20～約1：7、例えば約1：10～約1：7である。

【0080】

本出願人は、驚くべきことに、ニクロサミドが、活性ニトロレダクターゼを過剰発現しない大腸菌SOS-R2細胞に対して毒性であるが、活性ニトロレダクターゼがニクロサミドの存在下でSOS-R2の成長を増強することが認められることを見いたした。しかしながら、異なる大腸菌宿主菌株（「6KO」、ノックアウトされた6つの内因性ニトロレダクターゼ候補遺伝子を有する大腸菌W3110の派生物）では、該菌株が活性ニトロレダクターゼを過剰発現しなくも、ニクロサミドはもはや毒性であると認められない。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、本出願人は、ニクロサミド感受性SOS-R2菌株とニクロサミド耐性6KO菌株との間の重要な違いは、前者が、多数の生体異物及び他の化合物をグラム陰性菌細胞の両細胞膜を直接横断して運び去ができる排出ポンプをコードする、*tolC*遺伝子の欠失を保有していることにあると仮説を立てる。

【0081】

図1は、*tolC*遺伝子の欠失が大腸菌をニクロサミドに対して感受性にすることを示す。この実験は、2つの別の同質遺伝子大腸菌株（一方は無傷の*tolC*遺伝子を有し、他方は*tolC*のインフレーム欠失を保有する）のニクロサミドに対する相対感受性を測定する。ニトロレダクターゼ活性に起因するあらゆる潜在的な交絡効果を回避するために、この研究のために選択された基礎菌株は、5つの検証されたニトロレダクターゼ遺伝子（*nfsA*、*nfsB*、*azoR*、*nemA*、*mdaB*）及び2つの疑いをかけられたニトロレダクターゼ（*yneF*、*ycak*）のインフレーム欠失を保有する、7KO-大腸菌W3110である。内因性*tolC*遺伝子は、Datsenko及びWarnerのRedリコンビナーゼ法（Datsenko, K.A. and Warner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA 97:6640-6645）を使用してこの菌株からインフレーム欠失されて、菌株7KO-*tolC*を与える。

【0082】

7KO及び7KO-*tolC*の反復培養物の成長を2倍希釈系列のニクロサミド（5μM～20nM）にわたって比較すると、*tolC*突然変異がニクロサミドに対する極めて高い感受性を付与することが明らかである（図1）。これらのデータから、ニクロサミドIC₅₀（ニクロサミドが曝露された反復物の成長が非曝露対照の成長の50%であると予測されるニクロサミドの濃度）は、7KO-*tolC*では120nMであると計算されるが、7KOではIC₅₀を計算できない（すなわち、5μMより相当大きい）。

10

20

30

40

50

【0083】

to1C遺伝子の欠失がインフレームで構成されるため、ニクロサミド感受性の表現型が極性効果の結果である可能性は低い（すなわち、to1C突然変異それ自体というよりもむしろ隣接する遺伝子への欠失されたDNA領域の影響に起因する）。これは、図2に示される実験によって確認され、これは、To1C排出ポンプの化学阻害がまた大腸菌をニクロサミドに対して感受性にすることを実証する。大腸菌7KOのレプリカ培養物は、0μM、25μM又は50μMのいずれかのフェニルアラニン-アルギニン-ナフチルアミド(PAN)(To1C排出ポンプの化学阻害剤)の存在下、2倍希釈系列のニクロサミド(10μM~156nM)にわたって成長する(Lomovskaya, O., Warren, M. S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renaud, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H. and Lee, V. J. (2001). Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(1): 105-116)。PANの添加は、7KO菌株においてニクロサミド感受性を用量依存的に促進することが認められるが、試験濃度では、その効果は、To1C活性が完全に排除されている7KO to1Cについて観察されたものよりも低い。

【0084】

したがって、本出願人は、遺伝学的手段及び化学的手段の両方によって、To1Cがニクロサミドから大腸菌を防御できることを実証する。図3に示される実験は、ニクロサミドに対するニトロレダクターゼ酵素の防御能を、高レベルのニクロサミド曝露から機能性to1C遺伝子を含有する細胞を防御する内因性ニトロレダクターゼ酵素（すなわち、大腸菌において天然に見いだされる天然の染色体ニトロレダクターゼ遺伝子から発現される）の効果を調べることによって比較する。本出願人は、7KO菌株（候補ニトロレダクターゼ遺伝子nfSA、nfSB、azoR、nemA、mdaB、yieF、ycaKの欠失を保有する）の成長を、全ての7つの候補ニトロレダクターゼ遺伝子が無傷である市販のクローニング菌株DH5と比較した。反復培養物の成長を2倍希釈系列のニクロサミド(40μM~20nM)にわたって比較すると、DH5がニクロサミドに対して7KO菌株よりも耐性であることが明らかである（図3）。

【0085】

図4は、過剰発現されたニトロレダクターゼ遺伝子がニクロサミド曝露に対して高レベルの防御を提供することができる事を示す。この実験は、マルチコピープラスミド上の強力なプロモーターの制御下にあるニトロレダクターゼ遺伝子の高レベル発現が大腸菌7KO to1C（すなわち、To1C媒介防御系を有しないために、ニクロサミドに対してあらかじめ感受性である細胞）に対して高レベルの防御を提供するか否かを調べる。プラスミドpUCXから各ニトロレダクターゼ候補を過剰発現する反復培養物の成長(Prosser, G.A., Copp, J.N., Syddall, S.P., Williams, E.M., Smaill, J.B., Wilson, W.R., Patterson, A.V. and Ackerley, D.F. (2010). Discovery and evaluation of *Escherichia coli* nitroreductases that activate the anti-cancer prodrug CB1954. *Biochemical Pharmacology* 79: 678-687)を2倍希釈系列のニクロサミド(4μM~16nM)にわたって比較すると、ニトロレダクターゼNfSA、NfSB及びAzoRがニクロサミドに対して高レベルの保護を提供できるが（ニクロサミドに対して低いマイクロモルIC₅₀値を有する、これらの酵素を過剰発現する菌株）、一方で、NemAは遙かに低いレベルの保護を提供することが分かる（IC₅₀ = 300nM）（図4）。別の以前に立証された大腸菌ニトロレダクターゼであるMdaBでは、MdaBを過剰発現する菌株のIC₅₀が83nMであり、これは空プラスミド対照のIC₅₀（IC₅₀ = 47nM）よりそれほど高くない。

【0086】

図5は、高レベルのニクロサミド曝露から宿主細胞を防御することができるニトロレダクターゼを同定するための、7KO to1C細胞における、単一濃度のニクロサミド（

10

20

30

40

50

2.5 μ M)での、11の異なるオキシドレダクターゼファミリー (WO 2012 / 008860号; Prosser, G.A., Copp, J.N., Mowday, A.M., Guise, C.P., Syddall, S.P., Williams, E.M., Horvat, C.N., Swe, P.S., Ashoorzadeh, A., Denny, W.A., Smaill, J.B., Patterson, A.V. and Ackerley, D.F. (2013). Creation and screening of a multi-family bacterial oxidoreductase library to discover novel nitroreductases that efficiently activate the bioreductive prodrugs CB1954 and PR-104A. Biochemical Pharmacology 85:1091-1103) のメンバーを含有する58個からなるオキシドレダクターゼpUCXライブラリーのスクリーニングの結果を示す。NfsA、NfsB及びAzORファミリーのメンバーは一貫して活性であるが、他の8つのオキシドレダクターゼファミリーのいずれのメンバーもそのニクロサミド濃度で7KOctolC細胞の成長を可能にしない。

【0087】

図6及び7は、ニクロサミドを使用して、tolC突然変異体宿主細胞において発現された突然変異遺伝子ライブラリーから機能性ニトロレダクターゼを事前選択することができる示す。ニトロレダクターゼは、生物工学において広範な潜在的適用を有する。環境適用について特に興味深いのは、毒性の生体異物汚染物質からより毒性の小さい形態への変換を触媒するニトロレダクターゼ酵素の能力である (Roldan, M.D., Perez-Reinado, E., Castillo, F. and Moreno-Vivian, C. (2008). Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. FEMS Microbiol Rev 32(3):474-500)。反対に、プロドラッグから細胞毒性の高い形態への変換は、医学(例えば、抗癌戦略の遺伝子指向性酵素プロドラッグ療法 (Schellmann, N., Deckert, P.M., Bachran, D., Fuchs, H. and Bachran C. (2010). Targeted enzyme prodrug therapies. Mini Rev Med Chem. 10: 887-904))又は細胞生物学(例えば、遺伝子導入モデル生物における標的化組織切除) (Curado Rosenthal, V. D., Maki, D. G., Jamulitrat, S., Medeiros, E. A., Todi, S. K., Gomez, D. Y., Leblebicioglu, H., Abu Khader, I., Miranda Novales, M. G., Berba, R., Ramirez Wong, F. M., Barkat, A., Pino, O. R., Duenas, L., Mitrev, Z., Bijie, H., Gurskis, V., Kanj, S. S., Mapp, T., Hidalgo, R. F., Ben Jaballah, N., Raka, L., Gikas, A., Ahmed, A., Thu, L. T. A. and Guzman Siritt, M. E. (2010). International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. American Journal of Infection Control 38(2): 95-104)において適用を有する。ニトロレダクターゼはまた、生物触媒作用、すなわち、化学合成(例えば、医薬品製造)中のニトロ基の還元にも興味深い。これらの状況の全てで、ニトロレダクターゼは、一般に、それらの典型的な基質無差別性(substrate promiscuity)に依存して、非生理学的基質の還元に適用されている (Roldan et al., 2008)。したがって、おそらく、天然のニトロレダクターゼ酵素は、所望の基質に特に効率的ということではなく、それらの無差別な活性の開始レベルを指向性進化等の工学戦略によって実質的に改善できる可能性がある。

【0088】

典型的には、指向性進化において、標的遺伝子が突然変異されるほど、それが不活性になる可能性が高くなる。したがって、多数の突然変異を含有する進化酵素を達成するには、典型的には、改善された活性についてスクリーニングされている極めて多くの数のクローニングが必要である。しかしながら、望ましい活性についての多くのスクリーニングは、あまり高いスループット能力を有していない。

【0089】

いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、本出願人は、実質的に突然変異されたニトロレダクターゼライブラリーのニクロサミド事前選択が機能性ニトロレダクターゼを強く富化して、成長阻害アッセイ等の低いスループットスクリーニングアプローチが特定の基質に対して増強された活性を有するバリエントを回収することを可能にするだろうという仮説を立てる。突然変異体遺伝子ライブラリーは、大腸菌nfsAに基づいて、7つの活性部位残基に対するコドンを部分的に(NDTコドンセット)又は完全に(

10

20

30

40

50

N N K コドンセット) ランダム化させて合成される (GenScriptによって)。全てにおいて、該ライプラリーは約 9500 万個の遺伝子バリエントを含有し、その圧倒的大部分は不活性ニトロレダクターゼをコードすると予想される。このライプラリーを、大腸菌 S O S - R 4 細胞 (n f s A、n f s B、a z o R、n e m A 及び t o 1 C 遺伝子のノックアウト、並びにプラスミド媒介 S O S 調節 G F P 遺伝子を含有する) に形質転換し (Copp, J.N., Williams, E.M., Rich, M.H., Patterson, A.V., Smail, J.B. and Ackerley, D. F. (2014). Toward a high-throughput screening platform for directed evolution of enzymes that activate genotoxic prodrugs. *Protein Eng Des Sel.* 27(10):399-403)、そして、様々な希釈物を未修正の又は 500 nM ニクロサミドで修正されたレブリカ L B 寒天プレート上にプレーティングする。未修正の L B 寒天プレートから 57 個のコロニーをランダムに選択し、これを、空プラスミド及び野生型 N f s A 対照コロニー並びに無細胞対照と一緒に 96 ウェルプレートの 60 の最深ウェル内の L B 中に植菌する。この手順を、ニクロサミドで修正された L B 寒天プレート (+ 同じ 3 つの対照) からランダムに選択された 57 個のコロニーを使用して異なる 96 ウェルプレートで繰り返す。この後に、成長阻害アッセイを用いて、1 プレート当たりどれだけ多くのウェルが、ニトロ・プロドラッグ抗生物質であるメトロニダゾール (図 6 A、6 B) 又はチニダゾール (図 7 A、7 B) に関して活性である酵素バリエントを発現するクローンを含有したかを測定する。

【0090】

ニクロサミド事前選択の非存在下では、57 個のランダムに選択されたクローンのうち 1 つだけが、メトロニダゾール (図 6 A) 又はチニダゾール (図 7 A) に関して野生型 N f s A より活性であるニトロレダクターゼバリエントを発現することが認められる。しかしながら、ニクロサミド事前選択の後では、57 個のクローンのうち 50 個がメトロニダゾールに関して野生型 N f s A よりも活性であり (図 6 B)、そして、57 個のクローンのうち 52 個がチニダゾールに関して野生型 N f s A よりも活性である (図 7 B)。これらのデータは、ニクロサミド事前選択が、突然変異体遺伝子ライプラリーからの機能性ニトロレダクターゼ酵素バリエントをコードする遺伝子の強力な富化を提供できることを示している。

【0091】

したがって、1 つの態様において、本発明は、新規ニトロレダクターゼ酵素を同定するスクリーニング法であって、以下の工程を含む方法を提供する：

- (i) 存在するニトロレダクターゼ遺伝子の標的又はランダム突然変異誘発を実施し、それによってニトロレダクターゼバリエント遺伝子ライプラリーを作製する工程；
- (i i) 該バリエント遺伝子ライプラリーを、t o 1 C 遺伝子が欠失している又は t o 1 C 発現産物が阻害されているグラム陰性菌に形質転換し、そして、遺伝子バリエントが発現されるように該細胞を培養する工程；
- (i i i) 少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物を形質転換された細菌細胞に投与する工程；
- (i v) サリチルアミド毒性に対する感受性を欠いている細胞をスクリーニングし、それによって新規形態のニトロレダクターゼ酵素を発現する細胞を同定する工程；及び
- (v) 場合により、該ニトロレダクターゼ酵素を精製する工程。

【0092】

ある例では、グラム陰性菌の内因性ニトロレダクターゼ遺伝子はノックアウトされているか、又は、グラム陰性菌におけるニトロレダクターゼ活性は低減若しくは排除されている。

【0093】

なお別の態様において、本発明は、環境を起源とする D N A の調製物から新規ニトロレダクターゼ酵素を同定するスクリーニング法であって、以下の工程を含む方法を提供する：

- (i) その環境を起源とする D N A から細菌遺伝子ライプラリーを作製する工程；
- (i i) 該遺伝子ライプラリーを、t o 1 C 遺伝子が欠失している又は t o 1 C 発現産物

10

20

30

40

50

が阻害されているグラム陰性菌に形質転換し、そして、遺伝子ライブラリーが発現されるように該細胞を培養する工程；

(i i i) 少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物を形質転換された細菌細胞に投与する工程；

(i v) サリチルアミドに対する感受性を欠いている細胞をスクリーニングし、それによって新規形態のニトロレダクターゼ酵素を発現する細胞を同定する工程；及び

場合により、該ニトロレダクターゼ酵素を精製する工程。

【0094】

ある例では、グラム陰性菌の内因性ニトロレダクターゼ遺伝子はノックアウトされているか、又は、グラム陰性菌におけるニトロレダクターゼ活性は低減若しくは排除されている。

10

【0095】

別の例では、環境を起源とするDNAは、土壤を起源とする。

【0096】

また、本発明によって検討されるものは、サリチルアミド毒性、例えばニクロサミド及びニクロサミド類似体に感受性の細菌が関与するスクリーニングアッセイに基づく、新規TolC阻害剤をスクリーニングする方法である。

20

【0097】

したがって、なお別の態様において、本発明は、TolCの新規阻害剤を同定するスクリーニング法であって、以下の工程を含む方法を提供する：

20

(i) TolCを発現するグラム陰性菌を少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物及びTolCの候補阻害剤の存在下で培養する工程；並びに

(i i) サリチルアミド毒性に感受性である細胞をスクリーニングし、それによってTolCの新規阻害剤を同定する工程。

【0098】

本出願人はまた、ニクロサミド及びTolCの化学阻害剤が、驚くべきことに、多剤耐性臨床分離株を含む広範なグラム陰性菌に対して有効な相乗的抗菌併用物を提供することも示している。有利なことには、ニクロサミドは、ヒトにおいて高用量で耐容性を示すことが公知であり、そして、本出願人の仕事はまた、ニクロサミドが、グラム陰性TolC排出ポンプに対して幅広い範囲の活性を有するPaN等の化学阻害剤と併せて適用されて、グラム陰性菌に対して有効な抗生物質であることを実証する。本出願人の仕事は、成長阻害アッセイを使用して、ESR微生物株保存機関(<http://www.esr.cri.nz/competencies/Health/Pages/nzrcc.aspx>)から得られる様々な細菌性病原体の薬物耐性臨床分離株、並びにキウイフルーツ病原体シュードモナス・シリニガエ・p v . アクチニディア(Psa-V)(Landcare分離株ICMP18800)の高病原性野生分離株並びに本出願人の在庫からの大腸菌W3110及び緑膿菌PAO1の実験室株における、ニクロサミド及びPaN処置の併用効果を試験する。

30

【0099】

したがって、1つの態様において、本発明は、少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物及び少なくとも 1 つの排出ポンプ阻害剤を含む併用剤を提供する。

40

【0100】

別の態様において、本発明は、少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物及び少なくとも 1 つの排出ポンプ阻害化合物の相乗的併用物を提供する。

【0101】

別の態様において、本発明は、少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物及び少なくとも 1 つの排出ポンプ阻害化合物を含む組成物を提供する。ある例では、該組成物は、相乗的に有効な量のサリチルアミド化合物及び排出ポンプ阻害化合物を含む。

【0102】

さらなる態様において、本発明は、少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物及び少なくとも 1 つの排出ポンプ阻害化合物を薬学的に許容し得る賦形剤又は塩と一緒に含む医薬組

50

成物を提供する。

【0103】

本発明に係る一例では、サリチルアミド化合物は、ニクロサミド又はニクロサミド類似体である。ニクロサミド類似体の例は、以下に列挙される。

【0104】

本発明の併用剤及び組成物における使用のための好適な排出ポンプの例は、以下に列挙される。本発明の特定の実施態様において、排出ポンプ阻害剤は、To1C排出ポンプ阻害剤である。To1C排出ポンプ阻害剤の例は、PaN及び2,3-ジブロモマレイミド(2,3-dibromomaleide)を含むが、これらに限定されない。

【0105】

試験フォーマットは、各試験菌株のレプリカ培養物が増加する濃度のPaN(横軸)及び増加する濃度のニクロサミド(縦軸)で曝露される、2次元384ウェルプレートアッセイである(各々2倍希釀系列として調製される、PaNは右から左へ、ニクロサミドは下から上へ)。各384ウェルプレートを、各四分円中の左上のウェルがPaNとニクロサミドのいずれも含有しないように、一方で、各四分円中の右下のウェルが最高濃度のPaN及びニクロサミドの各々を含有するように、4つの四分円に分ける。次いで、各試験菌株をプレート毎に4反復で評価する。

【0106】

このフォーマットで試験するグラム陰性菌株は、以下を含む：

- ラクタム耐性肺炎桿菌(*Klebsiella pneumonia*) (NZ分離株N I L 0 5 / 2 6) (図8)

- ラクタム耐性大腸菌(NZ分離株A R L 0 6 / 6 2 4) (図9)

セフタジジム/ピペラシリン耐性緑膿菌(NZ分離株A R 0 0 / 5 3 7) (図10)

セフタジジム/シプロフロキサシン/コリスチン/メロペネム/ピペラシリン/トブラマイシン耐性バークホルデリア・マルチボランス(NZ分離株A R L 0 3 / 4 5 2) (図11)

大腸菌W 3 1 1 0(野生型) (図12)

緑膿菌P A O 1(野生型) (図13)

Psa-V(Landcare分離株I C M P 1 8 8 0 0) (図14)。

【0107】

各々の場合に、試験した菌株は、相乗的併用物としてのPaN及びニクロサミドに感受性である。しかしながら、臨床分離株のいずれもニクロサミド単独には特に感受性ではない(PaNの非存在下でI C₅₀ > 20 μM; 図8~11)。

【0108】

本発明に係る併用剤又は組成物は、それ故、患者における細菌感染症を治療若しくは予防するために使用され得るか、又は、細菌バイオフィルムの形成を低減若しくは排除するために使用され得る(ここで、該細菌が引き起こす感染症又はバイオフィルム形成は、グラム陰性菌を含む)。

【0109】

したがって、別の態様において、本発明は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の併用物又は少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を含む組成物の医薬としての使用を提供する。

【0110】

別の態様において、本発明は、医薬組成物の調製における使用のための、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の併用物を提供する。

【0111】

なお別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療又は予防するための、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の

10

20

30

40

50

併用物の使用を提供する（ここで、該細菌が引き起こす感染症は、グラム陰性菌を含む）。

【0112】

別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療又は予防するための、薬学的に有効な量の少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を含む医薬組成物の使用を提供する（ここで、該細菌が引き起こす感染症は、グラム陰性菌を含む）。

【0113】

さらなる態様において、本発明は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を含む抗菌剤を提供する。抗菌剤は、患者における細菌感染症を治療若しくは予防するために使用され得るか、又は、該抗菌剤は、細菌バイオフィルムの形成を低減若しくは排除するために使用され得る（ここで、該細菌が引き起こす感染症又はバイオフィルム形成は、グラム陰性菌を含む）。

10

【0114】

バイオフィルムは、創傷及び／若しくは火傷内に感染症を引き起こすか又は留置医療機器上若しくは内部に感染症を引き起こす可能性を有する。代替的に、細菌バイオフィルムの形成は、食品業界用の調製用機械内部、食品業界によって使用される包装上、水若しくは他の液体に使用される貯蔵タンク内部、又は水処理プラントにおける機械内部に生じ、その全ては、ヒト又は動物が消耗品と接触することから生じる感染症のリスクを増加させる可能性を有する。さらに、病院のベッド、浴室及び病棟に通じるドア等の表面のバイオフィルム形成を介した細菌の蓄積も、ヒトを感染症のリスクに曝す能力を有する。

20

【0115】

したがって、ヒト（及び動物）における細菌感染症を治療又は予防するだけでなく、細菌バイオフィルムの形成を低減又は排除する能力は、本発明の併用剤及び組成物の使用についての同様に重要な考慮事項である。

【0116】

本発明の併用物及び組成物はまた、植物における感染症、例えば、マタタビ (Actinidi a) 属のキウイフルーツ植物におけるショードモナス・シリナガエ・p v . アクチニディア (P s a - V) によって引き起こされる細菌感染症の治療又は予防に有用である。ある例では、本発明の併用物及び組成物は、細菌感染症の治療又は予防に関して相乗効果を示す。

30

【0117】

特定の実施態様において、本発明に係る併用剤又は組成物は、1以上の殺菌剤又は静菌剤をさらに含み得る。殺菌剤の例は、ベータラクタム抗生物質（例えば、ペニシリン誘導体、セファロスボリン類、モノバクタム類、カルバペネム類）、パンコマイシン、ダブトマイシン、フルオロキノロン類、メトロニダゾール、ニトロフラントイン、コトリモキサゾール又はテリスロマイシンを含むが、これらに限定されない。静菌剤の例は、テトラサイクリン類、マクロライド類、スルホンアミド類、リンコサミド類、オキサザリジノン、チゲサイクリン、ノボビオシン、ニトロフラントイン、スペクチノマイシン、トリメトプリム、クロラムフェニコール、エタンブトール又はクリンダマイシンを含むが、これらに限定されない。

40

【0118】

抗生素質耐性の台頭は、医療保険業界に深刻な影響を有しており、そして、細菌感染症に対抗する（すなわち、感染症を治療又は予防する）代替医療を提供するニーズは、ますます重要になっている。したがって、別の態様において、本発明は、医薬の製造における少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の使用、又は医薬の製造における使用のための少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の併用物を提供する。

【0119】

別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療又は予防するための、少

50

なくとも 1 つのサリチルアミド化合物及び少なくとも 1 つの排出ポンプ阻害化合物を含む医薬組成物を提供する（ここで、該細菌が引き起こす感染症は、グラム陰性菌を含む）。

【 0 1 2 0 】

なお別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療又は予防するための医薬の製造における、少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物及び少なくとも 1 つの排出ポンプ阻害化合物の使用を提供する（ここで、該細菌が引き起こす感染症は、グラム陰性菌を含む）。

【 0 1 2 1 】

なお別の態様において、本発明は、別個の単位剤形の少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物及び少なくとも 1 つの排出ポンプ阻害化合物を使用説明書と一緒に含むキットオブパーツを提供する。本発明に係るキットは、感染症に対抗する新たな方法として医療従事者によって処方及び / 又は投与され得る。

【 0 1 2 2 】

なお別の態様において、本発明は、細菌感染症を治療又は予防する方法であって、処置を必要とする患者に少なくとも 1 つのサリチルアミド化合物及び少なくとも 1 つの排出ポンプ阻害化合物を患者における細菌感染症を治療又は予防するのに十分な量で投与することを含む方法を提供する（ここで、該細菌が引き起こす感染症は、グラム陰性菌を含む）。

【 0 1 2 3 】

ニクロサミドの加水分解は、5 - クロロサリチル酸及び 2 - クロロ - 4 - ニトロアニリンを生成すると予測される。変異原性研究 (Espinosa-Aguirre, J. J., Reyes, R. E. and Cortinas de Nava, C. (1991). Mutagenic activity of 2-chloro-4-nitroaniline and 5-chlorosalicylic acid in *Salmonella typhimurium*: two possible metabolites of niclosamide. *Mutation Research Letters* 264(3): 139-145) は、2 - クロロ - 4 - ニトロアニリンは変異原性産物であるが、一方、5 - クロロサリチル酸は非変異原性であることを示唆している。図 15 は、大腸菌株 7 K O t o l C の成長を阻害するニクロサミド及び 2 - クロロ - 4 - ニトロアニリンの相対能力を示す。2 - クロロ - 4 - ニトロアニリンは、ニクロサミドよりも少なくとも 3 衍小さい毒性であるが、このことは、この加水分解されたニクロサミド誘導体が、ニクロサミド毒性がもたらされる主要な抗菌剤ではないことを示唆している。

【 0 1 2 4 】

ニタゾキサニド（図 16、差し込み図）は、本発明の併用物及び組成物において使用することができるサリチルアニリド化合物である。ニタゾキサニドは、クリプトスパリジウム・パルバム (*Cryptosporidium parvum*) 及びジアルジア・ランブル (*Giardia lamblia*) 感染症のための好ましい処置コースである (Anderson, V.R. and Curran, M.P. (2007). Nitazoxanide: a review of its use in the treatment of gastrointestinal infections. *Drugs*. 67(13):1947-1967)。ニタゾキサニドは、結核菌において膜電位及び pH 恒常性を崩壊させ、ヘリコバクター (*Helicobacter*) 及びカンピロバクター (*Campylobacter*) 並びに他の嫌気性細菌及び寄生生物においてピルビン酸オキシドレダクターゼを阻害する (de Carvalho, L. P. S., Darby, C. M., Rhee, K. Y. and Nathan, C. (2011). Nitazoxanide disrupts membrane potential and intrabacterial pH homeostasis of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS medicinal chemistry letters* 2(11): 849-854)。大腸菌 7 K O t o l C (DE3) 細胞 (T7 RNA ポリメラーゼプロモーター制御下で遺伝子の誘導性発現を可能にする、一体型 DE3 プロファージを有する菌株 7 K O t o l C) では、ニタゾキサニドは、ニクロサミドよりもおよそ 2 衍小さい毒性である (IC₅₀ = 5 . 2 μM)。しかしながら、ニクロサミドと同様に、大腸菌ニトロレダクターゼ NfSA 及び NfSB の過剰発現（この場合、7 K O t o l C (DE3) においてプラスミド pET28 から過剰発現される；Novagen）は、ニタゾキサニド毒性から防御することができる（図 16）。

【 0 1 2 5 】

10

20

30

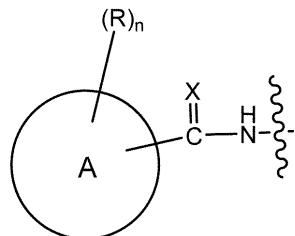
40

50

サリチルアミド化合物

当業者は、抗生素質活性を有する任意の好適なサリチルアミド化合物が、本発明の併用物及び組成物において使用され得ることを理解するだろう。好ましくは、サリチルアミド化合物は、グラム陰性菌に対して抗生素質活性を示す。本発明における使用のための好適なサリチルアミド化合物は、好ましくは、以下の構造部分を含む：

【化12】



10

式中、Aは、アリール又はヘテロアリール環、例えばフェニル環であり、(R)_nは、アリール又はヘテロアリール環が1以上の置換基で場合により置換されていてよいことを示し、そして、Xは、酸素又は別のヘテロ原子(硫黄等)である。基-C(=X)-NH-は、炭素又は窒素原子を介して環Aに連結することができる。好ましくは、サリチルアミド化合物は、1以上のニトロ基を含む。

【0126】

好ましくは、サリチルアミド化合物は、例えば、以下の式(I)に示されるとおり、各々場合により置換されていてよい2以上のアリール基、例えば2以上のフェニル環を含むサリチルアニリド化合物である。代替的に、サリチルアミド化合物は、1以上のヘテロアリール基を含み得る。サリチルアミド化合物は、アミド基の酸素の代わりに硫黄等のヘテロ原子を含み得る。用語「サリチルアミド化合物」は、全てのそのような類似体を含むことを意図する。

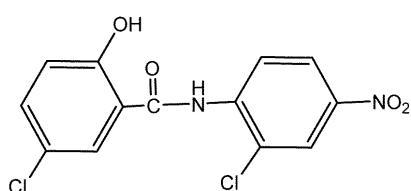
20

【0127】

好ましいサリチルアミド化合物は、サリチルアニリド化合物であるニクロサミド(N-(2'-クロロ-4'-ニトロフェニル)-5-クロロサリチルアミド)であり、その構造は、以下に示される。

30

【化13】



【0128】

エタノールアミン塩及びビペリジン塩を含むニクロサミドの塩形態が公知である。さらに、ニクロサミドの一水和物形態も公知である。任意の好適な薬学的に許容し得る塩又は水和物形態が本発明の組成物及び併用物に使用され得る。

40

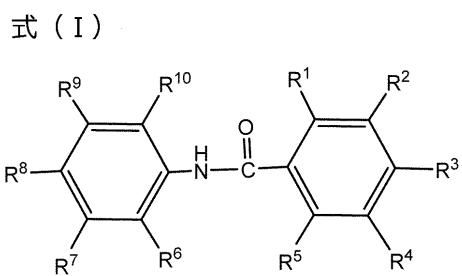
【0129】

他の好ましいサリチルアミド化合物は、ニクロサミドの類似体を含む。そのような類似体、例えば参照によって本明細書に組み入れられるU.S.2011/0183889号に記載されている類似体もまた公知である。本発明の併用物及び組成物における使用のための好適なニクロサミド類似体は、以下の表1に列挙されているものを含む一般式(I)(式中、R¹～R¹⁰は、本明細書に定義されるとおりである)によって記載される類似体を含むが、これらに限定されない。本発明における使用のための他の好適なニクロサミド類似体は、ニクロサミドの承認薬類似体を含む。

【0130】

50

【化14】



【0 1 3 1】

【表1】

化合物番号	置換基									
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹	R ¹⁰
1	OH	H	Cl	H	H	Cl	H	NO ₂	H	H
2	OH	Cl	H	H	H	Cl	H	NO ₂	H	H
3	OH	H	H	H	Cl	Cl	H	NO ₂	H	H
4	OH	H	H	Cl	H	H	Cl	NO ₂	H	H
5	OH	Cl	H	H	H	H	Cl	NO ₂	H	H
6	OH	H	Cl	H	H	H	Cl	NO ₂	H	H
7	OH	H	H	H	Cl	H	Cl	NO ₂	H	H
8	OH	H	H	Cl	H	Cl	NO ₂	H	H	H
9	OH	H	H	Cl	H	Cl	H	H	H	NO ₂
10	OH	H	H	H	Cl	Cl	H	H	NO ₂	H
11	H	OH	H	Cl	H	Cl	H	NO ₂	H	H
12	H	H	OH	Cl	H	Cl	H	NO ₂	H	H
13	Cl	OH	H	H	H	Cl	H	NO ₂	H	H
14	H	OH	Cl	H	H	Cl	H	NO ₂	H	H
15	H	OH	H	H	Cl	Cl	H	NO ₂	H	H
16	H	H	OH	H	Cl	Cl	H	NO ₂	H	H
17	OH	H	Cl	H	H	Cl	NO ₂	H	H	H
18	OH	Cl	H	H	H	Cl	NO ₂	H	H	H
19	OH	H	H	H	Cl	Cl	NO ₂	H	H	H
20	OH	H	H	Cl	H	F	H	NO ₂	H	H
21	OH	H	H	F	H	Cl	H	NO ₂	H	H
22	OH	H	H	Cl	H	Br	H	NO ₂	H	H
23	OH	H	H	Br	H	Cl	H	NO ₂	H	H
24	OH	H	H	Br	H	F	H	NO ₂	H	H
25	OH	H	H	F	H	Br	H	NO ₂	H	H
26	OH	H	H	Br	H	Br	H	NO ₂	H	H
27	OH	H	H	F	H	F	H	NO ₂	H	H
28	OH	H	H	Cl	H	Cl	H	NO ₂	H	H
29	OH	H	Cl	H	H	Br	H	H	H	H
30	H	H	OH	Cl	H	Br	H	NO ₂	H	H
31	OH	Cl	H	H	H	Br	H	NO ₂	H	H
32	OH	H	Cl	H	H	Cl	H	H	H	NO ₂

10

20

30

40

化合物番号	置換基									
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹	R ¹⁰
33	H	H	OH	Cl	H	Cl	H	H	H	NO ₂
34	OH	Cl	H	H	H	Cl	H	H	H	NO ₂
35	H	H	OH	F	H	Cl	H	H	H	NO ₂
36	H	H	OH	Br	H	Cl	H	H	H	NO ₂
37	H	OH	H	Cl	H	Cl	H	H	H	NO ₂
38	OH	H	Cl	H	H	F	H	NO ₂	H	H
39	H	H	OH	Cl	H	F	H	NO ₂	H	H
40	OH	Cl	H	H	H	F	H	NO ₂	H	H
41	H	OH	H	Cl	H	F	H	NO ₂	H	H
42	OH	H	H	H	Cl	Br	H	NO ₂	H	H
43	OH	H	H	H	Cl	F	H	NO ₂	H	H
44	OH	H	H	H	Cl	Cl	H	H	NO ₂	H
45	Cl	OH	H	H	H	Br	H	NO ₂	H	H
46	Cl	OH	H	H	H	Cl	NO ₂	H	H	H
47	Cl	OH	H	H	H	F	H	NO ₂	H	H
48	Cl	OH	H	H	H	H	Cl	NO ₂	H	H
49	Cl	OH	H	H	H	Cl	H	H	NO ₂	H
50	H	OH	Cl	H	H	Br	H	NO ₂	H	H
51	H	OH	Cl	H	H	Cl	NO ₂	H	H	H
52	H	OH	Cl	H	H	F	H	NO ₂	H	H
53	H	OH	Cl	H	H	H	Cl	NO ₂	H	H
54	H	OH	Cl	H	H	Cl	H	H	NO ₂	H
55	H	OH	H	H	Cl	Br	H	NO ₂	H	H
56	H	OH	H	H	Cl	Cl	NO ₂	H	H	H
57	H	OH	H	H	Cl	F	H	NO ₂	H	H
58	H	OH	H	H	Cl	H	Cl	NO ₂	H	H
59	H	OH	H	H	Cl	Cl	H	H	NO ₂	H
60	H	H	OH	H	Cl	Cl	NO ₂	H	H	H
61	H	H	OH	H	Cl	F	H	NO ₂	H	H
62	H	H	OH	H	Cl	H	Cl	NO ₂	H	H
63	H	H	OH	H	Cl	Cl	H	H	NO ₂	H
64	OH	H	Cl	H	H	Cl	H	H	NO ₂	H
65	H	H	OH	Cl	H	Cl	H	H	NO ₂	H

10

20

30

40

50

化合物番号	置換基									
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹	R ¹⁰
66	OH	Cl	H	H	H	Cl	H	H	NO ₂	H
67	OH	H	H	Br	H	Cl	H	H	NO ₂	H
68	OH	H	H	F	H	Cl	H	H	NO ₂	H
69	H	OH	H	Cl	H	Cl	H	H	NO ₂	H

10

【0132】

本発明の併用物及び組成物における使用に好適な他のサリチルアミド化合物は、オキシクロザニド(2,3,5-トリクロロ-N-(3,5-ジクロロ-2-ヒドロキシフェニル)-6-ヒドロキシベンズアミド)、クロサンテル(N-[5-クロロ-4-[4-クロロフェニル]-シアノメチル]-2-メチルフェニル]-2-ヒドロキシ-3,5-ジヨードベンズアミド)、ラフォオキサニド(N-[3-クロロ-4-(4-クロロフェノキシ)フェニル]-2-ヒドロキシ-3,5-ジヨードベンズアミド)、フルサラン(3,5-ジブロモ-2-ヒドロキシ-N-[3-(トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド)、トリブロムサラン(3,5-ジブロモ-N-(4-ブロモフェニル)-2-ヒドロキシベンズアミド)、ジブロムサラン(5-ブロモ-N-(4-ブロモフェニル)-2-ヒドロキシベンズアミド)、レスランテル(N-(4-ブロモフェニル)-2,6-ジヒドロキシベンズアミド)、クリオオキサニド(酢酸2-(4-クロロフェニルカルバモイル)-4,6-ジヨード-フェニルエステル)、4'-クロロ-5-ニトロサリチルアニリド、2'-クロロ-5'-メトキシ-3-ニトロサリチルアニリド、2'-メトキシ-3,4'-ジニトロサリチルアニリド、2',4'-ジメチル-3-ニトロサリチルアニリド、4',5'-ジブロモ-3-ニトロサリチルアニリド、2'-クロロ-3,4'-ジニトロサリチルアニリド、2'-エチル-3-ニトロサリチルアニリド、2'-ブロモ-3-ニトロサリチルアニリドを含むが、これらに限定されない。

20

【0133】

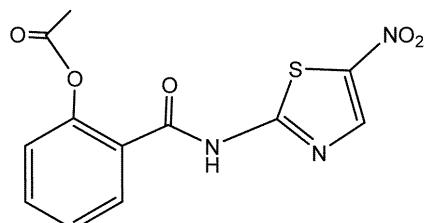
30

本発明はまた、他のサリチルアミド化合物、例えば、1以上のヘテロアリール環を含有するサリチルアミド化合物の使用を含む。ヘテロアリール環(单数又は複数)は、1以上の置換基を有し得る。そのような化合物の一例は、以下に示されるニタゾキサニド(2-アセチルオキシ-N-(5-ニトロ-2-チアゾリル)ベンズアミド)である。

【0134】

【化15】

ニタゾキサニド



40

【0135】

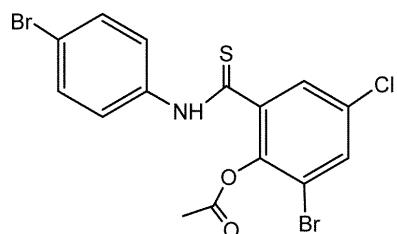
本発明はさらに、他のサリチルアミド化合物、例えば、アミド基の酸素が別のヘテロ原子に置き換わっているサリチルアミド化合物の使用を含む。そのような化合物の一例は、ブロチアニド(3,4'-ジブロモ-5-クロロチオサリチルアニリド)(以下に示される)である。

【0136】

50

【化16】

プロチアニド



【0137】

10

上記のサリチルアミド化合物のいくつかは市販されている。他のものは、当業者に公知の方法によって容易に調製され得る。例えば、参照によって本明細書に組み入れられるWO2004/006906号は、ニクロサミド類似体を調製するための方法を記載している。

【0138】

20

当業者は、サリチルアミド化合物とニトロ-プロドラッグ抗生物質が、両方の化合物クラスがその化学構造内にニトロ基（単数又は複数）を含むにしても異なることを理解するだろう。本明細書において使用される場合、用語「ニトロ-プロドラッグ抗生物質」は、初期の投与時に、細菌に非毒性又は実質的に非毒性であるが、1以上の細菌のニトロレダクターゼ酵素（単数又は複数）によって還元を受け、それによって細菌に毒性である薬物に変換されるプロドラッグ化合物を意味する。一方で、本出願人によって意外にも見いだされたとおり、本発明のサリチルアミド化合物、例えばニクロサミドは、細菌に毒性であるが、1以上のニトロレダクターゼ酵素（単数又は複数）によって細菌に非毒性である種に変換される化合物である。

【0139】

30

好ましくは、本発明において使用することができるニトロ-プロドラッグ抗生物質化合物はニトロイミダゾール誘導体であるが、当業者は、他の種類の化合物もニトロ-プロドラッグ抗生物質であり得ることを理解するだろう。好適なニトロ-プロドラッグ抗生物質の例は、ニトロフラントイソチアノン、ニトロフラゾン、メトロニダゾール、チニダゾール、フラゾリドン、ミソニダゾール、エタニダゾール、ニフルチモックス、オルニダゾール、ベンズニダゾール、ジメトリダゾール、ロニダゾール、RSU-1069(1-(1-アジリジニル)-3-(2-ニトロ-1-イミダゾリル)-2-プロパノール)、RB-6145(1H-イミダゾール-1-エタノール、アルファ-((2-プロモエチル)アミノ)メチル)-2-ニトロ-、モノヒドロプロミド)、CB1954(5-(アジリジン-1-イル)-2,4-ジニトロベンズアミド)、EF3(2-(2-ニトロイミダゾール-1H-イル)-N-(3,3,3-トリフルオロプロピル)アセトアミド)、EF5(2-(2-ニトロ-1H-イミダゾール-1-イル)-N-(2,2,3,3-ペンタフルオロプロピル)アセトアミド)、HX4(3-フルオロ-2-(4-((2-ニトロ-1H-イミダゾール-1-イル)メチル)-1H-1,2,3-トリアゾール-1-イル)-プロパン-1-オール)又はフッ化ミソニダゾールを含むが、これらに限定されない。

40

【0140】

排出ポンプ阻害化合物

排出ポンプは、グラム陰性菌とグラム陽性菌の両方で発現されるが、グラム陰性菌においてより強力な耐性機序である。大腸菌AcraB-TolC排出ポンプの同族体は、グラム陰性菌の主な排出ポンプであると考えられる。

【0141】

50

排出ポンプ阻害化合物は、別の化合物、例えば抗生物質を細胞から運び去る排出ポンプの能力に干渉する化合物である。排出ポンプ阻害化合物を抗生物質と一緒に送達することにより、耐性であると同定されている菌株に対してさえも抗生物質の効力を増加させるこ

とができることは公知である。そのような排出阻害化合物は、排出ポンプの競合阻害剤であり得る。例えば、PAN(フェニルアラニン-アルギニン-N-ナフチルアミド)は、AcridAB-TolCの競合阻害剤であり、このことは、それが細胞外に優先的に運び去られることを意味し、それによって抗生物質の輸送率を低下させ、かつ抗生物質を毒性レベルまで蓄積させる。

【 0 1 4 2 】

当業者は、任意の好適な排出ポンプ阻害化合物が本発明の併用物及び組成物において使用され得ることに気付くであろう。好ましい排出ポンプ阻害化合物は、広範な細菌株にわたって活性である化合物、特定すると大腸菌 A c r A B - T o 1 C 排出ポンプの同族体等のグラム陰性菌の排出ポンプに対して活性である化合物である。参照によって本明細書に組み入れられる WO 96 / 33285 号は、微生物の排出ポンプ阻害剤の阻害剤をスクリーニングするための方法を記載している。当業者は、そのようなスクリーニング法を使用して、本発明において用いられ得る排出ポンプ阻害剤を同定できることを認識するだろう。

【 0 1 4 3 】

R) - 2 - アミノプロピオンアミド] - N - (2 - フェニルエチル) - N - (3 - キノリルカルバモイル) エチル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4 R) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - (2 - フェニルエチル) - N - (3 - キノリルカルバモイル) エチル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 R , 4 S) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - (2 - メチルプロピル) - N - (7 - エチル - 3 - キノリルカルバモイル) エチル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 R , 4 R) - 4 - (アミノメチル) - N - (2 - フェニルエチル) - N - (3 - キノリルカルバモイル) エチル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 R , 4 R) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - (2 - フェニルエチル) - N - (3 - キノリルカルバモイル) メチル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 R , 4 S) - 4 - [(2 R) - 2 - アミノプロピオンアミド] - N - (3 , 3 - ジメチルブチル) - N - (3 - キノリルカルバモイル) メチル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 R , 4 R) - 4 - (アミノメチル) - N - [(1 R) - 3 - フェニル - 1 - [(2 - キノリルオキシ) メチル] プロピル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 R , 4 S) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - [(1 R) - 3 - メチル - 1 - [(2 - ナフチルオキシ) メチル] ブチル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4 R) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - [(1 R) - 3 - フェニル - 1 - [(4 - クロロフェニルチオ) メチル] プロピル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4 R) - 4 - [(2 R) - 2 - アミノプロピオンアミド] - N - [(1 R) - 3 - フェニル - 1 - [(4 - クロロフェニルチオ) メチル] プロピル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 R , 4 S) - 4 - [(2 R) - 2 - アミノプロピオンアミド] - N - [(1 R) - 3 - フェニル - 1 - [(4 - クロロフェニルチオ) メチル] プロピル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4 R) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - [(1 R) - 3 - フェニル - 1 - [(2 - キノリルオキシ) メチル] プロピル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4 R) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - [(1 R) - 3 - フェニル - 1 - [(2 - キノリルチオ) メチル] プロピル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド (carobxamide) 、 (2 S , 4 R) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - [(1 R) - 3 - フェニル - 1 - (フェニルチオメチル) プロピル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4 R) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - [(1 R) - 3 - フェニル - 1 - [(4 - フルオロフェニルチオ) メチル] プロピル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4 R) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - [(1 R) - 3 - メチル - 1 - [(2 - キノリルオキシ) メチル] ブチル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 R , 4 R) - 4 - (アミノメチル) - N - [(1 R) - 3 - メチル - 1 - [(3 - キノリルオキシ) メチル] ブチル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4 R) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - [(1 R) - 3 - メチル - 1 - [(4 - クロロフェニルチオ) メチル] ブチル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 R , 4 R) - 4 - (アミノメチル) - N - [(1 R) - 3 - メチル - 1 - [(4 - クロロフェニルチオ) メチル] ブチル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 R , 4 R) - 4 - (アミノメチル) - N - [(2 S) - 2 - (6 - メチル - 3 - キノリルカルボキサミド) - 4 - フェニルブチル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 R , 4 R) - 4 - (アミノメチル) - N - [(1 R) - 3 - フェニル - 1 - [(6 - メチル - 3 - キノリルカルボキサミド) メチル] プロピル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4 R) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - [(1 R) - 1 - [(R S) - (5 , 6 - ジメチル - 2 - ベンゾオキサゾリル) ヒドロキシメチル] - 3 - フェニルプロピル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4 R) - 4 - [(2 R) - 2 - アミノプロピオンアミド] - N - [(1 R) - 1 - [(R S) - (5 , 6 - ジメチル - 2 - ベンゾオキサゾリル) ヒドロキシメチル] - 3 - フェニルプロピル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 R , 4 S) - 4 - [(2 R) - 2 - アミノプロピオンアミド] - N - [(1 R) - 1 - [(R S) - (5 , 6 - ジメチル - 2 - ベンゾオキサゾリル) ヒドロキシメチル] - 3 - フェニルプロピル] - 10

20

30

40

50

, 4 R) - 4 - (グアナジニル (guanadinyl)) - N - [(1 R) - 3 - フェニル - 1 -
 (3 - キノリルカルバモイル) プロピル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4
 R) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - [7 - エチル - 3 - キノリル] - 2 - ピロ
 リジンカルボキサミド、 (2 R , 4 R) - 4 - (アミノメチル) - N - [6 - (1 , 1 -
 ジメチル) エチル - 3 - キノリル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4 R) -
 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N - (5 - ベンジル - 2 - ヒドロキシフェニル) - 2
 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4 R) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - N -
 [4 - ベンジル - 2 - ベンズイミダゾリル) エチル] - 2 - ピロリジンカルボキサミド、
 (2 R , 4 R) - 4 - (アミノメチル) - N - (6 - エチル - 3 - キノリル) - 2 - ピロ
 リジンカルボキサミド、 (2 R , 4 R) - 4 - (アミノメチル) - N - (5 - ベンジル -
 2 - ベンズイミダゾリル) - 2 - ピロリジンカルボキサミド、 (2 S , 4 R) - 4 - (2
 - アミノアセトアミド) - N - (5 - ベンジル - 2 - ベンズイミダゾリル) - 2 - ピロリ
 ディンカルボキサミド、 (2 R , 4 R) - 4 - (アミノメチル) - N - [(1 R) - 3 - フ
 エニル - 1 - [(3 - キノリルカルボキサミド) メチル] プロピル] - 2 - ピロリジンカル
 ボキサミド、 trans - 4 - グリシルアミノ - D - プロリル - D - プロリン - (6 - イソ
 プロピル) - 3 - キノリルアミド、 trans - 4 - アミノ - L - プロリル - trans - 4 - ((R) -
 2 - ヒドロキシ - 4 - フェニルブチリルアミノ - L - プロリン 3 - キノリルアミ
 ド、 trans - 4 - グリシルアミノ - L - プロリル - trans - 4 - ((R) - 2 - ヒドロキシ -
 4 - フェニルブチリル (butryl) アミノ) - L - プロリン 3 - キノリルアミド、 cis -
 4 - グリシルアミノ - L - プロリル - trans - 4 - ((R) - 2 - ヒドロキシ - 4 - フ
 エニルブチリルアミノ) - L - プロリン 3 - キノリルアミド、 trans - 4 - グリシルアミノ
 - D - プロリル - trans - 4 - ((R) - 2 - ヒドロキシ - 4 - フェニルブチリルアミノ) -
) - L - プロリン 3 - キノリルアミド、 trans - 4 - (N - メチルグリシルアミノ) - L
 - プロリル - trans - 4 - ((R) - 2 - ヒドロキシ - 4 - フェニルブチリルアミノ) -
 L - プロリン 3 - キノリルアミド、 trans - 4 - ((S) - 3 - アミノ - 2 - ヒドロキシ
 プロピオニルアミノ) - L - プロリル - trans - 4 - ((R) - 2 - ヒドロキシ - 4 - フ
 エニルブチリルアミノ) - L - プロリン 3 - キノリルアミド、 trans - 4 - アミノメチル
 - L - プロリル - trans - 4 - ((R) - 2 - ヒドロキシ - 4 - フェニルブチリルアミノ) -
) - L - プロリン 3 - キノリルアミド、 4 - (2 - アミノエチル) - L - プロリル - tra
 ns - 4 - ((R) - 2 - ヒドロキシ - 4 - フェニルブチリルアミノ) - L - プロリン 3
 - キノリルアミド、 1 - (N - メチルグリシル) - trans - 4 - アミノ - L - プロリル - t
 rans - 4 - ((R) - 2 - ヒドロキシ - 4 - フェニルブチリルアミノ) - L - プロリン
 3 - キノリルアミド、 trans - 4 - アミノ - L - ピペコリノイル (pipecolinoyl) - trans
 - 4 - ((R) - 2 - ヒドロキシ - 4 - フェニルブチリルアミノ) - L - プロリン 3 -
 キノリルアミド、 cis - 4 - アミノ - L - ピペコリノイル - trans - 4 - ((R) - 2 - ヒ
 ドロキシ - 4 - フェニルブチリルアミノ) - L - プロリン 3 - キノリルアミド、 trans -
 4 - グリシルアミノ - L - ピペコリノイル - trans - 4 - ((R) - 2 - ヒドロキシ - 4
 - フェニルブチリルアミノ) - L - プロリン 3 - キノリルアミド、 cis - 4 - グリシルア
 ミノ - L - ピペコリノイル (pipecolinoyl) - trans - 4 - ((R) - 2 - ヒドロキシ -
 4 - フェニルブチリルアミノ) - L - プロリン 3 - キノリルアミド、 D - オルニチル - t
 rans - 4 - (4 - フェニルブタノイル) アミノ - L - プロリン - 5 - インダニルアミド、
 L - オルニチル - cis - 4 - (4 - フェニルブタノイル) アミノ - L - プロリン - 5 - イ
 ンダニルアミド、 D - オルニチル - cis - 4 - (4 - フェニルブタノイル) アミノ - L -
 プロリン 5 - インダニルアミド、 4 - ヒドロキシ - L - オルニチル - trans - 4 - (4 -
 フェニルブタノイル) アミノ - L - プロリン 5 - インダニルアミド、 trans - 4 - グリ
 シルアミノ - L - プロリル - D - ホモフェニルアラニン 3 - キノリルアミド、 trans - 4 -
 アミノ - L - プロリル - D - ホモフェニルアラニン 3 - キノリルアミド、 trans - 4 - グ
 リシルアミノ - L - プロリル - D - ホモフェニルアラニン 5 - インダニルアミド、 trans
 - 4 - グリシルアミノ - L - プロリル - D - ホモフェニルアラニン 3 , 4 - ジメチルフ
 ェニルアミド、 trans - 4 - グリシルアミノ - L - プロリル - D - ホモフェニルアラニン
10
20
30
40
50

3,5-ジメチルフェニルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリル-D-ホモフェニルアラニン 4-クロロ-3-メチルフェニルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリルグリシン 4-ベンジルフェニルアミド、trans-4-グリシルアミノ(glyclamino)-L-プロリン 4-フェノキシフェニルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリン 4-(4'-メチルフェノキシ)フェニルアミド、
 trans-4-グリシルアミノ-L-プロリン 4-(4'-クロロフェノキシ)フェニルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリン 4-フェニルアミノフェニルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリン 3-ビフェニルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリン 4-ベンジルフェニルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリン 4-tert-ブチルフェニルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリン 4-フェニルベンジルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリン 4-ベンジルオキシフェニルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリン 3-ベンジルオキシフェニルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリン 4-(フェニルチオメチル)フェニルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリン 4-ベンジルチオフェニルアミド、trans-4-((S)-3-アミノ-2-ヒドロキシプロピオニルアミノ)-L-プロリン 4-フェノキシフェニルアミド、trans-4-(2-アミノエチルスルホニルアミノ)-L-プロリン 4-フェノキシフェニルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリン 4-フェニルチアゾール-2-イルアミド、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリン 3-(6-ベンジル)キノリルアミド、trans-4-アミノ-L-ピペコリノイル-(4-フェノキシフェニル)アミド、trans-4-グリシルアミノ-L-ピペコリノイル 4-フェノキシフェニルアミド、trans-4-アミノメチル-L-プロリン 4-フェノキシフェニルアミド、1-(trans-4-グリシルアミノ-L-プロリル)-4-(3-クロロフェニル)ピペラジン、1-[trans-4-((2S)-3-アミノ-2-ヒドロキシプロピオニルアミノ)-D-プロリル]-4-(3-クロロ-2-メチルフェニル)ピペラジン、1-(N-trans-4-グリシルアミノ-L-プロリル)-4-(4-クロロフェニル)ピペラジン、1-(trans-4-グリシルアミノ-L-プロリル)-4-(2-クロロフェニル)ピペラジン、1-(trans-4-アミノメチル-L-プロリル)-4-(3-クロロ-2-メチルフェニル)ピペラジン、1-(trans-4-グリシルアミノ-L-プロリル)-4-(4-フェニルブタノイル)ピペラジン、(2R)-4-ベンジル-1-(trans-4-グリシルアミノ-D-プロリル)-2-フェネチルピペラジン、1-(trans-4-グリシルアミノ-L-プロリル)-4-(4-ベンジルオキシフェノキシ)ピペリジン、1-(trans-4-グリシルアミノ-L-プロリル)-4-(3,5-ジクロロフェノキシ)ピペリジン、1-(trans-4-グリシルアミノ-D-プロリル)-4-(3,5-ジクロロフェノキシ)ピペリジン、trans-4-グリシルアミノ-L-プロリル-4-(2-クロロ-5-メチルフェノキシ)ピペリジン、(2S,4R)-4-グリシルアミノ-2-(4-ビフェニルオキシ)メチルピロリジン、(2S,4R)-4-グリシルアミノ-2-(3-ビフェニルオキシ)メチルピロリジン、(2R,4S)-4-グリシルアミノ-2-(4-ビフェニルオキシ)メチルピロリジン、(2R,4S)-4-グリシルアミノ-2-(3-ビフェニルオキシ)メチルピロリジン、trans-4-(3-ビフェニルオキシ)-L-プロリン 2-アミノエチルアミド、(2S,4R)-2-(2-アミノ-1-ヒドロキシエチル)-4-(3-ビフェニルオキシ)ピロリジン、1-(N-trans-4-グリシルアミノ-L-プロリルアミノ)-3-(4-フェニルプロパノイルアミノ)ベンゼン、2-(trans-4-グリシルアミノ(glycylanino)-L-プロリルアミノ)-6-(4-フェニルプロパノイルアミノ)ピリジン又は(2S,4R)-4-グリシルアミノ-2-((E及びZ)-4-フェニルスチリル)ピロリジンを含むが、これらに限定されない。

【0144】

本発明の併用物及び組成物における使用に好適な他の排出ポンプ阻害化合物は、グロボマイシン(グリシン、N-(N-(N-(N-(3-ヒドロキシ-2-メチル-1

10

20

30

40

50

- オキソノニル) - N - メチルロイシル) - L - アロイソロイシル) - L - セリル) - L - アロトレオニル) - 、 rho - ラクトン)、カルボニルシアニド m - クロロフェニルヒドラゾン (C C C P)、ピリドキノロン、MC - 04, 124 ((2R, 4R) - 4 - (アミノメチル) - N - [(2R) - 1 - オキソ - 4 - フェニル - 1 - (キノリン - 6 - イルアミノ) ブタン - 2 - イル] ピロリジン - 2 - カルボキサミド)、又は MC - 02, 595 (D - オルニチン - D - ホモフェニルアラニン - 3 - アミノキノリン) を含むが、これらに限定されない。

【0145】

本発明の併用物及び組成物における使用に好適な排出ポンプ化合物のクラスは、アルコキシキノリン誘導体、例えば、2, 8 - ジメチル - 4 - (2' - ピロリジノエチル) - オキシキノリン；ピペリジン及びピペリジン類似体；フェノチアジン類、例えば、クロロプロマジン；モノテルペン誘導体、例えば、グラニルアミン；又はアルギニン誘導体、例えば、参照によって本明細書に組み入れられる U S 6, 251, 869 号に記載されるものを含むが、これらに限定されない。

10

【0146】

本発明の併用物及び組成物における使用に好適な排出ポンプ阻害剤の別の例は、2 - 3ジプロモマレイミドである。

【0147】

本発明の併用物及び組成物における使用に好適な好ましい排出ポンプ阻害剤は、フェニルアラニン - アルギニン - ナフチルアミド (P A N) である。

20

【0148】

他の態様

サリチルアミド化合物及び排出ポンプ阻害化合物は、個別に、連続的に又は同時に投与され得る。例えば、サリチルアミド化合物及び排出ポンプ阻害化合物の併用物は、患者への投与のための組成物として一緒に製剤化され得る。代替的に、サリチルアミド化合物及び排出ポンプ阻害化合物は、各々、患者への個別又は連続投与のために個別に製剤化され得る。

【0149】

サリチルアミド化合物又はサリチルアミド化合物及び排出ポンプ阻害化合物は、経口、非経口、吸入スプレーによる、局所、直腸、経鼻、口腔、静脈内、筋肉内、皮内、皮下又は埋め込み型リザーバー (implanted reservoir) を介する経路を含む種々の経路によって、好ましくは静脈内によって、患者に投与され得る。投与されるべき各化合物の量は、患者の特質並びに処置されるべき障害の特質及び程度に応じて広く変化するだろう。成年についての典型的な投与量は、サリチルアミド化合物では最大で約 5 g、好ましくは最大で約 2 g、そして、排出ポンプ阻害化合物では最大で約 5 g、好ましくは最大で約 2 g であろう。任意の特定の患者に必要な具体的な投与量は、患者の年齢、体重、総体的な健康状態、性別等を含む種々の要因に依存するだろう。

30

【0150】

個別、連続又は同時経口投与のために、サリチルアミド化合物及び排出ポンプ阻害化合物は、固体又は液体製剤、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、液剤、懸濁剤及び分散剤へと製剤化され得る。そのような製剤は、ここに列挙していない他の経口投与計画と同様に当技術分野において周知である。錠剤形態において、該化合物は、ラクトース、スクロース及びトウモロコシデンプン等の従来の錠剤基剤を結合剤、崩壊剤及び滑剤と一緒に用いて錠剤化され得る。結合剤は、例えば、トウモロコシデンプン又はゼラチンであり得、崩壊剤はジャガイモデンプン又はアルギン酸であり得、そして、滑剤はステアリン酸マグネシウムであり得る。カプセル剤の形態での経口投与のために、ラクトース及び乾燥トウモロコシデンプン等の希釈剤が用いられる。着色剤、甘味料又は香料等の他の成分が加えられ得る。

40

【0151】

水性懸濁剤が経口使用に必要とされる場合、サリチルアミド化合物又はサリチルアミド

50

化合物及び排出ポンプ阻害化合物は、水及びエタノール等の担体と組み合わせられ得、そして、乳化剤、懸濁化剤及び／又は界面活性剤が使用され得る。着色剤、甘味料又は香料もまた加えられ得る。

【0152】

サリチルアミド化合物又はサリチルアミド化合物及び排出ポンプ阻害化合物はまた、水又は生理食塩水等の生理学的に許容し得る希釈剤中の注射によって、個別に、連続的に又は同時に投与され得る。希釈剤は、エタノール、プロピレンギリコール、油又は薬学的に許容し得る界面活性剤等の1以上の他の成分を含み得る。一例では、該化合物は、希釈剤がスクロース、L-ヒスチジン及び薬学的に許容し得る界面活性剤（例えば、Tween 20）の水溶液を含む静脈内注射によって、個別に、連続的に又は同時に投与される。

10

【0153】

サリチルアミド化合物又はサリチルアミド化合物及び排出ポンプ阻害化合物はまた、個別に、連続的に又は同時に局所投与され得る。該化合物の局所投与のための担体は、鉛油、流動ワセリン、白色ワセリン、プロピレンギリコール、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックス及び水を含む。該化合物は、皮膚又は粘膜への局所投与のために、ローション剤又はクリーム剤中の成分として存在し得る。そのようなクリーム剤は、1以上の薬学的に許容し得る担体中に懸濁又は溶解された活性化合物を含有し得る。好適な担体は、鉛油、モノステアリン酸ソルビタン、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコール及び水を含む。

20

【0154】

サリチルアミド化合物又はサリチルアミド化合物及び排出ポンプ阻害化合物は、さらに、持続放出系によって、個別に、連続的に又は同時に投与され得る。例えば、これらは、ゆっくり溶解する錠剤又はカプセル剤中へ組み込まれ得る。

【0155】

植物における感染症、例えば、マタタビ属のキウイフルーツ植物におけるシードモナス・シリンガエ・p.v.アクチニディア（Psa-V）によって引き起こされる細菌感染症の処置のために、サリチルアミド化合物及び排出ポンプ阻害化合物は、場合により、例えば植物への適用のためのスプレー剤として、1以上の担体を用いて製剤化され得る。該化合物は、個別に、連続的に又は同時に適用され得る。植物への適用のために、本発明の併用物及び組成物は、植物への適用に好適な1以上の補助剤、例えば乳化剤、分散剤、鉛油及び植物油、又はそれらの混合物をさらに含み得る。該併用物及び組成物はまた、果樹園間の細菌感染症の蔓延を防止するために、フィールド用具（例えば、剪定ばさみ）用の滅菌剤として使用され得る。

30

【0156】

本発明はまた、細菌感染症を治療又は予防するための機器及びキットに関する。好適なキットは、個別、連続又は同時使用のための、少なくとも1つの細菌感染症の少なくとも1つの処置に十分な少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物を、該治療／予防を実施するための説明書と一緒に含む。

40

【0157】

キットの及び細菌感染症の治療／予防の使用説明書は、ラベリングの形態であり得、それは、製造、輸送、販売又は使用中のあらゆる時点においてキットに添付されている又はそうでなければ付属されている任意の文書体又は記録体を指す。例えば、用語「ラベリング」は、広告リーフレット及びパンフレット、包装材料、説明書、オーディオ又はビデオカセット、コンピューターディスク、並びにキットに直接印刷された文書を包含する。

【0158】

本明細書に提示される本出願人の結果は、驚くべきことに、ニトロ-プロドラッグ抗生物質並びに1以上のニトロ基を含有するサリチルアミド、例えばニクロサミド及びニクロサミド類似体を含む特定の薬物を細菌がどのようにして代謝するかの分子基礎への興味深い見識を提供する。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、本出願人は

50

、ニトロ・プロドラッグ抗生物質での処置に耐性を持つようになっている細菌が、次いで、内因性ニトロレダクターゼ遺伝子の自然突然変異のために、1以上のニトロ基含有サリチルアミド化合物での処置に感受性になるだろうということを提唱する。一方で、野生型と比較した内因性ニトロレダクターゼ活性の喪失又は低減は、一旦細菌細胞内に入ってもプロドラッグは毒性抗生物質を產生するように開裂されないので、細菌細胞がニトロ・プロドラッグ抗生物質に耐性であることを意味する。一方で、内因性ニトロレダクターゼ活性の喪失又は低減は、ニトロレダクターゼ活性の非存在下では細菌細胞がもはや毒性のニクロサミドを非毒性形態に変換することができないので、細菌細胞が1以上のニトロ基含有サリチルアミド化合物、例えばニクロサミド及びニクロサミド類似体により感受性であることを意味する。排出ポンプ阻害剤は、場合により1以上のニトロ基含有サリチルアミド化合物と共に含まれ、該薬物に対する感受性を増強させ得る。

10

【0159】

したがって、なお別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療又は予防するための方法（ここで、該細菌は、ニトロ・プロドラッグ抗生物質での処置に耐性を持つようになっている）であって、該患者に少なくとも1つのサリチルアミド化合物を、感染症を治療又は予防するのに十分な量で投与することを含む方法（ここで、該サリチルアミド化合物は、1以上のニトロ基を含む）を提供する。場合により、該方法は、少なくとも1つの排出ポンプ阻害剤を投与することをさらに含む。

20

【0160】

なお別の態様において、本発明は、細菌バイオフィルムの形成を低減又は排除するための方法（ここで、該細菌は、ニトロ・プロドラッグ抗生物質での処置に耐性を持つようになっている）であって、少なくとも1つのサリチルアミド化合物を該バイオフィルムの形成を低減又は排除するのに十分な量で投与することを含む方法（ここで、該サリチルアミド化合物は、1以上のニトロ基を含む）を提供する。場合により、該方法は、少なくとも1つの排出ポンプ阻害剤を投与することをさらに含む。

20

【0161】

反対に、1以上のニトロ基含有サリチルアミド化合物での処置（排出ポンプ阻害剤が存在する又はしない）に耐性を持つようになっている細菌は、ニトロレダクターゼ酵素活性の増加を引き起こす内因性ニトロレダクターゼ遺伝子の突然変異を介してそのようになっている可能性がある。一方で、野生型と比較した内因性ニトロレダクターゼ活性の増加は、細菌細胞がもはや毒性のニトロ基含有サリチルアミド化合物、例えばニクロサミド及びニクロサミド類似体を非毒性形態に変換することができないので、細菌細胞がニトロ基含有サリチルアミド化合物（排出ポンプ阻害剤の存在下又は非存在下）に耐性であることを意味する。一方で、内因性ニトロレダクターゼ活性の増加は、細菌細胞がプロドラッグを開裂して活性形態の抗生物質を形成するので、細菌細胞が1以上のニトロ・プロドラッグ抗生物質により感受性であることを意味する。

30

【0162】

したがって、なお別の態様において、本発明は、患者における細菌感染症を治療又は予防するための方法（ここで、該細菌は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出阻害化合物での処置に耐性を持つようになっており、ここで、該サリチルアミド化合物は、1以上のニトロ基を含む）であって、該患者にニトロ・プロドラッグ抗生物質を、感染症を治療又は予防するのに十分な量で投与することを含む方法を提供する。

40

【0163】

なお別の態様において、本発明は、細菌バイオフィルムの形成を低減又は排除するための方法（ここで、該細菌は、少なくとも1つのサリチルアミド化合物又は少なくとも1つのサリチルアミド化合物及び少なくとも1つの排出ポンプ阻害化合物の併用物での処置に耐性を持つようになっており、ここで、該サリチルアミド化合物は、1以上のニトロ基を含む）であって、ニトロ・プロドラッグ抗生物質を該バイオフィルムの形成を低減又は排除するのに十分な量で投与することを含む方法を提供する。

50

【0164】

特定の実施態様において、ニトロ-プロドラッグ抗生物質は、ニトロフラントイントイン、ニトロフラゾン、メトロニダゾール、チニダゾール、フラゾリドン、ミソニダゾール、エタニダゾール、ニフルチモックス、オルニダゾール、ベンズニダゾール、ジメトリダゾール、ロニダゾール、R S U - 1 0 6 9、R B - 6 1 4 5、C B 1 9 5 4、E F 3、E F 5、H X 4 及びフッ化ミソニダゾールからなる群より選択される。

【0165】

定義

用語「患者」は、ヒト及び非ヒト動物を含む。非ヒト動物は、トリ並びに哺乳動物、特に、マウス、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ及びクロネズミを含むが、これらに限定されない。用語「患者」及び「被験体」は、本明細書において互換的に使用され、細菌感染症を予防又は治療する状況下で、医療健康従事者、並びに処置を受けている患者を含む。

【0166】

「処置」及び類似の用語は、医学的疾患、障害若しくは状態を予防、治療若しくは改善する、及び／又はそのような疾患若しくは障害の少なくとも1つの症状を低減させる、方法及び組成物を指す。特に、これは、医学的疾患、障害若しくは状態の発症を予防若しくは遅延させる；医学的疾患、障害若しくは状態の身体的若しくは発生上の影響を治療、修正、低減、減速若しくは改善する；及び／又は医学的疾患、障害若しくは状態によって引き起こされる疼痛若しくは苦痛を予防、終焉、低減若しくは改善する、方法及び組成物を含む。

【0167】

用語「予防する」は、事態又は事象、例えば、予防されるべき細菌感染症の生成又は出現を全体的若しくは部分的に予防すること、又は改善若しくは制御すること、又は低減若しくは停止することを意味する。

【0168】

用語「アリール」は、4～18個の炭素原子を有する芳香族基を意味する。例は、単環式基、並びに二環式基及び三環式基等の縮合基を含む。例は、フェニル、インデニル、1-ナフチル、2-ナフチル、アズレニル、ヘプタレニル、ビフェニル、インダセニル、アセナフチル、フルオレニル、フェナレニル、フェナントレニル、アントラセニル、シクロペニタシクロオクテニル及びベンゾシクロオクテニルを含む。

【0169】

用語「ヘテロアリール」は、4～18個の炭素原子を有しあつ1以上のヘテロ原子を含む芳香族基を意味する。例は、単環式基、並びに二環式基及び三環式基等の縮合基を含む。例は、ピリジル、ピロリル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、キナゾリニル、キノリル、イソキノリル、キノキサリニル、トリアジニル、フリル、ベンゾフリル、イソベンゾフリル、インドリル、チオフェニル、ベンジルチオフェニル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、ブリニル、ピラゾリル、インダゾリル、オキサゾリル、ベンゾオキサゾリル、イソオキサゾール、ベンズイソオキサゾリル、トリアゾリル、チアゾリル、ベンゾチアゾリル及びテトラゾリルを含む。

【0170】

用語「薬学的に許容し得る塩」は、例えば以下の酸塩を含む、無機酸又は有機酸から誘導される非毒性の塩に適用されることを意図する：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、カンファー酸塩、カンファースルホン酸塩、シクロペニ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、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩(glucoheptanoate)、グリセロリン酸塩、グリコール酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、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、マロン酸塩、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、硝酸塩、シュウ酸塩、パルモ酸塩(palmoate)、ペクチン

10

20

30

40

50

酸塩 (pectinate) 、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアノ酸塩及びウンデカン酸塩。

【0171】

本明細書において使用される場合、語「～を含む (comprises) 」、「～を含む (comprising) 」及び類似の語は、排他的又は網羅的意味で解釈されるべきではない。言い換えれば、これらは、「～を非限定的に含む (including, but not limited to) 」を意味することを意図する。

【0172】

本発明の目的のために、開示化合物への任意の言及は、全ての可能な形式、構成及び配置、例えば、遊離形態（例えば、遊離酸又は塩基として）、塩若しくは水和物の形態、異性体（例えば、cis/trans異性体）、エナンチオマー、ジアステレオマー及びエピマー等の立体異性体の形態、エナンチオマー若しくはジアステレオマーの混合物の形態、ラセミ体若しくはラセミ体混合物の形態、又は個々のエナンチオマー若しくはジアステレオマーの形態を含む。該化合物の具体的な形態は、本明細書に詳述される。

10

【0173】

例えば、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰に関して、本明細書に開示される下位範囲 (sub-scope) のいずれかを、本明細書に開示される他の下位範囲のいずれかと組み合わせて、さらなる下位範囲を生じさせ得ることが理解されよう。

20

【0174】

また、本明細書に開示される数値範囲（例えば、1～100）への任意の言及が、その範囲内の全ての有理数（例えば、1.1、20.5、55.6、70、90）、またその範囲内の有理数の任意の範囲（例えば、1.1～3.5）を包含することを意図し、それ故、本明細書に明示的に開示される全ての範囲の全ての下位範囲がこれによって明示的に開示されることが理解されよう。これらは、具体的に意図される単なる例であり、そして、列挙される最低値と最高値の間の数値の全ての可能な組み合わせが本明細書に明示的に開示されるものと見なされるべきである。

【実施例】

【0175】

30

本発明は、以下の実施例を参照してさらに説明される。特許請求される本発明がこれらの実施例に限定されることを決して意図していないことが理解されよう。

【0176】

大腸菌株の作製

欠失菌株を、Redリコンビナーゼ法を介して、PCR增幅破壊力セットを使用したインフレーム欠失によって作製する (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA 97:6640-6645)。破壊力セット増幅及びオーバーラップPCRに使用するPCRプライマーを図17に描写する。大腸菌株7KOを、大腸菌W3110から天然のnfSA、nfSB、azOR、nemA、yieF、ycaK及びmdaB遺伝子の欠失によって誘導する。大腸菌株7KO_tolCを、7KOから天然のtolC遺伝子の欠失によって誘導する。T7RNAポリメラーゼを介した誘導性発現を可能にする一体化したDE3プロファージを有する大腸菌株7KO_tolC (DE3) を、7KO_tolCからDE3溶原化キット (Novagen, Merck, Darmstadt, Germany) を使用して誘導する。オキシドレダクターゼを、7KO_tolC中、プラスミドpUCX (pUC19由來の発現プラスミドである) から発現する (Prosser, G.A., Copp, J.N., Mowday, A.M., Guise, C.P., Syddall, S.P., Williams, E.M., Horvat, C.N., Swe, P.S., Ashoorzadeh, A., Denny, W.A., Smail, J.B., Patterson, A.V. and Ackerley, D.F. (2013). Creation and screening of a multi-family bacterial oxidoreductase library to discover novel nitroreductases that efficiently activate the bioreduct

40

50

ive prodrugs CB1954 and PR-104A. *Biochemical Pharmacology* 85:1091-1103)。オキシドレダクターゼを、7 K O t o l C (D E 3) 中、プラスミド p E T 2 8 から発現する (Novagen, Merck, Darmstadt, Germany)。

【 0 1 7 7 】

細胞感受性アッセイ

この手順を、以下で又は個々の図の説明で他に指示がない限り、ニクロサミド又は2 - クロロ - 4 - ニトロアニリンの存在下で作製されるグラム陰性菌株の成長曲線を作成する全ての実験に適用する。L B (7 K O t o l C オキシドレダクターゼ過剰発現菌株用の $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ アンピシリン及び0 . 4 % (w/v) グルコースを補充した) $100 \mu\text{L}$ を含有する96ウェルマイクロタイプレートの個々のウェルに2反復で植菌し、200 rpmで振盪しながら30 で一晩インキュベートする。翌日、一晩培養物 $100 \mu\text{L}$ を使用して、L B (上記のアンピシリン及びグルコースの他に、オキシドレダクターゼ過剰発現菌株用の $50 \mu\text{M}$ I P T G を補充した) 2mLに植菌し、30 、200 rpmで3 . 5時間インキュベートする。次いで、各培養物のアリコート $40 \mu\text{L}$ を、L B (I P T G 、アンピシリン及びグルコース並びに上記のオキシドレダクターゼ過剰発現菌株用の抗生物質を補充した) $40 \mu\text{L}$ 中、ニクロサミド又は2 - クロロ - 4 - ニトロアニリンの希釈系列 ($0 \mu\text{M}$ 対照を含む) を各々含有する滅菌384ウェルプレートの個々のウェルに2反復で加える。曝露の4時間後、培養物濁度を600 nmでの光学密度 (O D 6 0 0) によってモニタリングする。成長百分率を、初期吸光度値 ($t = 0$ 時間) を減算した後、ニクロサミド又は2 - クロロ - 4 - ニトロアニリンを曝露した細胞と非曝露 $0 \mu\text{M}$ 対照との比較によって計算する。全てのマイクロタイプレートの吸光度読み取り値を、EnSpire (商標) 2300 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA) を使用して測定する。必要であれば、I C ₅₀ 値 (所与の菌株について非曝露対照に相対して50 % の成長阻害を引き起こす薬物濃度) を、GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) で非線形回帰分析を使用して計算する。

【 0 1 7 8 】

7 K O t o l C オキシドレダクターゼライブラリーのニクロサミド成長阻害アッセイ

この手順を、図5に描写される実験に適用する。 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ アンピシリン及び0 . 4 % (w/v) グルコースを補充したL B $100 \mu\text{L}$ を含有する96ウェルマイクロタイプレートの個々のウェルに、7 K O t o l C ライブラリー菌株 (p U C X 空プラスミド対照を含む) を2反復で植菌し、200 rpmで振盪しながら30 で一晩インキュベートする。各一晩培養物 $100 \mu\text{L}$ を使用して、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ アンピシリン及び $50 \mu\text{M}$ I P T G を補充したL B 2mLに植菌し、30 、200 rpmで3 . 5時間インキュベートする。次いで、各培養物のアリコート $40 \mu\text{L}$ を、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ アンピシリン、 $50 \mu\text{M}$ I P T G 、及び $2 . 5 \mu\text{M}$ ニクロサミド又は $0 \mu\text{M}$ ニクロサミドを含有する (対照ウェル) かのいずれかを補充したL B 培地 $40 \mu\text{L}$ を含有する滅菌384ウェルプレートの個々のウェルに加える。各オキシドレダクターゼ過剰発現菌株を2反復で試験する (独立反復)。曝露の4時間後、培養物濁度を600 nmでの光学密度によってモニタリングする。成長阻害率を、以下の式を使用して、初期吸光度値 ($t = 0$ 時間) を減算した後、曝露した細胞と非曝露 $0 \mu\text{M}$ 対照との比較によって計算する: ($1 - (\text{曝露 O D } 6 0 0 / \text{非曝露 O D } 6 0 0)) \times 100 \%$ 。全てのマイクロタイプレートの吸光度読み取り値を、EnSpire (商標) 2300 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA) を使用して測定する。

【 0 1 7 9 】

バリアント遺伝子ライブラリーからの活性ニトロレダクターゼを発現するクローンを富化するニクロサミドの能力の分析

この手順を、図6及び7に描写される実験に適用する。エレクトロコンピテント S O S - R 4 細胞を、p U C X にライゲーションされている約9500万からなるn f s A バリアントライブラリーの一部で形質転換する。形質転換後、細胞を、 $0 . 5 \mu\text{M}$ ニクロサミド及び $0 . 1 \mu\text{M}$ I P T G をプラスした又はプラスしていないのいずれかの $100 \mu\text{g}/\text{mL}$

10

20

30

40

50

アンピシリン及び 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ スペクチノマイシン含有寒天プレート上にプレーティングする。プレートを 30 h で一晩成長させ、コロニーを形成させる。次いで、各培地条件のプレートから 57 個のコロニーを選び取り、そして、(n f s A、空プラスミド及び培地対照と一緒に)、別々の 96 ウェルプレートの内側の 60 ウェル内の、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン及び 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ スペクチノマイシンを含有する LB 100 μL 中に移す。培養物を一晩成長させた後、そこからグリセロールストックを作り、全ての後続のアッセイに植菌する。成長阻害アッセイのために、各グリセロールプレートを使用して、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ スペクチノマイシン及び 0.4% グルコースをプラスした LB 150 μL を各々含有する新たなマイクロタイタープレートの内側の 60 ウェルに植菌する。次いで、プレートを 30 h 、200 rpm で一晩インキュベートする。翌日、一晩培養物 15 μL を使用して、新たなマイクロタイタープレートの内側の 60 ウェルの各々内の、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ スペクチノマイシン、0.2% グルコース及び 50 μM IPTG を含有する LB 200 μL に植菌する。各プレートを、30 h 、200 rpm で 2.5 時間インキュベートする。次いで、これらの一日培養物の各々 30 μL を、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ スペクチノマイシン、0.2% グルコース及び 50 μM IPTG 並びに 100 μM プロドラッグ(図 6 についてメトロニダゾール、図 7 についてチニダゾール)又は等価な DMSO 溶剤のみの対照のいずれかで修正された LB (30 μL) を含有する 384 ウェルプレートの個々のウェルに移す。各選択されたクローンを、各 384 ウェルプレート上にて 2 反復で曝露する。次いで、384 ウェルプレートを 30 h 、200 rpm で 3 時間インキュベートし、その後、プレートリーダー内で各ウェルの 600 nm における光学密度を読み取る。成長阻害率を、以下の式を使用して、初期吸光度値 (t = 0 時間) を減算した後、曝露した細胞と非曝露 0 μM 対照との比較によって計算する: (1 - (曝露 OD 600 / 非曝露 OD 600)) × 100%。全てのマイクロタイタープレートの吸光度読み取り値を、EnSpire (商標) 2300 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA) を使用して測定する。

【0180】

異なる細菌株に及ぼす併用又は個々のニクロサミド処置及び PA-N 処置の効果のヒートマップ分析

この手順を、図 8 ~ 15 に描写される実験に適用する。所望の菌株を LB 3 mL に植菌し、200 rpm で振盪しながら 30 h (Psa-V 又は大腸菌実験室株 K12 若しくは K12 t01C) 又は 37 h (大腸菌実験室株 W3110、緑膿菌実験室株 PAO1 又は全ての臨床分離菌株) で 16 時間インキュベートする。一晩培養物の OD 600 を測定し、そして、細胞を 0.1M MgSO₄ で修正された LB 中で 0.2 の OD 600 まで希釈する(これは、培地で 1/2 希釈した後に 0.1 の開始 OD 600 を与えるだろう)。培養培地 (384 ウェルプレートの 1 ウェル当たり 30 μL) は、LB、0.1M MgSO₄ 及び細菌培養物での 1/2 希釈を考慮して所望の終濃度の 2 倍の PA-N を含有する。各 PA-N 希釈のための培養培地のアリコート (1 ウェル当たり 60 μL) に、細菌培養物での 1/2 希釈を考慮して使用すべき最高終濃度の 2 倍のニクロサミドを補充する。384 ウェルプレートの行 H (又は P) に、図 18 に示されるとおり各ニクロサミド / PA-N 培地併用物 60 μL を加える。行 A ~ G に、培養培地 (PA-N のみ) 30 μL を加える。ニクロサミドの系列希釈を、行 H から培地 30 μL を取り出し、それを行 G に移し、混合し、次いで行 G の 30 μL を行 F に移すことを行 B まで続けることによって実施する。行 B の後、最後の 30 μL を廃棄し、行 A は 0 μM ニクロサミドのままにする。次いで、各ウェルに細菌培養物 (OD 600 = 0.2) 30 μL を植菌し、1 ウェル当たり 0.1 の最終 OD 600 を与える。OD 600 を測定し (t = 0)、そして培養物を 30 h 又は 37 h (一晩培養物に従って)、200 rpm で 4 時間インキュベートする。次いで、最終 OD 600 (t = 4) を記録する。成長阻害を計算するために、t = 0 値を t = 4 値から減算する。次いで、0 μM ニクロサミド及び 0 ウェル μM PA-N ウェル (100% 成長を表す) に相対的な成長百分率を計算する。

【0181】

10

20

30

40

50

7 K O t o l C (D E 3) 細胞感受性アッセイ

この手順を、図16に描寫される実験に適用する。50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ を補充したL B 100 μL を含有する96 ウエルマイクロタイプレートの個々のウェルに、大腸菌n f s A、大腸菌n f s B又はp E T 2 8 空プラスミド対照を過剰発現する7 K O t o l C (D E 3) 菌株を2反復で植菌する。900 rpmのHeidolph titramaxプラットフォームシェーカー内で菌株を30 で一晩インキュベートする。各一晩培養物30 μL を使用して、96 ウエルディープ培養プレート(Axygen)内の50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ カナマイシン及び50 μM I P T Gを補充したL B 600 μL の培養物に2反復で植菌する。培養物を30 、1200 rpmで2.5時間インキュベートする。次いで、各培養物のアリコート40 μL を、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ カナマイシン、50 μM I P T G及びニタゾキサニドの系列希釈物(0 μM 対照を含む)を補充したL B 培地40 μL を含有する滅菌384 ウエルプレートの個々のウェルに加える。各ニトロレダクターゼ過剰発現菌株を2反復で試験する(独立反復)。曝露の4時間後、培養物濁度を600 nmでの光学密度によってモニタリングする。成長百分率値を、初期吸光度値(t = 0 時間)を減算した後、ニタゾキサニドを曝露した細胞と非曝露対照との比較によって計算する。マイクロタイプレートの吸光度読み取り値を、Eon Biotek Reader (BioTek Instruments Inc.)を使用して測定する。

【0182】

ニクロサミド又はニタゾキサニドによるグラム陽性菌の成長阻害: I C₅₀ 測定

この手順を、図20及び21に描寫される実験に適用する。トリプチックソイプロス(T S B) 2mLを含有する15mLのチューブに、グラム陽性菌株の黄色ブドウ球菌A T C C 4 3 3 0 0 (M R S A)、バチルス・チューリングエンシス P.1. IPS-80 serovar israelensis、又はリステリア・ウェルシメリ A T C C 3 5 8 9 7 を植菌した。菌株を200 rpmで振盪しながら37 で一晩インキュベートした。翌日、一晩培養物を新鮮なT S B 中で希釈し、およそ0.3のO D₆₀₀をえた。次いで、この2反復のアリコート40 μL を、2×ニクロサミド又はニタゾキサニドの系列希釈物(0 μM 対照を含む)を補充したT S B 培地40 μL を含有する滅菌384 ウエルプレートの個々のウェルに加えた。曝露の4時間後、600 nmにおける光学密度によって培養物濁度をモニタリングした。成長阻害率値を、初期吸光度値(t = 0 時間)を減算した後、各菌株についてニクロサミド又はニタゾキサニドを曝露した細胞と非曝露対照との比較によって計算した。マイクロタイプレートの吸光度読み取り値を、EnSpire(商標)2300 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA)を使用して測定した。Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)を使用して、各菌株に対する化合物毎の阻害濃度(I C₅₀; 試験菌株の成長が非曝露対照の成長の50%の濁度レベルに達する化合物の濃度)を計算した。

【0183】

様々なニクロサミド又はニタゾキサニドの濃度にわたるグラム陽性菌株の黄色ブドウ球菌A T C C 4 3 3 0 0、リステリア・ウェルシメリ A T C C 3 5 8 9 7 及びバチルス・チューリングエンシス P.1. IPS-80 serovar israelensisについての図20及び21に提示されるデータから導出されたI C₅₀ 値を、以下のように表1に提示する:

【0184】

【表2】

表2：グラム陽性菌に対するニクロサミド及びニタゾキサニドについての IC_{50} 値

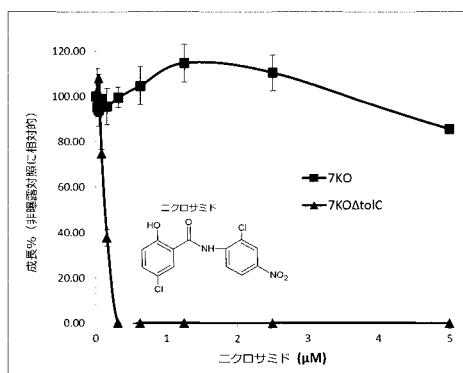
菌株	ニクロサミド (nM)	ニタゾキサニド (nM)
黄色ブドウ球菌 ATCC 43300 (MRS A)	132	2902
リステリア・ウェルシメリ ATCC 35897	284	8785
バチルス・チューリンゲンシス P.1. IPS-80 serovar israelensis	139	8671

10

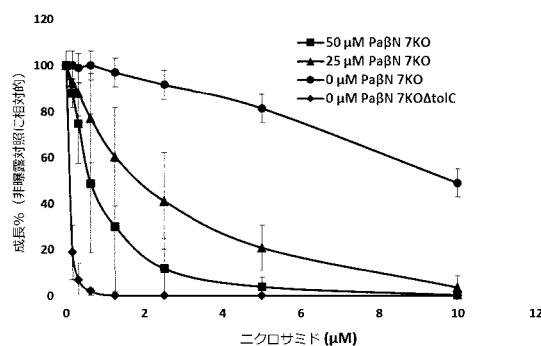
【0185】

本発明は、例として説明されているが、特許請求の範囲に定義されるとおりの本発明の範囲から逸脱することなく変形及び改変が行われ得ることが理解されるべきである。さらに、具体的特徴に対して公知の等価物が存在する場合、そのような等価物は、あたかも本明細書において具体的に言及されたかのように組み入れられる。

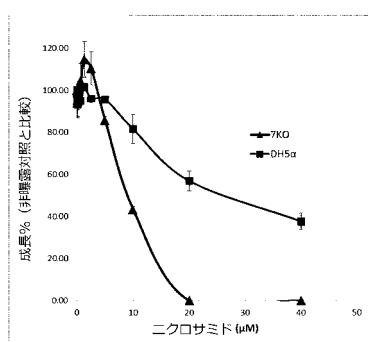
【図1】



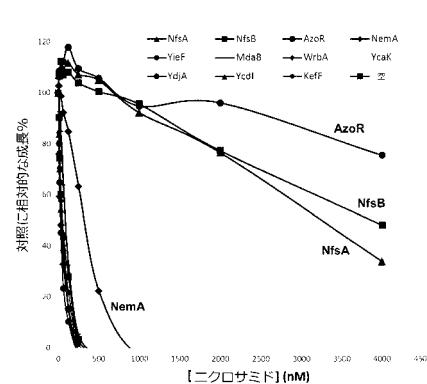
【図2】



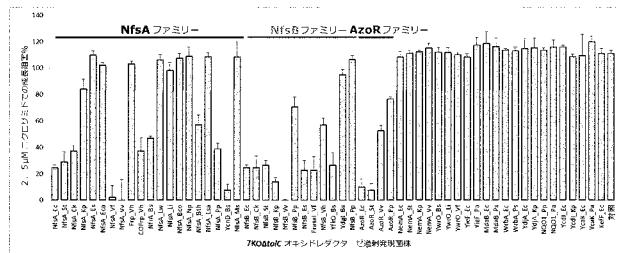
【図3】



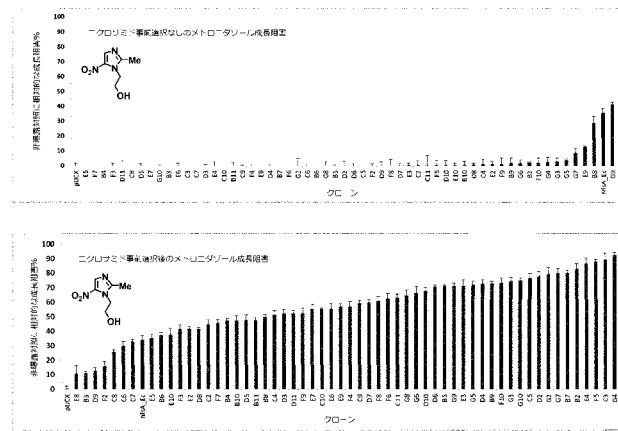
【図4】



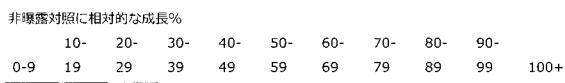
【図5】



【図6】

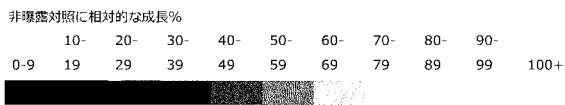


【図9】



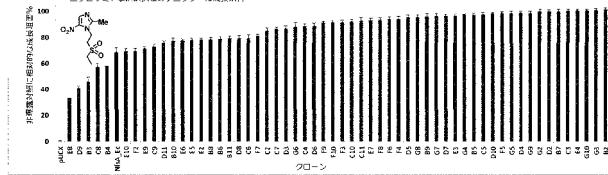
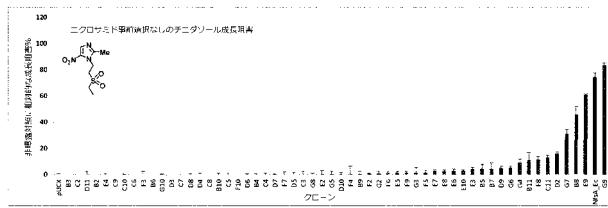
		PAβN (μM)							
		0	12.5	25	50	75	100		
ニクロサミド (μM)	0	100	95	92	92	91	91		
	0.3125	100	94	86	68	48	32		
	0.625	99	91	78	47	24	14		
	1.25	99	90	67	29	9	10		
	2.5	100	84	53	16	4	3		
	5	97	79	25	5	1	0		
	10	94	68	15	1	0	0		
	20	94	26	5	0	0	0		

【図10】

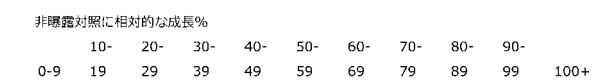


		PAβN (μM)					
		0	25	50	75	100	125
ニクロサミド (μM)	0	100	93	84	75	65	61
	0.625	95	89	70	55	47	38
	1.25	94	83	62	51	43	33
	2.5	92	85	61	51	39	30
	5	95	82	58	41	29	18
	10	91	75	51	24	10	7
	20	88	70	32	6	4	3
	40	83	46	12	1	1	0

【図7】

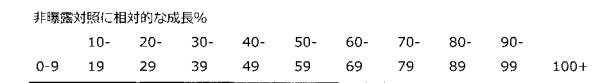


【図8】



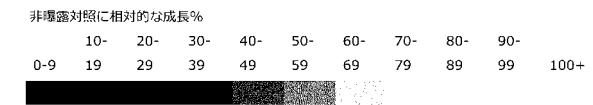
		PAβN (μM)								
		0	12.5	25	50	75	100			
ニクロサミド (μM)	0	100	89	83	85	83	83			
	0.3125	97	82	77	71	64	55			
	0.625	93	85	71	60	51	37			
	1.25	94	78	68	49	25	18			
	2.5	90	68	61	23	16	4			
	5	92	62	42	14	2	2			
	10	90	59	22	3	0	0			
	20	94	22	6	0	0	0			

【図11】



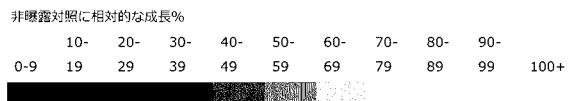
		PAβN (μM)						
		0	25	50	75	100	125	
ニクロサミド (μM)	0	100	71	63	66	63	64	
	0.625	88	64	58	59	54	58	
	1.25	84	68	61	60	57	62	
	2.5	87	65	61	58	58	59	
	5	88	66	58	57	56	55	
	10	88	59	54	54	48	55	
	20	90	53	45	39	34	34	
	40	100	15	0	0	0	0	

【図12】



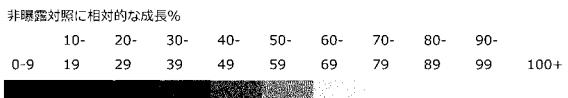
		PAβN (μM)				
		0	6.25	12.5	25	50
ニクロサミド (μM)	0	100	100	100	100	100
	0.625	5	100	96	100	99
	1.25	0	100	96	98	92
	2.5	0	100	89	90	68
	5	0	91	88	80	50
	10	0	76	68	58	0
	20	0	57	52	11	0
	40	0	7	7	2	0

【 図 1 3 】



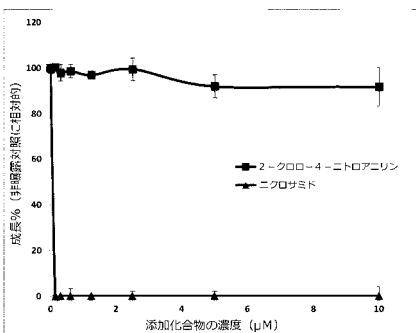
		PABN (μM)				
		0	25	50	75	100
ニクロロサブチル(μM)	0	100	90	80	78	77
	0.3125	93	93	82	81	77
	0.625	96	99	92	84	76
	1.25	100	100	95	90	82
	2.5	100	100	98	88	75
	5	100	100	96	77	42
	10	100	100	94	47	10
	20	100	98	51	7	0

【 図 1 4 】

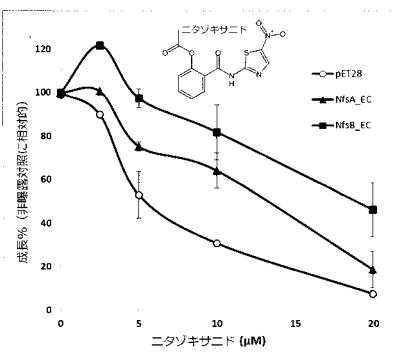


		PABN (μM)						
		0	3.125	6.25	12.5	25	50	
		0	100	98	93	92	93	97
PABN (μM)		6.25	94	81	71	67	57	46
		12.5	92	82	73	63	51	41
		25	87	77	71	60	54	41
		50	90	65	61	54	50	42
		100	81	45	36	39	37	37
		200	81	36	32	33	20	18

【図15】

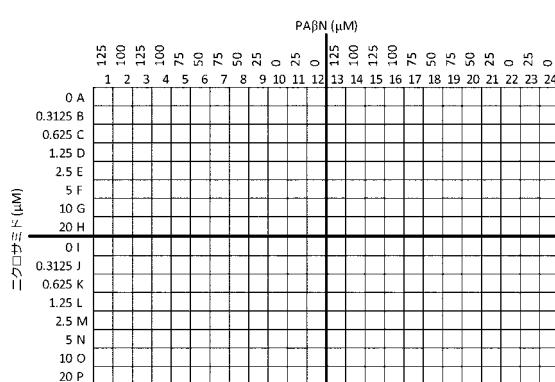


【 16 】

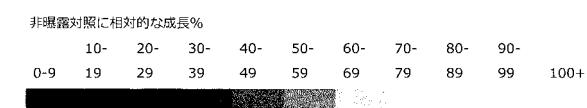


【 17 】

【 18 】

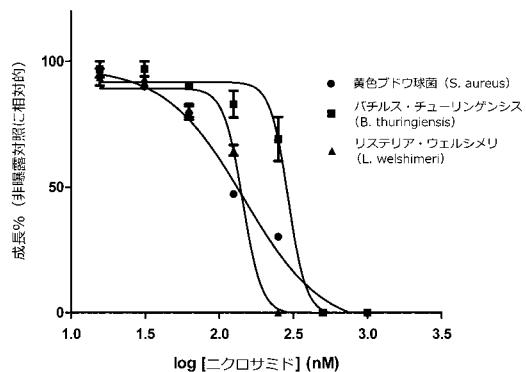


【図 19】

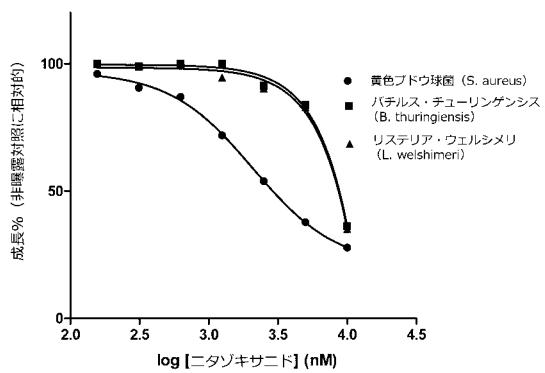


		PAβN (μM)					
		0	3.125	6.25	12.5	25	50
γH ₂ O ₂ (μM)	0	100	91	85	73	41	12
	0.015625	91	87	74	63	33	11
	0.03125	89	86	73	61	29	12
	0.0625	84	75	67	56	24	10
	0.125	74	64	56	43	17	8
	0.25	36	33	19	23	4	5
	0.5	9	6	1	9	0	3
	1	1	0	0	0	0	0

【図 2 0】



【図 2 1】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NZ2015/050192																				
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 31/609 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)																						
<p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																						
B. FIELDS SEARCHED <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p>																						
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p>																						
<p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIAP, EPODOC, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, HCPLUS, and keywords (salicylamide, cloxacil, cloxacillin, nitazoxanide, bacteria, efflux pump inhibitors, Gram positive, Staphylococcus, Listeria, Bacillus, MRSA, biofilm, nitroreductase, and related terms)</p>																						
<p>Espacenet, Internal databases provided by IP Australia (PAMS, INTESS), and keywords (Copp, J; Ackerley, D)</p>																						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																						
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																				
	Documents are listed in the continuation of Box C																					
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex																						
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>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)</td> <td>"Y"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family	"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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																			
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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																			
"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)	"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																			
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family																			
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																					
Date of the actual completion of the international search 26 February 2016	Date of mailing of the international search report 26 February 2016																					
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	Authorised officer Margaret Chang AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262832631																					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NZ2015/050192
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2002/028819 A1 (THE RESEARCH FOUNDATION OF STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 11 April 2002 Example 2; Tables 1 and 2	1-2, 5-6, 12 8-10, 13-15
Y	Example 2; Tables 1 and 2	
X	RAJAMUTHIAH, R., et al., "Whole Animal Automated Platform for Drug Discovery against Multi-Drug Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ", <i>PLoS ONE</i> , February 2014, Volume 9, Issue 2, e89189 Whole document, especially Table 3	1-2, 5-6, 12 8-10, 13-15
Y	Whole document, especially Table 3	
X	PAUK, K., et al., "New derivatives of salicylamides: Preparation and antimicrobial activity against various bacterial species", <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> , November 2013, Volume 21, Number 21, Pages 6574-6581 Whole document, especially Table 1	1-2, 5-6, 12 8-10, 13-15
Y	Whole document, especially Table 1	
X	TCHOUAFFI-NANA, F., et al., "Nitazoxanide Inhibits Biofilm Formation by <i>Staphylococcus epidermidis</i> by Blocking Accumulation of Surfaces", <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> , July 2010, Volume 54, Number 7, Pages 2767-2774 Whole document	1-7, 12 8-10, 13-15
Y	Whole document	
X	MÜLLER, J., et al., "Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in <i>Giardia lamblia</i> : characterization of a novel nitroreductase (GINR2)", <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> , August 2013, Volume 68, Number 8, Pages 1781-1789 Whole document, especially Table 1 and Figure 4	11
Y	US 2008/0132457 A1 (Bostian et al.) 05 June 2008 Abstract; Examples 81-85	8-10, 13-15
Y	US 2008/0076741 A1 (Glinka et al.) 27 March 2008 Abstract; Examples	8-10, 13-15
A	SISSON, G., et al., "Enzymes Associated with Reductive Activation and Action of Nitazoxanide, Nitrofurans, and Metronidazole in <i>Helicobacter pylori</i> ", <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> , July 2002, Volume 46, Number 7, Pages 2116-2123 Whole document, especially Abstract	1-15
A	BERISTAIN-CASTILLO, E., et al., "CYP1A1 and Cnr nitroreductase bioactivated niclosamide <i>in vitro</i> ", <i>Mutagenesis</i> , November 2013, Volume 28, Number 6, Pages 645-651 Abstract	1-15
A	MÜLLER, J., et al., "Characterization of <i>Giardia lamblia</i> WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole", <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> , August 2007, Volume 60, Number 2, Pages 280-287 Abstract	1-15
A	MÜLLER, J., et al., "A Novel <i>Giardia lamblia</i> Nitroreductase, GINR1, Interacts with Nitazoxanide and Other Thiazolidines", <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> , June 2007, Volume 51, Number 6, Pages 1979-1986 Whole document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/NZ2015/050192
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NILLIUS, D., <i>et al.</i> , "Nitroreductase (GINR1) increases susceptibility of <i>Giardia lamblia</i> and <i>Escherichia coli</i> to nitro drugs", <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> , May 2011, Volume 66, Number 5, Pages 1029-1035 Whole document	1-15
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/NZ2015/050192
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)</p>	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p style="text-align: center;">See Supplemental Box for Details</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>	
<p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/NZ2015/050192
Supplemental Box	
<p>Continuation of: Box III</p> <p>This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.</p> <p>This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:</p> <ul style="list-style-type: none">Claims 1-10, 12-15 are directed to salicylamide compounds, composition comprising thereof, and methods relating to the use of such compounds or compositions. The feature of "salicylamide compounds, particularly relating to their antimicrobial effects" is specific to this group of claims.Claims 11 is directed to a method of protecting a bacterial cell against the toxicity of salicylamide compounds, by increasing the expressing and/or activity of at least one nitroreductase enzyme in the bacterial cell. The feature of "protecting bacterial cell against the toxicity of salicylamides by increasing the expression and/or activity of nitroreductase enzyme" is specific to this group of claims. <p>PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.</p> <p>When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.</p> <p>In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a priori</i>.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/NZ2015/050192	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2002/028819 A1	11 April 2002	WO 0228819 A1	11 Apr 2002
		AU 1184202 A	15 Apr 2002
		CA 2424396 A1	11 Apr 2002
		CN 1468210 A	14 Jan 2004
		EP 1328507 A1	23 Jul 2003
		EP 1328507 B1	14 Mar 2007
		JP 2004510756 A	08 Apr 2004
		JP 4086658 B2	14 May 2008
		MX PA03002891 A	15 Oct 2003
		US 2002065322 A1	30 May 2002
		US 6407288 B1	18 Jun 2002
US 2008/0132457 A1	05 June 2008	US 2008132457 A1	05 Jun 2008
		US 7994225 B2	09 Aug 2011
		CA 2559208 A1	29 Sep 2005
		EP 1732527 A2	20 Dec 2006
		JP 2008500965 A	17 Jan 2008
		US 2006276473 A1	07 Dec 2006
		US 7947741 B2	24 May 2011
		WO 2005089738 A2	29 Sep 2005
US 2008/0076741 A1	27 March 2008	US 2008076741 A1	27 Mar 2008
		US 7879795 B2	01 Feb 2011
		AU 2005245962 A1	01 Dec 2005
		CA 2571828 A1	01 Dec 2005
		EP 1758920 A1	07 Mar 2007
		JP 2008502720 A	31 Jan 2008
		US 2006003944 A1	05 Jan 2006
		US 7893020 B2	22 Feb 2011
		WO 2005113579 A1	01 Dec 2005

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/NZ2015/050192	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

フロントページの続き

(51) Int.CI. F I テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/612 (2006.01) A 6 1 K 38/05
A 6 1 K 31/612

(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, T, J, 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, R, O, 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, H, N, 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

(72) 発明者 アッカーリー, デイビッド・フランシス
ニュージーランド国、ウェリントン 6012、カロリ、コーリア・アベニュー 29

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA17 AA19 AA20 BA01 BA08 BA14 BA23 DC50
MA16 MA21 MA23 MA35 MA37 MA43 MA52 MA55 MA57 MA59
MA60 MA66 MA67 NA05 ZB351 ZB352 ZC412 ZC751 ZC752
4C086 AA01 AA02 DA17 DA18 MA01 MA02 MA04 MA16 MA21 MA23
MA35 MA37 MA43 MA52 MA55 MA57 MA59 MA60 MA66 MA67
NA05 ZB35 ZC41 ZC75