

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6302487号
(P6302487)

(45) 発行日 平成30年3月28日(2018.3.28)

(24) 登録日 平成30年3月9日(2018.3.9)

(51) Int.Cl.

F 1

C08G 73/00	(2006.01)	C08G 73/00
A61K 31/785	(2006.01)	A61K 31/785
A61P 31/04	(2006.01)	A61P 31/04
A61P 31/10	(2006.01)	A61P 31/04
A61P 31/12	(2006.01)	A61P 31/10

請求項の数 19 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-553988 (P2015-553988)
 (86) (22) 出願日 平成26年1月22日 (2014.1.22)
 (65) 公表番号 特表2016-504474 (P2016-504474A)
 (43) 公表日 平成28年2月12日 (2016.2.12)
 (86) 國際出願番号 PCT/AT2014/050026
 (87) 國際公開番号 WO2014/113835
 (87) 國際公開日 平成26年7月31日 (2014.7.31)
 審査請求日 平成29年1月20日 (2017.1.20)
 (31) 優先権主張番号 A53/2013
 (32) 優先日 平成25年1月25日 (2013.1.25)
 (33) 優先権主張国 オーストリア(AT)

(73) 特許権者 511289781
 シーライフ ファルマ ゲーエムペーハー
 オーストリア国、エーー 3430 トゥル
 ン、テクノパーク 1
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宣
 (74) 代理人 100121212
 弁理士 田村 弥栄子
 (74) 代理人 100117743
 弁理士 村田 美由紀

最終頁に続く

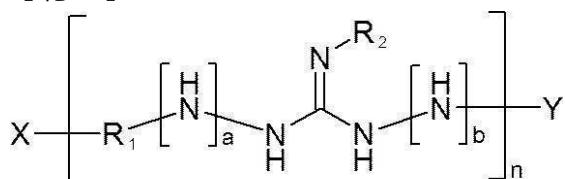
(54) 【発明の名称】新規生物活性ポリマー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノグアニジン及び / 又は 1 , 3 - ジアミノグアニジンの 1 以上のジアミンとの重縮合生成物、即ち、下記式 (I) :

【化 1】



10

(I)

[式中、

X は、 - NH₂ 、 アミノグアニジノ及び 1 , 3 - ジアミノグアニジノから選ばれ ;Y は、 - H 及び - R₁ - NH₂ から選ばれるか ; 或いは

X 及び Y が、一緒になって、化学結合を示し、環状構造を与え ;

R₁ は、 2 ないし 20 個の炭素原子を有し、 1 個以上の炭素原子が O 又は N で置き換えられていてもよい二価の有機基から選ばれ ;

a 及び b は、それぞれ 0 又は 1 であり (ただし、 1 , 3 - ジアミノグアニジン単位が含

20

まれない場合は $a + b = 2$ である。) ;

R_2 は、-H 及び -NH₂ から選ばれ (ただし、 $a + b = 0$ の場合は R_2 が -NH₂ であり、 $a + b = 1$ の場合は R_2 が -H 又は -NH₂ であり、 $a + b = 2$ の場合は R_2 が -H である。) ;

$n = 2$ である。]

のポリグアニジン誘導体又はその塩。

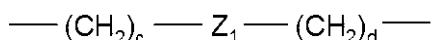
【請求項 2】

R_1 が、1 以上の炭素原子が O 又は N で置き換えられていてもよいアルキレン基から選ばれることを特徴とする請求項 1 に記載のポリグアニジン誘導体。

【請求項 3】

R_1 が、下記一般式 (I) ~ (V) :

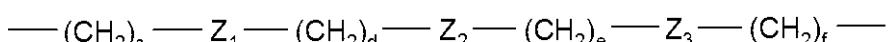
【化 2】



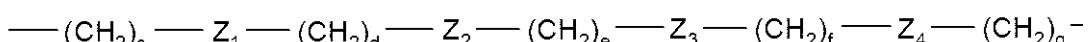
(II)



(III)



(IV)



(V)

[式中、 Z_1 ~ Z_4 は、それぞれ独立して、O 及び N から選ばれるヘテロ原子であり、表示 c ~ g は、それぞれ独立して、1 ないし 12 の範囲の整数であり、 R_1 基の原子総数は 20 を超えない。]

の基から選ばれることを特徴とする請求項 2 に記載のポリグアニジン誘導体。

【請求項 4】

1 個の R_1 基内の全てのヘテロ原子 Z が、O 又は N の何れかであることを特徴とする請求項 3 に記載のポリグアニジン誘導体。

【請求項 5】

R_1 が、ポリエーテルジアミンの二価の基を示すことを特徴とする請求項 4 に記載のポリグアニジン誘導体。

【請求項 6】

$n = 2 ~ 6$ であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載のポリグアニジン誘導体。

【請求項 7】

塩化水素、臭化水素、ヨウ化水素の形態の酸付加塩、硫酸塩、炭酸塩、ホウ酸塩、シアノ酸塩、チオシアノ酸塩、リン酸塩、メシル酸塩、硝酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、二官能性以上の場合にこれらの酸の何れかの部分エステル、又は 2 以上のこれらの塩及び / 又は部分エステルの混合物として存在することを特徴とする請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載のポリグアニジン誘導体。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

加熱することにより、アミノグアニジン若しくは 1, 3 - ジアミノグアニジン又はそれらの酸付加塩を、少なくとも 1 つのジアミン $H_2N - R_1 - NH_2$ と重縮合させることを特徴とするグアニジン誘導体又はその塩のジアミンとの重縮合による請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項に記載のポリグアニジン誘導体の製造方法。

【請求項 9】

少なくとも 1 つのジアミンが、グアニジン誘導体に対して 3 ないし 5 モル% の過剰量で用いられることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

アミノグアニジン又は 1, 3 - ジアミノグアニジンの塩を、少なくとも 1 つのジアミンと共に、まず、第一のより低い温度、次いで、第二のより高い温度に加熱することを特徴とする請求項 8 又は 9 に記載の方法。 10

【請求項 11】

アミノグアニジン又は 1, 3 - ジアミノグアニジンの塩を、少なくとも 1 つのジアミンと共に、まず 110 ~ 130 、次いで 160 ~ 180 に加熱することを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

反応混合物を、第一の温度で 1 ないし 3 時間、第二の温度で 1 ないし 8 時間保持することを特徴とする請求項 10 又は 11 に記載の方法。

【請求項 13】

得られたポリグアニジン誘導体を、3 ~ 10 倍量の水に溶解することにより精製することを特徴とする請求項 8 ~ 12 の何れか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 14】

細菌感染、真菌感染及びウイルス感染に拮抗するためにヒト医学分野及び獣医学分野において用いるための請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項に記載のポリグアニジン誘導体を含む薬剤。

【請求項 15】

有効量のポリグアニジン誘導体が、3 ~ 10 倍量の水中において溶液として存在することを特徴とする、請求項 14 に記載の薬剤。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項に記載のポリグアニジン誘導体を含む殺菌剤。 30

【請求項 17】

有効量のポリグアニジン誘導体が、3 ~ 10 倍量の水中において溶液として存在することを特徴とする、請求項 16 に記載の殺菌剤。

【請求項 18】

コールド / ウェット噴霧化、微粒子化及び蒸気滅菌のために溶解した形態の噴霧化物質として用いるための請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項に記載のポリグアニジン誘導体を含む薬剤。

【請求項 19】

有効量のポリグアニジン誘導体が、3 ~ 10 倍量の水中において溶液として存在することを特徴とする、請求項 18 に記載の薬剤。 40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

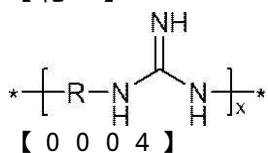
本発明は、新規生物活性ポリマー及びそれらの殺生物剤としての使用に関する。

【背景技術】**【0002】**

下記一般式のポリグアニジン及びその様々な誘導体が、長い間知られている。

【0003】

【化1】

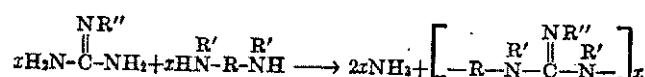


1943年にはすでに、特許文献が、米国特許2,325,586号において、i) グアニジン若しくはその塩、ii) シアノハライド、iii) ジシアノアミド、又はiv) イソシアニドジハライドのジアミンとの重縮合、或いはv) 2つのジシアノジアミドが一緒になる重縮合（シアノ置換ポリグアニジンが得られる）による様々なポリグアニジンを製造するためのいくつかの方法、並びにこのように製造されるポリグアニジンの染色助剤としての使用を開示している。

【0 0 0 5】

【化2】

i)



ii)



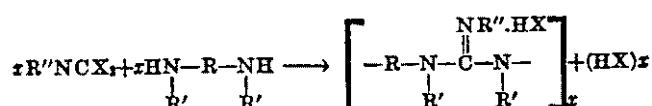
10

iii)



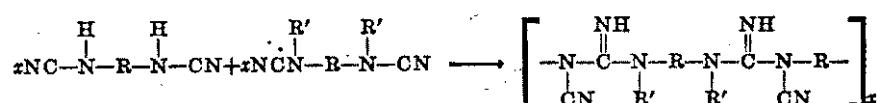
20

iv)



30

v)



【0 0 0 6】

既にその時点で、開示された反応i) ~ iv) におけるジアミンは、アルキレン及びフェニレンジアミン並びにオキシアルキレン又は他のポリエーテルジアミン（後にJ e f f a m i n e s (R) としても知られるようになるもの）である。

40

【0 0 0 7】

10年後には、このようなポリグアニジンが、優れた殺生物剤であることが証明された。オスカーシュミットの周りのグループにより、WO 99/54291 A1において、殺菌剤ポリ（ヘキサメチレンジアミン）の製造が、WO 01/85676 A1において、グアニジンのポリオキシアルキレンとの縮合により製造される殺菌剤ポリグアニジンが、WO 2006/047800 A1において、グアニジンのアルキレンジアミンとオキシアルキレンジアミンの混合物との重縮合により製造される、2つのタイプの二価の基R₁のうち1つのみを含むポリマーより低い毒性を有すると言われる殺生物剤（特に、殺菌剤）

50

として作用するポリグアニジン誘導体が開示される。

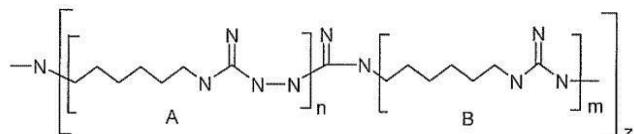
【0008】

WO 02 / 30877A1により、鎖中にフェニレン部分をさらに含む殺菌剤として使用される同様のポリグアニジンが開示される。研究者のロシアのグループ (Tets, Tets und Krasnov) により、WO 2011 / 043690A1 (U.S. 2011 / 0269936 A1 及び E.P. 2,520,605 A1 が由来する) において、ヒドラジン水和物の存在下でのグアニジンとヘキサメチレンジアミンの重縮合により製造される下記式の殺菌剤ポリグアニジンが開示される：

【0009】

【化3】

10



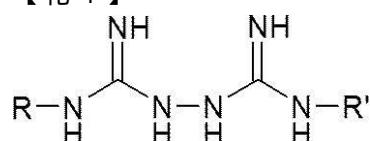
【0010】

このように、重縮合の間、ヒドラジンにより、(少なくとも正式には) 1つのグアニジン部分のみのアミノ基或いはまた2つのグアニジン部分のアミノ基が置き換えられ、交互のポリ(ヘキサメチレングアニジン)ブロック及びポリ(ヘキサメチレンアミノグアニジン)ブロックと共に、2つのタイプのブロックが以下に示すようなグアニジン二量体を介して結合しているブロックコポリマーをもたらすと言われている。

20

【0011】

【化4】



【0012】

また、これらのポリマー及びその酸付加塩は、細菌、ウイルス及び菌類に対する殺生物剤として作用するとも言われている。しかしながら、7つの異なるポリマーを製造する当該出願で得られる実施例には、実施例1のポリマーが「固体のほぼ無色透明な物質」であるという記述を除いて、得られた生成物のいかなる物理データも含まれていない。

30

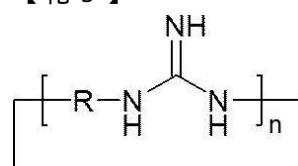
【0013】

グアニジンのジアミンとの重縮合の間で形成してもよい可能な構造に関し、グラーツ工科大学の研究員のグループによるいくつかの記事が存在する。例えば、「Albert et al., Biomacromolecules 4 (6), 1811-1817 (2003)」及び「Feier tag et al., Macromol. Rap. Comm. 24 (9), 567-570 (2003)」。出発モノマーの何れか1つで線状ポリマー鎖を終結する別の可能性に加えて、通常、下記一般式の環状分子もまた、無視できない部分で形成し、とりわけ、ジアミンの鎖長に依存する：

【0014】

【化5】

40



【0015】

実際に上記全てのポリグアニジン誘導体の主な欠点は、ヒドラジンのような毒生物学分野で知られる扱いにくい成分の使用に加えて、一方では、これらの生成物の無視できない毒性、並びに高い反応性の成分を用いる場合には、比較的困難な製造方法である。そのため

50

、本発明の目的は、単純な方法であり、可能な限り経済的であり、上記の欠点を回避する、新規であり且つより低い毒性にもかかわらず殺生物効果のあるポリグアニジンを製造することである。

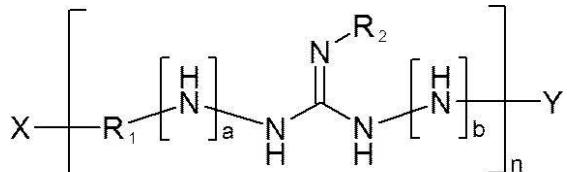
【発明の概要】

【0016】

本発明は、アミノグアニジン及び/又は1,3-ジアミノグアニジンの、1以上のジアミンとの新規重縮合生成物、即ち、下記式(I)：

【0017】

【化6】



10

(I)

【0018】

[式中、

Xは、-NH₂、アミノグアニジノ及び1,3-ジアミノグアニジノから選ばれ；

Yは、-H及び-R₁-NH₂から選ばれるか；或いは

20

X及びYが、一緒になって、化学結合を示し、環状構造を与える；

R₁は、2ないし20個の炭素原子を有し、1個以上の炭素原子がO又はNで置き換えるてもよい二価の有機基から選ばれ；

a及びbは、それぞれ、0又は1であり(ただし、1,3-ジアミノグアニジン単位が含まれていない場合はa+b=2である。)；

R₂は、-H及び-NH₂から選ばれ(ただし、a+b=0の場合は、R₂が-NH₂であり、a+b=1の場合は、R₂が-H又は-NH₂であり、a+b=2の場合は、R₂が-Hである。)；

n=2である。]

のポリグアニジン誘導体又はその塩を提供することにより上記目的を達成する。

30

【0019】

活性アッセイにおいて、式(I)の新規ポリグアニジン誘導体が、有効な抗菌性物質であることが証明された。しかしながら、下記の本発明の実施形態及び比較例で実証されるように、上記文献WO 2011/043690 A1、US 2011/0269936 A1及びEP 2,520,605 A1の同様の構造のポリマーに比べて驚くほどはるかに低い毒性を示す。いかなる理論にも拘束されることを望まずに、発明者らは、アミノ及びジアミノグアニジノ部分が、特に、上記のヒドロゾ架橋グアニジン二量体を含むポリマー比べて、ヒト真核細胞がグアニジノ部分に対してより耐容性を示すと推測している。さらに、開示された方法は、重合プロセスにおいて、従来技術の状態に応じて一部のポリマー中に残留モノマーとして含まれる可能性がある有毒成分ヒドロジン水和物の使用を避けている。

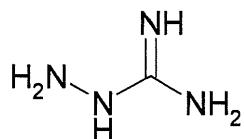
40

【0020】

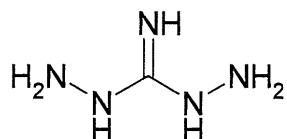
上記式(I)は、(モノ)アミノグアニジン(以下MAGとして言及する)の重縮合生成物、並びに1,3-ジアミノグアニジン(以下DAGとして言及する)の重縮合生成物を示す。

【0021】

【化7】



MAG



DAG

【0022】

式(I)は、アンモニアの同時分離と共に進行する重縮合の間、MAG及びDAGラジカルが、それらのアミノ又は互変異性イミノ基並びにそれらのヒドラゾ(ヒドラジニル)部分を介する当該重縮合に加わることができるという事実により説明され得る。その結果として、本発明のポリマー鎖に組み込まれる出発モノマーとしてのMAG及びDAGに関して3つの異なる可能性がある。MAGの場合は、式(I)のヒドラゾ部分のみが、DAGの場合は、イミノ/アミノ部分のみが、左方向、右方向又は上方向を指し得る。

【0023】

MAGについて、これは、式(I)における以下の可能なパラメーターを意味する：

a = 1、b = 0、R₂が-H：ヒドラゾ部分が左方向を指す；

a = 0、b = 1、R₂が-H：ヒドラゾ部分が右方向を指す；又は

a = 0、b = 0、R₂が-NH₂：ヒドラゾ部分が上方向を指す。

【0024】

DAGについては、以下のパラメーターの組み合わせが存在する：

a = 0、b = 1、R₂が-NH₂：アミノ/イミノ部分が左方向を指す；

a = 1、b = 0、R₂が-NH₂：アミノ/イミノ部分が右方向を指す；又は

a = 1、b = 1、R₂が-H：アミノ/イミノ部分が上方向を指す。

【0025】

これに限定されるものではないが、得られた重縮合物のNMRスペクトルは、後述する本発明の実施例に記載されているように、重縮合反応が、一貫して三つの可能な方向のうちいくつかの混合物をもたらすことを証明しているようである。これは、いくつかの方向の同じモノマーが、鎖内に存在するという推定につながる(まだ100%明らかにされていない)。

【0026】

これに関連して、グアニジノ部分のC=N二重結合の位置(並びに二重結合でのR₂置換基の空間位置)が互変異性の通常の影響を受けるということが明確に言及されるべきである。これは、グアニジンの二重結合は、鎖内にあっても鎖外にあってもよく、R₂が左方向或いは右方向を指してもよいことを意味する。したがって、このような上記式(I)の重縮合生成物の互変異性体もまた、本発明の範囲内である。

【0027】

X及びYの上記選択肢は、環化して環状重縮合を得る可能性を含む鎖を終結する異なる可能性(MAG、DAG又はその両方の混合物が、出発モノマーとして用いられるかどうかに依存する)からの結果である。アルバートらによる及びフェールタークらによる上記の記事も参照。もちろん、同じ選択肢が、鎖内の部分として末端アミノグアニジノ(MAG)部分及び1,3-ジアミノグアニジノ(DAG)部分のために利用可能である(即ち、鎖への結合は、任意の窒素原子を介していてもよい)。

【0028】

本発明によれば、R₁基は、2ないし20個の炭素原子、好ましくは4ないし18個の炭素原子、より好ましくは6ないし12個の炭素原子を有し、一部のC原子がO及び/又はNで置き換えられていてもよい、直鎖状、分枝状又は環状の飽和又は不飽和の二価炭化水素基であってもよい。上記設定は、以下の考慮事項の結果である。非常に短いR₁基の場合、活性型MAG又はDAG部分は、互いに非常に接近しており、ポリマーの活性を抑

10

20

30

40

50

えることができる；しかしながら、長い基であるとそれらは、非常に離れている。したがって、20個を超える原子を有する基は、基本的に可能であるが、それらは経済的な観点から好ましくはない。その理由は、単位重量あたりに比較的少数の抗感染的に有効なグアニジノ部分が含まれる式(I)のポリマーをもたらすためである。

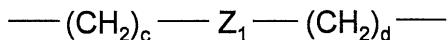
【0029】

好ましくは、R₁基は、鎖の親水性を増大させるために1以上の炭素原子がO又はNで置き換えていてもよいアルキレン基から選ばれ、より好ましくは、R₁が、下記一般式(II)～(V)の基から選ばれる：

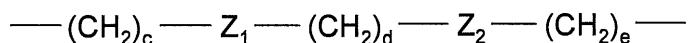
【0030】

【化8】

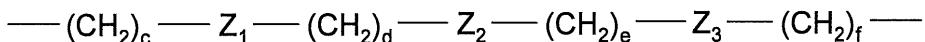
10



(II)

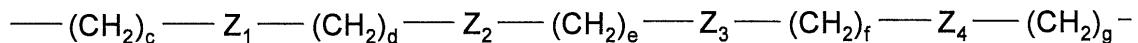


(III)



20

(IV)



(V)

【0031】

30

式中、Z₁～Z₄は、それぞれ独立して、O及びNから選ばれるヘテロ原子であり、表示c～gは、それぞれ独立して、1ないし12の範囲の整数であり、R₁基の原子総数は、20を超えない。1つのR₁基における全てのヘテロ原子Zが、O又はNの何れかであることが特に好ましい。

【0032】

殺菌効果又は毒性に関するアッセイの最良の結果は、R₁が、4, 9-ジオキサドデカン-1, 12-ジアミン、ポリオキシエチレン及び/又はプロピレンジアミンのようなポリエーテルジアミンの二価の基を示し、nは、好ましくは2ないし15、より好ましくは2ないし10、最も好ましくは2ないし6である化合物で達成された。

【0033】

40

式(I)の新規ポリグアニジンの有用な塩は、ハロゲン化水素酸、窒素、硫黄又はリンの酸素酸、ホウ酸、炭酸、カルボン酸、チオカルボン酸、カルバミン酸、スルホン酸、ホスホン酸又はホスフィン酸、並びにこれらの酸の多価形態の部分エステル類又は部分アミド類のような1以上の無機酸又は有機酸との任意の酸付加塩である。本発明によれば、好ましくは、医薬上許容される塩が用いられ、より好ましくは、塩化水素、臭化水素、ヨウ化水素の形態の酸付加塩、硫酸塩、メチル硫酸塩、炭酸塩、ホウ酸塩、シアン酸塩、チオシアン酸塩、リン酸塩、メシル酸塩、硝酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、マレイイン酸塩、フマル酸塩又はこれらが二官能性以上の場合にこれらの酸の部分エステル類である。このような部分エステル類の好ましいアルコール成分は、医薬上許容されるアルコールであり、特に、エタノールである。

50

【0034】

R₁基が1以上のOH基又はCOOH基を含む場合、無機塩基又は有機塩基との塩もまた本発明の範囲内であり、好ましくは、医薬上許容される塩基との塩であり、より好ましくは、グアニジン誘導体との塩であり、特に、アミノ又はジアミノグアニジンとの塩、即ち、本発明の新規ポリグアニジンの製造の基本となるグアニジン誘導体との塩である。通常、酸性部分及び塩基性部分の分子内塩が、いずれの場合においても、それぞれの分子内で形成されるだろう。

【0035】

本発明の第二の形態において、グアニジン誘導体又はその塩のジアミンとの重縮合による、第一形態に従う本発明のポリグアニジン誘導体を製造する方法であって、MAG及び/又はDAG又はその酸付加塩を、加熱することにより、少なくとも1つのジアミンH₂N-R₁-NH₂と重縮合させることを特徴とする方法が提供される。

10

【0036】

先行技術の状態とは対照的に、本発明の方法は、MAG又はDAGを1以上のジアミン（好ましくはただ一つのジアミン）と反応させることを含む。これは、ロシアの研究員により行われた上述方法のものに比べて、より明確に定義された生成物の製造を可能にする。その理由は、反応過程で、本発明に従って調製された反応混合物中に、クロマトグラフ上でも湿式化学的にも遊離ヒドラジンが検出されなかったからである。上記の従来技術で望ましいものの、本明細書では全く望ましくないヒドラジンとの（副）反応は、このように効果的に回避され得る。

20

【0037】

好ましくは、本発明の方法は、MAG又はDAGの塩（特に、その塩酸塩）を、ジアミンと一緒に加熱することにより行われる。ジアミンは、好ましくは、グアニジン誘導体の完全な変換を保証するために小モル過剰（例えば、（ジ）アミノグアニジンに対して3ないし5モル%、或いは経済的な理由のため最大で10モル%）で用いられる。加熱は、反応速度を制御するために、第一に、より低温（好ましくは、およそ80～150、より好ましくは110～130）で行い、次いで第二に、より高温（好ましくは150～250、より好ましくは160～180）で行う。また、このようにしてガスを形成する。反応混合物は、反応の完結を保証するために、第一の温度で、好ましくは1ないし3時間、より好ましくは2時間保持され、次いで第二の温度で、好ましくは1ないし8時間、より好ましくは3ないし5時間保持される。

30

【0038】

反応は、好ましくは、常圧で、水を排除して行われる。それは、例えば、はじめに反応容器を不活性ガスでバージし、反応容器に乾燥管を装備することにより達成できる。しかしながら、遊離アンモニア並びに残留モノマー（即ち、主に過剰なジアミン）を可能な限り完全に蒸発させるために、真空を適用することも可能である（特に、精製工程の過程における反応終了時）。

【0039】

反応終了後、好ましくは、得られたポリグアニジン誘導体を、水（例えば、3～10倍の量の水）に溶解する。これは、一方では、任意の水不溶解性成分を分離するために有効であり、他方で、水溶液が、新規ポリマーの使用のための好ましい製剤である。それは、該当する場合、任意のアジュvantを添加した後に、以下のように直接使用することができる可能性があることを意味する。

40

【0040】

現時点であまり好ましくはないさらなる精製の選択肢は、例えば、水溶液から水を蒸発させること、及び真空中でポリマーを乾燥すること、或いは酸の添加及びそれに続く乾燥により水溶液から塩析することを含み、ここでは、好ましいものとして記載されている医薬上許容される酸が有用である。塩析の一つの実施形態は、CO₂を導入し、炭酸塩又は炭酸水素塩としてポリグアニジンを塩析することを含む。所望のポリグアニジンを、塩として用い、遊離塩基として用いる場合、塩析した後に塩基で処理し、水性又は非水性の

50

溶液又は懸濁液中で提供することができる。

【0041】

第三形態において、本発明は、細菌感染、真菌感染及びウイルス感染並びにそれらの後遺症に拮抗するためにヒト医学及び獣医学分野において用いるため、農業分野及び環境分野において殺虫剤及び殺菌剤として用いるため、一般的に、病原菌を減少させ除去するための殺菌剤（殺生物剤）として用いるため、抗寄生虫薬として用いるため、製品を安定化（滅菌）するための補助剤として用いるため、或いはコールド／ウェット噴霧化、微粒子化及び蒸気滅菌のために溶解した形態の噴霧化物質として用いるための本発明の第一の形態に基づくポリグアニジン誘導体、或いは本発明の第二の形態に基づく方法により製造されたポリグアニジン誘導体を提供する。

10

【0042】

以下、比較例と共に非限定的に例示する実施形態を用いて、本発明をより詳細に説明するだろう。図（図1）のみが、毒性アッセイの結果をまとめたものである。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】図1は、毒性アッセイの結果をまとめたものである。

【実施例】

【0044】

実施例1～6及び比較例1及び2 - ポリマーの製造

実施例1

20

23 mmolの1,3-ジアミノグアニジニウム塩酸塩及び24 mmolの4,9-ジオキサドデカン-1,12-ジアミンを、乾燥管でふさいだ反応容器内で攪拌しながら120にて90分間加熱し、次いで温度を180に100分間昇温し、この反応時間の終わりに、45分間減圧下(50 mbar)とした。反応混合物を80未満に冷却した後、25 mlの水をゼラチン状の反応生成物に加えた。数時間後、透明な溶液を得た。

【0045】

得られた水溶液の試料から水を留去し、得られた残渣を真空乾燥し、赤みがかった粘性液体を得た。それを2 mlのD₂O（重水素化度>99.5%）に溶解し、¹H核共鳴(¹H-NMR-)スペクトルを得た。このように識別可能な生成物におけるR₁基のメチレンプロトン基の位置は、以下の通りである：

30

【0046】

¹H-NMR(D₂O), (ppm): 1.54-1.67(m, OCH₂CH₂CH₂), 1.80-1.95(m, NCH₂CH₂), 3.23-3.38 ppm(m, NCH₂), 3.42-3.65 ppm(m, CH₂CH₂OCH₂CH₂).

【0047】

これにより、使用されるジアミン成分4,9-ジオキサドデカン-1,12-ジアミンの構造が確認される。

【0048】

実施例2

4.6 mmolの1,3-ジアミノグアニジニウム塩酸塩及び4.8 mmolの4,9-ジオキサドデカン-1,12-ジアミンを、乾燥管でふさいだ反応容器内で攪拌しながら120にて90分間加熱し、次いで温度を180に8時間昇温し、この反応時間の終わりに45分間減圧下(50 mbar)とした。反応混合物を80未満に冷却した後、16 mlの水をゼラチン状の反応生成物に加えた。数時間後、透明溶液を得た。

40

【0049】

実施例3

4.6 mmolのN-アミノグアニジニウム塩酸塩及び4.8 mmolの4,9-ジオキサドデカン-1,12-ジアミンを乾燥管でふさいだ反応容器内で攪拌しながら120にて90分間加熱し、次いで温度を180に3.5時間昇温し、この反応時間の終わりに60分間減圧下(50 mbar)とした。反応混合物を80未満に冷却した後、1

50

6 m l の水をゼラチン状の反応生成物に加えた。数時間後、透明溶液を得た。

【0050】

実施例 4

1.16 mmol の 1,3-ジアミノグアニジニウム塩酸塩及び 1.21 mmol のトリス(2-アミノエチル)アミンを、乾燥管でふさいだ反応容器内で攪拌しながら 120

にて 150 分間加熱し、次いで温度を 160 に 2.5 時間昇温し、この反応時間の終わりに 45 分間減圧下(50 mbar)とした。反応混合物を 80 未満に冷却した後、4 m l の水をゼラチン状の反応生成物に加えた。数時間後、透明溶液を得た。

【0051】

実施例 5

8.12 mmol の 1,3-ジアミノグアニジニウム塩酸塩及び 8.47 mmol のトリス(2-アミノエチル)アミンを、乾燥管でふさいだ反応容器内で攪拌しながら 130

にて 120 分間加熱し、次いで温度を 180 に 8 時間昇温し、この反応時間の終わりに 90 分間減圧下(50 mbar)とした。反応混合物を 80 未満に冷却した後、28 m l の水をゼラチン状の反応生成物に加えた。数時間後、透明溶液を得た。

【0052】

実施例 6

2.32 mmol の 1,3-ジアミノグアニジニウム塩酸塩及び 2.43 mmol の 3,6-ジオキサオクタン-1,8-ジアミンを、乾燥管でふさいだ反応容器内で攪拌しながら 120 にて 60 分間加熱し、次いで温度を 170 に 4 時間昇温し、この反応時間の終わりに 60 分間減圧下(50 mbar)とした。反応混合物を 80 未満に冷却した後、7 m l の水をゼラチン状の反応生成物に加えた。数時間後、透明溶液を得た。

【0053】

比較例 1

23.2 mmol のグアニジニウム塩酸塩、5.4 mmol の 3,6-ジオキサオクタン-1,8-ジアミン及び 18.1 mmol の 1,6-ジアミノヘキサンを、乾燥管でふさいだ反応容器内で攪拌しながら 120 にて 90 分間加熱し、次いで温度を 170 に 8 時間昇温し、この反応時間の終わりに 90 分間減圧下(50 mbar)とした。反応混合物を 80 未満に冷却した後、60 m l の水をゼラチン状の反応生成物に加えた。数時間後、透明溶液を得た。

【0054】

得られたポリマーの構造は、WO2006/047800A1 に開示されたものに対応する。

【0055】

比較例 2

2.00 mmol のグアニジニウム塩酸塩、1.70 mmol の 1,6-ヘキサメチレンジアミン及び 0.3 mmol のヒドラジン水和物を、乾燥管でふさいだ反応容器内で攪拌しながら 160 にて 90 分間加熱し、次いで温度を 180 に 3.5 時間昇温し、この反応時間の終わりに 60 分間減圧下(50 mbar)とした。反応混合物を 80 未満に冷却した後、4 m l の水をゼラチン状の反応生成物に加えた。数時間後、透明溶液を得た。

【0056】

得られたポリマーの構造は、WO2011/043690A1 に開示されたものに対応する。

【0057】

実施例 7 - 活性の測定：抗菌 / 抗真菌 / 抗ウイルス効果

新規化合物の活性を多くのスクリーニング系で試験した。抗菌活性及び抗真菌活性を M I C アッセイで試験した。MIC とは、「最小阻害濃度」を言い、肉眼で識別可能な微生物の成長を阻害し得る物質の最低濃度である。MIC は、物質を希釈し次いで病原体を加える、いわゆる滴定濃度法を用いて決定する。

10

20

30

40

50

【0058】

通常これにより、菌種の増殖を阻害するのに十分に高い抗生剤の濃度を決定することができる。MICは、マイクログラムパーミリリッター($\mu\text{g}/\text{ml}$)又は%パーセントで特定され、希釈は、一般的に10g2のステップで行われる。ここで、1%の初期濃度を2倍ずつ希釈し、その結果として0.5%、0.25%、0.125%等の試験濃度を得る。したがって、低い値は、抗感染性のより良好な活性を示す。

【0059】

アッセイは、EUCAST(欧州抗菌薬感受性試験法検討委員会)により要求される基準に従って行い、欧州臨床微生物感染症学会議(ESCMID)のAFST(「抗真菌薬感受性試験」)規定に従って行った。

10

【0060】

ウイルスのスクリーニング系は、宿主細胞がインビトロで感染する感染系であり、試験物質を感染前後に加え、その活性を決定した。これらの全てのアッセイは、類似段階希釈を、例えば抗菌/抗真菌アッセイで用いる薬剤スクリーニングに関するシーライフファルマの内部基準規定に従って行った。

【0061】

下記表1～3は、多耐性細菌及び菌類並びにウイルスに対する実施例1、3、4及び5の本発明新規化合物の抗感染効果に関する試験結果をまとめたものである。データは、複数測定の平均値である。

【0062】

20

本発明新規化合物がグラム陽性並びにグラム陰性病原体に対して優れた活性を示すことは明らかである：

【0063】

【表1】

MICアッセイの結果	MRSA	表皮ブドウ球菌	肺炎双球菌	フェカリス菌	アクネ菌	大腸菌	肺炎桿菌	綠膿菌	アシネトバクター・ウマニ	汚物腸内菌	サルモネラ菌
実施例1	0.001%	0.001%	0.004%	0.008%	0.001%	0.016%	0.02%	0.02%	0.06%	0.03%	0.03%
実施例3	0.001%	0.001%	0.001%	0.008%	0.001%	0.02%	0.02%	0.02%	0.06%	0.2%	0.03%
実施例4	0.001%	0.001%	0.001%	0.008%	0.001%	0.016%	0.016%	0.030%	0.02%	0.016%	0.030%
実施例5	0.001%	0.001%	0.002%	0.002%	0.001%	0.020%	0.02%	0.04%	0.04%	0.13%	0.03%

30

【0064】

菌類及び酵母に対しても：

【0065】

【表2】

MICアッセイの結果	Candida albicans	Candida papilliosis	Candida glabrata	Candida kruzei	Aspergillus terreus	Aspergillus fumigatus	Fusarium rosei	Trichophyton sp.	Alternaria alternaria	Microsporum canis	Dematiaceae sp.
実施例1	0.008%	0.03%	0.02%	0.02%	0.02%	0.03%	0.03%	0.02%	0.02%	0.03%	0.02%
実施例3	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.03%	0.03%	0.03%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%
実施例4	0.008%	0.016%	0.016%	0.008%	0.125%	0.125%	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
実施例5	0.02%	0.02%	0.02%	0.020%	0.016%	0.016%	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

40

【0066】

ウイルスに対しても：

【0067】

【表3】

ウイルスアッセイの結果	インフルエンザA及びB	ヒトライノウイルス	パラインフルエンザウイルス	単純ヘルペスウイルス
実施例1	0,008 %	0,008 %	0,008 %	0,02 %
実施例3	0,02 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %
実施例4	0,04 %	0,02 %	0,04 %	0,02 %
実施例5	0,04 %	0,04 %	0,04 %	0,02 %

10

【0068】

したがって、試験された全ての新規化合物は、以下の毒性アッセイで示されるように先行技術により知られているポリグアニジン誘導体に比べて有意に低い毒性で、様々な病原体に対して非常に良好ないし非常に優れた活性を示す。

【0069】

実施例8 - 毒性アッセイ

以下に記載された Alamar Blue (R) アッセイを、4種のポリマーをそれらの毒性ポテンシャル（増殖、細胞死、細胞代謝を含む）について試験するために用い、IC₅₀ 値及び非毒性濃度を一次ケラチノサイト（H K E R）及び一次内皮細胞（H U V E C）で測定した。図1は、様々なポリマーの毒性効果がそれらの濃度に依存することを示す。

20

【0070】

Alamar Blue (R) アッセイ：20,000 個のヒトケラチノサイト（H K E R）又は内皮細胞（H U V E C）を、96 個のウェルプレートで播種し、24 時間インキュベートし、その後、異なる濃度（5 % ~ 0.005 %）の実施例1及び3の新規ポリマー並びに比較例1及び2の比較物質を加えた。24 時間後、10 μl の Alamar Blue (R) をそれぞれのウェル（100 μl 培地）に加え、3 時間のインキュベーション後、呈色反応を、マルチプレートリーダーを用いて検出した（ex: 530 nm；em: 590 nm）。H K E R：「ヒト一次ケラチノサイト」；H U V E C：「ヒト臍帯静脈内皮細胞」。

30

【0071】

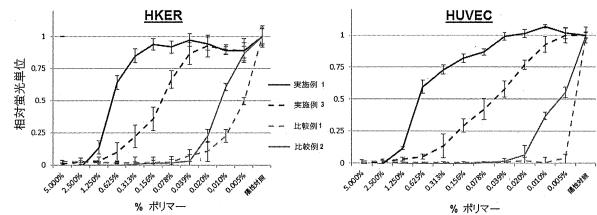
比較例1及び2のポリマーは、すでに非常に低濃度（即ち、およそ0.01 %以下のIC₅₀）でH K E R並びにH U V E Cに対して有意な毒性効果を示す。比較的に、本発明者らにより製造された実施例1及び3の新規ポリマーは、有意により高い濃度で毒性効果を示す（両方の細胞形態でのIC₅₀が、実施例1については、およそ1 %、実施例3については、0.05 %ないし0.1 %の範囲である。）。比較例により生み出された毒性は、実施例3のポリマーは5倍の濃度でのみ到達し、実施例1のポリマーは少なくとも100倍の濃度でのみ到達する。したがって、D A G 誘導体は、M A G ポリマーよりも本アッセイでより良好な結果を示した。

【0072】

40

結果として、新規化合物は、先行技術で知られているポリグアニジン誘導体よりも有意に低い毒性にて様々な病原体に対して非常に良好な優れた活性を示す。

【 図 1 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 31/12 1 7 1

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 ブレッチ、アレクサンダー

オーストリア国、エー- 3 5 2 4 ガインブルン、グロスレインプレヒツ 6 0

(72)発明者 ナグル、ミカエル

オーストリア国、エー- 1 0 2 0 ウィーン、ノヴァラガッセ 5 1 / 1 9

(72)発明者 ウィーズナー、クリストフ

オーストリア国、エー- 1 1 6 0 ウィーン、ブルネンガッセ 6 9 / 1 8

(72)発明者 バーグマン、ハインツ

オーストリア国、エー- 1 1 4 0 ウィーン、カール-ベケールティ-シュトラッセ 1 9

審査官 中西 聰

(56)参考文献 特表2 0 0 5 - 5 2 0 8 7 7 (JP, A)

特表2 0 0 4 - 5 2 0 4 7 3 (JP, A)

特表2 0 0 3 - 5 3 4 4 0 4 (JP, A)

特表2 0 0 6 - 5 1 6 5 7 5 (JP, A)

米国特許出願公開第2 0 1 1 / 0 2 6 9 9 3 6 (US, A 1)

特公昭4 7 - 0 0 8 2 3 5 (JP, B 1)

特開平0 1 - 0 5 6 6 1 4 (JP, A)

特開平0 9 - 2 7 2 7 5 2 (JP, A)

特開2 0 0 3 - 1 9 1 6 0 6 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 8 G 7 3 / 0 0 - 7 3 / 2 6

A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)