

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7602217号
(P7602217)

(45)発行日 令和6年12月18日(2024.12.18)

(24)登録日 令和6年12月10日(2024.12.10)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 F 9/6558(2006.01)

C 0 7 F 9/6558

C S P

A 6 1 K 8/55 (2006.01)

A 6 1 K 8/55

A 6 1 K 31/675(2006.01)

A 6 1 K 31/675

A 6 1 L 27/36 (2006.01)

A 6 1 L 27/36 3 1 1

A 6 1 L 27/54 (2006.01)

A 6 1 L 27/54

請求項の数 13 (全142頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-515787(P2019-515787)

(86)(22)出願日 平成29年6月2日(2017.6.2)

(65)公表番号 特表2019-518792(P2019-518792
A)

(43)公表日 令和1年7月4日(2019.7.4)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/035764

(87)国際公開番号 WO2017/210611

(87)国際公開日 平成29年12月7日(2017.12.7)

審査請求日 令和2年5月29日(2020.5.29)

審判番号 不服2022-11466(P2022-11466/J
1)

審判請求日 令和4年7月22日(2022.7.22)

(31)優先権主張番号 62/345,370

(32)優先日 平成28年6月3日(2016.6.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(73)特許権者 518428783

バイオピンク エルエルシー

アメリカ合衆国 9 1 1 0 7 カリフォル
ニア州 パサデナ イースト フットヒル
ブルバード 2 2 6 5

(73)特許権者 592048844

ユニバーシティ オブ サザン カリフォ
ルニアアメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 0
0 1 5 ロサンゼルス スイート 2 3 0 0
オリーブ ストリート 1 1 5 0 エス.

(74)代理人 100084995

弁理士 加藤 和詳

(72)発明者 エベティノ、 フランク、 エイチ.

アメリカ合衆国 9 1 1 0 7 カリフォル

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ビスホスホネート・キノロン複合体及びそれらの用途

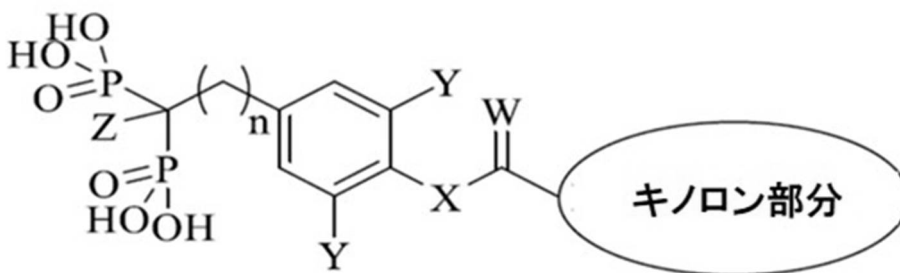
(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ビスホスホネートとキノロン部分の複合体である化合物であって、

前記キノロン部分が、以下の式で表されるように、カルバメート、オーチオカルバメート、又はS-チオカルバメートを介して、前記ビスホスホネートに分離可能に結合しており、

【化1】



(式中、XがOかつWがO、XがOかつWがS、又はXがSかつWがOであり、YがH、CH₃、NO₂、F、Cl、Br、I、又はCO₂Hであり、ZがH、CH₃、OH、NH

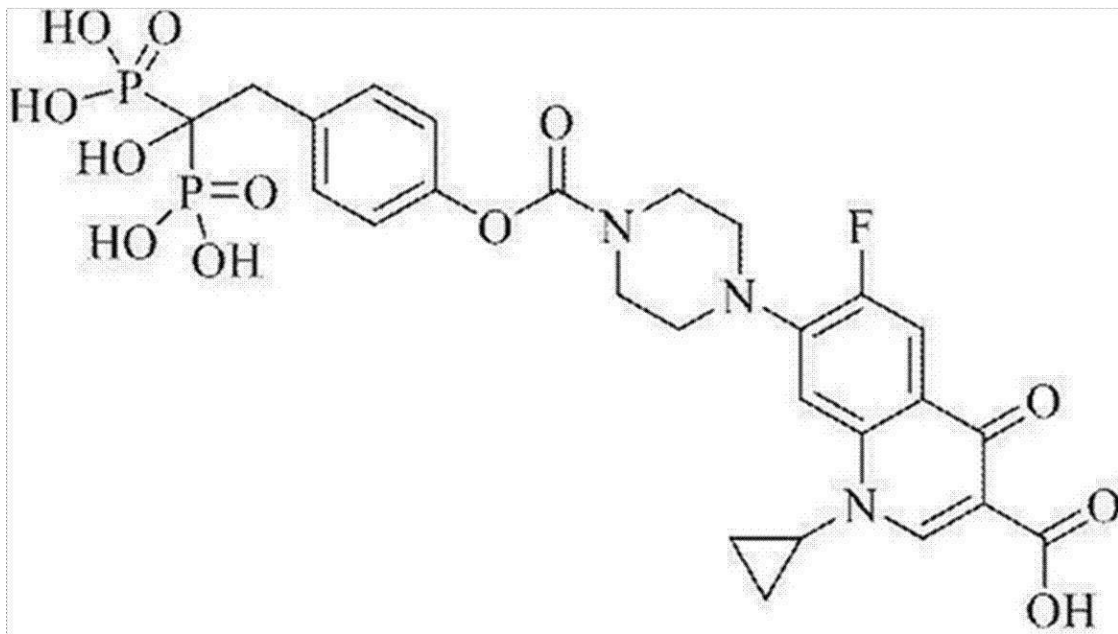
2、SH、F、Cl、Br、又はIであり、nが1～5である。)

前記キノロン部分が、アラトロフロキサシン、アミフロキサシン、バロフロキサシン、ベシフロキサシン、シプロフロキサシン、クリナフロキサシン、デラフロキサシン、エノキサシン、フィナフロキサシン、ガチフロキサシン、ゲミフロキサシン、グレパフロキサシン、JNJ-Q2、ロメフロキサシン、モキシフロキサシン、ノルフロキサシン、オルビフロキサシン、パズフロキサシン、プラドフロキサシン、サラフロキサシン、シタフロキサシン、スパルフロキサシン、テマフロキサシン、トスフロキサシン、トロバフロキサシン、ザボフロキサシン、及びネモノキサシンからなる群より選択される、化合物。

【請求項2】

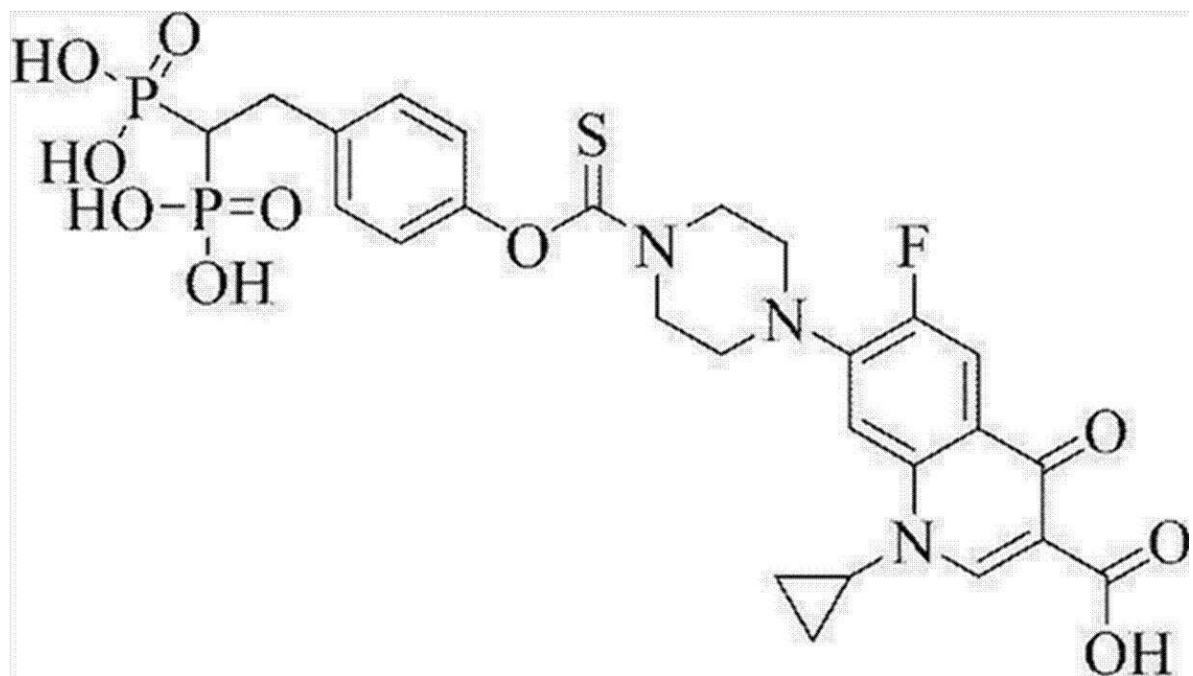
式(12)、式(13)又は式(15)で表される、請求項1に記載の化合物：

【化2】



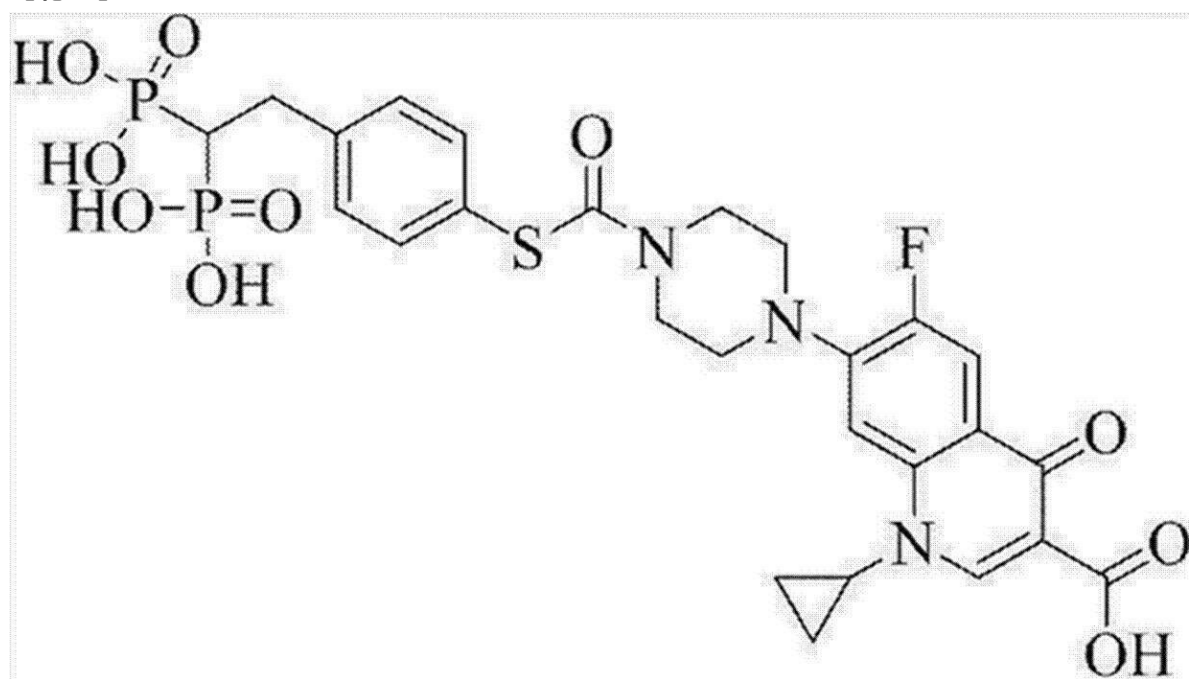
式 (12)

【化 3】



式 (13)

【化 4】



式 (15)

。

【請求項 3】

式 (6) で表される、請求項 1 に記載の化合物：

10

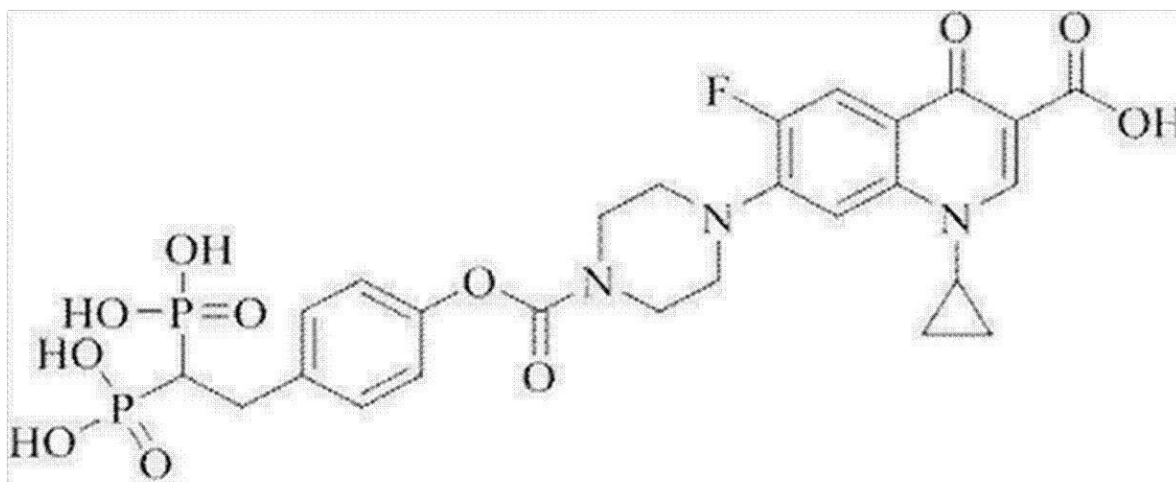
20

30

40

50

【化 5】



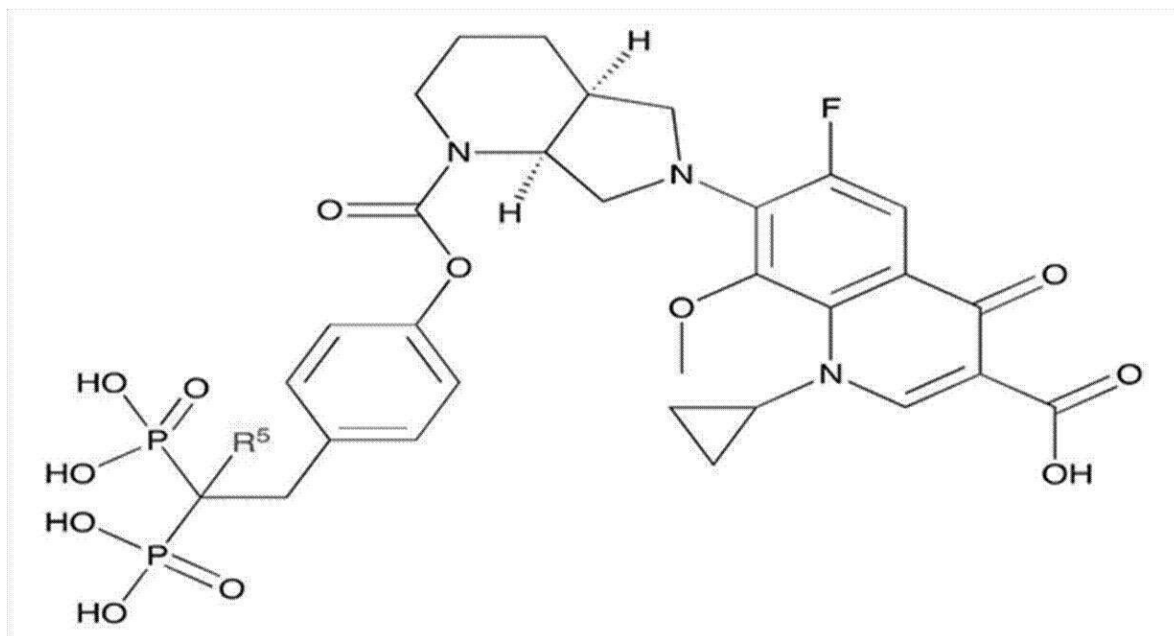
式 (6)

。

【請求項 4】

以下の式のいずれかで表される、請求項 1 に記載の化合物。

【化 6】

式中、 R^5 は水素又はヒドロキシ基である。

10

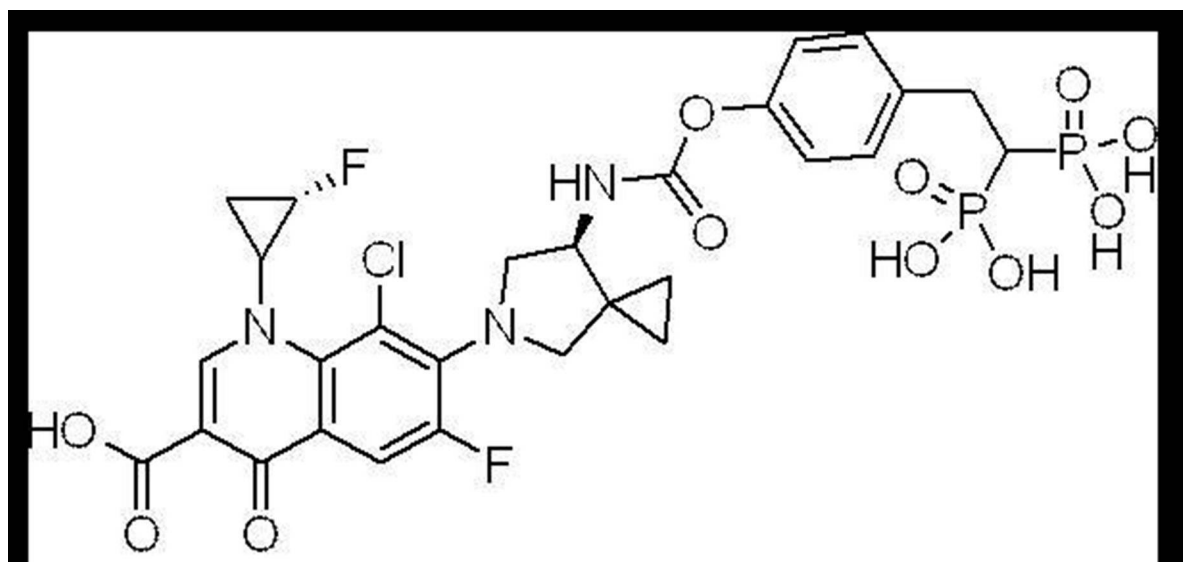
20

30

40

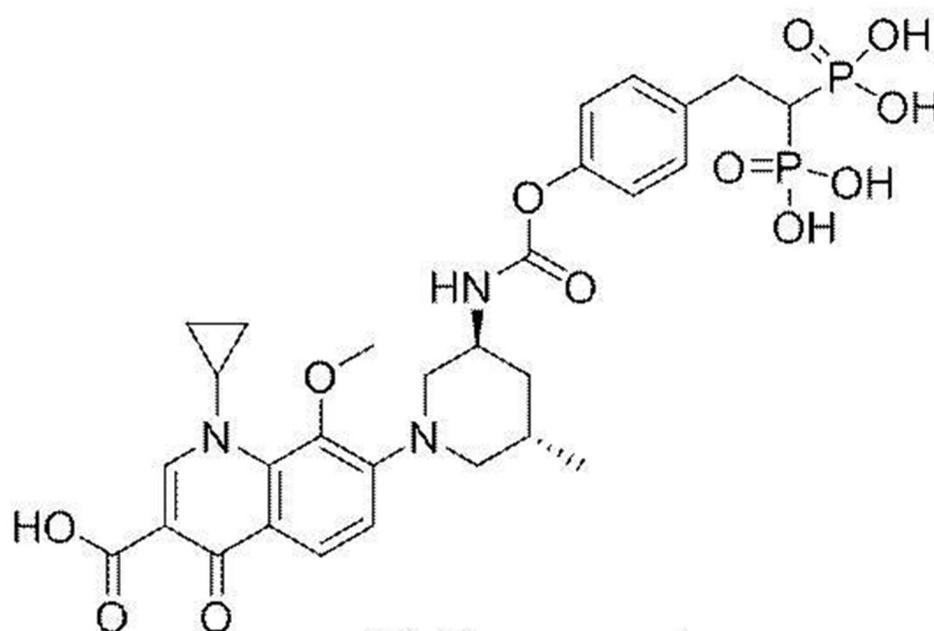
50

【化 7】



10

【化 8】



20

30

【請求項 5】

請求項 1～請求項 4 のいずれか一項に記載の化合物、及び
医薬的に許容可能なキャリア
を含む医薬組成物。

40

【請求項 6】

前記化合物の量が、骨髓炎、骨壊死、インプラント周囲炎、又は歯周炎の治療又は予防
に有効な量であるか、又は、細菌の殺菌又は成長抑制に有効な量である、請求項 5 に記載
の医薬組成物。

【請求項 7】

請求項 1～請求項 4 のいずれか一項に記載の化合物又は請求項 5 に記載の医薬組成物を
含む、骨感染症の治療用又は予防用の医薬。

【請求項 8】

請求項 1～請求項 4 のいずれか一項に記載の化合物又は請求項 5 に記載の医薬組成物を
含む、骨髓炎の治療用又は予防用の医薬。

50

【請求項 9】

請求項 1～請求項 4 のいずれか一項に記載の化合物又は請求項 5 に記載の医薬組成物を含む、糖尿病足病変の治療用又は予防用の医薬。

【請求項 10】

請求項 1～請求項 4 のいずれか一項に記載の化合物又は請求項 5 に記載の医薬組成物を含む、骨手術部位又はインプラント手術部位、又は骨移植が実施されている手術部位における細菌感染又はバイオフィーム感染の治療用又は予防用の医薬。

【請求項 11】

骨移植材料と、

請求項 1～請求項 4 のいずれか一項に記載の化合物又は請求項 5 に記載の医薬組成物とを含み、

10

前記化合物又は前記医薬組成物が、前記骨移植材料に付着しているか、前記骨移植材料と一体化しているか、前記骨移植材料に化学吸着されているか、又は前記骨移植材料と混合されている、骨移植組成物。

【請求項 12】

前記骨移植材料が自家移植骨材料、同種移植骨材料、異種移植骨材料、合成骨移植材料、又はそれらの組み合わせである、請求項 11 に記載の骨移植組成物。

【請求項 13】

骨手術部位又はインプラント手術部位、又は骨移植が実施されている手術部位における細菌感染又はバイオフィーム感染を治療又は予防するための、請求項 11 又は請求項 12 に記載の骨移植組成物を含む医薬製品。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は 2016 年 6 月 3 日に出願された「骨標的化治療薬及び診断薬 (BONE TARGETED THERAPEUTICS AND DIAGNOSTICS)」という標題の同時係属中の米国仮特許出願第 62/345370 号の利益とその仮特許出願に基づく優先権を主張するものであり、その仮出願の内容の全体を参照により本明細書に援用する。

30

【0002】

本願は 2016 年 7 月 1 日に出願された「ビスホスホネート・キノロン・バイオコンジュゲート及びそれらの使用 (BISPHOSPHONATE QUINOLONE BIOCONJUGATES AND USES THEREOF)」という標題の同時係属中の米国仮特許出願第 62/357727 号の利益とその仮特許出願に基づく優先権も主張するものであり、その仮出願の内容の全体を参照により本明細書に援用する。

【0003】

本願は 2017 年 1 月 19 日に出願された「ビスホスホネート・キノロン・バイオコンジュゲート及びそれらの使用 (BISPHOSPHONATE QUINOLONE BIOCONJUGATES AND USES THEREOF)」という標題の同時係属中の米国仮特許出願第 62/448060 号の利益とその仮特許出願に基づく優先権も主張するものであり、その仮出願の内容の全体を参照により本明細書に援用する。

40

【0004】

合衆国政府の助成による研究又は開発に関する陳述

本発明は、NIH/NIDCR によって支給された研究助成番号第 1R41DE025789-01 号の政府支援によって行われた。米国政府は本発明に対して一定の権利を有する。

【背景技術】

【0005】

感染性骨疾患は骨髓炎、顎骨感染症、及び他の骨感染症とも呼ばれ、ヒト及び動物の健

50

康における重大な問題であり、その結果は四肢欠損から死亡までにわたる深刻なものであり得る。骨に特有の問題のため、骨髄炎及び他の骨感染症の治療は長期にわたり、且つ、困難であることが典型的であり、外科的介入を必要とすることが多い。したがって、あらゆる形態又は臨床亜型の骨髄炎及び他の骨感染症の治療法の改善について長く望まれながらも達成されていなかった要求が存在する。

【発明の概要】

【0006】

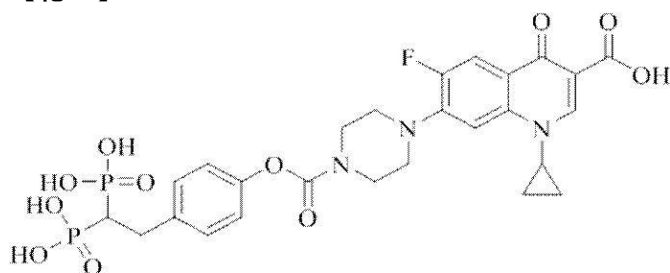
幾つかの態様では、本明細書はキノロン、例えばシプロフロキサシンに対して分離可能に複合体化可能であるビスホスホネート（BP）を含有し得るBPキノロン複合体を提供する。複数の実施形態において前記BPキノロン複合体は対象においてキノロンを骨、骨移植片、及び／又は代替骨移植片へ選択的に送達することができる（すなわち、骨、骨移植片、又は代替骨移植片を標的とすることができる）。幾つかの実施形態では前記BPキノロン複合体は前記キノロンを分離することができる。本明細書はBPキノロン複合体の合成方法及び本明細書において提供される1又は複数の前記BPキノロン複合体を使用する骨髄炎又は他の骨感染症の治療方法又は予防方法も提供する。

【0007】

幾つかの態様では、前記複合体は式（6）の化合物であり得る。

【0008】

【化1】



式 (6)

【0009】

本明細書は式（6）の化合物及び医薬的に許容可能なキャリアを含有する医薬組成物も提供する。

【0010】

本明細書は、必要とする対象において骨感染症を治療する方法であって、骨感染症の治療を必要とする対象に特定量の式（6）の前記化合物又は式（6）の化合物を含有する医薬製剤を投与する工程を含み得る前記方法も提供する。

【0011】

本明細書は、ビスホスホネート（BP）及びキノロン化合物を含有する化合物であって、前記キノロン化合物がリンカーを介して前記ビスホスホネートに分離可能に結合している前記化合物も提供する。前記BPは、置換されていても置換されていなくてもよい、ヒドロキシルフェニルアルキルビスホスホネート、ヒドロキシルフェニルアリールビスホスホネート（hydroxyl phenyl alkyl or aryl bisphosphonates）、ヒドロキシルフェニル（又はアリール）アルキルヒドロキシルビスホスホネート（hydroxyl phenyl (or aryl) alkyl hydroxyl bisphosphonates）、アミノフェニル（又はアリール）アルキルビスホスホネート（amino phenyl (or aryl) alkyl bisphosphonates）、アミノフェニル（又はアリール）アルキルヒドロキシルビスホスホネート（amino phenyl (or aryl) alkyl hydroxyl bisphosphonates）、ヒドロキシルアルキルビスホスホネ

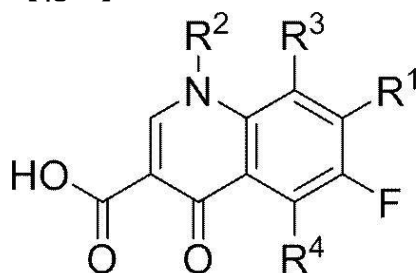
ート、ヒドロキシルアルキルヒドロキシルビスホスホネート、ヒドロキシルアルキルフェニル（又はアリール）アルキルビスホスホネート（hydroxyl alkyl phenyl (or aryl) alkyl bisphosphonates）、ヒドロキシルフェニル（又はアリール）アルキルヒドロキシルビスホスホネート（hydroxyl phenyl (or aryl) alkyl hydroxyl bisphosphonates）、アミノフェニル（又はアリール）アルキルビスホスホネート（amino phenyl (or aryl) alkyl bisphosphonates）、アミノフェニル（又はアリール）アルキルヒドロキシルビスホスホネート（amino phenyl (or aryl) alkyl hydroxyl bisphosphonates）、ヒドロキシルアルキルビスホスホネート、ヒドロキシルアルキルヒドロキシルビスホスホネート、ヒドロキシピリジルアルキルビスホスホネート、ピリジルアルキルビスホスホネート、ヒドロキシルイマダゾイルアルキルビスホスホネート、イマダゾイルアルキルビスホスホネート、エチドロネート、パミドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、アレンドロネート、イバンドロネート、リセドロネート、ゾレドロネート、ミノドロネート、及びそれらの混合物からなる群より選択され得る。前記キノロン化合物はフルオロキノロンであり得る。前記キノロン化合物はアラトロフロキサシン、アミフロキサシン、パロフロキサシン、ベシフロキサシン、カダゾリド、シプロフロキサシン、クリナフロキサシン、ダノフロキサシン、デラフロキサシン、ジフロキサシン、エノキサシン、エンロフロキサシン、フィナフロキサシン、フレロフロキサシン、フルメキン、ガチフロキサシン、ゲミフロキサシン、グレパフロキサシン、イバフロキサシン、JNJ-Q2、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、マルボフロキサシン、モキシフロキサシン、ナジフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、オルビフロキサシン、バズフロキサシン、ペフロキサシン、プラドフロキサシン、プルリフロキサシン、ルフロキサシン、サラフロキサシン、シタフロキサシン、スパルフロキサシン、テマフロキサシン、トスフロキサシン、トロバフロキサシン、ザボフロキサシン、ネモノキサシン、及びそれらの混合物からなる群より選択され得る。

【0012】

前記キノロン化合物は式Aで記載される構造を有し得る。

【0013】

【化2】



式 (A)

【0014】

式中、 R^1 はアルキル基、置換アルキル基、アルケニル基、置換アルケニル基、アルキニル基、置換アルキニル基、フェニル基、置換フェニル基、アリール基、置換アリール基、ヘテロアリール基、置換ヘテロアリール基、ハロ基、ヒドロキシル基、アルコキシ基、置換アルコキシ基、フェノキシ基、置換フェノキシ基、アロキシ基、置換アロキシ基、アルキルチオ基、置換アルキルチオ基、フェニルチオ基、置換フェニルチオ基、アリールチオ基、置換アリールチオ基、シアノ基、イソシアノ基、置換イソシアノ基、カルボニル基、置換カルボニル基、カルボキシ基、置換カルボキシ基、アミノ基、置換アミノ基、アミド基、置換アミド基、スルホニル基、置換スルホニル基、スルホン酸基、ホスホリル基、置換ホスホリル基、ホスホニル基、置換ホスホニル基、ポリアリール基、置換ポリア

リール基、 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、置換 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、複素環基、置換複素環基、アミノ酸基、ペプチド基、及びポリペプチド基をはじめとする置換基であり得、

R^2 はアルキル基、置換アルキル基、アルケニル基、置換アルケニル基、アルキニル基、置換アルキニル基、フェニル基、置換フェニル基、アリール基、置換アリール基、ヘテロアリール基、置換ヘテロアリール基、ハロ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、置換アルコキシ基、フェノキシ基、置換フェノキシ基、アロキシ基、置換アロキシ基、アルキルチオ基、置換アルキルチオ基、フェニルチオ基、置換フェニルチオ基、アリールチオ基、置換アリールチオ基、シアノ基、イソシアノ基、置換イソシアノ基、カルボニル基、置換カルボニル基、カルボキシ基、置換カルボキシ基、アミノ基、置換アミノ基、アミド基、置換アミド基、スルホニル基、置換スルホニル基、スルホン酸基、ホスホリル基、置換ホスホリル基、ホスホニル基、置換ホスホニル基、ポリアリール基、置換ポリアリール基、 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、置換 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、複素環基、置換複素環基、アミノ酸基、ペプチド基、及びポリペプチド基をはじめとする置換基であり得、

R^3 はアルキル基、置換アルキル基、アルケニル基、置換アルケニル基、アルキニル基、置換アルキニル基、フェニル基、置換フェニル基、アリール基、置換アリール基、ヘテロアリール基、置換ヘテロアリール基、ハロ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、置換アルコキシ基、フェノキシ基、置換フェノキシ基、アロキシ基、置換アロキシ基、アルキルチオ基、置換アルキルチオ基、フェニルチオ基、置換フェニルチオ基、アリールチオ基、置換アリールチオ基、シアノ基、イソシアノ基、置換イソシアノ基、カルボニル基、置換カルボニル基、カルボキシ基、置換カルボキシ基、アミノ基、置換アミノ基、アミド基、置換アミド基、スルホニル基、置換スルホニル基、スルホン酸基、ホスホリル基、置換ホスホリル基、ホスホニル基、置換ホスホニル基、ポリアリール基、置換ポリアリール基、 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、置換 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、複素環基、置換複素環基、アミノ酸基、ペプチド基、及びポリペプチド基をはじめとする置換基であり得、且つ、

R^4 はアルキル基、置換アルキル基、アルケニル基、置換アルケニル基、アルキニル基、置換アルキニル基、フェニル基、置換フェニル基、アリール基、置換アリール基、ヘテロアリール基、置換ヘテロアリール基、ハロ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、置換アルコキシ基、フェノキシ基、置換フェノキシ基、アロキシ基、置換アロキシ基、アルキルチオ基、置換アルキルチオ基、フェニルチオ基、置換フェニルチオ基、アリールチオ基、置換アリールチオ基、シアノ基、イソシアノ基、置換イソシアノ基、カルボニル基、置換カルボニル基、カルボキシ基、置換カルボキシ基、アミノ基、置換アミノ基、アミド基、置換アミド基、スルホニル基、置換スルホニル基、スルホン酸基、ホスホリル基、置換ホスホリル基、ホスホニル基、置換ホスホニル基、ポリアリール基、置換ポリアリール基、 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、置換 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、複素環基、置換複素環基、アミノ酸基、ペプチド基、及びポリペプチド基をはじめとする置換基であり得る。

【0015】

1つ又は複数の態様においては、前記リンカーはカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーはアリールカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーは O -チオアリールカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーは S -チオアリールカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーはフェニルカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーはチオカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーは O -チオカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーは S -チオカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーは式Aの R^1 基に結合し得る。

【0016】

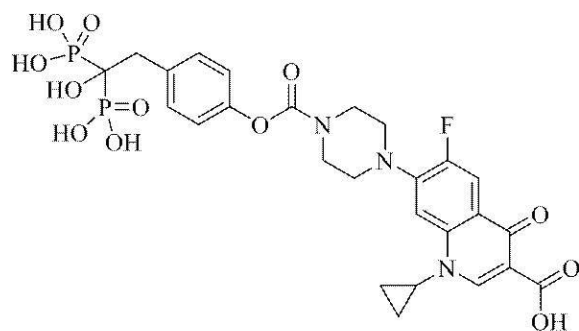
1つ又は複数の態様においては、前記エチリデンビスホスホネートの α 位はヒドロキシ、フルオロ、クロロ、ブromo、又はヨードによって置換され得る。幾つかの態様では、前記ビスホスホネートは p -ヒドロキシフェニルエチリデン基又はその誘導体を含み得る。幾つかの態様ではエチリデンビスホスホネートは α 位に α -ヒドロキシを含まない。

【0017】

幾つかの態様では、前記化合物は式(12)の式を有する。

【 0 0 1 8 】

【化 3】



式 (12)

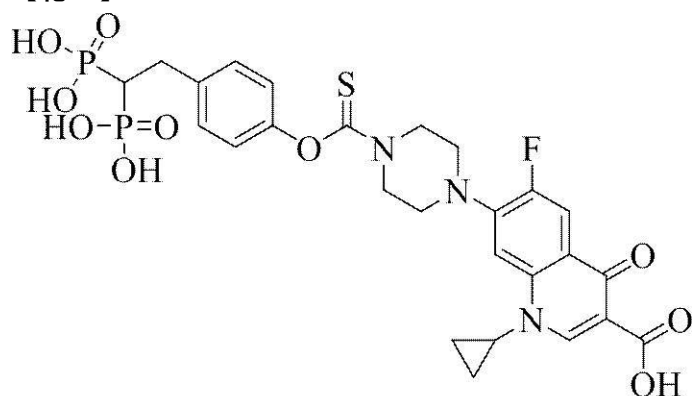
10

【 0 0 1 9 】

幾つかの態様では、前記化合物は式 (1 3) の式を有する。

【 0 0 2 0 】

【化 4】



式 (13)

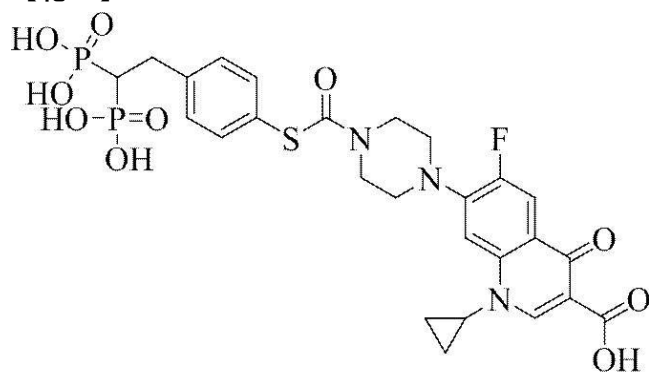
20

【 0 0 2 1 】

幾つかの態様では、前記化合物は式 (1 5) の式を有する。

【 0 0 2 2 】

【化 5】



式 (15)

30

【 0 0 2 3 】

本明細書は、ビスホスホネートとキノロン化合物と医薬的に許容可能なキャリアを含有し得る医薬製剤であって、前記キノロン化合物がリンカーを介して、前記ビスホスホネートに分離可能に結合している前記医薬製剤も提供する。前記ビスホスホネートは、置換さ

40

50

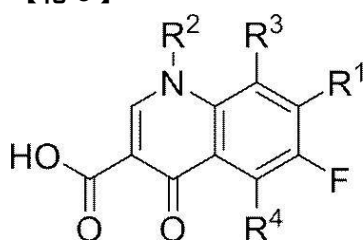
れていても置換されていなくてもよい、ヒドロキシルフェニルアルキルビスホスホネート、ヒドロキシルフェニルアリールビスホスホネート、ヒドロキシルフェニル（又はアリール）アルキルヒドロキシルビスホスホネート、アミノフェニル（又はアリール）アルキルビスホスホネート、アミノフェニル（又はアリール）アルキルヒドロキシルビスホスホネート、ヒドロキシルアルキルビスホスホネート、ヒドロキシルアルキルヒドロキシルビスホスホネート、ヒドロキシルアルキルフェニル（又はアリール）アルキルビスホスホネート、ヒドロキシルフェニル（又はアリール）アルキルヒドロキシルビスホスホネート、アミノフェニル（又はアリール）アルキルビスホスホネート、アミノフェニル（又はアリール）アルキルヒドロキシルビスホスホネート、ヒドロキシルアルキルビスホスホネート、ヒドロキシルアルキルヒドロキシルビスホスホネート、ヒドロキシピリジルアルキルビスホスホネート、ピリジルアルキルビスホスホネート、ヒドロキシイマダゾイルアルキルビスホスホネート、イミダゾイルアルキルビスホスホネート、エチドロネート、パミドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、アレンドロネート、イバンドロネート、リセドロネート、ゾレドロネート、ミノドロネート、及びそれらの混合物からなる群より選択され得る。前記キノロン化合物はフルオロキノロンであり得る。前記キノロン化合物はアラトロフロキサシン、アミフロキサシン、バロフロキサシン、ベシフロキサシン、カダゾリド、シプロフロキサシン、クリナフロキサシン、ダノフロキサシン、デラフロキサシン、ジフロキサシン、エノキサシン、エンロフロキサシン、フィナフロキサシン、フレロフロキサシン、フルメキン、ガチフロキサシン、ゲミフロキサシン、グレパフロキサシン、イバフロキサシン、JNJ-Q2、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、マルボフロキサシン、モキシフロキサシン、ナジフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、オルビフロキサシン、パズフロキサシン、ペフロキサシン、ブラドフロキサシン、プurlフロキサシン、ルフロキサシン、サラフロキサシン、シタフロキサシン、スパルフロキサシン、テマフロキサシン、トスフロキサシン、トロバフロキサシン、ザボフロキサシン、ネモノキサシン、及びそれらの混合物からなる群より選択され得る。

【0024】

前記キノロン化合物は式Aで記載される構造を有し得る。

【0025】

【化6】



式 (A)

【0026】

式中、R¹はアルキル基、置換アルキル基、アルケニル基、置換アルケニル基、アルキニル基、置換アルキニル基、フェニル基、置換フェニル基、アリール基、置換アリール基、ヘテロアリール基、置換ヘテロアリール基、ハロ基、ヒドロキシル基、アルコキシ基、置換アルコキシ基、フェノキシ基、置換フェノキシ基、アロキシ基、置換アロキシ基、アルキルチオ基、置換アルキルチオ基、フェニルチオ基、置換フェニルチオ基、アリールチオ基、置換アリールチオ基、シアノ基、イソシアノ基、置換イソシアノ基、カルボニル基、置換カルボニル基、カルボキシル基、置換カルボキシル基、アミノ基、置換アミノ基、アミド基、置換アミド基、スルホニル基、置換スルホニル基、スルホン酸基、ホスホリル基、置換ホスホリル基、ホスホニル基、置換ホスホニル基、ポリアリール基、置換ポリアリール基、C₃～C₂₀環基、置換C₃～C₂₀環基、複素環基、置換複素環基、アミノ酸基、ペプチド基、及びポリペプチド基をはじめとする置換基であり得、

R^2 はアルキル基、置換アルキル基、アルケニル基、置換アルケニル基、アルキニル基、置換アルキニル基、フェニル基、置換フェニル基、アリール基、置換アリール基、ヘテロアリール基、置換ヘテロアリール基、ハロ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、置換アルコキシ基、フェノキシ基、置換フェノキシ基、アロキシ基、置換アロキシ基、アルキルチオ基、置換アルキルチオ基、フェニルチオ基、置換フェニルチオ基、アリールチオ基、置換アリールチオ基、シアノ基、イソシアノ基、置換イソシアノ基、カルボニル基、置換カルボニル基、カルボキシ基、置換カルボキシ基、アミノ基、置換アミノ基、アミド基、置換アミド基、スルホニル基、置換スルホニル基、スルホン酸基、ホスホリル基、置換ホスホリル基、ホスホニル基、置換ホスホニル基、ポリアリール基、置換ポリアリール基、 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、置換 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、複素環基、置換複素環基、アミノ酸基、ペプチド基、及びポリペプチド基をはじめとする置換基であり得、

10

R^3 はアルキル基、置換アルキル基、アルケニル基、置換アルケニル基、アルキニル基、置換アルキニル基、フェニル基、置換フェニル基、アリール基、置換アリール基、ヘテロアリール基、置換ヘテロアリール基、ハロ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、置換アルコキシ基、フェノキシ基、置換フェノキシ基、アロキシ基、置換アロキシ基、アルキルチオ基、置換アルキルチオ基、フェニルチオ基、置換フェニルチオ基、アリールチオ基、置換アリールチオ基、シアノ基、イソシアノ基、置換イソシアノ基、カルボニル基、置換カルボニル基、カルボキシ基、置換カルボキシ基、アミノ基、置換アミノ基、アミド基、置換アミド基、スルホニル基、置換スルホニル基、スルホン酸基、ホスホリル基、置換ホスホリル基、ホスホニル基、置換ホスホニル基、ポリアリール基、置換ポリアリール基、 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、置換 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、複素環基、置換複素環基、アミノ酸基、ペプチド基、及びポリペプチド基をはじめとする置換基であり得、且つ、

20

R^4 はアルキル基、置換アルキル基、アルケニル基、置換アルケニル基、アルキニル基、置換アルキニル基、フェニル基、置換フェニル基、アリール基、置換アリール基、ヘテロアリール基、置換ヘテロアリール基、ハロ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、置換アルコキシ基、フェノキシ基、置換フェノキシ基、アロキシ基、置換アロキシ基、アルキルチオ基、置換アルキルチオ基、フェニルチオ基、置換フェニルチオ基、アリールチオ基、置換アリールチオ基、シアノ基、イソシアノ基、置換イソシアノ基、カルボニル基、置換カルボニル基、カルボキシ基、置換カルボキシ基、アミノ基、置換アミノ基、アミド基、置換アミド基、スルホニル基、置換スルホニル基、スルホン酸基、ホスホリル基、置換ホスホリル基、ホスホニル基、置換ホスホニル基、ポリアリール基、置換ポリアリール基、 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、置換 $C_3 \sim C_{20}$ 環基、複素環基、置換複素環基、アミノ酸基、ペプチド基、及びポリペプチド基をはじめとする置換基であり得る。

30

【0027】

1つ又は複数の態様では、前記リンカーはカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーはアリールカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーはO-チオアリールカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーはS-チオアリールカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーはフェニルカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーはチオカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーはO-チオカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーはS-チオカルバメートリンカーであり得る。前記リンカーは式Aの R^1 基に結合し得る。

40

【0028】

幾つかの態様では、前記エチリデンビスホスホネートの α 位はヒドロキシ、フルオロ、クロロ、ブromo、又はヨードによって置換され得る。幾つかの態様では前記ビスホスホネートはp-ヒドロキシフェニルエチリデン基又はその誘導体を含み得る。幾つかの態様ではエチリデンビスホスホネートは α 位に α -ヒドロキシを含まない。

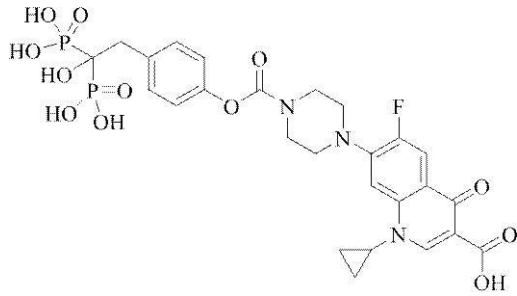
【0029】

幾つかの態様では、前記化合物は式(12)の式を有する。

【0030】

50

【化 7】



式 (12)

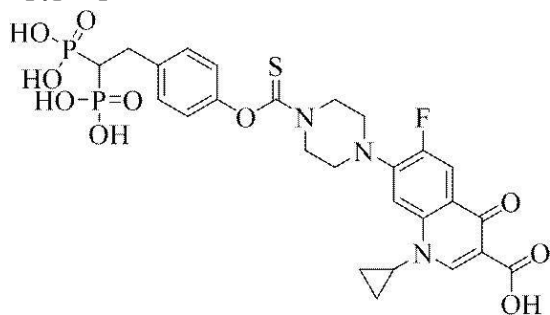
10

【 0 0 3 1】

幾つかの態様では、前記化合物は式 (1 3) の式を有する。

【 0 0 3 2】

【化 8】



式 (13)

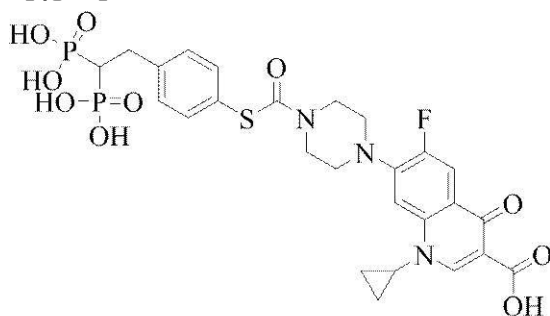
20

【 0 0 3 3】

幾つかの態様では、前記化合物は式 (1 5) の式を有する。

【 0 0 3 4】

【化 9】



式 (15)

30

40

【 0 0 3 5】

前記医薬製剤中の前記化合物の量は、細菌の殺菌又は抑制に有効な量であり得る。前記医薬製剤中の前記化合物の量は骨髓炎、骨壊死、インプラント周囲炎、及び歯周炎の治療又は予防に有効な量であり得る。

【 0 0 3 6】

本明細書は、必要とする対象において骨髓炎を治療する方法であって、骨髓炎の治療を必要とする前記対象に特定量の本明細書において提供される化合物又はその医薬製剤を投与する工程を含み得る前記方法も提供する。

【 0 0 3 7】

50

本明細書は、必要とする対象においてインプラント周囲炎又は歯周炎を治療する方法であって、インプラント周囲炎又は歯周炎の治療を必要とする前記対象に特定量の本明細書において提供される化合物又はその医薬製剤を投与することを含む前記方法も提供する。

【0038】

本明細書は、必要とする対象において糖尿病足を治療する方法であって、糖尿病足の治療を必要とする前記対象に特定量の本明細書において提供される化合物又はその医薬製剤を投与することを含む前記方法も提供する。

【0039】

本明細書は、骨移植材料と本明細書に記載される化合物又はその医薬製剤を含み得る骨移植組成物であって、前記化合物又はその医薬製剤が前記骨移植材料に付着している、前記骨移植材料と一体化している、前記骨移植材料に化学吸着されている、又は前記骨移植材料と混合されている前記骨移植組成物も提供する。前記骨移植材料は自家移植骨材料、同種移植骨材料、異種移植骨材料、合成骨移植材料、又はそれらのあらゆる組合せであり得る。

【0040】

本明細書は、必要とする対象において本明細書に記載される骨移植組成物を移植する工程を含み得る方法も提供する。

【0041】

本明細書は、骨手術部位又はインプラント手術部位、又は骨移植が実施されている手術部位におけるバイオフィーム感染を予防する方法であって、バイオフィーム感染の予防を必要とする対象に本明細書に記載される化合物を投与する工程を含み得る前記方法も提供する。

【0042】

本明細書は、骨手術部位又はインプラント手術部位、又は骨移植が実施されている手術部位におけるバイオフィーム感染を予防する方法であって、バイオフィーム感染の予防を必要とする対象に本明細書に記載される骨移植組成物を移植する工程を含み得る前記方法も提供する。

【0043】

ナノワイヤーテンプレート合成用製造システムについての本開示の他の化合物、組成物、製剤、方法、特徴、及び利点は、以下の図面及び発明を実施するための形態を検討することで当業者に明らかとなろう。全てのそのような追加の系、方法、特徴、及び利点がこの説明の中に含まれ、本開示の範囲内にあり、且つ、添付されている特許請求の範囲によって保護されるものとする。

【0044】

添付図面と併せて本開示の様々な実施形態の詳細な説明を検討すれば、本開示のその他の態様が容易に理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】骨表面の内側及び外側にコロニー形成している特徴的な重層的マトリックス封入バイオフィームを示す慢性骨髓炎の患者由来の外科標本の走査電子顕微鏡写真（SEM；100倍の倍率）を示す図である。上右隅の挿入図は原因のスタフィロкокカスバイオフィーム病原体の高倍率図（5000倍の倍率）である。（本試料はSEM用に処理され、プラチナでスパッタコーティングされ、そして二次電子像モードにおいて5kVで作動するXL 30S SEM（FEG；FEI社、ヒルズボロ、オレゴン州）によって画像撮影された。）

【0046】

【図2A】フェニルカルバメートBP-シプロフロキサシン複合体の一般的な合成スキームを示す図である。

【図2B】フェニルカルバメートBP-シプロフロキサシン複合体の一般的な合成スキームを示す図である。

10

20

30

40

50

【図3】一団の臨床黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 骨髄炎病原体に対するシプロフロキサシン及びBP-シプロフロキサシンのASTとMICの結果を示す表である。

【図4】インビトロ抗菌物質感受性試験において使用された様々な濃度のBP-シプロフロキサシン複合体についての0時間及び24時間におけるトリプチケースソイブロス微生物用培地中の前記複合体の分光分析の結果を示すグラフである。インビトロ抗菌試験の典型的な実験期間である24時間の後に分解が観察されず、前記抗菌物質の優れた安定性が示されている。(*0.24~3.9mcg/mLの結果(赤色のバー)は高い「ブランク」測定値のために不確定である。)

【図5】HA球状体を添加したトリプチケースソイブロス微生物用培地中の1つのBP-シプロフロキサシン複合体(BP-カルバメート-シプロフロキサシン、BCC、化合物6)の分光分析の結果を示すグラフである。複合体を吸着したHA球状体を含まずに上清だけが測定されるため、0時間から24時間までの大きな減少によりHAへの複合体の吸着が確認される。(1.95~250mcg/mLの結果は全て統計学的に有意である($p < 0.05$ 、ANOVA; 三回の複製実験)。*0.12~0.48mcg/mLの結果(赤色のバー)は高い「ブランク」測定値のために不確定である。)

【図6】黄色ブドウ球菌ATCC-6538株のプランクトン型培養物に対するBP-シプロフロキサシンの抗菌物質感受性試験の結果を示すグラフであり、改善された殺菌プロファイルを塩基性pH(左のグラフ)よりも酸性pH(右のグラフ)において示している。

【図7】強い殺菌活性を示す確定されたMICの1倍(赤色の線)及び1/2倍(黒色の線)のBP-シプロフロキサシン(複合体)の黄色ブドウ球菌ATCC-6538株(右のグラフ)及びMRSA MR4-CIPS株(左のグラフ)に対する1時間及び最大で24時間の時点での時間殺菌の結果を示すグラフである。

【図8】基材としてのポリスチレン上に形成された黄色ブドウ球菌ATCC-6538株(上のグラフ)及び緑膿菌(*P. aeruginosa*) ATCC-15442株(下のグラフ)のバイオフィルムに対するBP-シプロフロキサシンの抗菌物質感受性試験の結果を示すグラフである。

【図9】基材としてのHAディスク上に形成された黄色ブドウ球菌ATCC-6538株(左のグラフ)及び緑膿菌ATCC-15442株(右のグラフ)のバイオフィルムに対するBP-シプロフロキサシンの抗菌物質感受性試験の結果を示すグラフである。シプロフロキサシン単体(赤色のバー)を含む全ての試験濃度の前記複合体(オレンジ色のバー)によって統計学的に有意な殺菌活性が黄色ブドウ球菌に対して生じた(* $p < 0.05$ 、クラスカル・ウォリス検定; 三回の複製実験)。

【図10】HA球状体を予めBP-シプロフロキサシンで被覆し、次にそれらの球状体に黄色ブドウ球菌を接種する予防実験の結果を示すグラフである。対照(C:赤色のバー)はHAを含まずに培養され、複合体で処理されていない細菌を表し、上清を測定するとプランクトン型増殖の予期された著しい増大が24時間後に観察される。対照+HA(C+HAのバー)はHAと共に培養されたがそれでも処理されていない細菌を表し、24時間後に細菌の増殖が幾らか観察されるが、細菌がHAに付着し、HAを含まない上清中には測定されないバイオフィルムを形成するため、その増殖はHA陰性対照(赤色のバー)と同程度には観察されない。これらの対照を処理区と比較すると前記複合体が7.8~250mcg/mLであるときに24時間後に細菌の完全な抑制が存在することを見ることができる。0.12~3.9mcg/mLの比較的に低い濃度では細菌がわずかに増殖したが、それでも大いに抑制された。

【図11】BP-シプロフロキサシン被覆HAディスクの存在下で24時間培養された後のバイオフィルム細菌の生存率を示す表である。

【図12】細菌量の減少についての試験化合物の効力を示すインビボ動物試験の抗菌成績を示すグラフである。前記複合体は複数回の投与で投与された総計0.9mg/kgの用量で最も高い効力を示し、回復可能な細菌が存在しなかった。次に10mg/kgという単回用量の前記複合体は陰性対照と比較して10の2乗倍の減少(99%殺菌活性)を示し、10の1乗倍の減少を示すシプロフロキサシン単体の複数回投与処方と比較してほぼ

10

20

30

40

50

10の1乗倍高い殺菌活性を示した。

【図13】BPキノロン複合体ターゲティング戦略の概略を示す図である。

【図14】標的化と分離を可能とするBPキノロン複合体の戦略の概略を示す図である。

【図15】BP-FQ複合体の実施形態を示す図である。

【図16】BP-FQ複合体の合成スキームを示す図である。

【図17】一団の臨床的に妥当な黄色ブドウ球菌骨髓炎病原体に対して試験されたシプロフロキサシン、BCC（化合物6）及びBP-アミド-シプロフロキサシン（BAC、化合物11）の抗菌物質感受性試験の結果を示す図である。（MSSA＝メチシリン感受性黄色ブドウ球菌；MRSA＝メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）

【図18】HA球状微粒子を添加した微生物用培地中のBCC（化合物6）の分光分析の結果を示すグラフである。複合体を吸着したHA球状体を含まずに上清だけが測定されるため、0時間から24時間までの大きな減少により明らかであるようにHAへの複合体の吸着が確認される（ $1.95 \sim 250 \text{ mcg/mL}$ の結果は全て統計学的に有意である（ $p < 0.05$ 、ANOVA；三回の複製実験）。* $0.12 \sim 0.48 \text{ mcg/mL}$ の結果（赤色のバー）は高い「ブランク」測定値のために不確定である。）

【図19】細菌量の減少、又は組織1グラム当たりの平均CFUの減少についてのBCC（化合物6）の効力を示すグラフである。対照と比較すると前記複合体が単回高用量（ 10 mg/kg ）のときに最も高い効力が再び観察された（* $p = 0.0005$ ；独立t検定；エラーバーは標準誤差を表す）。

【図20】追加のBP-Ab複合体デザインを示す図である。

【図21】O-チオカルバメートリンカーを含むBP-Ab複合体の合成の合成スキームの一実施形態を示す図である。

【図22】 α -OH保護BPエステルの合成のスキームの一実施形態を示す図である。

【図23】BP3-リンカー3-シプロフロキサシンの合成のスキームの一実施形態を示す図である。

【図24】プランクトン型黄色ブドウ球菌ATCC-6538株に対するO-チオカルバメートBP複合体のMIC評価の結果を示すグラフと画像である。陰性対照＝培地＋複合体処理されていない微生物；陽性対照＝微生物を含まない滅菌培地。

【図25】基材としてのポリスチレン上に形成された黄色ブドウ球菌ATCC-6538株のバイオフィルムに対する前記チオカルバメート複合体の抗菌活性又は細菌量減少の評価の結果を示すグラフである。陰性対照＝複合体処理されていない細菌希釈物；陽性対照＝微生物を含まない滅菌希釈物。

【図26】基材としてのハイドロキシアパタイト上の黄色ブドウ球菌ATCC-6538の形成済みバイオフィルムに対して試験されたO-チオカルバメートBP複合体の抗菌活性の評価の結果を示すグラフである。陰性対照＝複合体処理されていない細菌希釈物。（* $p < 0.05$ 、クラスカル・ウォリス検定；三回の複製実験；対照薬＝対照）。

【図27】黄色ブドウ球菌ATCC6538のバイオフィルム形成を防止する能力を評価するO-チオカルバメートBP複合体処理済みハイドロキシアパタイトディスクを使用する試験の結果を示すグラフである。陰性対照＝複合体処理されていない細菌希釈物。（* $p < 0.05$ 、クラスカル・ウォリス検定；三回の複製実験；対照薬＝対照）。

【図28】黄色ブドウ球菌ATCC6538のバイオフィルム形成を防止する能力を評価するO-チオカルバメートBP複合体処理済みハイドロキシアパタイトパウダーを使用する試験の結果を示すグラフである。陰性対照＝複合体処理されていない細菌希釈物。（* $p < 0.05$ 、クラスカル・ウォリス検定；三回の複製実験；対照薬＝対照）。

【図29】 α -ヒドロキシ改変リセドロネート及びゾレドロネートを示す図である。

【図30】（1） α -ヒドロキシ基を置換又は除去することにより改変されたBP（p-PyREBP）、（2）ピリジン環のパラ位において置換を行うことにより改変されたBP（p-RIS）を示す図である。円で囲まれたHは前記ビスホスホネート置換炭素鎖の α 炭素に結合している。

【0047】

10

20

30

40

50

【図31】カルバメート結合と対照的にアミド結合を有するB P-シプロフロキサシン複合体(BAC、化合物11)の合成スキームを示す図である。

【図32】微量希釈法を用いる8株の黄色ブドウ球菌に対する6及び11の最小発育阻止濃度(MIC)アッセイの結果を示すグラフである。

【図33】基材としてのHAディスク上に形成された黄色ブドウ球菌ATCC-6538株(上のグラフ)及び緑膿菌ATCC-15442株(下のグラフ)のバイオフィルムに対する6の抗菌物質感受性試験を示すグラフである。全ての試験濃度の6(上のグラフの点付きバー)及び親抗生物質であるシプロフロキサシンによって統計学的に有意な殺菌活性が黄色ブドウ球菌に対して生じた；c = 陰性対照薬。緑膿菌に対して6は生理的pHにおいて8 µg/mLの濃度で最も有効であり、酸性pHにおいてもこの濃度で有効であったが、シプロフロキサシンは対照と比較して酸性条件又は生理的条件のどちらでも不活性であった。(* p < 0.05、クラスカル・ウォリス検定；三回の複製実験)。

10

【図34】基材としてのHA上に形成された黄色ブドウ球菌ATCC-6538株のバイオフィルムに対する濃度が上昇する11の抗菌物質感受性試験(上のグラフ)の結果を示すグラフである。濃度対照C+と比較するとどの濃度においても有意な活性が観察されない(p > 0.05、クラスカル・ウォリス検定；三回の複製実験)。下のグラフはHAを予め11又は親抗生物質であるシプロフロキサシンで処理し、次にそのHAに黄色ブドウ球菌を接種する予防実験を示しており、これにもまた抗菌活性が11に認められない。比較的に高用量の400 µg/mLの親薬品で大きな減少が見られるだけである(* p < 0.05、クラスカル・ウォリス検定；三回の複製実験)。

20

【図35】HA上で増殖したアグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンスD7S-5株のバイオフィルムに対する6の抗菌感受性を示すグラフであり、15 µg/mLを超える濃度の複合体6について有効な抗菌プロファイルを示している。

【図36】インビボ動物試験の抗菌成績を示すグラフである。データは細菌量の減少についての試験化合物の効力を示している。単回高用量(10 mg/kg)の6で最も高い効力が観察され、陰性対照と比較して10の2乗倍の減少(99%殺菌活性)が見られた。

【図37】第2の動物実験の抗菌成績を示すグラフである。データは細菌量の減少、又は組織1グラム当たりの平均CFUの減少についての6の効力(Y軸)を示している。対照及び複数回低用量投与群(0.3 mg/kg × 3回)と比較して前記複合体が単回高用量(10 mg/kg)のときに最も高い効力が観察された(* p = 0.0005；独立t検定；エラーバーは標準誤差を表す)。

30

【図38】B P-カルバメート-モキシフロキサシンB P複合体及び合成スキームを示す図である。

【図39】B P-カルバメート-ガチフロキサシンB P複合体及び合成スキームを示す図である。

【図40】B P-p-ヒドロキシフェニル酢酸-シプロフロキサシンB P複合体及び合成スキームを示す図である。

【図41】B P-OH-シプロフロキサシンB P複合体及び合成スキームを示す図である。

【図42】B P-O-チオカルバメート-シプロフロキサシンB P複合体及び合成スキームを示す図である。

40

【図43】B P-S-チオカルバメート-シプロフロキサシンB P複合体及び合成スキームを示す図である。

【図44】B P-レゾルシノール-シプロフロキサシンB P複合体及び合成スキームを示す図である。

【図45】B P-ヒドロキノン-シプロフロキサシンB P複合体及び合成スキームを示す図である。

【図46】B P-フルオロキノロン類の構造の1つの実施形態を示す図である。

【図47-1】様々なB P-フルオロキノロン複合体を示す図である。

【図47-2】様々なB P-フルオロキノロン複合体を示す図である。

【図47-3】様々なB P-フルオロキノロン複合体を示す図である。

50

【図 4 7 - 4】 様々な B P - フルオロキノロン複合体を示す図である。
【図 4 7 - 5】 様々な B P - フルオロキノロン複合体を示す図である。
【図 4 7 - 6】 様々な B P - フルオロキノロン複合体を示す図である。
【図 4 7 - 7】 様々な B P - フルオロキノロン複合体を示す図である。
【図 4 8】 アリール基を含有するホスホネート類の構造の 1 つの実施形態を示す図である。
【図 4 9 - 1】 X が F、C l、B r、又は I であり得る様々な B P を示す図である。
【図 4 9 - 2】 X が F、C l、B r、又は I であり得る様々な B P を示す図である。
【図 4 9 - 3】 X が F、C l、B r、又は I であり得る様々な B P を示す図である。
【図 5 0】 末端一級アミンを有する様々な B P を示す図である。
【図 5 1】 末端ヒドロキシル官能基及びアミン官能基を含有するリンカーに結合し、式中
、 R がリセドロネート、ゾレドロネート、ミノドロネート、パミドロネート、又はアレンド
ドロネートであり得るリンカーに結合している様々な B P を示す図である。
【図 5 2 - 1】 様々な B P - パミドロネート-シプロフロキサシン複合体を示す図である。
【図 5 2 - 2】 様々な B P - パミドロネート-シプロフロキサシン複合体を示す図である。
【図 5 2 - 3】 様々な B P - パミドロネート-シプロフロキサシン複合体を示す図である。
【 0 0 4 8】
【図 5 3】 様々な B P - アレンドロネート-シプロフロキサシン複合体を示す図である。
【発明を実施するための形態】

10

【 0 0 4 9】

本開示をさらに詳細に説明する前に、本開示は説明される特定の実施形態に限定されず、したがって当然変化し得ることを理解されたい。本明細書において使用される用語は特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定を意図するものではないことも理解されたい。

20

【 0 0 5 0】

数値の範囲が提供されている場合、文脈によって別途明確に指示されない限り下限値の単位の 1 0 分の 1 まで、その範囲の上限値と下限値の間にある各介在値、及びその記載範囲内の他の任意の記載値又は介在値が本開示に包含されると理解される。これらの小範囲の上限値と下限値は独立してそれらの小範囲に含まれてよく、また本開示に包含されるが、その記載範囲中の特に除外される任意の限界値が優先される。記載範囲が前記限度の一方又は両方を含む場合、それらの含まれる限度の一方又は両方を除外する範囲もまた本開示に含まれる。

30

【 0 0 5 1】

別途定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語及び科学用途は本開示が属する技術分野の当業者が共通して理解するものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様又は均等であるどんな方法及び材料も本開示の実施又は検討において使用可能であるが、好ましい方法及び材料をこれより説明する。

【 0 0 5 2】

本明細書の中で引用される全ての刊行物及び特許は、それぞれ個々の刊行物又は特許が参照により援用されると具体的、且つ、個別に示されたかのように参照により本明細書に援用され、且つ、引用されたそれらの刊行物が関連する方法及び／又は材料を開示及び記載するために参照により本明細書に援用される。どの刊行物の特記も本願の出願日より前のその刊行物の開示のためのものであり、先行開示のために本開示がその刊行に先行するという資格が無いと認めたと解釈されてはならない。さらに、提示される刊行日は独立して確認される必要があり得る実際の刊行日とは異なる可能性がある。

40

【 0 0 5 3】

本開示を読めば当業者には明らかになるように、本明細書において記載及び例示される個々の実施形態のそれぞれが、本開示の範囲又は主旨から逸脱することなく他の幾つかの実施形態のうちのいずれかの特徴から容易に分けられる、又はいずれかの特徴と組み合わせられる別個の要素及び特徴を有する。列挙されるあらゆる方法を列挙された順序で実施することも論理的に可能である他のあらゆる順序で実施することも可能である。

50

【0054】

本開示の実施形態は別途指示されない限り分子生物学、微生物学、ナノテクノロジー、薬理学、有機化学、生化学、植物学等の技術であって当分野の技術内にある技術を使用する。そのような技術は文献中に十分に説明されている。

【0055】

定義

本明細書において別途明示されない限り、以下の定義が提供される。

【0056】

本明細書において使用される場合、「約」、「およそ」等が数値変数と共に使用されるとその言葉はその変数の値、及び表示されている値の実験誤差内（例えば平均値の95%信頼区間内）か、又は±10%の範囲内のどちらか大きい方の範囲内にあるその変数の全ての値を指すことが一般的である。

10

【0057】

本明細書において互換的に使用される場合、「対象」、「個体」、又は「患者」は脊椎動物、好ましくは哺乳類動物、より好ましくはヒトを指す。哺乳類動物にはネズミ、類人猿、ヒト、家畜、競技動物、及び愛玩動物が含まれるがこれらに限定されない。「愛玩動物」という用語にはイヌ、ネコ、モルモット、マウス、ラット、ウサギ、フェレット等が含まれる。「家畜」という用語にはウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ブタ、ウシ、ロバ、リャマ、アルパカ、七面鳥等が含まれる。

20

【0058】

本明細書において使用される場合、「対照」は比較目的のために実験に使用され、且つ、独立変数以外の変数の効果を最小限にする、又は区別するために含まれる代替りの対象又は試料を指すことができる。

【0059】

本明細書において使用される場合、本明細書に記載されるビスホスホネートの類似体などの「類似体」はその親分子の構造的に近縁のメンバー又はビスホスホネートなどの別記された親分子を指すことができる。

【0060】

本明細書において使用される場合、「複合体化」は1又は複数の共有結合又は非共有結合を介した2又は複数の化合物の相互直接結合を指すことができる。本明細書において使用される「複合体化」という用語はリンカーなどの介在性化合物を介した2又は複数の化合物の相互間接結合も指すことができる。

30

【0061】

本明細書において使用される場合、「医薬製剤」は組成物を試験管内、生体内、又は生体外での診断用使用、治療用使用、又は予防用使用に適切なものにする活性薬剤、化合物、又は成分と医薬的に許容可能なキャリア又は賦形剤との組合せを指す。

【0062】

本明細書において使用される場合、「医薬的に許容可能なキャリア又は賦形剤」は全般的に安全であり、非毒性であり、且つ、生物学的にも他の点でも有害ではない医薬製剤の調製に有用であるキャリア又は賦形剤を指し、ヒト用の製薬用途と同様に獣医向け用途にも許容可能なキャリア又は賦形剤を含む。本明細書及び特許請求の範囲において使用される「医薬的に許容可能なキャリア又は賦形剤」には1つのそのようなキャリア又は賦形剤と1つより多くのそのようなキャリア又は賦形剤の両方が含まれる。

40

【0063】

本明細書において使用される場合、「医薬的に許容可能な塩」は、それらの塩を医薬品としての用量で投与する対象にとって非毒性である対イオンを有するあらゆる酸付加塩又は塩基付加塩を指す。

【0064】

本明細書において使用される場合、「活性薬剤」又は「活性成分」は効果の全体又は一部の原因であると考えられる組成物の一成分又は複数の成分を指す。

50

【0065】

本明細書において使用される場合、「用量」、「単位用量」、又は「投与量」は対象における使用に適切な物理的に別個の単位を指しており、それぞれの単位はその投与に関連して所望の応答又は所望の複数の応答を生じるように計算された所定の量の本明細書に記載されるBPキノロン複合体などのBP複合体、組成物、又は製剤を含有する。

【0066】

本明細書において使用される場合、「誘導体」は、ある化合物と同じ、又は類似のコア構造を有するが、1又は複数の原子又は官能基の置換、欠失、及び／又は付加を含む少なくとも1つの構造上の差を有するあらゆる化合物を指す。「誘導体」という用語は出発物質又は中間体のどちらかとしての親化合物から誘導体が合成されるように思えるが、そのような意味ではない。「誘導体」という用語は親化合物のプロドラッグ又は代謝物を含み得る。誘導体には親化合物中の遊離アミノ基が誘導体化されてアミン塩酸塩、p-トルエンスルホンアミド、ベンズオキシカルボアミド、セーブチルオキシカルボアミド、チオウレタン型誘導体、トリフルオロアセチルアミド、クロロアセチルアミド、又はホルムアミドを形成する化合物が含まれる。誘導体には親化合物中のカルボキシル基が誘導体化されてメチル及びエチルエステル、又は他のタイプのエステル、アミド、ヒドロキサム酸、又はヒドラジドを形成する化合物が含まれる。誘導体には親化合物中のヒドロキシル基が誘導体化されてO-アシル誘導体、O-カルバモイル誘導体、又はO-アルキル誘導体を形成する化合物が含まれる。誘導体には供与基親化合物中の水素結合供与基がOH、NH、又はSHなどの別の水素結合供与基によって置き換えられている化合物が含まれる。誘導体は親化合物中の水素結合受容基をエステル、エーテル、ケトン、カーボネート、第三級アミン、イミン、チオン、スルホン、三級アミド、及びスルフィドなどの別の水素結合受容基で置き換えることを含む。「誘導体」には一例として飽和若しくは不飽和シクロヘキサン又は他のより複雑な環、例えば窒素含有環によるシクロペンタン環の置換による拡大部分、及び様々な基によるこれらの環の拡大部分も含まれる。

【0067】

本明細書において使用される場合、「投与すること」は経口投与、局所投与、静脈内投与、皮下投与、経皮投与、経皮投与、筋肉内投与、関節内投与、非経口投与、細動脈内投与、皮内投与、脳室内投与、頭蓋内投与、腹腔内投与、傷害内投与、鼻腔内投与、直腸投与、腔内投与、吸入による投与、又は移植貯留槽を介した投与を指す。「非経口」という用語には皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、肝臓内、傷害内、及び頭蓋内の注射又は注入技法が含まれる。

【0068】

本明細書において使用される「置換された」という用語は本明細書に記載される化合物の全ての許容可能な置換基に当てはまる。広義では許容可能な置換基には有機化合物の非環式置換基及び環式置換基、分岐型置換基及び非分岐型置換基、炭素環置換基及び複素環置換基、芳香族置換基及び非芳香族置換基が含まれる。例となる置換基はハロゲン、ヒドロキシル基、又はあらゆる数の炭素原子、例えば1～14個の炭素原子を含有する他のあらゆる有機基を含むがこれらに限定されず、所望により直鎖状、分岐型、又は環状の構造形式で酸素、硫黄、又は窒素などの1又は複数のヘテロ原子を含んでもよい。代表的な置換基にはアルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、フェニル、置換フェニル、アリール、置換アリール基、ヘテロアリール基、置換ヘテロアリール基、ハロ基、ヒドロキシル基、アルコキシ基、置換アルコキシ基、フェノキシ基、置換フェノキシ基、アロキシ基、置換アロキシ基、アルキルチオ基、置換アルキルチオ基、フェニルチオ基、置換フェニルチオ基、アリールチオ基、置換アリールチオ基、シアノ基、イソシアノ基、置換イソシアノ基、カルボニル基、置換カルボニル基、カルボキシル基、置換カルボキシル基、アミノ基、置換アミノ基、アミド基、置換アミド基、スルホニル基、置換スルホニル基、スルホン酸基、ホスホリル基、置換ホスホリル基、ホスホニル基、置換ホスホニル基、ポリアリール基、置換ポリアリール基、C₃～C₂₀環基、置換C₃～C₂₀環基、複素環基、置換複素環基、アミノ酸基、ペプチド基、及びポリペ

ブチド基が挙げられる。

【0069】

本明細書において使用される場合、「適切な置換基」は化学的及び医薬的に許容可能な基、すなわち本発明の化合物の調製をあまり妨害しない、又は本発明の化合物の効力を大きく損なわない部分を意味する。そのような適切な置換基は当業者によって日常的に選択され得る。適切な置換基には次のもの、すなわちハロ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルケニル、($C_3 \sim C_8$ シクロアルキル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、($C_3 \sim C_8$ シクロアルキル) $C_2 \sim C_6$ アルケニル、($C_3 \sim C_8$ シクロアルキル) $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_3 \sim C_7$ ヘテロシクロアルキル、($C_3 \sim C_7$ ヘテロシクロアルキル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、($C_3 \sim C_7$ ヘテロシクロアルキル) $C_2 \sim C_6$ アルケニル、($C_3 \sim C_7$ ヘテロシクロアルキル) $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ヒドロキシ、カルボキシ、オキソ、スルファニル、 $C_1 \sim C_6$ アルキルスルファニル、アリール、ヘテロアリール、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アラルキル、ヘテロアラルキル、アラルコキシ、ヘテロアラルコキシ、ニトロ、シアノ、アミノ、 $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、ジ- ($C_1 \sim C_6$ アルキル) アミノ、カルバモイル、($C_1 \sim C_6$ アルキル) カルボニル、($C_1 \sim C_6$ アルコキシ) カルボニル、($C_1 \sim C_6$ アルキル) アミノカルボニル、ジ- ($C_1 \sim C_6$ アルキル) アミノカルボニル、アリールカルボニル、アリールオキシカルボニル、($C_1 \sim C_6$ アルキル) スルホニル、及びアリールスルホニルが含まれるがこれらに限定されない。適切な置換基として上に挙げられた基は以下に定義される通りであるが、適切な置換基はさらに所望により置換されなくてもよいことを例外とする。

【0070】

「アルキル」という用語は飽和脂肪族基のラジカル（すなわち、1個の水素原子が取り除かれたアルカン）を指し、直鎖アルキル基、分岐鎖アルキル基、シクロアルキル（脂環）基、アルキル置換シクロアルキル基、及びシクロアルキル置換アルキル基を含む。

【0071】

幾つかの実施形態では、直鎖又は分岐鎖アルキルはその骨格中に30個以下の炭素原子（例えば、直鎖については $C_1 \sim C_{30}$ 、及び分岐鎖については $C_3 \sim C_{30}$ ）を有し得る。他の実施形態では、直鎖又は分岐鎖アルキルはその骨格中に20個以下、15個以下、又は10個以下の炭素原子を含み得る。同様に、幾つかの実施形態では、シクロアルキルはそれらの環構造中に3～10個の炭素原子を有し得る。これらの実施形態のうちの幾つかでは、シクロアルキルは環構造中に5個、6個、又は7個の炭素を有し得る。

【0072】

本明細書において使用される「アルキル」（又は「低級アルキル」という用語は「非置換アルキル」と「置換アルキル」の両方を含むものとされ、後者は炭化水素骨格の1又は複数の炭素上の水素を置換する1又は複数の置換基を有するアルキル部分を指す。そのような置換基にはハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル、又はアシル等）、チオカルボニル（チオエステル、チオアセテート、又はチオホルマート等）、アルコキシル、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、ホスフィナート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、サルフェート、スルホネート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ヘテロシクリル、アラルキル、又は芳香族若しくは複素芳香族部分が含まれるがこれらに限定されない。

【0073】

炭素数が別途明示されない限り、本明細書において使用される「低級アルキル」は、その骨格構造中に1～10個の炭素を有することを除いて上で定義された通りのアルキル基を意味する。同様に、「低級アルケニル」及び「低級アルキニル」は同様の鎖長を有する。

【0074】

炭化水素鎖上の置換された部分はそれ自体が適切な場合に置換され得ることを当業者は理解する。例えば、置換アルキルの置換基はハロゲン、ヒドロキシ基、ニトロ基、チオー

ル基、アミノ基、アジド基、イミノ基、アミド基、ホスホリル基（ホスホネート及びホスフィネートを含む）、スルホニル基（サルフェート、スルホンアミド、スルファモイル及びスルホネートを含む）、及びシリル基、並びにエーテル、アルキルチオ、カルボニル（ケトン、アルデヒド、カルボキシレート、及びエステル）、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等を含み得る。シクロアルキルは同様に置換され得る。

【0075】

「ヘテロアルキル」という用語は本明細書において使用される場合に少なくとも1個のヘテロ原子を含有する直鎖又は分岐鎖又は環状の炭素含有ラジカル、又はそれらの組合せを指す。適切なヘテロ原子にはO、N、Si、P、Se、B、及びSが含まれるがこれらに限定されず、リン原子及び硫黄原子は所望により酸化されてもよく、窒素ヘテロ原子は所望により四級化されてもよい。ヘテロアルキルはアルキル基について上で定義されたように置換され得る。

10

【0076】

「アルキルチオ」という用語は上で定義された通りのアルキル基であって、それに硫黄ラジカルが結合したものを指す。好ましい実施形態では「アルキルチオ」部分は $-S-$ アルキル、 $-S-$ アルケニル、及び $-S-$ アルキニルのうちの1つによって表現される。代表的なアルキルチオ基にはメチルチオ、エチルチオ等が挙げられる。「アルキルチオ」という用語はシクロアルキル基、アルケン及びシクロアルケン基、並びにアルキン基も包含する。「アリールチオ」はアリール基又はヘテロアリール基を指す。アルキルチオ基はアルキル基について上で定義されたように置換され得る。

20

【0077】

「アルケニル」及び「アルキニル」という用語は、長さ及び置換可能性の点で上記のアルキルと類似しているが、それぞれ少なくとも1つの二重結合又は三重結合を含む不飽和脂肪族基を指す。

【0078】

「アルコキシル」又は「アルコキシ」という用語は本明細書において使用される場合に上で定義された通りのアルキル基であって、それに酸素ラジカルが結合したものを指す。代表的なアルコキシル基にはメトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、tert-ブトキシ等が挙げられる。「エーテル」は酸素によって共有結合された2つの炭化水素である。したがって、アルキルの置換基であって、そのアルキルをエーテルにする、又はアルコキシル様のものにする置換基は $-O-$ アルキル、 $-O-$ アルケニル、及び $-O-$ アルキニルのうちの1つによって表現可能である。「アロキシ」及び「アリールオキシ」という用語は本明細書において互換的に使用される場合に $-O-$ アリール又は $O-$ ヘテロアリールによって表現可能であり、アリール及びヘテロアリールは下で定義される通りである。アルコキシ基及びアロキシ基はアルキルについて上に記載されたように置換され得る。

30

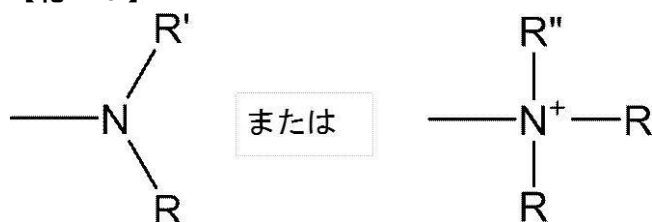
【0079】

「アミン」及び「アミノ」（及びそのプロトン化形）という用語が当技術分野において理解されており、且つ、非置換型と置換型の両方のアミン、例えば次の一般式によって表現可能な部分を指す。

【0080】

40

【化10】



【0081】

式中、R、R'、及びR''はそれぞれ独立して水素、アルキル、アルケニル、又は $-(CH_2)_m-R_c$ を表し、又はRとR'が結合しているN原子と一緒に環構造中に4～

50

8個の原子を有する複素環を完成し、 R_c はアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、複素環、又は多重環を表し、 m は0又は1～8の範囲の整数である。幾つかの実施形態では R 又は R' のうちの一方だけがカルボニルであり得、例えば、 R 、 R' 、及び窒素と一緒にイミドを形成することがない。他の実施形態では「アミン」という用語はアミドを包含せず、その場合に例えば R 及び R' のうちの一方がカルボニルを表す。その他の実施形態では R 及び R' （及び所望により R'' ）はそれぞれ独立して水素、アルキル若しくはシクロアルキル、アルケニル若しくはシクロアルケニル、又はアルキニルを表す。したがって、本明細書において使用される「アルキルアミン」という用語は上で定義された通りのアミン基であって、それに（アルキルについて上に記載されたような）置換アルキル又は非置換アルキルが結合したものの、すなわち R 及び R' のうちの少なくとも一方がアルキル基であるものを意味する。

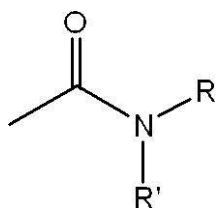
10

【0082】

「アミド」という用語はアミノ置換カルボニルとして当技術分野において理解されており、且つ、次の一般式によって表現可能である部分を含む。

【0083】

【化11】



20

【0084】

式中、 R 及び R' は上で定義された通りである。

【0085】

本明細書において使用される場合、「アリール」は $C_5 \sim C_{10}$ 員の芳香族環系、複素環系、融合芳香族環系、融合複素環系、二芳香族環系、又は二複素環系を指す。広く定義すると、「アリール」は本明細書において使用される場合に0～4個のヘテロ原子を含んでもよい5員、6員、7員、8員、9員、及び10員の単環式芳香族基、例えば、ベンゼン、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、トリアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジン、ピリミジン等を含む。環構造中にヘテロ原子を有するアリール基は「アリール複素環」又は「複素芳香族」と呼ばれることもある。芳香族環は環の1又は複数の位置においてハロゲン、アジド、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アルコキシル、アミノ（又は四級化アミノ）、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィナート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、スルホンアミド、ケトン、アルデヒド、エステル、ヘテロシクリル、芳香族若しくは複素芳香族部分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、及びそれらの組合せを含むがこれらに限定されない1又は複数の置換基によって置換され得る。「アリール」という用語はフェニルを含む。

30

【0086】

「アリール」という用語は、2又は複数の炭素が2つの隣接する環の間で共通である2又は複数の環状環を有する多重環系（すなわち、「融合環」）であって、それらの環のうちの少なくとも1つが芳香族である多重環系も含み、例えば他の環状環又は他の複数の環状環はシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、及び／又は複素環であり得る。複素環の例にはベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチオフラニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾオキサゾリニル、ベンズチアゾリル、ベンズトリアゾリル、ベンズテトラゾリル、ベンズイソオキサゾリル、ベンズイソチアゾリル、ベンズイミダゾリニル、カルバゾリル、4aHカルバゾリル、カルボリニル、クロマニル、クロメニル、シンノリニル、デカヒドロキノリニル、2H，6H-1，5，2-ジチアジニル、ジヒドロフロ[2，3b]テトラヒドロフラン、フラニル、フラザ

40

50

ニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリル、1H-インダゾリル、インドレニル、インドリニル、インドリジニル、インドリル、3H-インドリル、イサチノイル、イソベンゾフラニル、イソクロマニル、イソインダゾリル、イソインドリニル、イソインドリル、イソキノリニル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、メチレンジオキシフェニル、モルホリニル、ナフチリジニル、オクタヒドロイソキノリニル、オキサジアゾリル、1, 2, 3-オキサジアゾリル、1, 2, 4-オキサジアゾリル、1, 2, 5-オキサジアゾリル、1, 3, 4-オキサジアゾリル、オキサゾリジニル、オキサゾリル、オキシンドリル、ピリミジニル、フェナントリジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサチニル、フェノキサジニル、フタラジニル、ピペラジニル、ピペリジニル、ピペリドニル、4-ピペリドニル、ピペロニル、プテリジニル、プリニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリドオキサゾール、ピリドイミダゾール、ピリドチアゾール、ピリジニル、ピリジル、ピリミジニル、ピロリジニル、ピロリニル、2H-ピロリル、ピロリル、キナゾリニル、キノリニル、4H-キノリジニル、キノキサリニル、キヌクリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロイソキノリニル、テトラヒドロキノリニル、テトラゾリル、6H-1, 2, 5-チアジアジニル、1, 2, 3-チアジアゾリル、1, 2, 4-チアジアゾリル、1, 2, 5-チアジアゾリル、1, 3, 4-チアジアゾリル、チアントレニル、チアゾリル、チエニル、チエノチアゾリル、チエノオキサゾリル、チエノイミダゾリル、チオフエニル、及びキサンテニルが挙げられるがこれらに限定されない。それらの環のうちの1、又は複数が「アリアル」について上で定義されたように置換され得る。

【0087】

「アラルキル」という用語は、本明細書において使用される場合、アリアル基（例えば芳香族基又は複素芳香族基）で置換されたアルキル基を指す。

【0088】

「アラルキルオキシ」という用語は-O-アラルキルによって表現可能であり、その場合にアラルキルは上で定義された通りである。

【0089】

「炭素環」という用語は、本明細書において使用される場合、環の各原子が炭素である芳香族環又は非芳香族環を指す。

【0090】

「複素環」又は「複素環の」という用語は、本明細書において使用される場合に、~10個の環原子、幾つかの実施形態では5~6個の環原子を含有する単環式又は二環式の構造体であって、それらの環原子が炭素及び1~4個のヘテロ原子であり、各ヘテロ原子が非過酸化物性酸素、硫黄、及びYが存在しないか、又はH、O、(C₁~C₁₀)アルキル、フェニル若しくはベンジルであるN(Y)からなる群より選択され、且つ、所望により1~3個の二重結合を含んでよく、且つ、所望により1又は複数の置換基で置換されてもよい前記構造体を指す。複素環の例にはベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチオフラニル、ベンゾチオフエニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾオキサゾリニル、ベンズチアゾリル、ベンズトリアゾリル、ベンズテトラゾリル、ベンズイソオキサゾリル、ベンズイソチアゾリル、ベンズイミダゾリニル、カルバゾリル、4aHカルバゾリル、カルボリニル、クロマニル、クロメニル、シンノリニル、デカヒドロキノリニル、2H、6H-1, 5, 2-ジチアジニル、ジヒドロフロ[2, 3b]テトラヒドロフラン、フラニル、フラザニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリル、1H-インダゾリル、インドレニル、インドリニル、インドリジニル、インドリル、3H-インドリル、イサチノイル、イソベンゾフラニル、イソクロマニル、イソインダゾリル、イソインドリニル、イソインドリル、イソキノリニル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、メチレンジオキシフェニル、モルホリニル、ナフチリジニル、オクタヒドロイソキノリニル、オキサジアゾリル、1, 2, 3-オキサジアゾリル、1, 2, 4-オキサジアゾリル、1, 2, 5-オキサジアゾリル、1, 3, 4-オキサジアゾリル、オキサゾリジニル、オキサゾリル、オキセパニル、オキセタニル、オキシンドリル、ピリミジニル、フェナントリジニル、フ

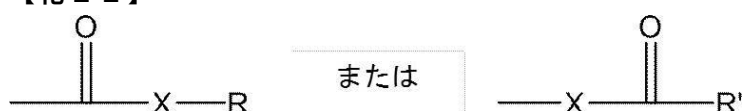
エナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサチニル、フェノキサジニル、フタラジニル、ピペラジニル、ピペリジニル、ピペリドニル、4-ピペリドニル、ピペロニル、プテリジニル、ブリニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリドオキサゾール、ピリドイミダゾール、ピリドチアゾール、ピリジニル、ピリジル、ピリミジニル、ピロリジニル、ピロリニル、2H-ピロリル、ピロリル、キナゾリニル、キノリニル、4H-キノリジニル、キノキサリニル、キヌクリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロイソキノリニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラゾリル、6H-1, 2, 5-チアジアジニル、1, 2, 3-チアジアゾリル、1, 2, 4-チアジアゾリル、1, 2, 5-チアジアゾリル、1, 3, 4-チアジアゾリル、チアントレニル、チアゾリル、チエニル、チエノチアゾリル、チエノオキサゾリル、チエノイミダゾリル、チオフェニル、及びキサンテニルが含まれるがこれらに限定されない。所望により複素環基はアルキル及びアリールについて上で定義されたように1又は複数の位置において1又は複数の置換基、例えば、ハロゲン、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスフェート、ホスホネート、ホスフィナート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、ケトン、アルデヒド、エステル、ヘテロシクリル、芳香族若しくは複素芳香族部分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、又はそのようなもので置換され得る。「複素環」又は「複素環の」という用語は、ヘテロサイクル又は複素環を含み得る化合物を説明するために使用され得る。

【0091】

「カルボニル」という用語が当技術分野において理解されており、且つ、次の一般式によって表現可能であるような部分を含む。

【0092】

【化12】



【0093】

式中、Xは結合であるか、又は酸素若しくは硫黄を表し、R及びR'は上で定義された通りである。Xが酸素であり、且つ、R又はR'が水素ではない場合、前記式は「エステル」を表す。Xが酸素であり、且つ、Rが上で定義された通りである場合、前記部分は本明細書においてカルボキシル基と呼ばれ、特にRが水素であるときに前記式は「カルボン酸」を表す。Xが酸素であり、且つ、R'が水素である場合、前記式は「ホルマート」を表す。上の式の酸素原子が硫黄によって置き換えられる場合、一般的に前記式は「チオカルボニル」基を表す。Xが硫黄であり、且つ、R又はR'が水素ではない場合、前記式は「チオエステル」を表す。Xが硫黄であり、且つ、Rが水素である場合、前記式は「チオカルボン酸」を表す。Xが硫黄であり、且つ、R'が水素である場合、前記式は「チオホルマート」を表す。他方、Xが結合であり、且つ、Rが水素ではない場合、上の式は「ケトン」基を表す。Xが結合であり、且つ、Rが水素である場合、上の式は「アルデヒド」基を表す。

【0094】

本明細書において使用される「ヘテロ原子」という用語は、炭素又は水素以外のあらゆる元素の原子を意味する。例となるヘテロ原子にはホウ素、窒素、酸素、リン、硫黄、ケイ素、ヒ素、及びセレンが挙げられるがこれらに限定されない。窒素などのヘテロ原子はそれらのヘテロ原子の価数に当てはまる水素置換基、及び／又は本明細書に記載される有機化合物からなるあらゆる許容可能な置換基を有し得る。「置換」又は「置換された」という用語にはそのような置換が置換原子及び置換基の許された価数に合致すること、及びその置換によって安定な化合物、すなわち自然に再構成、環化、脱離等のような変質を起こすことがない化合物が生じるという暗黙の条件が含まれることが理解される。

【0095】

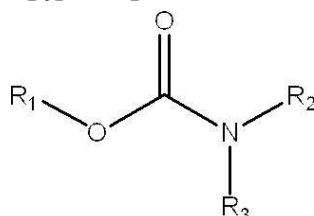
本明細書において使用される場合、「ニトロ」という用語は $-\text{NO}_2$ を指し、「ハロゲン」という用語は $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、又は $-\text{I}$ を指し、「スルフヒドリル」という用語は $-\text{SH}$ を指し、「ヒドロキシル」という用語は $-\text{OH}$ を指し、「スルホニル」という用語は $-\text{SO}_2-$ を指す。

【0096】

本明細書において使用される場合、カルバミン酸(NH_2COOH)に由来する化合物を指すために「カルバメート」という用語を使用することができ、その用語はカルバメートエステルを含むことができる。「カルバメート」は次の一般構造を有することができる。

【0097】

【化13】



【0098】

式中、 R_1 、 R_2 、及び R_3 はあらゆる許容可能な置換基であり得る。

【0099】

本明細書において使用される場合、「有効量」は研究者、獣医師、医師、又は他の臨床家が求めている組織、系、動物、植物、原生生物、細菌、酵母、又はヒトの望ましい生物学的応答又は医学的応答を誘発することになる本明細書に記載される組成物又は本明細書に記載される医薬製剤の量を指すことができる。その所望の生物学的応答は骨の形成及び／又は再構築の調整であり得、それには骨吸収の調整及び／又は本明細書に記載されるBPキノロン複合体などのBP複合体の取り込みの調整が含まれるがこれらに限定されない。有効量は前記組成物又は医薬製剤の正確な化学構造、感染の原因因子及び／又は感染の重症度、治療又は予防される疾患、障害、症候群、又はそれらの症状、投与経路、投与期間、排出速度、薬品の組合せ、担当医師の判断、剤形、並びに治療を受ける対象の年齢、体重、一般的健康状態、性別及び／又は食事に応じて変化する。「有効量」は細菌又は細菌集団を含むがこれらに限定されない微生物の増殖又は繁殖を抑制するのに有効である本明細書に記載される組成物の量を指すことができる。「有効量」は細菌又は細菌集団を含むがこれらに限定されない微生物を殺菌する本明細書に記載される組成物の量を指すことができる。「有効量」は必要とする対象において骨髄炎を治療及び／又は予防するのに有効である本明細書に記載される組成物の量を指すことができる。

【0100】

本明細書において使用される場合、「治療的」という用語は通常、疾患、障害、体調、又は副作用の治療、治癒、及び／又は改善、又は疾患、障害、体調、若しくは副作用の進行速度の減少に関連し得る。前記用語は正常な生理的機能、一時緩和的治療、及び疾患、障害、体調、副作用、又はそれらの症状の部分的治療の強化もその範囲内に含む。

【0101】

本明細書において使用される場合、「治療すること」及び「治療」という用語は通常、所望の薬理学的及び／又は生理学的硬化を得ることに関連し得る。その効果は疾患、症状、又はそれらの状態の防止又は部分的防止の点で予防的であり得る。

【0102】

本明細書において使用される場合、「相乗的效果」、「相乗作用」、又は「相乗」という用語は、2又は複数の分子、化合物、物質、因子、又は組成物の間で生じる効果であって、それらの個々の効果の合計よりも大きな効果、又はその合計とは異なる効果を指す。

【0103】

本明細書において使用される場合、「相加的效果」は2又は複数の分子、化合物、物質

10

20

30

40

50

、因子、又は組成物の間で生じる効果であって、それらの個々の効果の合計に等しい効果、又はその合計と同一である効果を指す。

【0104】

本明細書において使用される場合に「生体適合性」という用語は、受容者にとって概ね非毒性であり、且つ、受容者に重大な悪性効果を引き起こさない材料とそのあらゆる代謝物又は分解産物に関連する。一般的に言う生体適合性材料は患者に投与されたときに重大な炎症応答又は免疫応答を誘発しない材料である。

【0105】

本明細書において使用される場合、骨髓炎という用語は、急性又は慢性の骨髓炎、及び／又は糖尿病足性骨髓炎、糖尿病性慢性骨髓炎、人工関節感染症、歯周炎、インプラント周囲炎、骨壊死、及び／又は血液原性骨髓炎及び／又は他の骨感染症を指すことができる。

【0106】

考察

感染性骨疾患、すなわち骨髓炎は、ヒト医療及び獣医医療における世界的な大問題であり、四肢欠損に関わる後遺症及び死亡の可能性のために深刻な問題であり得る。骨髓炎に対する治療アプローチは主に抗菌剤によるものであり、長期間のアプローチであることが多く、多くの症例で感染を管理するために外科的介入を伴う。長骨骨髓炎の大半の症例における原因病原体は黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) のバイオフィルムであり、それらの黄色ブドウ球菌はそれらのプランクトン型（浮遊型）の対応物と対照的に骨に結合する。他の骨感染症が広範囲のグラム陽性細菌とグラム陰性細菌の両方から生じることが知られている。

【0107】

多くのバイオフィルム病原体が培養不可能であり、且つ、（それらのプランクトン型の対応物と比較すると）増殖速度及び抗菌剤耐性に関して変化した表現型を示すため、骨髓炎のバイオフィルム介在性は临床上及び実験上の設定において重要である。整形外科領域における感染症について比較的の高い成功率の抗菌剤治療が一般的に未だに実現していない理由は耐性バイオフィルム病原体の発生、骨内での抗菌剤の低い浸透度、及び全身毒性に関連付けられている有害事象と共に従来の抗生物質によってバイオフィルムを根絶することが困難であるということによって部分的に説明される。

【0108】

骨髓炎治療に伴う多くの困難を克服するため、全身曝露を最小限にしながら抗生物質の比較的の高い、又は比較的に持続的な局所的治療濃度を骨において達成するための骨標的複合体を使用する薬物送達アプローチに関心が高まっている。ビスホスホネート（BP）、例えば骨吸着性BPに複合体化されたフルオロキノロン抗生物質及び非フルオロキノロン抗生物質は各成分の安全性についての長期の実績及びそれらの有利な生化学的特性のために有望なアプローチである。この状況におけるフルオロキノロンファミリーの初期の研究の中でシプロフロキサシンはBPに結合しているときに最良の結合特性及び微生物学的特性を示した。シプロフロキサシンはこの状況での目的再設定に対して幾つかの利点を有する。すなわち、シプロフロキサシンでは経口投与又は静脈内投与が可能であり、それらの投与は生物学的に見て比較的に同等であり、シプロフロキサシンは最も一般的に出会う骨髓炎病原体を含む広範囲の抗菌活性を有し、シプロフロキサシンは臨床的に達成可能な用量において殺菌活性を示し、シプロフロキサシンはフルオロキノロンファミリーの中で最も安価な薬品である。

【0109】

BPファミリーは、その特異的な骨標的特性のため、骨髓炎薬物療法における骨への抗生物質の導入にとって理想的なキャリアとなっている。BPはカルシウムと強力な二座配位結合及び三座配位結合を形成し、結果としてハイドロキシアパタイト（HA）、特に代謝活性が高い部位、又は感染及び炎症部位のハイドロキシアパタイトに濃縮される。BPは化学的分解と生物学的分解の両方に対する例外的な安定性も示す。BPとの複合体化を介して骨をシプロフロキサシンの標的とするという考えが年とともに多数の報告書の中で

考察されている。

【0110】

B P及びフルオロキノロン類、例えばシプロフロキサシンのこれらの肯定的な属性にもかかわらず、B P及びフルオロキノロン類、例えばシプロフロキサシンを含有するプロドラッグを作製する現在の試みは成功していない。大半の試みが、たいていファーマコフォア要件に抵触することによって複合体のどちらの構成要素も不活性化することが分かっている全体的に不安定なプロドラッグか切断不可能な複合体のどちらかになって終わった。

【0111】

現在のB Pフルオロキノロン複合体の欠点を念頭に置いて、キノロン、例えばシプロフロキサシンに対して分離可能に複合体化可能であるB Pを含有し得るB Pキノロン複合体を本明細書において説明する。複数の実施形態において前記B Pキノロン複合体は対象においてキノロンを骨、骨移植片、及び／又は代替骨移植片へ選択的に送達することができる（すなわち、骨、骨移植片、又は代替骨移植片を標的とすることができる）。幾つかの実施形態では前記B Pキノロン複合体は前記キノロンを分離することができる。本明細書はB Pキノロン複合体の合成方法及び本明細書において提供される1又は複数の前記B Pキノロン複合体を使用する骨髓炎又は他の骨感染症の治療方法又は予防方法も提供する。

【0112】

以下の図面、発明を実施するための形態、及び実施例を検討すると本開示の他の組成物、化合物、方法、特徴、及び利点が当業者に明らかになる。全てのそのような追加の組成物、化合物、方法、特徴、及び利点がこの説明の中に含まれ、且つ、本開示の範囲内にあるものとする。

【0113】

ビスホスホネート（B P）キノロン複合体及びそれらの製剤

B Pキノロン複合体

本明細書はB Pキノロン複合体及びそれらの製剤を提供する。B Pはリンカーを介してキノロンに複合体化され得る。複数の実施形態において前記リンカーは分離可能リンカーである。前記キノロンはリンカーを介して分離可能に前記B Pに結合し得る。したがって、幾つかの実施形態では前記B Pキノロン複合体は骨、骨移植片、又は代替骨移植片に、又はその近傍に前記キノロンを選択的に送達し、且つ、分離することができる（図13）。換言すると、前記B Pフルオロキノロン複合体は骨及び／又は骨の近接領域へのフルオロキノロン類の標的化送達を提供することができる。本明細書において提供される前記B Pキノロン複合体のB PはあらゆるB Pであり得、そのB Pにはヒドロキシルフェニルアルキル又はアリールビスホスホネート（hydroxyl phenyl alkyl or aryl bisphosphonates）、ヒドロキシルフェニル（又はアリール）アルキルヒドロキシルビスホスホネート（hydroxyl phenyl (or aryl) alkyl hydroxyl bisphosphonates）、アミノフェニル（又はアリール）アルキルビスホスホネート（amino phenyl (or aryl) alkyl bisphosphonates）、アミノフェニル（又はアリール）アルキルヒドロキシルビスホスホネート（amino phenyl (or aryl) alkyl hydroxyl bisphosphonates）、ヒドロキシルアルキルビスホスホネート（hydroxyl alkyl bisphosphonates）、ヒドロキシルアルキルヒドロキシルビスホスホネート（hydroxyl alkyl hydroxyl bisphosphonates）、ヒドロキシルフェニル（又はアリール）アルキルビスホスホネート（hydroxyl phenyl (or aryl) alkyl bisphosphonates）、ヒドロキシルフェニル（又はアリール）アルキルヒドロキシルビスホスホネート（hydroxyl phenyl (or aryl) alkyl hydroxyl bisphosphonates）、アミノフェニル（又はアリール）アルキルビスホスホネート（amino phenyl (or aryl) alkyl bisphosphonates）、アミノフェニル（又はアリール）アルキルヒドロキシルビスホスホネート（amino ph

10

20

30

40

50

enyl (or aryl) alkyl hydroxyl bisphosphonates)、ヒドロキシルアルキルビスホスホネート (hydroxyl alkyl bisphosphonates)、ヒドロキシルアルキルヒドロキシルビスホスホネート (hydroxyl alkyl hydroxyl bisphosphonates) (前記化合物の全てがさらに置換されていないか、又はさらに置換されている)、エチドロネート、パミドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、アレンドロネート、イバンドロネート、リセドロネート、ゾレドロネート、ヒドロキシメチレンビスホスホネート、及びそれらの組合せが含まれるがこれらに限定されない。ビスホスホネートはホスホノホスフィン酸又はホスホノカルボン酸の代わりにもなり得る。複数の実施形態において前記BPは、改変されていなくても本明細書に記載されるように改変されてもよい、パミドロネート、アレンドロネート、リセドロネート、ゾレドロネート、ミノドロネート、ネリドロネート、エチドロネートであり得る。

【0114】

前記BPは α -ヒドロキシ基 (例えば α -ヒドロキシ改変リセドロネート及びゾレドロネート; 図29) を含有するように改変され得る。他のBPも同様に改変可能である。幾つかの実施形態では前記BPは α -ヒドロキシ基を置換又は除去することにより改変され得る (図30; 例えばp-PyrEBP)。前記 α -ヒドロキシ基の除去又は置換によって未改変の同等のBPと比較して前記BPの骨吸収抑制効果を低減又は削減することができる。したがって、幾つかの実施形態では本明細書において提供される前記BP複合体は前記 α -ヒドロキシ基を有しないか、又は置換 α -ヒドロキシ基を有するBPを含有し得る。 α -ヒドロキシ基の適切な代わりにはH、アルキル、アリール、アルキルアリールが含まれ得るがこれらに限定されない。前記BPに複合体化されるその他の追加的な分子も骨吸収抑制効果に影響し得る。例えば、前記キノロン及び/又はリンカーがパラ位置置換サイドチェンジを有する前記BPに結合しているとき、骨吸収抑制効果が大きい低減又は削減され得る。幾つかの実施形態では前記BPは α -ヒドロキシ基欠失又は置換とパラ位置置換側鎖の両方を含むように改変され得る。

【0115】

アリール又はフェニルを含有するBPではそのアリール又はフェニルは環上のあらゆる位置で適切な置換基によって置換され得る。幾つかの実施形態では前記BPのアリール環又はフェニル環は1又は複数の電子供与種 (例えばF、N、及びCl) によって置換される。

【0116】

BP作用が無いフルオロキノロン送達目的で薬理学的に不活性のBP変異体を使用してもよい。

【0117】

前記キノロンはあらゆるキノロンであり得、そのキノロンにはアラトロフロキサシン、アミフロキサシン、バロフロキサシン、ベシフロキサシン、カダゾリド、シプロフロキサシン、クリナフロキサシン、ダノフロキサシン、デラフロキサシン、ジフロキサシン、エノキサシン、エンロフロキサシン、フィナフロキサシン、フレロフロキサシン、フルメキン、ガチフロキサシン、ゲミフロキサシン、グレパフロキサシン、イバフロキサシン、JNJ-Q2、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、マルボフロキサシン、モキシフロキサシン、ナジフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、オルビフロキサシン、パズフロキサシン、ペフロキサシン、プラドフロキサシン、プルリフロキサシン、ルフロキサシン、サラフロキサシン、シタフロキサシン、スパルフロキサシン、テマフロキサシン、トスフロキサシン、トロバフロキサシン、ザボフロキサシン、ネモノキサシン及びそれらのあらゆる組合せが含まれるがこれらに限定されない。前記キノロンはフルオロキノロンであり得る。

【0118】

前記キノロンは式1の一般構造を有することが可能であり、式中、R¹はアルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、フェニル、置

10

20

30

40

50

40

【化 1 4】



【0120】

前記BPは分離可能リンカーを介して前記フルオロキノロンに複合体化され得る。幾つかの実施形態では前記分離可能リンカーはフェニルカルバメートリンカーであり得る。前記分離可能リンカーはアリアルカルバメートリンカーであり得る。幾つかの実施形態では前記リンカーはアリアルチオカルバメートリンカーであり得る。幾つかの実施形態では前記リンカーはフェニルチオカルバメートリンカーであり得る。幾つかの実施形態では前記チオカルバメートリンカーはO-チオカルバメートリンカーであり得る。幾つかの実施形態では前記チオカルバメートリンカーはS-チオカルバメートリンカーであり得る。幾つかの実施形態では前記リンカーはカーボネートリンカーであり得る。幾つかの実施形態では前記リンカーは尿素リンカーであり得る。幾つかの実施形態では前記リンカーはアリアルジチオカルバメートリンカーであり得る。

10

【0121】

BPキノロン複合体医薬製剤

本明細書は本明細書中のどこかに記載される量のBPキノロン複合体を含有し得る医薬製剤をはじめとする製剤も説明する。その量は有効量であり得る。その量は細菌の増殖及び／又は繁殖を抑制するのに有効であり得る。その量は細菌を殺菌するのに有効であり得る。医薬製剤を含む製剤は様々な経路を介した送達向けに製剤化能であり、且つ、医薬的に許容可能なキャリアを含有し得る。全般的にRemington's Pharmaceutical Sciences、Meade Publishing社、イーストン、ペンシルバニア州（第20版、2000年）の中に技術と製剤を見出すことができ、その開示全体を参照により本明細書に援用する。全身投与には筋肉内注射、静脈内注射、腹腔内注射、及び皮下注射を含む注射が有用である。注射用に本発明の治療組成物は溶液中に、例えばハンス液又はリンゲル液などの生理学的に適合する緩衝液中に製剤可能である。さらに、前記BPキノロン複合体及び／又はそれらの構成要素は固形形態で製剤され、使用直前に再溶解又は懸濁され得る。凍結乾燥形態も含まれる。前記BPキノロン複合体の医薬製剤を含む製剤は少なくとも無菌であり、且つ、発熱性物質を含まないことを特徴とし得る。これらの製剤はヒト用及び獣医用に使用される製剤を含む。

20

【0122】

適切な医薬的に許容可能なキャリアには水、塩溶液、アルコール、アラビアガム、植物油、ベンジルアルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、又はデンプンなどの炭水化物、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、及びポリビニルピロリドンが含まれるがこれらに限定されず、これらはBPキノロン複合体に対して害となるように反応することがない。

30

【0123】

前記医薬製剤は滅菌可能であり、前記BPキノロン複合体に対して害となるように反応することがない助剤、例えば滑沢剤、保存剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与えるための塩、緩衝剤、着色剤、着香剤、及び／又は芳香物質等と所望により混合可能である。

【0124】

別の製剤は骨髓炎、インプラント周囲炎又はプロテーゼ周囲感染症の予防又は治療のため、及び抜歯窩の維持のための骨移植材料又は骨間隙充填材にBPキノロン複合体を添加することを含む。

40

【0125】

医薬製剤はその意図する投与経路と適合するように製剤可能である。投与経路の例には非経口投与、例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、経口投与（例えば、吸入）、経皮（局所）投与、経粘膜投与、及び直腸内投与が挙げられる。非経口的適用、皮内適用、又は皮下適用のために使用される溶液又は懸濁液は次の構成成分、すなわち注射用水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒などの無菌希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗

50

菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩などの緩衝剤、及び塩化ナトリウム又はブドウ糖などの浸透圧調節剤を含み得る。pHは塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基によって調節可能である。非経口製剤はガラス製又はプラスチック製のアンブル瓶、使い捨て注射筒、又は複数回投与用バイアル瓶の中に封入可能である。

【0126】

注射用途に適切な医薬製剤を含む製剤は無菌水性溶液（水溶性の場合）又は分散液、及び無菌注射溶液又は分散液の即時調製用の無菌粉剤を含み得る。静脈内投与のため、適切なキャリアには生理食塩水、静菌水、クレモフォールEM（商標）（BASF、パーシッパニー、ニュージャージー州）又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が含まれ得る。注射可能医薬製剤は無菌であり得、良好な注射針通過特性が存在する限り流体であり得る。注射可能医薬製剤は製造時及び保存時の状態で安定であり得、且つ、細菌及び真菌などの微生物の汚染混入活動に対抗して保存されなければならない。前記キャリアは、例えば水、エタノール、グリセロールのような医薬的に許容可能なポリオール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール、及びそれらの適切な混合物を含有する溶媒又は分散媒体であり得る。適正な流動性が、例えば、レシチンなどの被覆の使用、分散剤の場合には必要な粒径の維持、及び界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の活動の防止は様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等によって達成され得る。幾つかの実施形態では前記組成物の中に等張剤、例えば糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、及び塩化ナトリウムを含めることが有用であり得る。

【0127】

無菌注射溶液は必要に応じて本明細書において列挙された成分のうちの1つ、又はそれらの成分の組合せを含む適切な溶媒中に特定量の本明細書に記載されるBPキノロン複合体のうちのいずれかを組み入れ、続いてフィルター滅菌することにより調製され得る。概して分散体は基礎分散媒体及び本明細書において列挙された成分に由来する必要な他の成分を含有する無菌ベヒクルの中にBPキノロン複合体を組み入れることにより調製され得る。無菌注射溶液調製用の無菌粉剤の場合では、前記活性成分とあらゆる望ましい追加成分の予め濾過滅菌された溶液からそれらの粉末を産出する真空乾燥及び凍結乾燥が有用な調製方法の例である。

【0128】

全身投与は経粘膜手段又は経皮手段による可能性もある。経粘膜投与又は経皮投与のため、透過される障壁にとって適切な浸透剤を前記製剤中に使用することができる。そのような浸透剤は当技術分野において一般的に知られており、例えば経粘膜投与向けの浸透剤には界面活性剤、胆汁塩、及び流動性酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は点鼻スプレー剤又は坐剤の使用を介して達成され得る。経皮投与のため、前記BPキノロン複合体は当技術分野において一般的に知られている軟膏、膏薬、ゲル剤、又はクリーム剤に製剤され得る。幾つかの実施形態では前記BPキノロン複合体は経皮送達系を介して適用可能であり、それらの経皮送達系は前記BPキノロン複合体を経皮吸収のためにゆっくりと放出することができる。透過増強剤を使用して条件媒体中の活性因子の経皮浸透を促進することができる。経皮送達用パッチは例えば米国特許第5,407,713号、第5,352,456号、第5,332,213号、第5,336,168号、第5,290,561号、第5,254,346号、第5,164,189号、第5,163,899号、第5,088,977号、第5,087,240号、第5,008,110号、第4,921,475号に記載されている。

【0129】

経口投与のため、本明細書に記載される製剤はカプセル剤、錠剤、粉剤、顆粒剤、又は懸濁剤若しくは水剤として提供され得る。その製剤はラクトース、マンニトール、トウモロコシデンプン、又はジャガイモデンプンなどの従来の添加物；結合剤、クリスタリンセルロース、セルロース誘導体、アカシアガム、トウモロコシデンプン、ゼラチン、崩壊剤

、ジャガイモデンプン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、無水第二リン酸カルシウム、又はデンプングリコール酸ナトリウム、滑沢剤、及び／又はステアリン酸マグネシウムを含有し得る。

【0130】

非経口投与（すなわち、消化管以外の経路を介した投与）のため、本明細書に記載される前記製剤は対象の血液と等張である無菌水性溶液と混合され得る。そのような製剤は、水溶液を作製するために塩化ナトリウム、グリシン等のような生理学的に適合可能な物質を含有し、且つ、生理的条件下に適合可能である緩衝化されたpHを有する水の中に活性成分（例えば前記BPキノロン複合体）を溶解し、そしてその溶液を無菌にすることで調製され得る。その製剤は単位投与用容器又は複数回投与用容器、例えば密封アンプル瓶又はバイアル瓶の中に入れて提供され得る。その製剤は注射、点滴、又は当技術分野において知られている他の手段によって送達され得る。

【0131】

経皮投与のため、本明細書に記載される前記製剤をプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、イソプロパノール、エタノール、オレイン酸、N-メチルピロリドン等のような皮膚浸透増強剤と組み合わせることが可能であり、それらの皮膚浸透増強剤によって本発明の核酸ベクターに対する皮膚の透過性が上昇し、且つ、それらの核酸ベクターが皮膚を通過して血流中に浸透する。本明細書に記載される前記製剤及び／又は組成物をエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、エチレン／ビニル酢酸、ポリビニルピロリドン等のような高分子物質とさらに混合してゲル状の組成物を提供することが可能であり、そのゲル状の組成物を塩化メチレンなどの溶媒に溶解し、所望の粘度まで水分を抜き、そしてパッチ剤を提供するための下地材料に添加することが可能である。

【0132】

局所的術後感染症又は術後移植片生着不全を防止し、且つ、移植部位における抗生物質の持続性局所的放出を提供するための代替骨移植片又は骨間隙充填材の中に含めるため、本明細書に記載される前記製剤は異種移植材料（ウシ）、自己移植材料（自己）又は同種移植材料（人間の死体）又は合成代替骨と組み合わせ可能である。例えば、担当外科医又は臨床医は市販されているあらゆる既存の代替骨移植片、又は自己移植片と粉末製剤を予め混合することができる。この製剤をこれまでに説明されたあらゆる製剤とさらに組み合わせることができ、且つ、ハイドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、コラーゲン、脂肪族ポリエステル（ポリ乳酸（PLA）、ポリグリコール酸（PGA）、及びポリカプロラクトン（PCL）、ポリヒドロキシブチレート（PHB）、メタクリレート、ポリメチルメタクリレート、樹脂、モノマー、ポリマー、海綿骨同種移植片、ヒトフィブリン、高血小板血漿、高血小板フィブリン、焼き石膏、燐灰石、合成ハイドロキシアパタイト、サンゴ性ハイドロキシアパタイト、珪灰石（ケイ酸カルシウム）、硫酸カルシウム、生体活性ガラス、セラミック、チタン、失活骨マトリックス、非コラーゲン性タンパク質、コラーゲン、及び骨細胞自己融解済み抗原性低下人骨を含む製品と組み合わせることができる。この実施形態ではBPキノロン複合体と組み合わせられる前記骨移植材料はペースト、粉末、パテ、ゲル、ヒドロゲル、マトリックス、顆粒、粒子、凍結乾燥粉末、凍結乾燥骨、脱ミネラル化凍結乾燥骨、生鮮又は生鮮凍結骨、皮質海綿骨ミックス、ペレット、ストリップ、プラグ、メンブレン、湿餅を形成するために水でもどされる凍結乾燥粉末、球状体、スポンジ、ブロック、モーセル、スティック、ウェッジ、セメント、又は非晶質粒子からなる製剤の状態であり得る。これらの多くは注射可能製剤の状態で存在してもよく、又は2又は複数の前述の製剤の組合せ（例えばスポンジと注射可能ペースト）として存在してもよい。

【0133】

別の実施形態では、BPキノロン複合体はトランスフォーミング増殖因子 β （TGF- β ）、血小板由来増殖因子（PDGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、及び／又は骨形成タンパク質（BMP）などの天然型又は組換え型の増殖因子を含有する因子系骨移植片と組み合わせ可能である。別の実施形態ではBPキノロン複合体は胚性幹細胞及び／

又は成体幹細胞、組織特異的幹細胞、造血性幹細胞、表皮性幹細胞、上皮性幹細胞、歯肉性幹細胞、歯根膜性幹細胞、脂肪幹細胞、骨髓幹細胞、及び血液幹細胞をはじめとする再生医療及び歯科医術において使用される細胞系骨移植片と組み合わせ可能である。したがって、骨伝導性、骨誘導性、骨促進性、骨形成性、又はそれらのあらゆる組合せを有する骨移植片は臨床用途又は治療用途のB Pキノロン複合体と組み合わせ可能である。

【0134】

剤形

本明細書に記載される前記B Pキノロン複合体及びその製剤は錠剤、カプセル剤、単回投与注射バイアル、又は単回投与注入バイアルなどの単位剤形で、又は上記製剤の場合のように骨移植材料と混合するための所定の用量として提供され得る。適切な場合、本明細書に記載される剤形はマイクロカプセル化され得る。いずれかの成分の放出を長期化するように、又は持続させるように前記剤形を調製することも可能である。幾つかの実施形態では放出が遅くなっている成分は前記複合型活性薬剤であり得る。他の実施形態では補助成分の放出が遅くなっている。成分の放出を遅くするための適切な方法には前記成分をポリマー、ワックス、ゲル等の材料で被覆すること、又はその材料の中に包埋することが含まれるがこれらに限定されない。遅延放出製剤は、例えば“Pharmaceutical dosage form tablets,” eds. Liberman et al. (New York, Marcel Dekker, Inc., 1989), “Remington—The science and practice of pharmacy”, 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000、及び“Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems”, 6th Edition, Ansel et al., (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995)などの標準的な参考文献の中に記載されているように調製され得る。これらの参考文献は賦形剤、材料、装置、並びに錠剤及びカプセル剤の調製方法、並びに錠剤及びペレット剤、カプセル剤、及び顆粒剤の遅延放出剤形についての情報を提供する。その遅延放出はどこでも約1時間～約3か月又はそれ以上の期間にわたり得る。

【0135】

所望の放出プロファイルを生成するために、異なる比率の水溶性重合体、水不溶性重合体、及び／又はpH依存性重合体を使用して水不溶性／水溶性非重合体賦形剤と共に、又は水不溶性／水溶性非重合体賦形剤を使用せずに被覆を形成してもよい。どちらの被覆も（被覆ビーズと共に打錠されるか、又は被覆ビーズを使用せずに打錠された）錠剤、（被覆ビーズを含むか、又は含まない）カプセル剤、ビーズ、粒状組成物、限定されないが懸濁剤形又は散布剤形として製剤される「現状の成分」を含むがこれらに限定されない剤形（マトリックス型又は簡易型）に対して実施され得る。

【0136】

適切な被覆材の例には酢酸フタル酸セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、及び酢酸コハク酸ヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロース重合体；酢酸フタル酸ポリビニル、アクリル酸重合体及び共重合体、並びにEUDRAGIT（登録商標）（Roth Pharma、ヴェスターシュタット、ドイツ）の商品名で市販されているメタクリル酸樹脂、ゼイン、シェラック、及び多糖類が含まれるがこれらに限定されない。

【0137】

有効量

前記製剤は（細菌の抑制及び／又は殺菌に有効な）有効量の明細書に記載されるB Pキノロン複合体を含有し得る。幾つかの実施形態ではその有効量は明細書に記載される前記B Pキノロン複合体の約0.001pg～約1,000g又はそれ以上までの範囲にある。幾つかの実施形態では明細書に記載される前記B Pキノロン複合体の有効量は体重に対して約0.001mg/kg～約1,000mg/kgまでの範囲であり得る。さらに他の実施形態では前記B Pキノロン複合体の有効量は製剤全体の%（重量／重量）、

%（重量／体積）、又は%（体積／体積）で約1%～約99%又はそれ以上までの範囲であり得る。幾つかの実施形態では前記BPキノロン複合体の有効量は骨髓炎及びその全ての亜型（例えば糖尿病足骨髓炎）、顎骨壊死、及び歯周炎の原因因子である *Staphylococcus*、*Pseudomonas*、*Aggregatibacter*、*Actinomyces*、*Streptococcus*、*Haemophilus*、*Salmonella*、*Serratia*、*Enterobacter*、*Fusobacterium*、*Bacteroides*、*Porphyromonas*、*Prevotella*、*Veillonella*、*Campylobacter*、*Peptostreptococcus*、*Eikenella*、*Treponema*、*Dialister*、*Micromonas*、*Yersinia*、*Tannerella*、及び *Escherichia* のあらゆる株又は種を含むがこれらに限定されない細菌を殺菌するのに有効である。

10

【0138】

BPキノロン複合体の使用法

有効量を含む特定量の本明細書に記載される前記BPキノロン複合体及びそれらの製剤はそれらを必要とする対象に投与可能である。幾つかの実施形態ではそれらを必要とする前記対象は骨感染症、骨疾患、骨障害、又はその症状を有する可能性がある。幾つかの実施形態ではそれらを必要とする前記対象は骨感染症、骨疾患、骨障害、又はその症状を有することが疑われる可能性があるか、他の場合としてそのようなものを有する傾向を持つ可能性がある。幾つかの実施形態ではそれらを必要とする前記対象は骨髓炎、骨壊死、プロテーゼ周囲感染症、及び／又はインプラント周囲炎を発症する危険性を有する場合がある。複数の実施形態において前記疾患又は障害は骨髓炎及びその全ての亜型、骨壊死、インプラント周囲炎、又は歯周炎であり得る。幾つかの実施形態ではそれらを必要とする前記対象は細菌などの微生物が感染している骨を有する。幾つかの実施形態では前記細菌は *Staphylococcus*、*Pseudomonas*、*Aggregatibacter*、*Actinomyces*、*Streptococcus*、*Haemophilus*、*Salmonella*、*Serratia*、*Enterobacter*、*Fusobacterium*、*Bacteroides*、*Porphyromonas*、*Prevotella*、*Veillonella*、*Campylobacter*、*Peptostreptococcus*、*Eikenella*、*Treponema*、*Dialister*、*Micromonas*、*Yersinia*、*Tannerella*、または *Escherichia* のあらゆる株又は種であり得る。幾つかの実施形態では前記細菌はバイオフィルムを形成し得る。幾つかの実施形態では必要とする対象に特定量、例えば有効量の本明細書に記載されるBPキノロン複合体又はその製剤を投与することにより前記対象において骨髓炎を治療することが可能である。幾つかの実施形態では本明細書において提供される前記組成物及び化合物は骨壊死の治療及び／又は予防、骨延長法、口唇口蓋裂修復、重症の歯槽上欠損の修復、顎骨再構築、並びに骨及び／又は関節の他のあらゆる再構築又は修復に使用可能である。

20

30

【0139】

前記BPキノロン複合体の投与は単一の経路に限定されず、複数の経路による投与を包含し得る。例えば、複数の経路による例となる投与には何よりも皮内投与と筋肉内投与の組合せ、又は皮内投与と皮下投与の組合せが挙げられる。複数回の投与は順次投与又は同時投与であり得る。複数の経路による他の適用モードが当業者に明らかになる。

40

【0140】

インビボで対象に対して前記医薬製剤がその効果を発揮することを可能にするあらゆる適切な方法によって前記対象に前記薬剤を投与することが可能である。例えば、経口投与、舌下又はバツカル投与、非経口投与、経皮投与、吸入、経鼻送達、腔内投与、直腸内投与、及び筋肉内投与を含むがこれらに限定されない公知の方法によって前記対象に本明細書に記載される前記製剤及び他の組成物を投与することが可能である。本明細書に記載される前記製剤又は他の組成物は筋膜上送達、嚢内送達、皮内送達、皮下送達、皮内送達、髄腔内送達、筋肉内送達、腹腔内送達、胸骨内送達、血管内送達、静脈内送達、実質送達

50

、及び／又は舌下送達によって非経口的に投与可能である。送達は注射、点滴、カテーテル送達、又は他の幾つかの手段、例えば錠剤又はスプレーによるものであり得る。送達はハイドロキシアパタイト、又は手術部位の抗感染性骨移植材料の場合は骨などのキャリアによるものでもあり得る。送達は骨移植材料との結合又は他の接触によるものであり得る。

【実施例】

【0141】

これまでに本開示の実施形態を述べてきたが、以下の実施例は概して幾つかの追加的な本開示の実施形態を説明する。以下の実施例及び対応する文章と図との関連で本開示の実施形態を説明するが、本開示の実施形態をこの説明に限定するつもりはない。反対に本開示の実施形態の主旨及び範囲内に含まれる全ての代替物、改変物、及び均等物を包含するつもりである。

【0142】

実施例1

イントロダクション

感染性骨疾患、すなわち骨髄炎は、ヒト医療及び獣医医療における世界的な大問題であり、四肢欠損に関わる後遺症及び死亡の可能性のために深刻な問題であり得る (Lew, et al., Osteomyelitis. Lancet 2004; 364: 369-79; Desrochers, et al, Limb amputation and prosthesis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2014; 30: 143-55; Stoodley, et al., Orthopaedic biofilm infections. Curr Orthop Pract 2011; 22: 558-63; Huang, et al., Chronic osteomyelitis increases long-term mortality risk in the elderly: a nationwide population-based cohort study. BMC Geriatr 2016; 16: 72)。骨髄炎に対する治療アプローチは主に抗菌剤によるものであり、長期間のアプローチであることが多く、多くの症例で感染を管理するために外科的介入を伴う。長骨骨髄炎の大半の症例における原因病原体が黄色ブドウ球菌のバイオフィームであり、定義によるとこれらの微生物はそれらのプランクトン型（浮遊型）の対応物と対照的に骨（図1）に結合する (Wolcott, et al., Biofilms and chronic infections. J Am Med Assoc 2008; 299: 2682-2684)。

【0143】

多くのバイオフィーム病原体が培養不可能であり、且つ、（それらのプランクトン型の対応物と比較すると）増殖速度及び抗菌剤耐性の表現型が変化するため、骨髄炎のバイオフィーム介在性 (biofilm-mediated nature) は臨床上及び実験上の設定において重要である (Junka, et al., Microbial biofilms are able to destroy hydroxyapatite in the absence of host immunity in vitro. J Oral Maxillofac Surg 2015; 73: 451-64; Herczegh, et al., Osteoadsorptive bisphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials. J Med Chem 2002; 45: 2338-41)。整形外科領域における感染症について比較的の高い成功率の抗菌剤治療が一般的に未だに実現していない理由は、耐性バイオフィーム病原体の発生、骨内での抗菌剤の低い浸透度、及び全身毒性に関連付けられている有害事象と共に従来の抗生物質によってバイオフィームを根絶することが困難であるということによって部分的に説明される (Buxton, et al., Bisphosphonate-ciprofloxacin bound to Skelite is a prototype for enhancing experimental local antibiotic delivery to injured

10

20

30

40

50

bone. Br J Surg 2004;91:1192-6)。

【0144】

骨髄炎治療に伴う多くの困難を克服するため、全身曝露を最小限にしながら抗生物質の比較的に高い、又は比較的に持続的な局所的治療濃度を骨において達成するための骨標的複合体を使用する薬物送達アプローチに関心が高まっている (Panagopoulos, et al., Local Antibiotic Delivery Systems in Diabetic Foot Osteomyelitis: Time for One Step Beyond? Int J Low Extrem Wounds 2015;14:87-91; Puga, et al., Hot melt poly-ε-siloxane-caprolactone/poloxamine implantable matrices for sustained delivery of ciprofloxacin. Acta biomaterialia 2012;8:1507-18)。

骨吸着性ビスホスホネート (BP) に複合体化されたフルオロキノロン抗生物質は、各成分の安全性についての長期の実績及びそれらの有利な生化学的特性のために有望なアプローチである (Buxton, et al., Bisphosphonate-ciprofloxacin bound to Skelite is a prototype for enhancing experimental local antibiotic delivery to injured bone. Br J Surg 2004;91:1192-6)。

この状況におけるフルオロキノロンファミリーの初期の研究の中で、シプロフロキサシンはBPに結合しているときに最良の結合特性及び微生物学的特性を示した (Herczegh, et al., Osteoadsorbative bisphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials. J Med Chem 2002;45:2338-41)。

シプロフロキサシンはこの状況での目的再設定に対して幾つかの利点を有する。すなわち、シプロフロキサシンでは経口投与又は静脈内投与が可能であり、それらの投与は生物学的に見て比較的に同等であり、シプロフロキサシンは最も一般的に出会う骨髄炎病原体を含む広範囲の抗菌活性を有し、シプロフロキサシンは臨床的に達成可能な用量において殺菌活性を示し、シプロフロキサシンはフルオロキノロンファミリーの中で最も安価な薬品である (Houghton, et al., Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluoroquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. J Med Chem 2008;51:6955-69)。

【0145】

BPファミリーは、その特異的な骨標的特性により、骨髄炎薬物療法における骨への抗生物質の導入にとって理想的なキャリアとなっている (Zhang S, et al., 'Magic bullets' for bone diseases: progress in rational design of bone-seeking medicinal agents. Chem Soc Rev 2007;36:507-31)。

BPはカルシウムと強力な二座配位結合及び三座配位結合を形成し、結果としてハイドロキシアパタイト (HA)、特に代謝活性が高い部位、又は感染及び炎症部位のハイドロキシアパタイトに濃縮される (Cheong, et al., Bisphosphonate uptake in areas of tooth extraction or periapical disease. J Oral Maxillofac Surg 2014;72:2461-8)。

BPは化学的分解と生物学的分解の両方に対する例外的な安定性も示す (Russell, et al., Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. Osteoporos Int 2008;19:733-59)。

BPとの複合体化を介して骨をシプロフロキサシンの標的とするという

コンセプトが、年来多数の報告書の中で考察されている (David, et al., Methylene-bis[(aminomethyl) phosphinic acids]: synthesis, acid-base and coordination properties. Dalton Trans 2013; 42: 2414-22; Fardeau, et al., Synthesis and antibacterial activity of catecholate-ciprofloxacin conjugates. Bioorg Med Chem 2014; 22: 4049-60; EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2015. [\[0146\]](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUC; CLSI. M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-fifth informational supplement, 2015; Tanaka, et al., Bisphosphonated fluoroquinolone esters as osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. Bioorg Med Chem 2008; 16: 9217-29; McPherson, et al., Synthesis of osteotropic hydroxybisphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials. Eur J Med Chem 2012; 47: 615-8)。しかしながら、初期の試みは、ファーマコフォア要件に抵触することによってたいい複体内のどちらの構成要素も不活性化することが見出される全身的に不安定なプロドラッグか切断不可能な複体のどちらかになって終わった。フルオロキノロンの分野では、シプロフロキサシン成分の重要な抗グラム陽性細菌特性が安定なBP連結同類物と複合体化されると失われるという顕著な例がHerczeghらによって記載された (Herczegh, et al., Osteoadsorptive bisphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials. J. Med. Chem 2002; 45: 2338-41)。この分野でのその後の研究により、これらの複体だけでは親抗生物質の切断を行わずに顕著な抗菌作用を発揮することはできないことが解明された (Herczegh, et al., Osteoadsorptive bisphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials. J. Med. Chem 2002; 45: 2338-41; Houghton, et al., Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluoroquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. J. Med. Chem 2008; 51: 6955-69)。Houghtonらは例えば様々なBP-フルオロキノロン複体を合成及び試験し、そしてフェニルプロパノンガチフロキサシンプロドラッグとアシルオキシアルキルカルバメートガチフロキサシンプロドラッグが一度骨に結合するとそれらのプロドラッグはおそらく親薬品を再生することができ、したがって前記抗生物質を分離することができないビスホスホノエチル誘導体、ビスホスホノプロピオニル誘導体、及びアミド誘導体などの単純な複体よりも高い抗菌活性を示すことを見出した (Houghton, et al., Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluoroquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. J. Med. Chem 2008; 51: 6955-69)。</p></div><div data-bbox=)

10

20

30

40

50

まとめると、B P－フルオロキノロンの抗菌活性は複雑であり、試験した病原体の特定の株、抗生物質及び共有結合したB P部分の選択、それらの2成分の間のテザー長、前記B Pの骨結合親和性、前記B Pの吸着脱離平衡、並びに複合体化に使用された結合スキームの安定性／易変性及びカイネティクスに関連付けられることがこの分野の現在までの研究知見から示される（Herczegh, et al., Osteoadsorptive bisphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials. J. Med. Chem 2002; 45:2338-41; Houghton, et al., Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluoroquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. J. Med. Chem 2008; 51:6955-69; Tanaka, et al., Bisphosphonated fluoroquinolone esters as osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. Bioorg Med Chem 2008; 16:9217-29; McPherson, et al., Synthesis of osteotropic hydroxybiphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials. Eur J. Med Chem 2012; 47:615-8）。したがって、より多くの最適化の機会と成功の機会がこの状況で「ターゲット・リリース」リンカー戦略によって提供され得ることが、蓄積されつつある証拠から示唆される。したがって、我々は代謝により加水分解可能なカルバメートリンカーを介したフェニルB P部分へのシプロフロキサシンの複合体化によって骨髄炎薬物療法における抗生物質の骨への投与に見られる問題が軽減されるはずであると仮説を立てた。その切断可能カルバメート結合と構造モチーフが特定の組織における標的化と分離に適うように設計された多数の薬品における重要な機能であり、酸性かつ酵素的環境（acidic and enzymatic environment）が存在する中で血清中の安定性及び感染骨表面での易変性などの薬物動態上の利点をもたらす（Ossipov, et al., Bisphosphonate-modified biomaterials for drug delivery and bone tissue engineering. Expert Opin Drug Deliv 2015; 12:1443-58; Guo, et al., pH-triggered intracellular release from actively targeting polymer micelles. Biomaterials 2013; 34:4544-54; Ghosh, et al., Organic carbamates in drug design and medicinal chemistry. J Med Chem 2015; 58:2895-940）。

【0147】

骨ターゲット・リリース戦略を利用した最近の一つの明確な成功事例が認められており、その事例ではMoriokaらが比較的安定なアミドペプチド結合の切断可能変異体（カルバメート）を使用することでエストラジオール類似体が骨を標的とし、且つ、骨において分離するように設計した（Morioka, et al., Design, synthesis, and biological evaluation of novel estradiol-bisphosphonate conjugates as bone-specific estrogens. Bioorg Med Chem 2010; 18:1143-8）。この結合の幾つかのバージョンが、薬理的に活性を有する変異体（フェニルカルバメート）が見つかる前に試みられた。重要なことに、彼らは単体で投与されたエストラジオールの骨に対する効果と同様の効果が1000倍低い単回用量の同様に連結されたB P－エストラジオール複合体によって生じることを実証した（Morioka, et al., Design, synthesis, and biological evaluation of novel estradiol-bisphos

phonate conjugates as bone-specific estrogens. *Bioorg Med Chem* 2010; 18:1143-8)。子宮組織において効果が最小であったことから、前記複合体はより高い治療指数又は改善された安全性も提供した。Arnsらが完成させた薬物動態学的研究はフェニルカルバメート連結BP-プロスタグランジンに関連するこの劇的な効力増強と一致する (Arns, et al., Design and synthesis of novel bone-targeting dual-action pro-drugs for the treatment and reversal of osteoporosis. *Bioorg Med Chem* 2012; 20:2131-40)。抗菌分野におけるこのアプローチの合成例がマクロライド系について報告されている。しかしながら、アルキルカルバメートが調べられただけであり、その他の成功例が存在しないことから、ターゲット・リリース戦略は生化学的標的に依存すると同時に (各構成成分の官能基の適合性を考慮すると) 化学的分類に依存するようであり、そしてその戦略を使用するためにはいずれか特定の化学分類に適うような設計をする必要があることが示唆される (Tanaka, et al., Synthesis and in vitro evaluation of bisphosphonated glycopeptide prodrugs for the treatment of osteomyelitis. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20:1355-9)。

【0148】

本実施例は、フェニルカルバメートBP-シプロフロキサシン複合体、及び当該複合体のインビトロにおける一般的な骨髄炎病原体に対する抗菌活性の系統的評価を示しており、本実施例によってインビボ安全性と効力がインプラント周囲骨髄炎の動物モデルにおいて評価された。重要なことに、本明細書において提示されるそれらのインビトロ試験とインビボ試験は、プランクトン型培養物に加えてこの分野において現在まで実施されておらず、且つ、比較的の高い臨床上的妥当性を提供するはずであるバイオフィームモデルとバイオフィーム方法論に基づいている。本試験は感染性骨疾患の治療において達成されていなかった医療上の要求を具体的に扱っており、したがって技術移転上の重要性に適うように設計されている。

【0149】

結果と考察

化学：

1つのBP-シプロフロキサシン複合体 (BCC、化合物6) の全体的な合成経路が図2A~2Bのスキームに示されている。出発点として我々のプロジェクトチームはこの複合体化のために不活性4-ヒドロキシフェニルエチリデンBPを確認した。このBP設計の論理的根拠は、不必要な前記BP部分の骨吸収抑制活性を抑制しながらその骨探索能力を保持し、交絡因子を最小限にし、且つ、一意的に親シプロフロキサシン化合物に起因する抗菌作用の評価に集中することであった。BPリガンドは、解剖学的感染部位において抗菌作用に加えて骨組織保護という二重作用を提供することが必要である場合は (様々な効力の) 骨吸収抑制機能性を有するように設計可能である。弱い結合親和性によって標的化効率が低下すること、及び前記フルオロキノロンと前記BP官能基との間の距離を長くすることにより、加水分解と前記親化合物の再生を減速することが可能であることが、これまでの研究から実証されているため、我々はこのフェニルBPも骨結合親和性とテザー長を考慮して選択した (Houghton, et al., Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluoroquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. *J. Med. Chem.* 2008; 51:6955-69; Tanaka, et al., Bisphosphonated fluoroquinolone esters as osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis, *Bioorg Med Chem* 200

8, 16: 9217-29; McPherson, et al., Synthesis of osteotropic hydroxybisphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials, Eur J Med Chem 2012, 47: 615-8)。最も重要なことは、アリールカルバメートをリンカーとして使用することによって、これまでのBP-Fキノロン複合体と比べてこの生化学的標的に関して血漿中で最適化された安定性と骨での適切な分離が提供され得る、と我々が考えたことである。したがって、4-ヒドロキシフェニルエチリデンBPのテトラエチルエステル(4)をこれまでに記載されたように調製した(David, et al., Methylene-bis[(aminomethyl) phosphinic acids]: synthesis, acid-base and coordination properties. Dalton Trans 2013; 42: 2414-22)。その後、BP(4)のフェノール基をp-ニトロフェニルクロロホルマートで活性化して保護化シプロフロキサシン(7)との複合体化のための化合物(5)を形成した(Fardeau, et al., Synthesis and antibacterial activity of catecholate-ciprofloxacin conjugates. Bioorg Med Chem 2014; 22: 4049-60)。二炭酸ジ-tert-ブチル(Boc₂O)反応を介してシプロフロキサシン(6)をベンジル(Bn)基で保護した。加水分解とブロモトリメチルシラン(TMSBr)による前記複合体(8)の最後の脱保護化によって生化学的評価及び抗菌性評価にすぐに使用可能な我々の第1のフルオロキノロンフェニルカルバメートBP-シプロフロキサシンプロドラッグ(9)が生じる。

【0150】

微生物学：

我々が着手した最初の調査では、骨感染症に関連する一団の14黄色ブドウ球菌臨床株(メチシリン感受性：MSSA及びメチシリン耐性：MRSA)に対する前記複合体の抗菌活性を標準的な実験室用プランクトン型培養システム中で評価することを目的とした。EUCAST(欧州薬剤感受性試験委員会)ガイドラインに従うと、ディスク拡散阻止帯分析法の結果は25~40mmの範囲(平均値：31.5、SD：±5)の直径を示し、全ての株がEUCASTブレイクポイントに従う抗菌薬感受性を示した(EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2015. <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUC>)。微量希釈法を用いる14株全てに対して試験されたBP-シプロフロキサシンのMICの結果が図3に示されている。基準とするために親化合物であるシプロフロキサシン単体のMICを同時に決定し(表1を表す)、それらのMICが確定済み臨床ブレイクポイント²⁶と矛盾しないことを見出した。この分類のプロドラッグは当該プロドラッグ自体の顕著な抗菌活性を失っており、且つ、どのBP関連抗菌作用も無視できる程度であることが既に証明されており、したがって親薬品の分離があらゆる認知可能な抗菌活性、例えばここで報告される抗菌活性を観察するための前提条件である(Houghton, et al., Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluoroquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. J. Med. Chem. 2008, 51: 6955-69)。

【0151】

前記複合体とシプロフロキサシンの両方がプランクトン型黄色ブドウ球菌病原体に対して殺菌活性を有すること、及び複合体化がインビトロでシプロフロキサシンの抗菌活性に影響し、MICに到達するためにシプロフロキサシン単体よりもわずかに高い濃度の複合体が必要とされることが、AST及びMICのデータから示されている。複合体化はBP

と骨に送達されるべき抗生物質の両方の化学的改変に基づくことが十分に証明されており、結果として治療効果を含む親薬品の特性がそのような改変によって変化する可能性がある。この結果は予期されるものである。我々の結果は、複合体化に成功した機能的な複合体は親化合物の抗菌活性よりもわずかに低いレベルではあるがその抗菌活性を保持することを示すこの分野の以前の文献とも一致している (Herczegh, et al., Osteoadsorptive bisphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials. J. Med. Chem 2002, 45: 2338-41; Houghton, et al., Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluoroquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. J. Med. Chem 2008, 51: 6955-69; Zhang, et al., 'Magic Bullets' for bone diseases: progress in rational design of bone-seeking medicinal agents)。重要なことに、骨髄炎の治療という状況では病原体は（これらの標準的なアッセイにおけるような）プランクトン型ではなくむしろバイオフィームであり、且つ、基材としての骨に結合しており、前記BP-シプロフロキサシン複合体の強化された骨標的特性は（後述のバイオフィーム関連インビトロ及びインビボデータが裏付けるように）抗菌作用に適切な抗生物質の濃度よりも高い濃度を骨にもたらし、したがってより高い効力をもたらすはずである。

【0152】

インビトロ抗菌試験に使用される微生物用培地はタンパク質、炭水化物、酵素及び塩／金属を有しているので抗菌試験中のBP-シプロフロキサシンの分解、変性、又はキレート化の可能性が存在する。この分解、変性、又はキレート化は抗生物質活性に悪影響を与えるが、化学的複合体化自体には無関係である可能性があった。我々のAST及びMICの結果と前記複合体の明白な抗菌効果に基づくと、このことは少しもありそうにない。それにもかかわらず、我々は、BP-シプロフロキサシンをトリプチケースソイブロス微生物用培地に導入し、図4に示されるように定量的分光分析を実施することにより前記複合体の安定性を客観的に評価しようとした。結果として前記抗菌剤の良好な安定性が示され、24時間後において微生物用培地中での分解又は変性の証拠はなかった。したがって、微生物用培地はおそらく複合体の活性及び効力に対して悪影響を全くかほとんど持たない。

【0153】

我々は、前記複合体の抗菌効果及び化学的安定性を確定した後で、次にHA結合能を評価しようとした。HA球状体を我々の微生物用培地に添加し、そして我々の抗菌試験に使用した濃度と同様の様々な濃度のBP-シプロフロキサシンを導入したところ、HAによる前記複合体の顕著な吸着と保持が上清（HA球状体を含まない）の定量的分光分析によって確認された（図5）。これらの結果は類似する骨親和性を有するBP部分を含有するこの分類の以前に報告された類似体と一致する (Tanaka, et al., Bisphosphonated fluoroquinolone esters as osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. Bioorg Med Chem 2008; 16: 9217-29; McPherson, et al., Synthesis of osteotropic hydroxybisphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials. Eur J Med Chem 2012; 47: 615-8)。骨吸着も濃度依存的現象のようであった。

【0154】

黄色ブドウ球菌ATCC-6538株が他の試験株と比較してシプロフロキサシンと前記複合体の両方に対して最小の感受性と最低のMICプロファイル（図3）を示したので、我々は次にこの菌株をさらに詳しい試験のために選択した。この株は他の試験株と比較してよく知られた強固なバイオフィーム形成性病原体でもある。そのため、我々にはバイ

オフィルムベースで臨床的に妥当なモデルでの抗菌活性の試験も促進しつつ、バイアス及び結果の過大評価を限定するために、我々の複合体を最も悪性の病原体に対して試験し、そして最適化する可能性があった。そこで、我々は酸性条件と塩基性条件の両方でBP-シプロフロキサシンを用いてプランクトン型黄色ブドウ球菌ATCC-6538株に対してASTを実施して複合体活性に対するpHの効果を評価した。酸性条件下では抗菌活性が全体的に改善され、且つ、塩基性条件下でMIC⁵⁰に到達するために必要とされる前記複合体濃度の半分でMIC⁵⁰に到達する(図6)ことが、標準的な微量希釈法に由来する定量的な結果から示された。宿主の炎症及び破骨細胞形成と共にバイオフィルム病原体が酸性の局所的環境を作り出す骨髄炎への臨床応用にとって、このことは有用である可能性があった。しかしながら他の研究者は、感染性生物及び炎症により生じた局所酸性環境は骨における幾らかの薬物溶出と関連する可能性があるが、十分な濃度の前記抗菌剤を提供する点でそのような過程の効率はおぼつかなく、プロドラッグの設計と複合体化スキームがより大きな役割を果たすだろうと示唆している(Houghton, et al., Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluoroquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. J. Med. Chem 2008; 51:6955-69)。最後に、シプロフロキサシン及び前記複合体のMICはそれぞれそれらの平均殺菌濃度(MBC)に等しいこともASTデータから示された。

【0155】

次に前記複合体を用いて時間殺菌アッセイをCLSI(米国臨床検査標準協会)法に従って実施したところ、前記複合体はこれまでに確定されたMICでプランクトン型黄色ブドウ球菌のメチシリン感受性(ATCC-6538)単離株とメチシリン耐性(MR4-CIPS)単離株を1時間以内、最大で24時間以内に殺菌し、増殖を100%抑制することが結果より示された。対照と比較すると前記MICの半分で1時間以内に殺菌作用が示され、増殖も最大で24時間まで抑制される(50%)ことがこれらのカインティクス試験によって示された(図7)(CLSI. M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement; 2015)。カインティクスの結果は試験細菌に対する前記複体の時間依存的効力と24時間にわたる持続的殺菌活性を示しており、試験細菌の存在下での切断活性を裏付けている。

【0156】

次に我々は、2種類の異なる基材(ポリスチレン及びHAディスク)上に予め形成された細菌バイオフィルムに対して前記複合体を試験して、バイオフィルムに対する抗菌効果をこの状況で初めて評価し、且つ、基材特異性が役割を担うかどうかとも判定した。黄色ブドウ球菌(ATCC-6538)のバイオフィルム及び追加として緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)(ATCC-15442)のバイオフィルムをBP-シプロフロキサシンに曝露し、抗菌活性を評価した。緑膿菌は有病率の点で黄色ブドウ球菌の事例よりもずっと頻度が低いものの、2番目に最も一般的な骨髄炎の臨床病原体であるので、我々は緑膿菌も試験した。図8はバイオフィルム増殖のための基材としてのポリスチレンの結果を示しており、BP-シプロフロキサシンの最小バイオフィルム阻止濃度(MBIC⁵⁰)は黄色ブドウ球菌ATCC-6538については15.6~31.2 mcg/mLであり、それはプランクトン型培養物状態のこの株に対するMICに相当した。その試験濃度範囲では緑膿菌ATCC-15442株についてMBIC⁵⁰が認められなかった。

【0157】

しかしながら、HAディスクがバイオフィルム基材として使用されると図9に示されるように殺菌活性の顕著な改善が認められ、全ての試験濃度の前記複合体によって統計学的に有意な殺菌活性が生じ、コロニー形成単位(CFU)の低下が起こった。黄色ブドウ球

菌 ATCC-6538 株に対して前記複合体の MIC⁵⁰ は 8 mcg/mL であり、MIC⁹⁰ は 50 mcg/mL であった。この病原体に対して親薬品であるシプロフロキサシンの MIC⁹⁰ は 8 mcg/mL であった。しかしながら、緑膿菌 ATCC-15442 株に対してシプロフロキサシンは全く抑制活性又は殺菌活性を持たず、一方で前記複合体は酸性条件及び塩基性条件下において 50 mcg/mL の濃度で殺菌性であり、且つ、酸性条件で抗菌活性の改善が認められる黄色ブドウ球菌と対照的に塩基性条件で抗菌活性の改善を示した。まとめると、前記複合体は基材としてのポリスチレンよりも基材としての HA の存在下でバイオフィーム病原体に対して効果的であり、試験される病原体の株及び細菌増殖モード（プランクトン型対バイオフィーム）のような因子に加えて基材特性が抗菌活性に役割を担うことがこれらの結果から示唆される。このことは以前には実証されておらず、バイオフィーム病原体に対する臨床応用に関するこれらの化合物の抗菌能力に対する見通しがこれにより加えられる。

【0158】

最後に我々は、プランクトン型培養物とバイオフィーム培養物を用いる予防型の実験設定であって、骨髄炎向けの抗生物質による予防シナリオにおいて臨床的妥当性を有する可能性もある前記実験設定において前記複合体を使用する抗菌試験を実施した。ここでは HA 球状体を様々な濃度の BP-シプロフロキサシンに導入し、そして 24 時間にわたって黄色ブドウ球菌と共にインキュベートし、そして定量的評価によって図 10 に示されるように 7.8 mcg/mL という低い濃度から最大で 250 mcg/mL の前記複合体の濃度で細菌増殖が示されず、0.12~3.9 mcg/mL の範囲の複合体濃度では強く抑制された最小の細菌増殖が示された。

【0159】

我々は次に黄色ブドウ球菌バイオフィームを増殖させるための基材として HA ディスクを再び使用したが、今度は BP-シプロフロキサシン又はシプロフロキサシンのどちらかとインキュベートした後であって、接種してバイオフィームを増殖させる前の時点でこれらのディスクを培地で洗浄した。図 11 は定量的バイオフィーム培養の結果と 24 時間の増殖後の CFU を示しており、100 mcg/mL の濃度でシプロフロキサシンは全てのバイオフィーム増殖を抑制し、一方で 10 mcg/mL の濃度で BP-シプロフロキサシンは全ての増殖を抑制した。シプロフロキサシンの分子質量は前記複合体の分子質量のおよそ半分であるので前記複合体はシプロフロキサシン単体と比較して完全殺菌作用の達成に関して活性が 20 倍高かった。これらの発見はプロドラッグからの親薬品であるシプロフロキサシンの酵素切断と経時的分離についての効率的なメカニズムを裏付けている。HA への効率的な結合及び親抗生物質の切断又は再生は、親抗生物質単体に相当する、又はそれよりも高い実質的な抗菌効果を示すためのこの分類の複合体にとっての必要条件である (Houghton, et al., Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluoroquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. J. Med. Chem 2008; 51:6955-69 (Tanaka, et al., Bisphosphonated fluoroquinolone esters as osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. Bioorg Med Chem 2008; 16:9217-29; McPherson, et al., Synthesis of osteotropic hydroxybiphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials)。

【0160】

インビボ安全性及び効力：

この BP-シプロフロキサシン複合体は新しく、インビボでこれまでに試験されていないので、我々はインプラント周囲骨髄炎の動物モデルにおいて初めての安全性効力試験を実施した。このモデルは、バイオフィーム介在性疾患及び宿主応答をインビボで研究する

ために技術移転上の価値に適うように特異的に開発された、ユニークな自家製の顎骨インプラント周囲骨髄炎モデルである (Freire, et al, Development of animal model for Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm-mediated oral osteolytic infection: a preliminary study. J Periodontol 2011; 82: 778-89)。簡単に説明すると、ラットの正常な細菌叢に常在性の細菌ではない顎骨骨髄炎病原体アグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンス (Aa; 野生型 R 型株 D7S-1; a 血清型) のバイオフィルムを 10^9 CFU で小型チタン製インプラント上に予備培養した。我々の動物試験の前に、親薬品であるシプロフロキサシンに対する Aa の感受性を確認するため、我々は以前に記載された長骨骨髄炎病原体について実施されたように AST アッセイと MIC アッセイを実施した。ディスク拡散阻止帯分析法によって 40 mm を超える直径が明らかになり、且つ、MIC₉₀ は 2 mcg/mL であり、親薬品であるシプロフロキサシンに対するこの微生物の強い感受性が示された。Aa は pH 感受性バイオチン化シプロフロキサシンプロドラッグに対する感受性についても以前に試験されており、親抗生物質に対して感受性であることが分かった (Manrique, et al., Perturbation of the indigenous rat oral microbiome by ciprofloxacin dosing. Mol Oral Microbiol 2013; 28: 404-14)。インビトロでバイオフィルムがインプラント上に定着した後に各ラットの顎骨にそれらのインプラントを外科的に移植する。動物に麻酔をかけ、頬を鉤で引っ張り、そして手作業で骨切除部にインプラントを挿入し、且つ、固定することができるよう経粘膜骨切除術を実施する。2 個のバイオフィルム接種インプラントを各ラットの口蓋骨の両側に設置する (n = 12 ラット及び 24 インプラント)。標準的、且つ、再現可能な量の生きた細菌がこのモデルによって各インプラント上によく定着したバイオフィルムとして形成されるが、我々はそのバイオフィルムがインプラント設置から数週間にわたってインビボで存続し、局所的に感染症、炎症、及び骨破壊の原因となることをこれまでに実証している (Freire, et al, Development of animal model for Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm-mediated oral osteolytic infection: a preliminary study. J Periodontol 2011; 82: 778-89)。

【0161】

術後 1 週間でインプラント周囲感染症が確立されたところで、実験の項において明記された投与計画においてそれらの動物に BP-シプロフロキサシン、陽性対照としてシプロフロキサシン単体、及び陰性対照として無菌エンドトキシン非含有生理食塩水を投与する。適切な投与濃度を決定するため、我々は類似のターゲット・リリース戦略を使用し、且つ、げっ歯類も使用する以前の試験及び薬物動態データに基づいて前記複合体のおおよその初回投与量を計算した (Houghton, et al., Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluoroquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. J Med Chem 2008; 51: 6955-69; Morioka, et al., Design, synthesis, and biological evaluation of novel estradiol-bisphosphonate conjugates as bone-specific estrogens. Bioorg Med Chem 2010; 18: 1143-8)。我々はサンプルサイズの見積もり及びこの動物モデルに関するこれまでの経験に基づいて 0.1 mg/kg、1 mg/kg、及び 10 mg/kg と徐々に増加する用量に相当するモル当量の BP-シプロフロキサシンにより群当たり 2 匹の実験動物において抗菌活性を決定することが可能になると予測した (Freire, et al, Development of animal

10

20

30

40

50

model for Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm-mediated oral osteolytic infection: a preliminary study. J Periodontol 2011; 82: 778-89)。動物は全身麻酔下で腹腔内注射により投与され、全ての化合物が適切なpHの無菌注射可能生理食塩水中に構成された。薬物療法から1週間後に全ての動物を殺処理し、インプラント周囲組織の摘出を実施し、そして微生物負荷量の定量的評価のために組織をすぐに均質化及び処理した。薬物療法の局所的又は全身的な悪影響について試験期間にわたって動物をモニターした。

【0162】

全ての動物が前記薬物療法をよく忍容し、皮膚の注射部位反応も炎症も無く、試験期間にわたって管理獣医師によって報告された全身性有害事象も無かった。治療効力は図12に示されるように生きた細菌の量の対数（組織グラム当たりのCFUの平均対数）に関して定量的に測定された。

【0163】

インビボでは一週間の期間にわたる複数回の投与（3回）において0.3mg/kgの用量の前記複合体を投与された前記動物がAaの回復を示さず、又は100%の殺菌を示した。BP-シプロフロキサシンの10mg/kgの用量での単回投与によっても10の2乗倍の減少又は99%の殺菌、及び複数回の投与ではあるが同じ合計濃度のシプロフロキサシン単体よりも一桁より高い活性を伴う高い効力が示された。複数回投与処方の中のシプロフロキサシン単体により10の1乗倍の減少又は90%の殺菌が生じたが、このことは予期されたことであり、且つ、我々がこの化合物の公知の効力、その抗菌活性、及びこの化合物が前記複合体の親薬品であるという事実を考慮してシプロフロキサシンを陽性対照として選択した理由である。0.1mg/kg及び1mg/kgという複合体濃度はほとんど効果を持たず、さらなる最適化がこの状況下で可能であることが示唆された。それにもかかわらず、前記プロドラッグの標的化と分離の能力を考慮すると、有効な用量が構成化合物の安全性プロファイルと経口投与能又は静脈内投与能を考慮した臨床背景で達成可能であることは当然である。前記複合体の複数回投与群では我々の培養物に酵母状の形態の証拠が示され、且つ、回復可能なAaが示されなかったことが興味深い。汚染混入がこの現象についての1つの説明であり得たが、同様、且つ、同時に方法を実施しており、我々の研究室では酵母を培養しておらず、この同じ複数回投与群及び2匹の別個の動物の中にはAaが回復されなかった動物試料しか存在しないので、この説明は全く非現実的である。したがって、Aaの殺菌と消散がインビボで生じ、親薬品であるシプロフロキサシンに対して感受性が低い酵母などの別の生物が我々の培養物の中で増殖したというのが、より尤もらしい説明である。実際、口腔カンジダ症のよく確立されたモデルとしてラットが使用されており、通常のヒト口腔フローラの酵母に相当するラットの同等物はカンジダ・ピントロペッシ（*Candida pintolopesi*）であり、カンジダ・ピントロペッシは抗生物質で処理されたげっ歯類動物又は免疫不全のげっ歯類動物において予期せぬ疾患の原因となり得る（Junqueira. Models hosts for the study of oral candidiasis. Adv Exp Med Biol. 2012; 710: 95-105）。このこと、すなわち通常はインビボで酵母と競合する細菌叢の抑制による酵母の過剰増殖又はカンジダ症は抗生物質で処理されたヒト患者においてよく知られる現象でもある。

【0164】

陰性対照と比較して、及び陽性対照親薬品とも比較して前記複合体によってインビボで感染症が経時的に解決されることは前記複合体が効果的に骨に結合し、親抗菌剤を分離することをさらに裏付ける。このモデルで効力が無ければ前記プロドラッグが結合していないか、前記プロドラッグが親薬品を分離していないかどちらかを示唆することになる。インビボでの前記プロドラッグの薬物動態学を理解するための間接的な方法が少なくともこれにより提供される（Houghton, et al., Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluor

oquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. J. Med. Chem. 2008; 51:6955-69)。ラット脛骨骨髓炎モデルにおける研究であることを除いて類似の研究によってBP-フルオロキノロン類の活性が試験され、骨の感染の1~2日前に前記プロドラッグの単回静脈内注射が投与される予防的背景であることを除き、試験複合体の類似の効力及び大いに増強された抗菌活性の証拠が見出された(Houghton, et al., Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluoroquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. J. Med. Chem. 2008; 51:6955-69)。このモデルにおける感染は外科的に露出された脛骨へのプランクトン型細菌のボーラス注射によって作出され、感染から24時間後に動物が殺処理された。本試験はバイオフィーム介在性骨髓炎治療試験ではなかったが、BP-シプロフロキサシンの前処理によってバイオフィーム増殖が防止され得ることを示す本明細書において提示されるインビトロデータと一致する(Houghton, et al., Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluoroquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. J. Med. Chem. 2008; 51:6955-69)。我々の実験により、親抗生物質単体の活性が既に消失しているときに定着したバイオフィームに対する殺菌活性を維持するために十分な濃度のその親薬品を産出する安全、且つ、適切な単回用量のBP-シプロフロキサシンプロドラッグの能力が確認されている。動物モデルにおいて長骨骨髓炎を治療する能力についてこの複合体をさらに評価し、包括的な薬物動態学的及び薬力学的研究もインビボで実施する。追ってこれらの試験の結果を提示する。

【0165】

考察

本実施例はターゲット・リリース戦略を利用したフェニルカルバメートBP-シプロフロキサシン複合体の成功した設計と合成を示しており、本実施例によってこの化合物の各成分(並びに前記複合体全体)の機能性がインビトロ及びインビボで系統的に評価された。一般的な骨髓炎病原体に対して試験されたBP-シプロフロキサシンのインビトロ抗菌性調査により強力な殺菌プロファイルが明らかになり、安全性と効力がプロテーゼ周囲骨髓炎の動物モデルにおいてインビボで示された。インビボでは一週間の期間にわたる複数回の投与において0.3mg/kgの用量(合計で0.9mg/kg)の前記複合体を投与された前記動物が最高の効力を示し、回復可能な細菌を示さなかった。kg当たり10mgという用量の複合体(前記複合体の分子質量が前記親薬品の分子質量の二倍であることを考慮すると5mgのシプロフロキサシン)の単回投与も強力な抗菌活性を示し、細菌の99%を殺菌することになった。前記複合体の複数回投与及び前記複合体の最大単回用量は親抗生物質であるシプロフロキサシンの30mg/kgの用量での複数回投与に勝った。より低い単回投与濃度(0.1mg/kg及び1mg/kg)の前記複合体は有効ではなかった。

【0166】

これらの発見により、単回用量として提供されるときには最小用量が前記複合体のインビボ効力にとって必要であるが、定期的に投与されるときにはずっと低い濃度の前記複合体が最高の効力を提供することができ、親抗生物質の濃度の10分の1未満で最高の効力を提供することができることが示されている。臨床への移行についてはこの標的化戦略が患者への投与濃度を低くし、且つ、治療指数を改善することによって、また全身曝露を限定することによって有用であることが判明し得るだろう。複合体は独特の薬効評価パラメーターを有しているのでこれらのプロドラッグとそれらの親化合物との間の直接的比較はやや恣意的であることがこの分野の他の研究と共にこれらの結果によって示されている

ことが重要である。この分類の複合体のどんな将来的な薬物動態学的モデリングにも分布について骨格コンパートメントを数理的に含む必要が出てくるが、それは抗生物質の薬物動態学研究では一般的に行われていない。これにより新しい薬理学的データがもたらされるであろうし、これはインビボでの密接な関係も有する。

【0167】

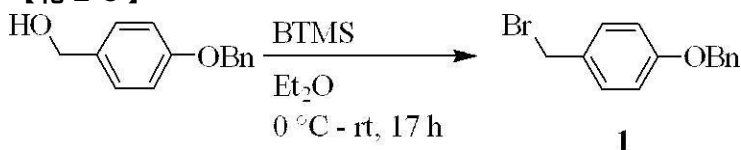
B P－シプロフロキサシンはここで初めて臨床的に妥当なバイオフィームに対しても試験され、インビトロとインビボの両方で基材としての骨にバイオフィームが結合しているときに強力な抗菌活性を示した。前記複合体の抗菌活性は試験した病原体の種と株、その増殖モード（バイオフィーム対プランクトン型）、バイオフィームがコロニー形成するための基材、pH、濃度、骨結合親和性、及び分離カインेटクスをはじめとする多数のパラメーターと関連するようである。ターゲット・リリース戦略による抗菌剤の（バイオフィーム病原体が常在する）骨への送達のための生化学的ベクターとしてのB Pを使用するこの分類の複合体を最適化することが骨髄炎の治療にとって有利なアプローチであり、且つ、全身毒性を最小にしつつ改善された薬物動態を提供するはずである。

材料と方法

化学：

【0168】

【化15】



【0169】

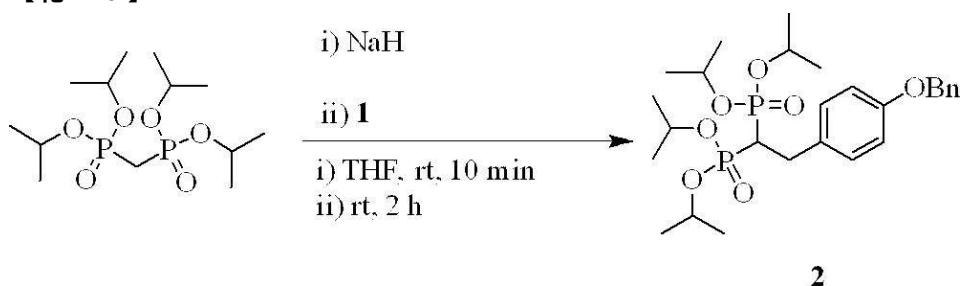
1（ベンジルオキシ）－4（ブロモメチル）ベンゼン（1）

【0170】

4－ベンジルオキシベンジルアルコール（1.00 g、4.67 mmol）を窒素下の炉内乾燥したフラスコ内の無水ジエチルエーテル（25 mL）中に溶解した。フラスコを氷浴中で冷却した。プロトトリメチルシラン（BTMS、1.26 mL、9.52 mmol）を注射器によって添加した。フラスコを室温までゆっくりと温めた。17時間攪拌した後に反応混合物を水（50 mL）に投入し、有機相を分離した。水相をジエチルエーテル（2×20 mL）で洗浄し、混合した有機相を塩水（2×20 mL）で洗浄し、そして硫酸ナトリウム上で乾燥した。エーテルの蒸発により白色の結晶質の固形物として生成物が生じた（1.23 g、95%の収率）。¹H NMR（400 MHz, Chloroform-d） δ 7.47 – 7.28（m, 7H）, 6.98 – 6.90（m, 2H）, 5.07（s, 2H）, 4.50（s, 2H）。

【0171】

【化16】



【0172】

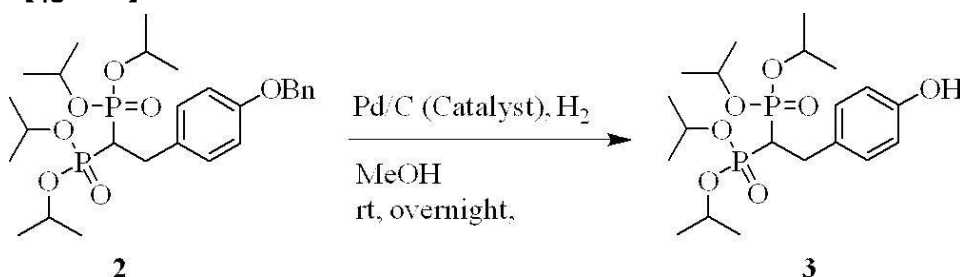
テトライソプロピル（2（4（ベンジルオキシ）フェニル）エタン－1,1－ジイル）ビス（ホスホネート）（2）

【0173】

窒素保護下で無水THF（2 mL）を鉍物油中の57～63%の分散度の水素化ナトリウムに添加した。室温で攪拌しながらメチレンジホスホン酸テトライソプロピル（0.57 mL、1.8 mmol）を滴下して添加した。ガスが放出され、灰色の懸濁固形物が消費されてほとんど透明な溶液を残した。混合物をさらに10分間にわたって攪拌した。固形物1を窒素向流下で一度に添加した。溶液は1分間にわたって透明であり、その後に濁った。2時間にわたって攪拌し続け、次に反応をTLC（100% EtOAc；UV又はモリブデン酸アンモニウムセリウム（CAM）染色により可視化）により確認し、2つの新規スポットがR_F = 0.37及び0.58に現れた。幾らか1（0.9超のR_F）が残し、30分間にわたって50℃まで反応を加熱したが、TLCでは進行がほとんど明らかにならなかった。反応混合物を5%クエン酸水溶液に投入し、エーテル（2×30 mL）で抽出し、塩水で洗浄し、そして蒸発処理した。ヘキサン中のEtOAc濃度が10%から100% EtOAcまで上昇するものを溶離液として使用して残留物を230～400メッシュのシリカを使用したフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。所望の化合物を無色の油として得た（0.508 g、52%の収率）。

【0174】

【化17】



【0175】

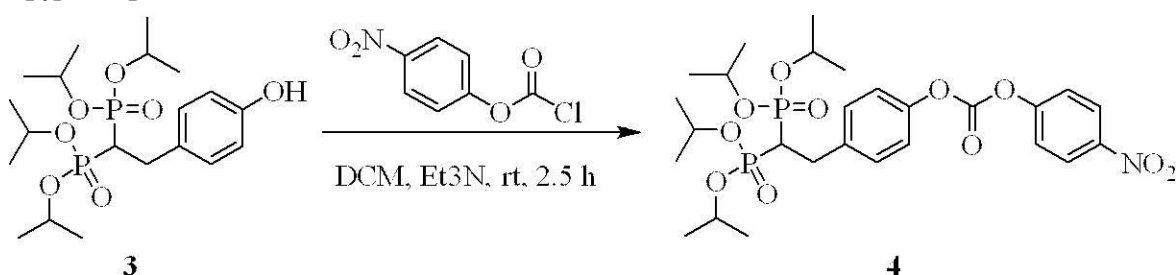
テトライソプロピル（2（4-ヒドロキシフェニル）エタン-1,1-ジイル）ビス（ホスホネート）（3）

【0176】

化合物2（0.508 g、0.925 mmol）を13 mLのメタノール中に溶解し、70 mgの10%パラジウム炭素を添加した。フラスコを窒素でフラッシングし、その後に水素でフラッシングし、そして水素バルーンを取り付けて一晩にわたって攪拌した。TLC（EtOAc中の10% MeOH、UV又はCAM染色により可視化）は出発物質（R_F = 0.63）の消失とR_F = 0.49の新しいスポットの出現を示した。100 mLのメタノールを使用してセライトで反応混合物を濾過した。濾液の蒸発により所望の化合物がさらに精製されずに使用される薄黄色の油として生じた（0.368 g、88%の収率）。¹H NMR（400 MHz, Chloroform-d） δ 7.07（d, J = 8.2 Hz, 2H）, 6.69（d, J = 8.2 Hz, 2H）, 4.71（m, 4H）, 3.11（td, J = 16.9, 6.0 Hz, 2H）, 2.47（tt, J = 24.4, 6.0 Hz, 1H）, 1.32 – 1.21（m, 24H）。³¹P NMR（162 MHz, Chloroform-d） δ 21.06。

【0177】

【化18】



10

20

30

40

50

【0178】

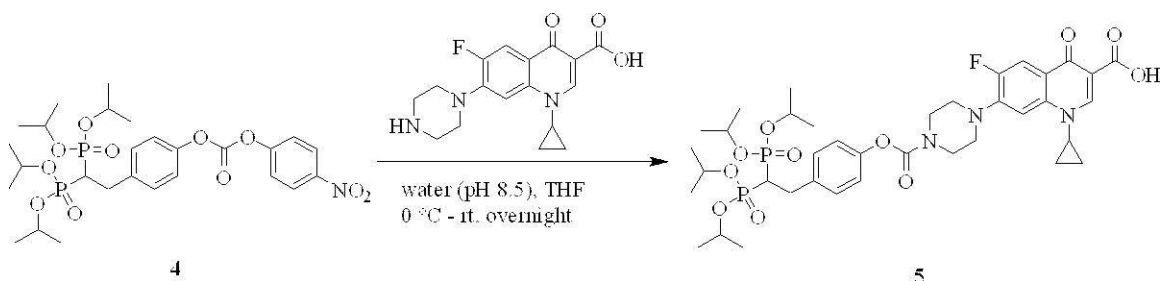
4 (2, 2-ビス(ジイソプロポキシホスホリル)エチル)フェニル(4-ニトロフェニル)カーボネート(4)

【0179】

化合物3(0.171g、0.380mmol)を8mlのジクロロメタン中に溶解し、その後にトリエチルアミン(159 μ l、1.14mmol)を添加し、続いてp-ニトロフェニルクロロホルマート(0.086g、0.418mmol)を一度に添加した。その溶液は無色からすぐに黄色に変化した。2.5時間にわたって攪拌した後にTLC(EtOAc中の5%MeOH;UVで可視化)によってわずかに微量の出発物質(RF=0.31)が示され、且つ、RF=0.59における高強度のスポットの出現が示された。溶離液として1:1の酢酸エチル:ヘキサン混液を使用するフラッシュクロマトグラフィーによりその化合物を精製して1つの不純物(RF=0.88)を除去した後に純粋な酢酸エチルで生成物を溶出した。¹H NMR(400MHz, Chloroform-d) δ 8.29(d, J=9.1Hz, 2H), 7.46(d, J=9.1Hz, 2H), 7.33(d, J=8.5Hz, 2H), 7.15(d, J=8.6Hz, 2H), 4.84-4.58(m, 4H), 3.22(td, J=16.5, 6.2Hz, 2H), 2.47(tt, J=24.1, 6.2Hz, 1H), 1.33-1.14(m, 24H)。

【0180】

【化19】



【0181】

7(4((4(2, 2-ビス(ジイソプロポキシホスホリル)エチル)フェノキシ)カルボニル)ピペラジン-1-イル)-1-シクロプロピル-6-フルオロ-4-オキソ-1, 4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(5)

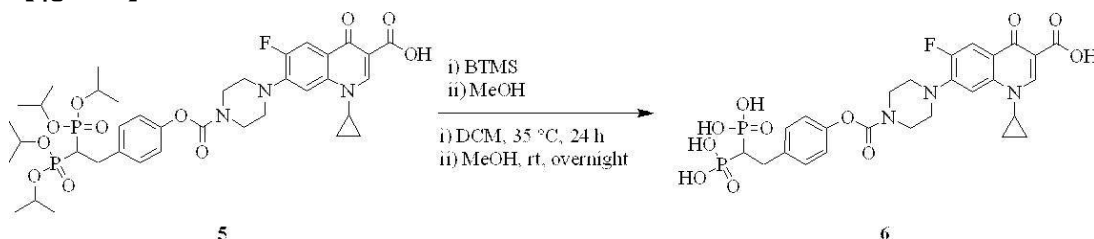
【0182】

シプロフロキサシン(46.5mg、0.140mmol)をプラスチック製バイアル瓶の中の1.4mlの水の中に懸濁した。151 μ lの1MのHClを添加し、そのバイアル瓶をボルテックスミキサーにかけてシプロフロキサシンを溶解して透明無色の溶液を得た。Na₂CO₃を添加してpHを8.5に調節し、濃白色の沈殿物が生じた。そのバイアル瓶を氷浴中に配置し、1.4mlのTHF中に溶解された化合物4(71.9mg、0.117mmol)を約5分間にわたって滴下して添加した。その後でそのバイアル瓶をその氷浴から取り出し、遮光し、そして室温で一晩にわたって攪拌した。固形物が攪拌されるとその反応混合物は明黄色に変化した。TLC(EtOAc中の5%MeOH)によって出発物質4の消失、及び蛍光下で青色のスポット(RF=0.51)とp-ニトロフェノール副生成物に起因する可視光下で黄色のスポット(RF=0.816)の出現が示された。その反応混合物を10mlの水で希釈し、そして目の細かいガラス製フリットに通して濾過した。残留固形物を黄色が残なくなるまで水で洗浄した。その後、それらの固形物をDCMで溶解してそのフリットから洗い流し、その溶液をフラッシュシリカカラムに負荷し、そしてMeOH濃度が5%まで上昇するDCMで溶出して明青色の蛍光を有するバンドを溶出した。画分を混合したものを蒸発させて白色の固形物として標記化合物を得た。¹H NMR(400MHz, Methanol-d₄) δ 8.79(s, 1H), 7.93(d, J=

13.3 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.30 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.70 (dpd, J = 7.4, 6.2, 1.3 Hz, 4H), 3.90 (s, 5H), 3.75 (s, 3H), 3.39 (s, 4H), 3.18 (td, J = 16.6, 6.4 Hz, 2H), 2.65 (tt, J = 24.3, 6.3 Hz, 1H), 1.43–1.34 (m, 1H), 1.34–1.19 (m, 24H), 1.18–1.10 (m, 2H).

【0183】

【化20】



10

【0184】

本明細書において式2とも呼ばれる1-シクロプロピル-7-(4-(4-(2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボニル)ピペラジン-1-イル)-6-フルオロ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(6)

【0185】

化合物5(10.0mg、0.0124mmol)を1.5mlのバイアル瓶の中のDCM(0.2ml)中に溶解し、ブロモトリメチルシラン(BTMS)(0.2ml)を添加し、そしてすぐにそのバイアル瓶にキャップをし、35℃の油浴の中に浸した。24時間にわたって攪拌した後に溶媒及びBTMSを蒸発処理によって除去し、1mlのMeOHを添加し、そしてそのバイアル瓶を一晚にわたって攪拌した。溶媒の蒸発によって6.82mg(0.107mmol)の緑色の蛍光を有する薄黄色の固形物が残った。HPLC分析のために約0.2mgの試料を取り出した。水中に懸濁し、pHが2.5に測定され、その後でそれを6.7に調節して青色の蛍光を有する薄黄色の溶液を得た。HPLC分析(Luna C₁₈; 緩衝液系: 0.1M NH₄OAc 緩衝液 pH7.1; A: 20% アセトニトリル、B: 70% アセトニトリル。0~7分: 100% A、7~25分: 0~100% Bの濃度勾配)はRT=14.8分で主要ピークを示し、5.76分(シプロフロキサシンに割り当てられる)及び18.8分で小ピークを示した。シプロフロキサシン標準品(緩衝液A中の飽和溶液を2倍希釈したもの; 5μlを注入)によって5.68分のRTが生じた。

20

【0186】

微生物学:

実験株:

12株のメチシリン感受性プロファイルを有する黄色ブドウ球菌臨床骨髓炎株及び1株の臨床メチシリン耐性株(MR-CIPS)を試験した。これらの病原体はポーランドのヴロツワフ医科大学薬学微生物学寄生虫学科の菌株コレクションの一部である。さらに、次のATCCコレクション株、すなわち黄色ブドウ球菌6538株と緑膿菌15442株を実験目的のために選択した。

30

40

【0187】

HAディスク:

特注仕様のディスクの製造のために市販のHA粉末を使用した。結合剤を使用せずに9.6mmの直径の粉末ペレットをプレス加工した。焼結を900℃で行った。静的引張試験、圧縮試験、及び曲げ試験用のUniversal Testing System(Instronモデル3384; Instron社、ノーウッド、マサチューセッツ州)を使用してそれらの錠剤を圧縮した。それぞれLEXT OLS4000顕微鏡(Olympus社、センターバレー、ペンシルバニア州)とMetrotom 1500マイクロ

50

トモグラフ (Carl Zeiss 社、オーバーコッヘン、ドイツ) を使用する共焦点顕微鏡法とマイクロトモグラフィー (マイクロCT) により、製造されたHAディスクの品質を検査した。

【0188】

試験株のシプロフロキサシンに対する感受性を評価するためのディスク拡散テスト：

EUCASTガイドラインに従ってこの方法を実施した。簡単に説明すると、0.5マクファーランド (MF) の細菌希釈物をミュラー・ヒントン (MH) 寒天プレート上に広げた。5mgのシプロフロキサシンを含有するディスクを差し込み、そのプレートを37℃で24時間にわたってインキュベートした。次に定規を使用して阻止帯を記録した。得られた値 (mm) をEUCASTの表に由来する適切な阻止帯の値と比較した。

10

【0189】

分析されたプランクトン型の臨床スタフィロкокカス株に対する試験化合物のMICの評価：

微生物の増殖に対するBP-シプロフロキサシン及びシプロフロキサシンの効果を評価するため、 1×10^5 cfu/mlの密度を有する100µlの微生物溶液を適切な濃度の試験化合物と共に96ウェル検査プレートのウェルに入れた。その直後に分光光度計 (Thermo Scientific Multiscan GO) を580nmの波長で使用して溶液の吸光度を測定した。その後、細菌増殖に最適な条件を得るため、及び細菌のバイオフィーム形成を防止するためにプレートを攪拌機の中で24時間にわたって37℃でインキュベートした。インキュベートした後に吸光度を再度測定した。次の対照試料を用意した：陰性対照試料1：微生物を含まない滅菌培地、陰性対照試料2：DMSO (ジメチルスルホキシド；シグマ・アルドリッチ社) を1% (体積/体積) の終濃度になるまで加えた微生物を含まない滅菌培地、陽性対照試料1：試験化合物を含まない培地+微生物、陽性対照試料2：試験化合物を含まないがDMSOを1% (体積/体積) の終濃度になるまで加えた培地+微生物。シプロフロキサシンはこの溶媒に効率的に溶解するが、DMSO濃度が1%を超えると微生物細胞にとって有害になり得ることが1%のDMSOを使用する論理的根拠であった。細胞の相対数を評価するために次の計算を行った。対照試料の吸光度の値 (BP-シプロフロキサシンの場合では培地+微生物、シプロフロキサシンについては培地+微生物+DMSO) を100%と評価した。次に試験化合物と共にインキュベートされた細胞の相対数を以下のように計数した：対照試料吸光度の値/試験試料の値×100%。

20

30

【0190】

安定性を検査するためのトリプチケースソイブロス (TSB) 微生物用培地中のBP-シプロフロキサシン複合体の分光分析：

TSB微生物培地中に0.24~250mg/Lの終濃度のBP-シプロフロキサシンを96ウェルプレートのウェルに入れた。直後に分光光度計 (Thermo Scientific Multiscan GO) を275nmの波長で使用して溶液の吸光度を測定した。次に溶液を攪拌しながら24時間にわたって37℃で放置した。インキュベートした後に吸光度を再度測定した。複合体の分解を評価するために0時間及び24時間で測定された吸光度の値を比較した。

40

【0191】

HA球状体を添加したトリプチケースソイブロス微生物用培地中のBP-シプロフロキサシン複合体の分光分析：

TSB微生物培地中に懸濁されたHA粉末 (球状体) に様々な濃度のBP-シプロフロキサシンを導入した。BP-シプロフロキサシンとHA球状体を含有する溶液を24ウェルプレートのウェルに入れた。粉末の終濃度は10mg/mLであり、一方で複合体の終濃度は0.24~250mg/Lであった。直後に分光光度計 (Thermo Scientific Multiscan GO) を275nmの波長で使用して溶液の吸光度を測定した。プレートは測定前に前記分光光度計の中で自動的に攪拌された。次にプレートを攪拌しながら24時間にわたって37℃で放置した。24時間後に吸光度を再度測定

50

した。0時間及び24時間の時点における前記複合体の相対濃度を評価するために実験の開始時と終了時に測定された吸光度の値を比較した。

【0192】

酸性pHと塩基性pHでの黄色ブドウ球菌ATCC-6538株のプランクトン型培養物に対するBP-シプロフロキサシンの抗菌物質感受性試験：

KOH溶液又はHCl溶液を使用して微生物用培地をpH7.4とpH5に調節し、そして万能pH指示薬（Merck社、ポーランド）を使用してその微生物用培地を測定したことを除いてディスク拡散試験についてこれまでに記載されたようにしてこの実験設定を実施した。

【0193】

黄色ブドウ球菌ATCC-6538株（MSSA）及び臨床MRSA MR4-CIP S株に対するBP-シプロフロキサシン複合体の時間殺菌アッセイ：

吸光度の測定（580nmの波長）を0時間、1時間、2時間、4時間、8時間、16時間、及び24時間の時点で行ったことを除いて「分析されたプランクトン型の臨床スタフィロкокカス株に対する試験化合物のMICの評価」の小見出しの下でこれまでに記載されたようにしてこの実験を実施した。

【0194】

黄色ブドウ球菌ATCC-6538株及び緑膿菌ATCC-15442株のバイオフィルムに対して実施されたBP-シプロフロキサシンの抗菌物質感受性試験：

適切な寒天プレート（黄色ブドウ球菌についてはコロンビア寒天プレート；緑膿菌についてはマッコンキー寒天プレート）上で培養された株を液体微生物用培地へ移し、嫌気性条件下において24時間にわたって37℃で培養した。培養後に株を1MFの密度まで希釈した。基材としてのHAディスクを含有する24ウェルプレートのウェルにそれらの微生物希釈物を入れるか、又は底面がバイオフィルム形成用の基材として機能するポリスチレンウェルにそのままそれらの微生物希釈物を入れた。株を37℃で4時間にわたって培養した。次にそれらのウェルから微生物含有溶液を取り除いた。それらの面、HAディスク、及びポリスチレンプレートを静かに洗って接着した細胞を残すと共にプラクトン型又は緩く結合した微生物を除去した。0.24~125mg/LのBP-シプロフロキサシン複合体を含む新しいTSB培地の中にこの様にして調製された面を浸した。37℃で24時間のインキュベーションの後に生理食塩水溶液を使用してそれらの面を洗浄し、そして1mLの0.5%サポニン（シグマ・アルドリッチ社、セントルイス、ミズーリ州）に移した。それらの面を1分間にわたってボルテックスミキサーで激しく攪拌して細胞を剥離させた。その後、全ての微生物懸濁液を10~10⁹倍希釈した。各希釈物（100mL）を適切な安定培地（緑膿菌と黄色ブドウ球菌についてそれぞれマッコンキーとコロンビア）上で培養し、24時間にわたって37℃でインキュベートした。この後に微生物コロニーを計数し、バイオフィルムを形成する細胞の数を評価した。結果を平方ミリメートルの面当たりの平均CFU数±平均の標準誤差として表した。HAディスクの正確な表面積を推定するためにX線トモグラフィ分析を適用した。検査プレートの底面積を推定するために円の面積の数式である πr^2 を適用した。

【0195】

HA球状体への黄色ブドウ球菌6538株の接着を抑制するBP-シプロフロキサシン複合体の抑制能：

TSB微生物培地中に懸濁されたHA粉末（球状体）に様々な濃度のBP-シプロフロキサシンを導入した。複合体とHA球状体を含有する溶液を24ウェルプレートのウェルに入れた。粉末の終濃度は10mg/1mLであり、一方で前記複合体の終濃度は0.12~250mg/Lであった。懸濁液を攪拌しながら24時間にわたって37℃で放置した。24時間後にそれらのウェルから懸濁液を取り除き、瞬間的に遠心分離してHA粉末を沈殿させた。次に非常に静かに上清を捨て、105cfu/mLの密度を有する新しい1mLの黄色ブドウ球菌を前記HA球状体に加えた。その後、この溶液を攪拌し、580nmの波長を使用して吸光度を測定し、そして攪拌しながら24時間にわたって37℃で

10

20

30

40

50

放置した。インキュベーションの後に吸光度を再度測定し、0時間と24時間の値を比較して対照試料1（球状体を含まない細菌懸濁液）及び対照試料2（複合体が添加されていない細菌懸濁液＋球状体）に対する細菌増殖の低下を評価した。さらに、溶液を瞬間的に遠心分離し、静かに上清を捨て、一方で前のように細菌含有HA球状体をプレート上に蒔いて培養し、定量的に評価した。

【0196】

複合体被覆HAディスクが存在する中での24時間のインキュベーション後の黄色ブドウ球菌の生存：

様々な濃度のBP-シプロフロキサシン又はシプロフロキサシン単体を含有する2mLの溶液の中にHAディスクを浸し、それらのディスクを24時間にわたって37℃で放置した。DMSO又はリン酸緩衝液の中でインキュベートされたHAディスクが対照試料として働いた。次にディスクを滅菌水で3回洗浄した。洗浄後にバイオフィーム形成用の基材としてのHAディスクを含有するウェルに2mLの0.5MFの黄色ブドウ球菌ATCC 6538株を入れ、前と同じようにバイオフィームを形成した。

【0197】

動物試験：

全ての動物実験のプロトコルと方法は南カリフォルニア大学（USC）の動物実験委員会（IACUC）及び米国獣医師会安楽死研究班の推奨に従って認可及び実施された。USCは米国農務省（USDA）に登録されており、米国国立衛生研究所（NIH）に登録されている完全認可された認証状（第A3518-01号）を有しており、且つ、米国実験動物管理評価認証協会（AAALAC）によって認定されている。USCの動物福祉保証番号はA3518-01である。IACUCによって認可された我々のプロトコルの標題は「バイオフィーム介在性骨溶解性感染症の治療用骨標的化抗菌剤」であり、そのプロトコル番号は20474である。この研究のため、それぞれ約200gの体重の12匹の5か月齢未経産のメスSprague-Dawleyラットをこの研究に使用した。12時間毎の明暗サイクル下、22℃の小動物保存室においてケージ当たり2匹の動物を収容し、軟質食餌（Purina Laboratory Rodent Chow）を自由に摂取させた。USCにおける動物の使用と管理についてのガイドラインと規制に従って全ての動物を扱った。動物は、毎日それらの動物を直接評価する1日24時間待機している専任の獣医師の監督下にあった。全ての動物実験は、結果の質、信頼性、有効性、及び再現性を確保するために動物実験について報告するためのARRIVEガイドラインを使用して記載されている（Kilkenny, et al., Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. Vet Clin Pathol 2012; 41: 27-31）。

【0198】

この動物モデルはバイオフィーム介在性疾患及び宿主応答をインビボで研究するために特異的に設計された自家製の顎骨インプラント周囲骨髄炎モデルである（Freire, et al, Development of animal model for Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm-mediated oral osteolytic infection: a preliminary study. J Periodontol 2011; 82: 778-89）。顎骨骨髄炎病原体Aaのバイオフィームを 10^9 CFUで小型チタン製インプラント上に予め形成した。我々の動物試験の前に親薬品であるシプロフロキサシンに対するAaの感受性を確認するために我々は以前に記載された長骨骨髄炎病原体について実施されたようにASTアッセイとMICアッセイを実施した。インビトロでバイオフィームがインプラント上に定着した後に各ラットの顎骨にそれらのインプラントを外科的に移植した。手術のため、最初に4%イソフルラン吸入剤を使用し、続いてケタミン（80～90mg/kg）とキシラジン（5～10mg/kg）の腹腔内注射により動物に麻酔をかけた。次に手術部位への0.25%ブピバカインの浸潤注射により局所麻酔を加えた。次

10

20

30

40

50

に先制鎮痛として持続放出性ブプレノルフィン（ $1.0 \sim 1.2 \text{ mg/kg}$ ）を最初の切開の前に皮下投与した。麻酔されたところで各ラットの頬粘膜を鉤で引っ張り、前口蓋の自然正中離開状態の歯槽堤にパイロットドリルを使用して経粘膜骨切除術を実施した。その後、プラットホームが粘膜の高さになるまで手作業で骨切除術部にインプラントを挿入し、骨に固定した。2個のバイオフィルム接種インプラントを各ラットの口蓋骨の両側に設置した。

【0199】

手術から1週間後に4%のイソフルランを再度投与してラットに軽く麻酔をかけ、インプラントの安定性を確認し、インプラント及び感染部位における臨床的発見を書き留めた。その後、腹腔内注射によりそれらの動物にB P-シプロフロキサシン（単回投与として 0.1 mg/kg 、 1 mg/kg 、又は 10 mg/kg 、及び複数回投与群については 0.3 mg/kg を週3回）又は陽性対照としてシプロフロキサシン単体（これも複数回投与群として 10 mg/kg を週3回）を投与し、陰性対照として無菌エンドトキシン非含有生理食塩水を投与した。ランダム化過程を介して動物の処置群と対照群への割り当てを行った。その週にわたってそれぞれの追加の注射の前に複数回投与群の動物を前に記載したように麻酔した。全ての化合物は薬理学グレードであり、適切なpHの無菌注射可能生理食塩水中に構成された。薬物療法から1週間後に全ての動物をCO₂室（60～70%の濃度）の中に5分間にわたって入れ、その後で頸椎脱臼により安楽死させた。インプラント周囲組織（ 1 cm^2 ）の摘出を一括実施し、インプラントを取り出した。微生物負荷量の定量的評価のためにインプラント周囲組織をすぐに均質化及び処理した。処置群及び対照群に割り当てられたラットを匿名化し、その微生物データを分析する後の調査者から秘密にした。微生物分析のため、インプラント周囲軟組織及び骨を1mLの0.5%サポニンの中に入れて処理し、1分間にわたってボルテックスミキサーで攪拌した後にそのまま寒天プレートに移し、そして培養した。Aaを培養するための培地は改変TSBからなり、凍結ストックは20%グリセロール、80%改変TSBの中で-80℃に維持された。全ての培養は5%CO₂中において37℃で実施された。ホモジェネートのCFU数（グラム当たりのCFU数）は段階希釈されたホモジェネートのアリコットをTSAプレートに蒔くことにより決定された。処置の関数としてのグラム当たりのCFU数の10を底とする平均対数の減少を記録した。

【0200】

統計分析：

SigmaStatパッケージバージョン2.0（SPSS社、シカゴ、イリノイ州）を使用して統計計算を行った。実験前にインビトロ試験及びインビボ試験のサンプルサイズの見積もりをするためにG Power 3ソフトウェアを使用して検定力分析を実施した（Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. Behav Res Meth 2009; 41: 1149-60）。クラスカル・ウォリス検定又は一元配置ANOVAを用いて実験結果に由来する定量的データを分析し、処置群を対照群に比較するときに $p < 0.05$ で統計学的有意性を受け入れた。

【0201】

実施例2

【0202】

10

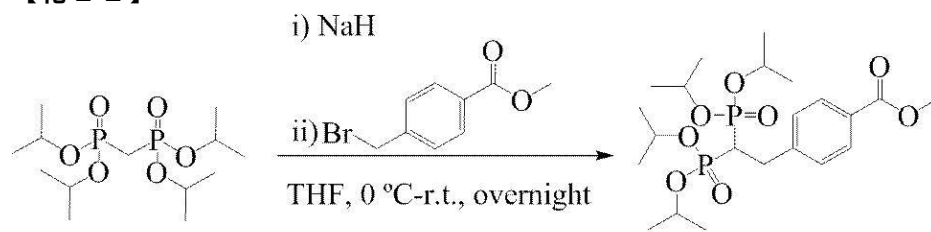
20

30

40

50

【化 2 1】



7

【0 2 0 3】

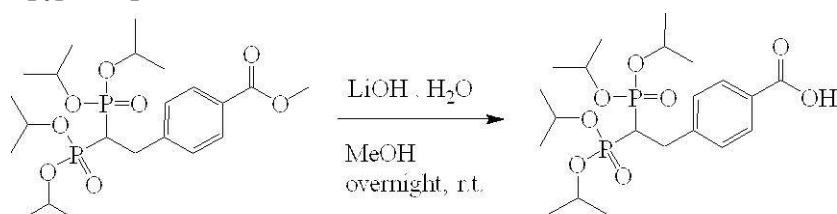
4 (2, 2-ビス(ジイソプロポキシホスホリル)エチル)安息香酸メチル(7)

【0 2 0 4】

窒素雰囲気下において50 mLの2首丸底フラスコの中で鉱物油中の60% NaH分散物(0.122 g、3.05 mmol)にTHF(3 mL)を添加した。攪拌しながらその懸濁液を0℃まで冷却し、メチレンジホスホン酸テトライソプロピル(0.69 mL、2.18 mmol)を徐々に添加した。その反応を放置して外界温度にし、水素ガスがその反応混合物から泡立つことを止めたところでその溶液を再び0℃まで冷却した。4(ブロモメチル)安息香酸メチル(0.5 g、2.18 mmol)をTHF(2 mL)中に溶解し、それを滴下しながら前記反応に添加した。それにより生じた溶液をゆっくりと外界温度に近づけながら一晩にわたって攪拌した。その後、反応混合物を0℃まで冷却し、H₂O(1 mL)でクエンチした。クエン酸の5%水溶液(30 mL)を添加し、Et₂O(3×30 mL)で抽出し、混合した有機物を塩水(50 mL)で洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥し、濾過し、減圧したで濃縮し、そしてEtOAc:Hex濃度勾配(10~100%)を使用するシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製してかすかに黄色の油として7を得た(0.323 g、30%の収率)。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 7.93 (d, J=8.0 Hz, 2H), 7.33 (d, J=8.4, 6.0 Hz, 2H), 4.79–4.683 (m, 4H), 3.88 (s, 3H), 3.24 (td, J=16.0, 6.4 Hz, 2H), 2.50 (tt, J=24.0, 6.2 Hz, 1H), 1.34–1.24 (m, 24H)。³¹P NMR(162 MHz, Chloroform-d) δ 20.57。

【0 2 0 5】

【化 2 2】



7

8

【0 2 0 6】

4 (2, 2-ビス(ジイソプロポキシホスホリル)エチル)安息香酸(8)

【0 2 0 7】

8ドラムのガラス製バイアル瓶の中のMeOH(3 mL)中の7(0.278 g、0.583 mmol)の溶液にLiOH·H₂O(0.122 g、2.914 mmol)を添加し、それにより生じた溶液を一晩にわたって室温で攪拌した。その反応混合物を乾燥するまで蒸発処理し、残留物を水(30 mL)中に溶解し、そしてHCl(水溶液)(1 M)を添加してゆっくりとpH 3まで到達させた。それにより生じた混合物をCHCl₃(3×30 mL)で抽出した。混合した有機物をMgSO₄上で乾燥し、減圧下で濃縮して濃厚で透明な油を得た。収率：定量的。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃): δ

10

20

30

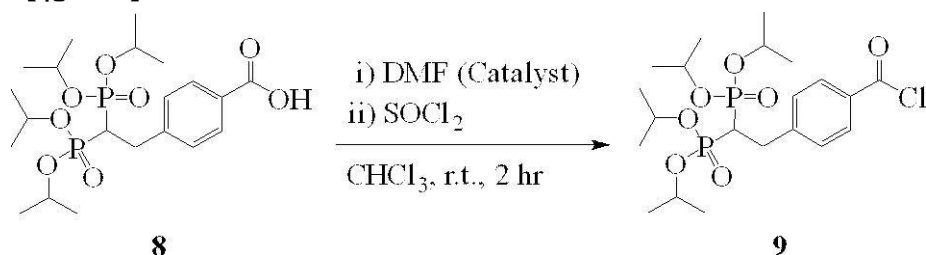
40

50

= 7.96 (d, J 6.4, 2H), 7.36 (d, J 6.4, 2H), 4.78 (sex, J 5.0, 4H), 3.27 (td, J 14.0, 4.8, 2H), 2.60 (tt, J 20.0, 4.8, 1H), 1.43–1.26 (m, 24H). ^{31}P NMR (162 MHz, Chloroform-d) δ 20.57.

【0208】

【化23】



10

【0209】

テトライソプロピル (2 (4 (クロロカルボニル) フェニル) エタン-1, 1-ジイル) ビス (ホスホネート) (9)

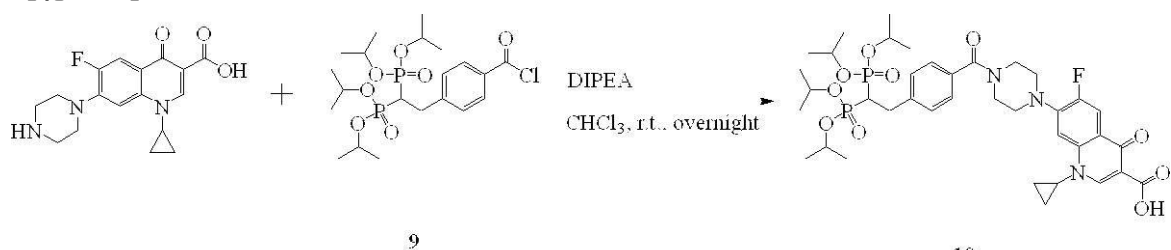
【0210】

窒素雰囲気下において化合物 8 (0.162 g、0.339 mmol) をクロロホルム (1 mL) 中に溶解し、そして触媒量の DMF (1.3 μL 、0.017 mmol) を添加した。塩化チオニル (49.2 μL 、0.678 mmol) をゆっくりと添加し、その反応を 2 時間にわたって室温で撹拌した。溶媒を真空下で除去して透明な油を得た。さらに操作せずに生成物を次の工程にすぐに使用した。収率：定量的。

20

【0211】

【化24】



30

【0212】

7 (4 (4 (2, 2-ビス (ジイソプロポキシホスホリル) エチル) ベンゾイル) ピペラジン-1-イル) -1-シクロプロピル-6-フルオロ-4-オキソ-1, 4-ジヒドロキノリン-3-カルボキシレート (10)

【0213】

シプロフロキサシン (0.112 g、0.339 mmol) をクロロホルム (1 mL) 中に懸濁し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (354.3 μL 、2.034 mmol) を添加した。新しく作製された化合物 9 をクロロホルム (1 mL) 中に溶解し、徐々に前記シプロフロキサシン：DIPEA 懸濁液に添加した。反応混合物をホイルで覆い、室温で一晩にわたって撹拌した。翌日、溶媒を真空下で除去し、それにより生じた粗製物を DCM (5 mL) 中に溶解し、中程度のフリット漏斗に通して濾過し、そしてより多くの DCM (3 $\times$ 5 mL) で洗浄した。濾液を真空下で濃縮し、MeOH : DCM 濃度勾配 (0 ~ 10 %) を使用するシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりさらに精製して徐々に固化する粘性の有る油として 10 を得た (0.226 g、84 % の収率、1.8 当量の DIPEA 塩)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.79 (s, 1H), 8.06 (d, J 12.8, 1H), 7.38 (m, 5H), 4.80–4.73 (m, 4H), 4.00 (s, br, 4H), 3.56–3.53 (m, 1H), 3.33–3.20 (m, 6H), 2.50 (m, 1H), 1.45–1.3

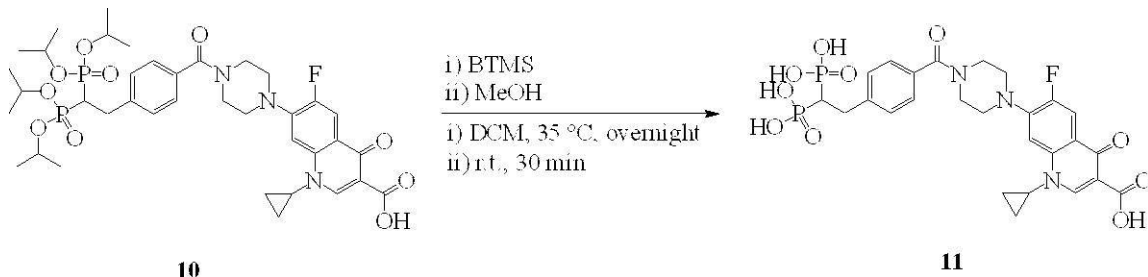
40

50

8 (m, 2H), 1.32–1.25 (m, 24H), 1.23–1.19 (m, 2H). ^{31}P NMR (162 MHz, Chloroform-d) δ 20.77.

【0214】

【化25】



10

【0215】

1-シクロプロピル-7-(4-(4-(2,2-ジホスホエチル)ベンゾイル)ピペラジン-1-イル)-6-フルオロ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸 (11)

【0216】

8ドラムのガラス製バイアル瓶の中で化合物10 (0.108 g、0.136 mmol) をDCM (700 μL) 中に溶解し、BTMS (686.0 μL 、5.200 mmol) を添加した。そのバイアル瓶にキャップをし、ホイルで覆い、且つ、攪拌しながら35 °Cで一晩にわたって加熱した。翌日、溶媒を真空下で除去し、粗製物をMeOH (2 mL) でクエンチした。それにより生じた溶液を室温で30分間にわたって攪拌した。溶媒を真空下で除去してオレンジ色の油を得た。数滴の水を添加して黄色の固形物を沈殿させた。より多くのMeOH (2 mL) を添加し、中程度のガラス製フリット漏斗を使用して、それにより生じた懸濁液を濾過した。それにより生じた固形物をMeOHでさらに洗浄して黄色の粉末を得た (0.070 g、82%の収率)。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O , pH 7.5): δ = 8.54 (s, br, 1H), 7.89 (m, 1H), 7.64 (m, 1H), 7.54 (d, J 8.0, 2H), 7.44 (d, J 8.0, 2H), 4.79 (m, overlap with D_2O , 4H), 4.00 (s, br, 2H), 3.79 (s, br, 2H), 3.47 (s, br, 2H), 3.34 (s, br, 2H), 3.21 (td, J 14.0, 6.4, 2H), 2.30 (tt, J 22.0, 6.6, 1H). ^{31}P NMR (162 MHz, Chloroform-d) δ 19.12. ESI-MS m/z (-): 622.24 [M-H].

20

30

【0217】

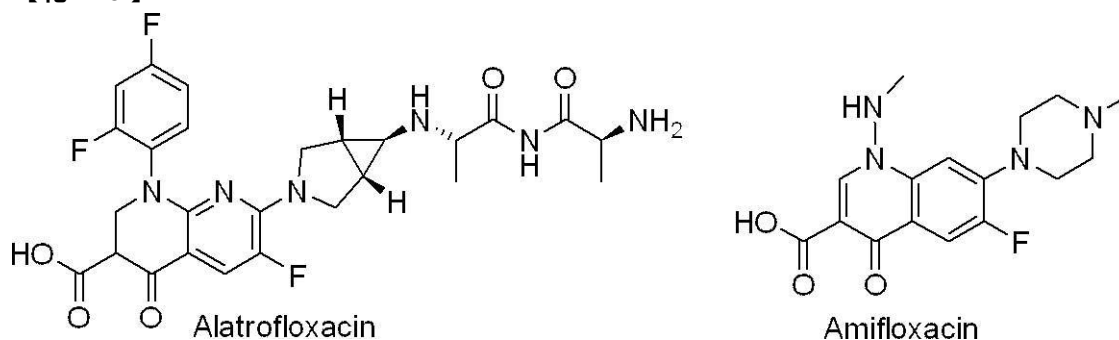
実施例3

前記BP複合体に含めることが可能なキノロンの非限定的な例

フッ素化キノロン

【0218】

【化26】

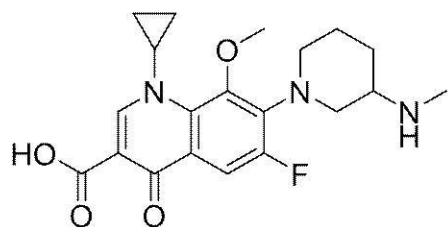


40

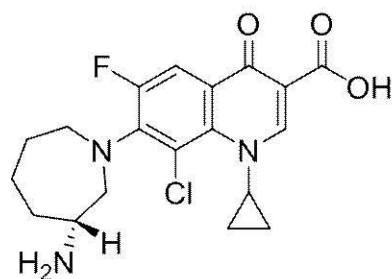
【0219】

50

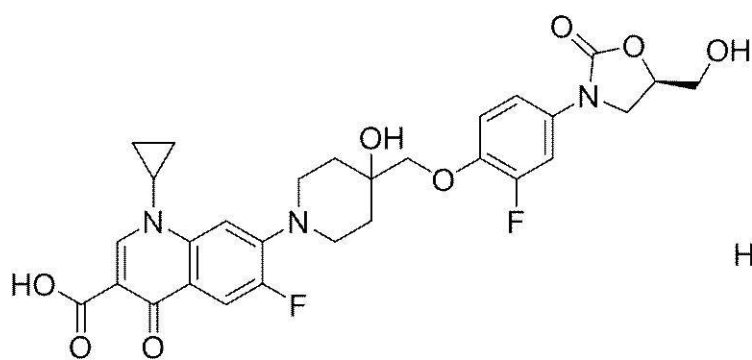
【化 2 7】



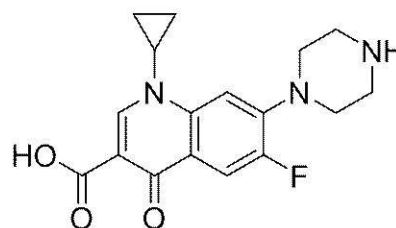
Balofloxacin



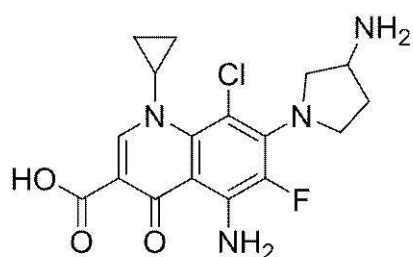
Besifloxacin



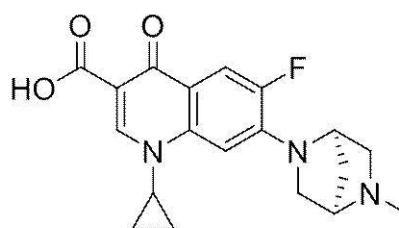
Cadazolid



Ciprofloxacin



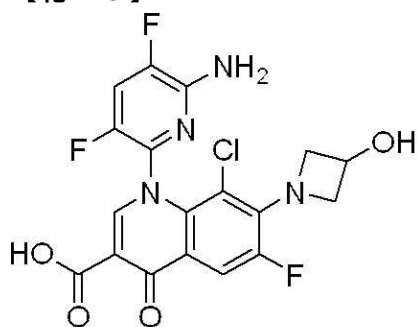
Clinafloxacin



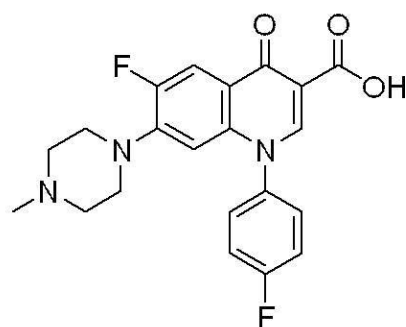
Danofloxacin

【 0 2 2 0】

【化 2 8】



Delafloxacin



Difloxacin

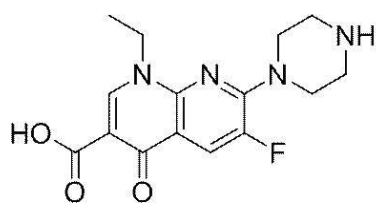
10

20

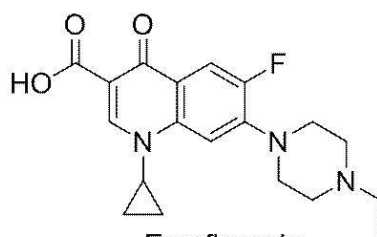
30

40

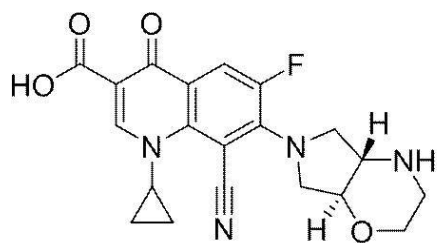
50



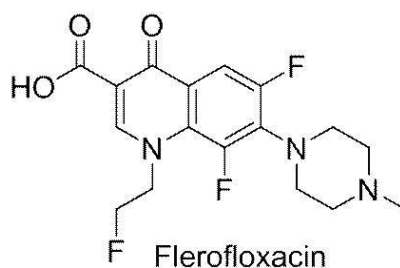
Enoxacin



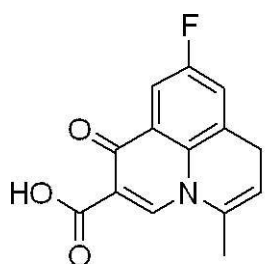
Enrofloxacin



Finafloxacin



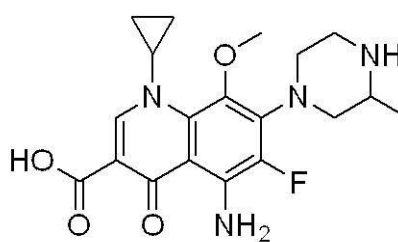
Flerofloxacin



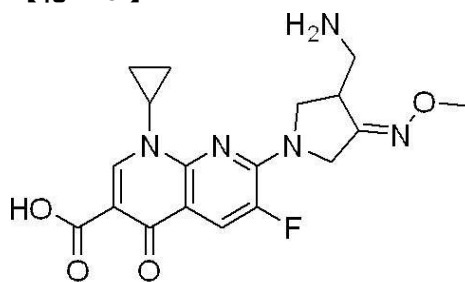
Flumequine

【 0 2 2 1 】

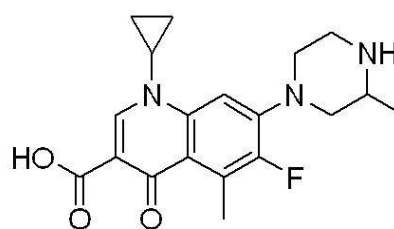
【化 2 9 】



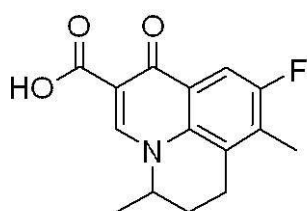
Gatifloxacin



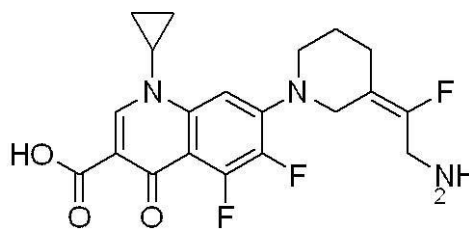
Gemifloxacin



Grepafloxacin



Ibafoxacin



JNJ-Q2

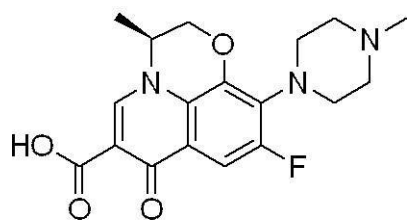
10

20

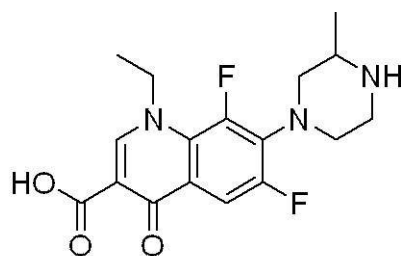
30

40

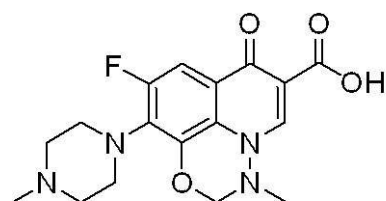
50



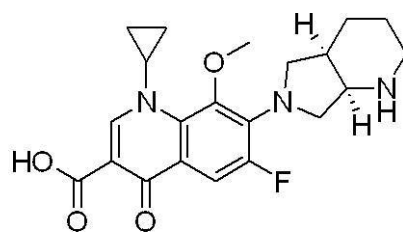
Levofloxacin



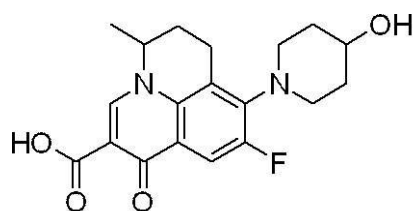
Lomefloxacin



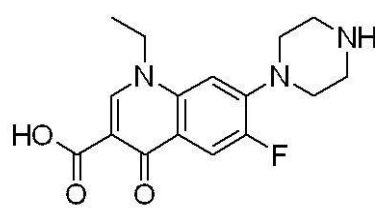
Marbofloxacin



Moxifloxacin



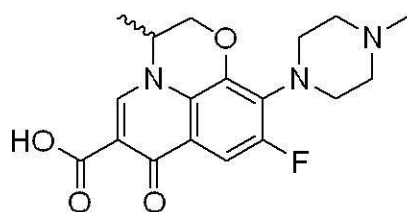
Nadifloxacin



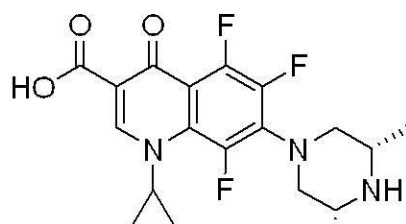
Norfloxacin

【 0 2 2 2 】

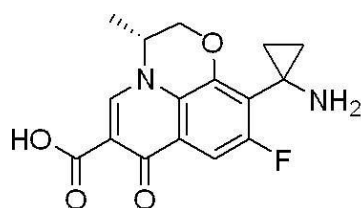
【 化 3 0 】



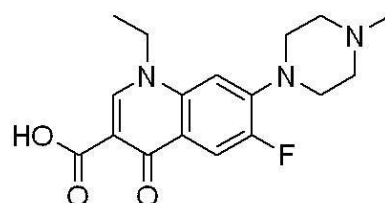
Ofloxacin



Orbifloxacin



Pazufloxacin



Pefloxacin

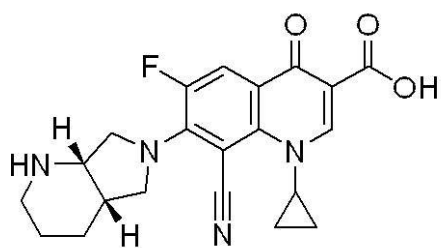
10

20

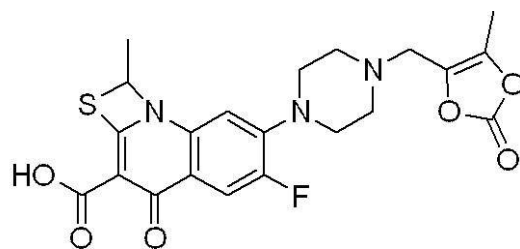
30

40

50

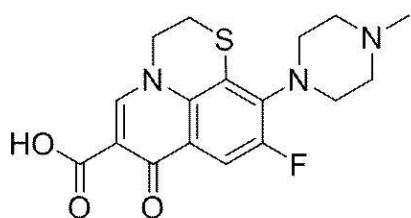


Pradofloxacin



Prulifloxacin

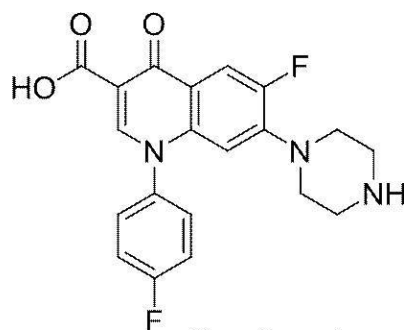
10



Rufloxacin

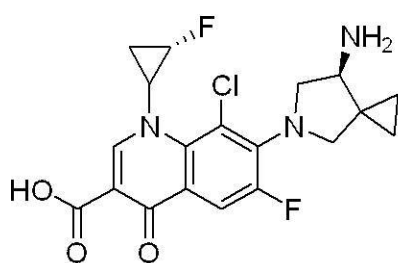
【 0 2 2 3 】

【 化 3 1 】

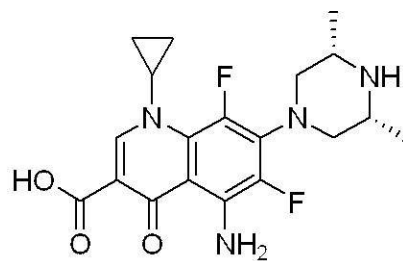


Sarafloxacin

20

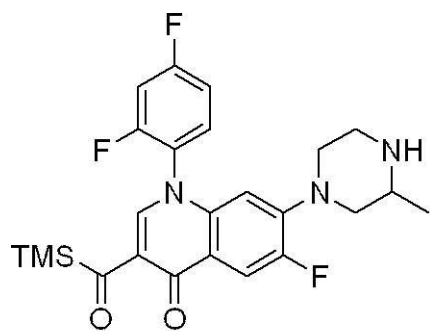


Sitaflaxacin

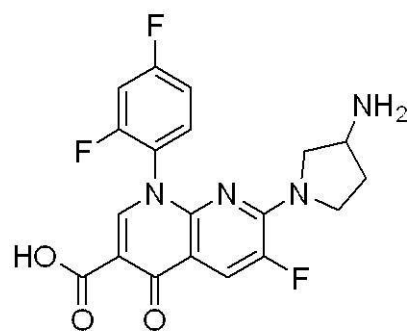


Sparfloxacin

30



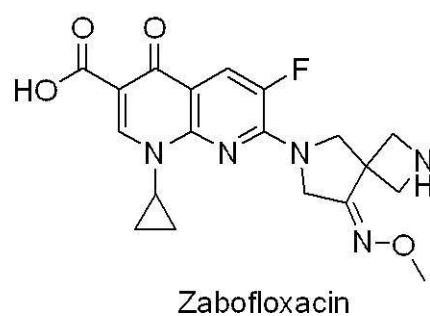
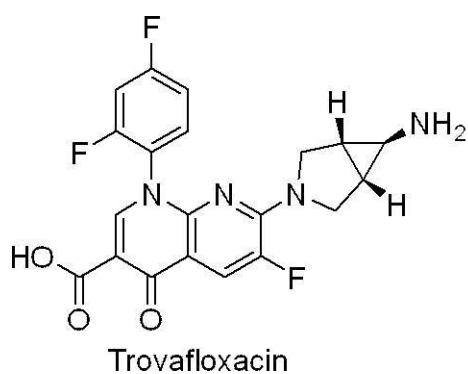
Terafloxacin



Tosufloxacin

40

50



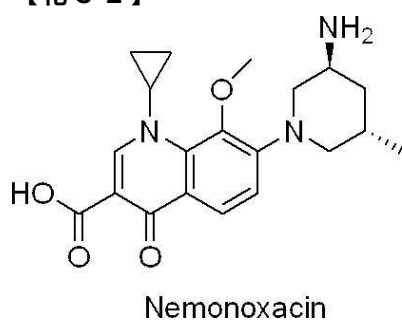
10

【 0 2 2 4 】

次のものは非フッ素化キノロンの一例である。

【 0 2 2 5 】

【化 3 2 】



20

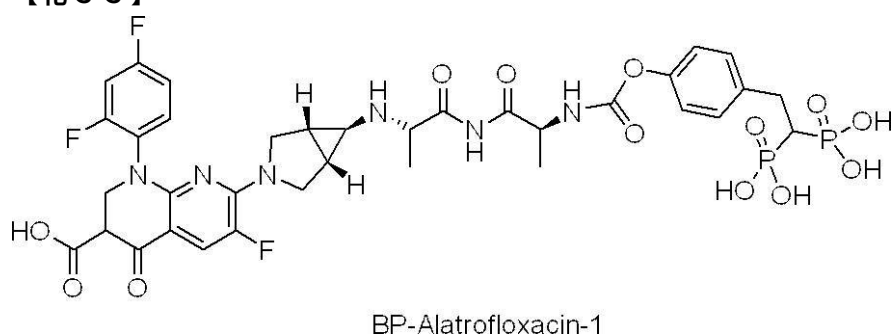
【 0 2 2 6 】

実施例 4

次のものは本明細書に記載される B P -キノロン複合体の非限定的な例である。

【 0 2 2 7 】

【化 3 3 】

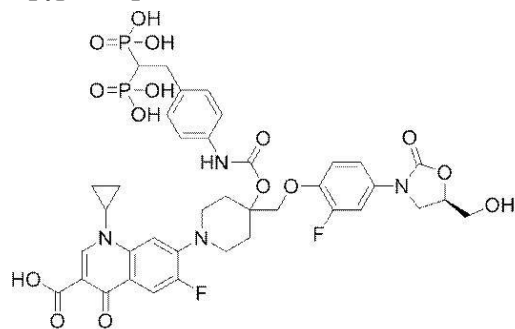


30

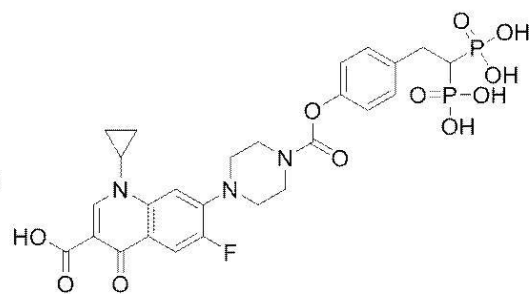
40

50

【化 3 5】

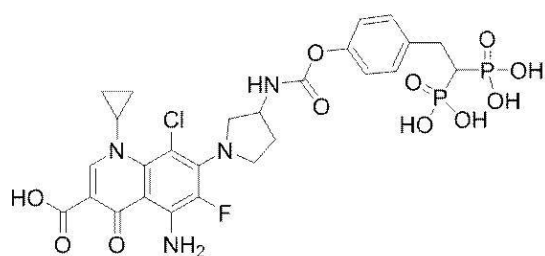


BP-Cadazolid-2

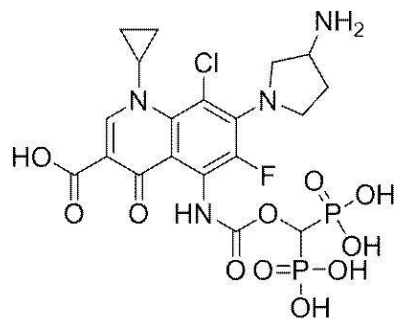


BP-Ciprofloxacin (6)

10

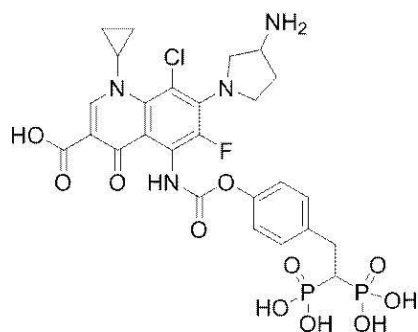


BP-Clinafloxacin-1



BP-Clinafloxacin-2

20

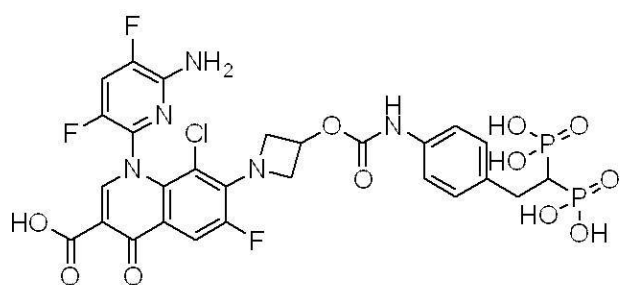


BP-Clinafloxacin-3

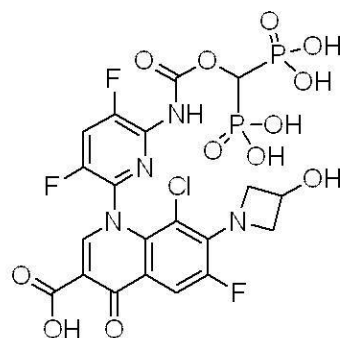
30

【 0 2 3 0 】

【化 3 6】



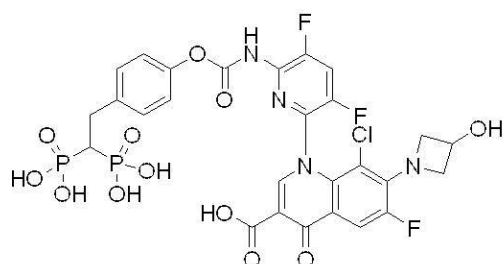
BP-Delafoxacin-1



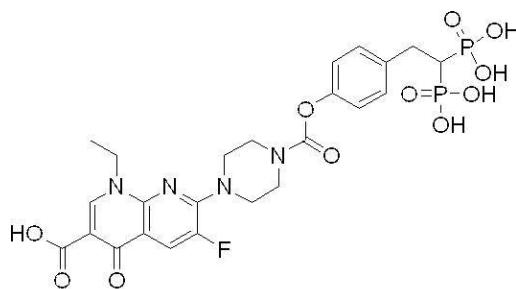
BP-Delafoxacin-2

40

50

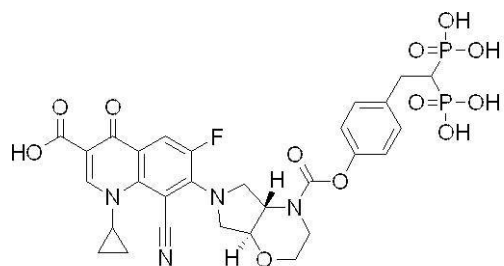


BP-Delafloxacin-3

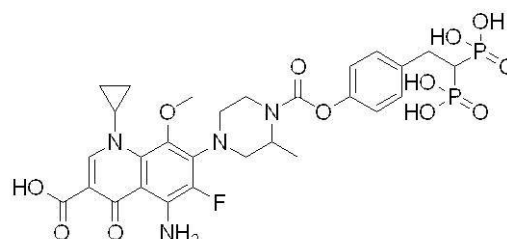


BP-Enoxacin

10



BP-Finafloxacin

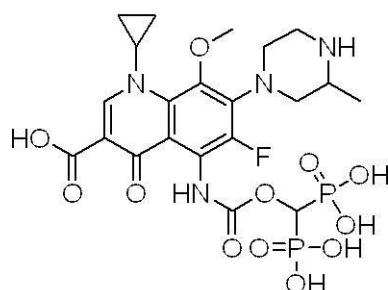


BP-Gatifloxacin-1

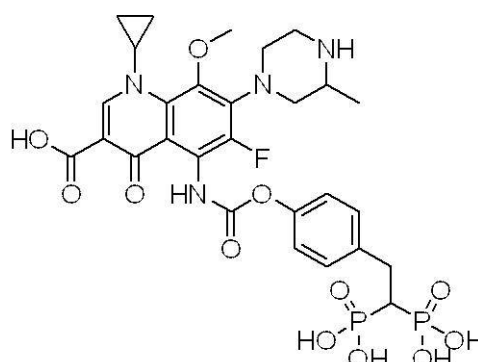
20

【 0 2 3 1 】

【 化 3 7 】

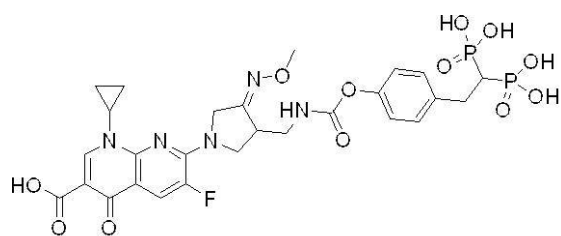


BP-Gatifloxacin-2

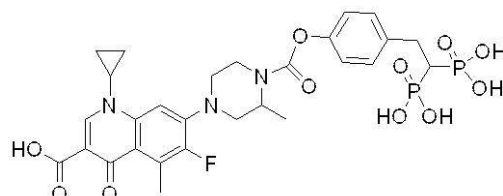


BP-Gatifloxacin-3

30

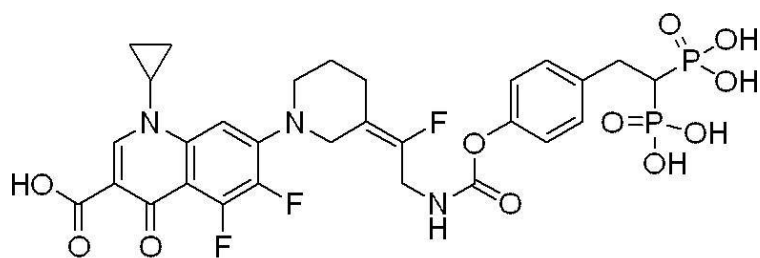


BP-Gemifloxacin



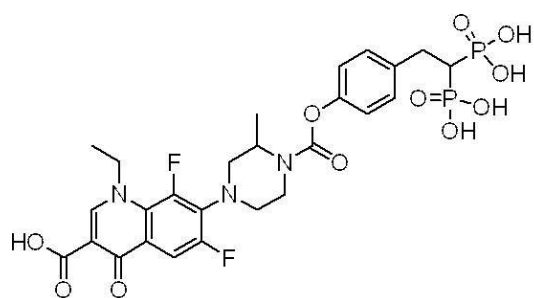
BP-Grepafloxacin

40

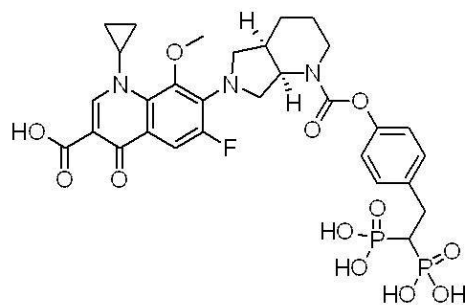


BP-JNJ-Q2

50



BP-Lomefloxacin

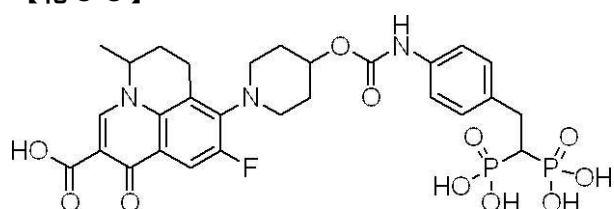


BP-Moxifloxacin

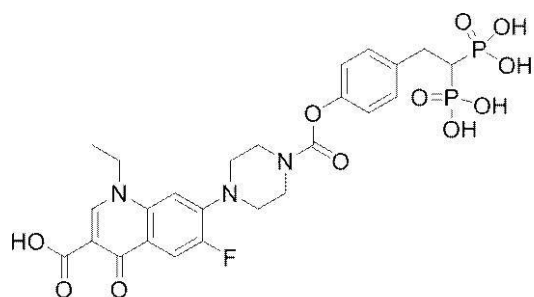
10

【 0 2 3 2 】

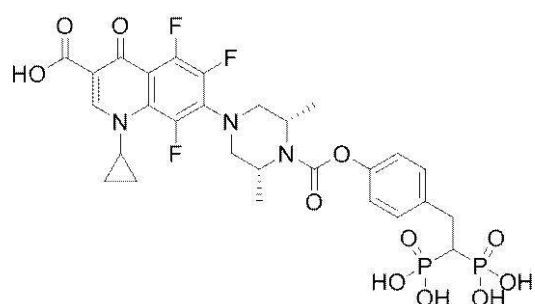
【 化 3 8 】



BP-Nadifloxacin

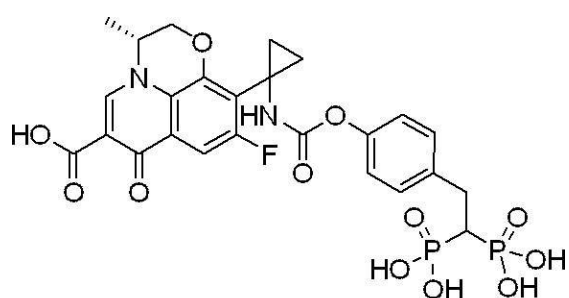


BP-Norfloxacin



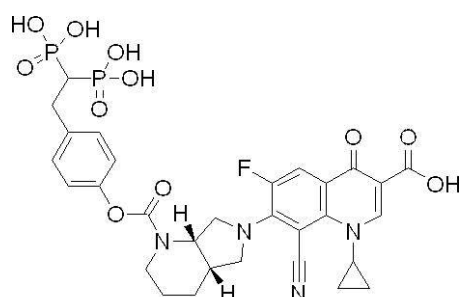
BP-Orbifloxacin

20



BP-Pazufloxacin

30



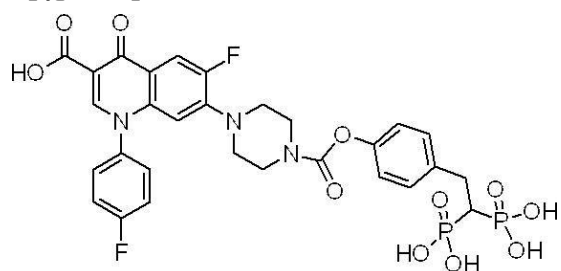
BP-Pradofloxacin

40

50

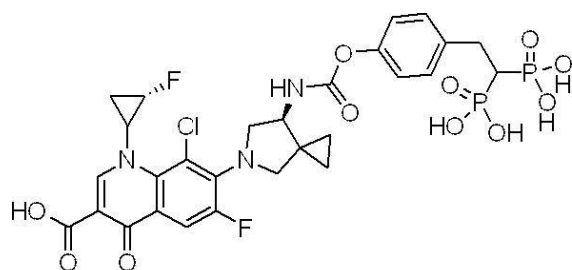
【 0 2 3 3 】

【化 3 9】



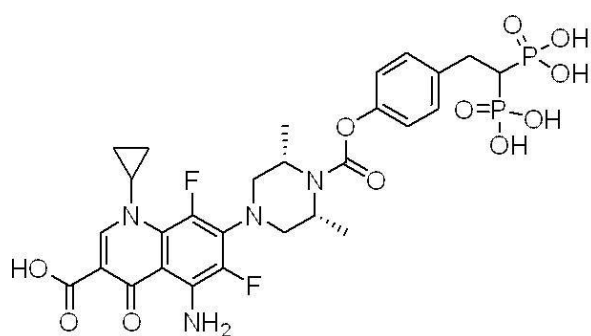
BP-Sarafloxacin

10

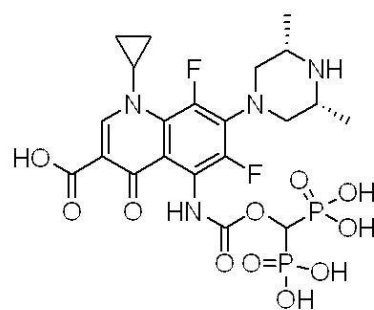


BP-Sitafloxacin

20

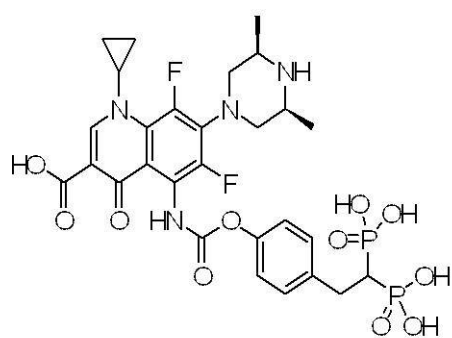


BP-Sparfloxacin-1

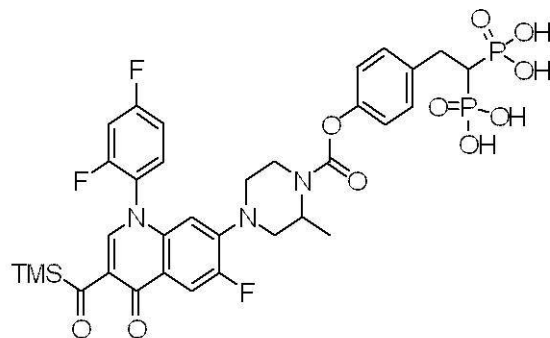


BP-Sparfloxacin-2

30



BP-Sparfloxacin-3



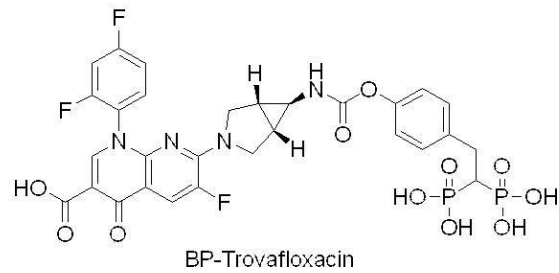
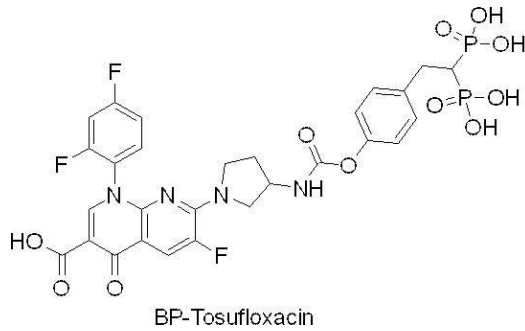
BP-Temafloxacin

40

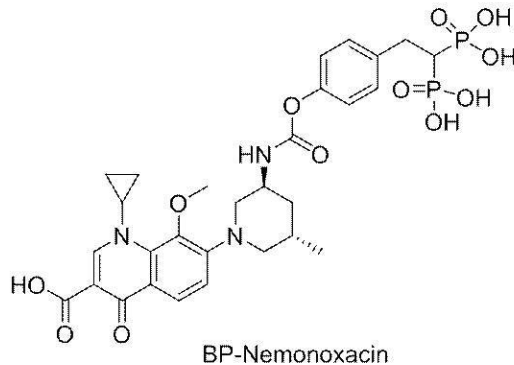
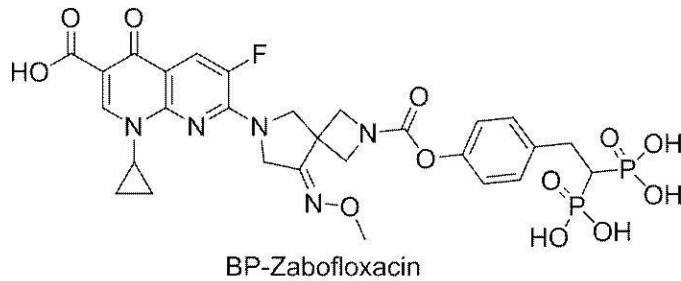
【 0 2 3 4 】

50

【化 4 0】



10



20

【 0 2 3 5】

30

実施例 5

感染性骨疾患、すなわち骨髓炎はヒト医療¹及び獣医医療²における世界的な大問題であり、四肢欠損に関わる後遺症³及び死亡⁴の可能性のために深刻な問題であり得る。骨髓炎を治療するための現行のアプローチは主に抗菌剤によるものであり、静脈内長期アプローチであることが多く、感染を管理するために多くの症例で外科的介入を伴う。長骨骨髓炎の症例の大半における原因病原体が黄色ブドウ球菌のバイオフィルムであり、これらの微生物はそれらのプランクトン型（浮遊型）の対応物と対照的に骨（図 1）に結合する⁵。

【 0 2 3 6】

40

多くのバイオフィルム病原体が培養不可能であり、且つ、増殖速度及び抗菌剤耐性に関して変化した表現型を示すため、骨髓炎のバイオフィルム介在性は临床上及び実験上の設定において重要である^{5、6}。整形外科領域における感染症について高い成功率の抗菌剤治療が一般的に未だに実現していない理由は耐性バイオフィルム病原体の発生、骨内への抗菌剤の低い浸透度、及び全身毒性に関連付けられている有害事象³と共に従来の抗生物質によってバイオフィルムを根絶することが困難であるということによって部分的に説明される。

【 0 2 3 7】

骨髓炎治療に伴う多くの困難⁷を克服するため、全身曝露を最小限にしながら抗生物質の比較的の高い、又は比較的に持続的な局所的治療濃度を骨において達成するための骨標的複合体を使用する薬物送達アプローチに関心が高まっている⁸。骨吸着性ビスホスホネ

50

ート（ＢＰ）へのフルオロキノロン抗生物質の複合体化（図１３）は各成分の安全性についての長期の実績及びそれらの有利な生化学的特性のために有望なアプローチである^{9、10}。シプロフロキサシン（図１３）はこの背景での目的再設定に対して幾つかの利点を有する。すなわち、１）シプロフロキサシンでは経口投与又は静脈内投与が可能であり、それらの投与は生物学的に見て比較的に同等であり、２）シプロフロキサシンは緑膿菌及び幾つかの他の病原体が原因の骨及び関節の感染症について既にFDAにより認可されており、且つ、それらの感染症を適応症としており、３）シプロフロキサシンは最も一般的に出会う黄色ブドウ球菌（メチシリン感受性）のような骨髄炎病原体、長骨骨髄炎については緑膿菌¹¹、及び顎骨骨髄炎についてはアグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンス¹²を含む広範囲の抗菌活性を有し、４）シプロフロキサシンは臨床的に達成可能な用量において殺菌活性を示し¹³、５）シプロフロキサシンはフルオロキノロンファミリーの中で最も安価な薬品である。

【０２３８】

しかしながら、大半の抗生物質のようにフルオロキノロン類にはプランクトン型の同じ細菌と比較してバイオフィームに対する活性が低下するという難点がある。この活性の低下は他の多くの細菌株及び抗生物質分類クラスに加えて黄色ブドウ球菌に対するシプロフロキサシンについて具体的に示されている^{14～17}。そのような研究により、バイオフィームはそれらのプランクトン型の対応物と比較すると同じ抗菌剤に対して一桁～数桁高い耐性を有し得ることがこれまでに示されている。このことは、抗生物質の比較的の高い局所的濃度を原因バイオフィームに対して達成し、且つ、潜在的な耐性を克服するために骨標的化アプローチの重要性を骨髄炎治療に対して強調する。

【０２３９】

前記ＢＰファミリーの特異的な骨標的特性のためにこれらの薬品は骨髄炎薬物療法における骨への抗生物質の標的化にとって理想的なキャリアとなっている^{18～20}。ＢＰはリン酸カルシウム鉱物質と強力な二座配位結合及び三座配位結合を形成し、結果としてハイドロキシアパタイト（HA）、特に感染及び炎症部位を含む代謝活性が高い骨格部位のハイドロキシアパタイトに濃縮される²¹。ＢＰは化学的分解と生物学的分解の両方に対する例外的な安定性も示す²²。ＢＰ－フルオロキノロンの抗菌活性は複雑であり、試験した病原体の特定の株、抗生物質及び共有結合したＢＰ部分の選択、それらの２成分の間のテザー長、前記ＢＰの骨結合親和性、前記ＢＰの吸着脱離平衡、並びに複合体化に使用された結合部分の安定性／易変性及びカイネティクスに関連付けられる^{18～20}。したがって、複合体が循環中では安定であるが骨表面では不安定である場合により多くの最適化の機会と成功の機会がこの状況で「ターゲット・リリース」リンカー戦略（図１３）によって提供され得ることが蓄積されつつある証拠から示唆される。したがって、我々は代謝により加水分解可能なカルバメートリンカーを介したフェニルＢＰ部分へのシプロフロキサシンの複合体化によって骨髄炎薬物療法における抗生物質の投与に見られる問題が軽減されるはずであると仮説を立てた。その切断可能カルバメート結合が特定の組織における標的化と分離に適うように設計された多数の薬品における重要な機能であり^{23、24}、酸性及び酵素環境（例えば炎症又は感染症）が存在する中で血清中の安定性及び感染骨表面での易変性などの薬物動態上の利点をもたらす²⁵。

【０２４０】

骨ターゲット・リリース戦略を利用した最近の一つの明確な成功事例がMoriokaら²⁶によって提示されており、彼らは比較的に安定なアミドペプチド結合の切断可能変異体（カルバメート）を使用してエストラジオール類似複合体を設計した。この結合の幾つかのバージョンが、薬理学的に活性を有する変異体（アリアルカルバメート）が見つかる前に試みられた。重要なことに、彼らは単体で投与されたエストラジオールの骨に対する効果と同様の効果が（エストラジオール単体の合計の用量よりもほぼ5,600倍低い）単回用量の同様に連結されたＢＰ－エストラジオール複合体によって生じることを実証した²⁶。エストラジオール単体と比較して全身及び子宮組織において効果が最小であったことから前記複合体はより高い治療指数も提供した。Arnsらが完成させた薬物動態

10

20

30

40

50

学的研究²⁷は比較的に不安定なリンカーを含むB Pープロスタグランジンに基づく研究におけるこの劇的な効力増強と一致する。抗菌分野におけるこのアプローチの他の合成例がマクロライド系について報告されている²⁸。しかしながら、アルキルカルバメートが調べられただけであり、その他の成功例が存在しないことからターゲット・リリース戦略は生化学的標的に依存すると同時に（各構成成分の官能基の適合性を考慮すると）化学的分類に依存するようであり、そしてその戦略を使用するためにはいずれか特定の化学分類に適うような設計をする必要があることが示唆される。

【0241】

本実施例ではアリールカルバメートB Pーカルバメートーシプロフロキサシン複合体6（BV600022）について説明し、一般的な骨髄炎病原体に対する抗菌活性、及びプロテゼ周囲骨髄炎の動物モデルにおけるインビボ安全性と効力についてその複合体を評価する。比較的の高い臨床上又は技術移転上の妥当性を提供するために本実施例での研究はプラクティン型培養物に加えてバイオフィームモデルとバイオフィーム方法論を活用している。

【0242】

本明細書では時にはこの化合物を「化合物6」、「複合体6」、又は単に「6」と呼ぶ場合がある。同様に他の化合物又は複合体も例えば「化合物11」、例えば「複合体11」と呼ぶ場合があり、又は単に化合物の場合暗号（例えば11）によって呼ぶ場合がある。

【0243】

結果

化学

比較的に薬理学的に不活性の4ーヒドロキシフェニルエチリデンB P（3）から始まる6の全体的な合成スキームが図16に示されている。図16に提示されているスキームの試薬は次の通りであった。試薬及び条件：（a）BTMS（2当量）、Et₂O、0℃～室温、17時間、収率95%。（b）i）テトライソプロピルメチレンビスホスホネート（1当量）、NaH（1当量）、THF、室温、10分；ii）1（1当量）、室温、2時間、収率52%。（c）Pd/C（触媒）（0.07当量）、H₂、MeOH、室温、終夜、収率88%。（d）4ーニトロフェニルクロロホルマー（1.1当量）、Et₃N（3当量）、DCM、室温、2.5時間、収率44%。（e）シプロフロキサシン（1.2当量）、水（pH8.5）、THF、0℃～室温、終夜、収率52%。（f）i）BTMS（過剰量）、DCM、35℃、24時間、ii）MeOH、室温、終夜、収率86%。

【0244】

このB P設計の論理的根拠は、不必要な前記B P部分の骨吸収抑制活性を抑制しながらその骨探索能力を保持し、交絡因子を最小限にして親シプロフロキサシン化合物に起因する抗菌作用の評価に集中することであった。B Pリガンドは、解剖学的感染部位において抗菌作用に加えて骨組織保護という二重作用を提供することが必要である場合は（様々な効力の）骨吸収抑制機能性を有するようにも設計可能である。弱い結合親和性によって標的化効率が低下することがこれまでの研究¹³、¹⁴から実証されているため、骨結合親和性とテザー長を考慮してこのフェニルB Pを選択した。アリールカルバメートをリンカーとして使用することによりこれまでに得られたB Pーフルオロキノロン複合体と比べて最適な血漿中安定性と骨上での適切な分離がこの生化学的標的に提供され得ると考えられた。

【0245】

さらに、カルバメート結合と対照的にアミド結合を有する類似のB Pーシプロフロキサシン複合体を対照複合体11（BV600026）として図31に示されるスキームによって略述されるように合成した。図31に提示されているスキームの試薬は次の通りであった。試薬及び条件：（a）i）NaH（1.4当量）、THF、0℃～室温、1時間；ii）メチル4（ブromoメチル）ベンゾエート（0.7当量）、THF、0℃～室温、終夜、収率37%。（b）LiOH・H₂O（5当量）、MeOH、室温、終夜、収率91%。（c）SOCl₂（2当量）、DMF（0.05当量）、DCM、室温、2時間、定

量的収率。(d) シプロフロキサシン (1 当量)、DIPEA (6 当量)、 CHCl_3 、室温、終夜、収率 65%。(e) i) BTMS (過剰量)、DCM、35℃、終夜、ii) MeOH、室温、30 分間、収率 82%。アミド複合体は親抗生物質を分離することができず、したがってこの例では 11 について確認されることが求められたインビトロ及びインビボで有効性が低いことがこれまでの研究によって示されている。

【0246】

BP-シプロフロキサシン複合体の抗菌特性

最小発育阻止濃度 (MIC) アッセイ：

骨感染症に関連するメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) 及びメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を含む一団の黄色ブドウ球菌臨床株に対する複合体 (6 及び 11) 及び親抗生物質であるシプロフロキサシンの両方の抗菌活性を標準的な実験室用プランクトン型培養システム中で評価した。EUCAST (欧州薬剤感受性試験委員会) ガイドライン²⁹に従うと、ディスク拡散阻止帯分析法の結果は 25~40 mm の範囲 (平均値: 31.5、SD: ± 5) の直径を示し、全ての株が親抗生物質であるシプロフロキサシンに対する EUCAST 臨床ブレイクポイントに従う抗菌薬感受性を示した。微量希釈法を用いる 8 株の黄色ブドウ球菌に対する 6 及び 11 の最小発育阻止濃度 (MIC) の結果が図 32 に示されている。基準とするために親化合物であるシプロフロキサシンの MIC を同時に決定し (図 32 参照)、それらの MIC が確定済み臨床ブレイクポイント²⁹と矛盾しないことを見出した。

【0247】

ハイドロキシアパタイト (HA) 結合アッセイ：

6 の抗菌効果を確定し、次に HA 結合能を評価しようとした。HA 球状体を前記微生物用培地に添加し、前記抗菌試験に使用された濃度と同様の様々な濃度の 6 を導入した。HA による前記複合体の顕著な吸着と保持が上清 (HA 球状体を含まない) の定量的分光分析によって確認された (図 18 及び図 5)。

【0248】

抗菌物質感受性試験 (AST) におけるプランクトン型黄色ブドウ球菌 ATCC-6538 株に対する pH の効果：

黄色ブドウ球菌 ATCC-6538 株は他の試験株と比較してシプロフロキサシンと 6 の両方に対して最低の MIC プロファイルを示した (図 32 参照) のでこの株をさらに詳しい調査のために選択した。この ATCC 株はよく知られた強固なバイオフィーム形成性病原体でもある。そのため、バイオフィームベースで臨床的に妥当なモデルでの抗菌活性の評価も促進しつつ、バイアス及び結果の過大評価を限定するために前記複合体を難しい病原体に対して試験した。酸性 pH と生理的 pH の両方で 6 を用いてプランクトン型黄色ブドウ球菌 ATCC-6538 株に対する抗菌物質感受性試験 (AST) を実施して複合体活性に対する pH の効果を評価した。生理的条件下で MIC 50 に到達するために必要とされる前記複合体濃度の半分で MIC 50 に到達することから酸性条件 (pH 5) 下では 6 の抗菌活性が全体的に改善されることが標準的な微量希釈法に由来する定量的な結果から示された (図 6 及び図 4)。これらの結果及び本明細書中のどこかに提示される結果では、最小阻害濃度の表現である MIC 50 又は MIC 90 はそれぞれ細菌量の 50% 又は 90% の減少を指し、最小バイオフィーム阻止濃度についてのバイオフィーム関連の表現 (MBIC 50 又は MBIC 90) はバイオフィーム細菌量の減少であることを除いて同様の減少 (50% 又は 90%) を指す。

【0249】

化合物 6 の時間殺菌アッセイ：

次に 6 を用いてカイネティクスアッセイを CLSI (米国臨床検査標準協会) 法³⁰に従って実施した。この複合体はこれまでに確定された MIC でプランクトン型黄色ブドウ球菌のメチシリン感受性 (ATCC-6538) 単離株とメチシリン耐性 (MR4-CIP S) 単離株を 1 時間以内、最大で 24 時間以内に殺菌し、細菌増殖を 100% 抑制することが結果より示された。前記 MIC 値の半分で細菌増殖の防止が 2 時間後に明確になり

、増殖の抑制が24時間後に対照の50%の割合であることもこれらのカイネティクス試験によって示された（例えば図7）。

【0250】

バイオフィルムに対する6の抗菌効果の評価：

次に2種類の異なる基材（ポリスチレンディスク及びHAディスク）上に予め形成された細菌バイオフィルムに対して化合物6を試験してバイオフィルムに対する抗菌効果を評価し、且つ、観察された抗菌効果において基材結合特性が何らかの役割を担うかどうかとも判定した。黄色ブドウ球菌（ATCC-6538）のバイオフィルム及び追加として緑膿菌（ATCC-15442）のバイオフィルムを基材としてのポリスチレン又はHAの上で増殖させ、抗菌活性の評価のためにそれらのバイオフィルムを様々な濃度の6に曝露した。緑膿菌はグラム陰性病原体であり、且つ、有病率の点でグラム陽性黄色ブドウ球菌よりも頻度が低い2番目に最も一般的な骨髄炎の臨床病原体であるので緑膿菌をここで。例えば、図8はバイオフィルム増殖のための基材としてのポリスチレンの結果を示しており、6の最小バイオフィルム阻止濃度（MBIC50）は黄色ブドウ球菌ATCC-6538については15.6~31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、それはプランクトン型培養物状態のこの株に対するMICに相当した。その試験濃度範囲では緑膿菌ATCC-15442株についてMBIC50が観察されず、MBIC90はどちらの病原体についても観察されなかった。

10

【0251】

しかしながら、HAディスクがバイオフィルム基材として使用されると顕著な殺菌活性が6について認められた。図33に示されるように、全ての試験濃度のこの複合体によって統計学的に有意な（ $p < 0.05$ 、クラスカル・ウォリス検定）殺菌活性が生じ、コロニー形成単位（CFU）の低下が起こった。黄色ブドウ球菌ATCC-6538株に対して6のMBIC50は16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、MBIC90は100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。この病原体に対して親薬品であるシプロフロキサシンのMBIC90は8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。しかしながら、緑膿菌ATCC-15442株に対してシプロフロキサシンはこの設定では抑制活性又は殺菌活性を持たず、一方で前記複合体は酸性条件及び生理的条件下において50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で殺菌性であり、且つ、酸性条件で抗菌活性の改善が認められる黄色ブドウ球菌と対照的に生理的条件下において殺菌活性の改善を示した。

20

【0252】

予防的抗菌アッセイ：

次に、プランクトン型培養物とバイオフィルム培養物を用いる予防型の実験設定であって、骨髄炎薬物療法向けの抗生物質による予防シナリオにおいて臨床的妥当性を有する可能性もある前記実験設定において6を使用する抗菌試験を実施した。ここではHA球状体を様々な濃度の6に導入し、そして24時間にわたって黄色ブドウ球菌と共にインキュベートし、そして定量的評価によって例えば図10に示されるように15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ という低い濃度から最大で250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の6の濃度で細菌増殖が示されず、0.24~7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲の複合体濃度では強く抑制された最小の細菌増殖が示された。

30

【0253】

次に黄色ブドウ球菌ATCC-6538株バイオフィルムを治療する能力について前記カルバメート複合体6を試験するために使用した実験条件と類似の実験条件下で前記アミド複合体（11）を試験した。HA上で増殖して定着した黄色ブドウ球菌バイオフィルム、及び予防実験設定においてバイオフィルム増殖の前に11で前処理されたHA上で増殖して定着した黄色ブドウ球菌バイオフィルムに対して11の活性を評価したところ、6を試験するために使用された用量よりも高い用量であっても11の抗菌活性は図34に示されるように両方の場合でわずかなものであった。

40

【0254】

前処理されたHA上での黄色ブドウ球菌ATCC-6538バイオフィルム形成を防止する能力について6を試験すると、前記複合体は親抗生物質と比較して、且つ、顕著な抗菌活性を示さなかった11と対照的に、優れた抗菌活性を示した。図11は定量的バイオ

50

フィルム培養の結果と24時間の増殖後のCFU数を示しており、親薬品であるシプロフロキサシンは100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度であらゆるバイオフィルム増殖を抑制し、一方で6は10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度であらゆる増殖を抑制した。シプロフロキサシンの分子質量は6の分子質量のおよそ半分であるので6はシプロフロキサシン単体と比較して完全殺菌作用の達成に関して活性が20倍高かった。

【0255】

インビボ安全性及び効力：

6が有望な活性をインビトロで示したので我々はプロテゼ周囲骨髄炎の動物モデルにおいて薬品安全性と効力をインビボで評価しようとした。このモデルはバイオフィルム介在性疾患及び宿主応答をインビボで研究するために技術移転上の価値に適うように特異的に開発されたユニークな自家製の顎骨インプラント周囲骨髄炎モデルである³¹。感染の結果として生じる骨溶解は骨のあらゆる高代謝部位のように高濃度のBP複合体の誘引（標的化）にとって重要であり、後にこの疾患骨表面で前記複合体の活性シプロフロキサシン成分を分離するためにも重要であるため、全身治療レジメンが利用されることからこのアッセイはあらゆる感染した骨表面のモデル化にも役立つ。簡単に説明すると、ラットの正常な細菌叢に常在性の細菌ではなく、顎骨感染症に特異的な細菌である顎骨骨髄炎病原体アグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンス（Aa；野生型R型株D7S-1；a血清型）のバイオフィルムを10⁹ CFUで小型チタン製インプラント上に予備接種した。我々の動物試験の前に親薬品であるシプロフロキサシンに対するAaの感受性を確認するため、以前に記載された長骨骨髄炎病原体について実施されたようにASTアッセイとMICアッセイを実施した。ディスク拡散阻止帯分析法によって40mmを超える直径が明らかになり、且つ、MIC90は2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、親薬品であるシプロフロキサシンに対するこの微生物の強い感受性が示された。AaはpH感受性ピオチン化シプロフロキサシンプロドラッグに対する感受性についても以前に試験されており、親抗生物質に対して感受性であることが分かった³²。本研究におけるこれまでの病原体のように、6に対する感受性についてHA上で増殖したAaバイオフィルム病原体を試験し、我々の複合体が図35に示されるような効果的な抗菌活性を示すことが分かった。

【0256】

インビトロでAaバイオフィルムがインプラント上に定着した後に各ラットの顎骨にこれらのインプラントを外科的に移植する。動物に麻酔をかけ、頬を鉤で引っ張り、そして手作業で骨切除部にインプラントを挿入し、且つ、固定することができるよう経粘膜骨切除術を実施する。2個のバイオフィルム接種インプラントを各ラットの口蓋骨の両側に設置する（n=12ラット、合計24インプラント）。標準的、且つ、再現可能な量の生きた細菌がこのモデルによって各インプラント上によく定着したバイオフィルムとして形成されるが、我々はそのバイオフィルムがインプラント設置から数週間にわたってインビボで存続し、局所的に感染症、炎症、及び骨破壊の原因となることをこれまでに実証している³¹。

【0257】

術後1週間でインプラント周囲感染症が確立されたところで、実験の項において明記された投与計画においてこれらの動物に6、陽性対照としてシプロフロキサシン単体、及び陰性対照として無菌エンドトキシン非含有生理食塩水を投与した。適切な投与濃度を決定するため、げっ歯類においても類似のターゲット・リリース戦略を使用する以前の試験及び薬物動態データに基づいて前記複合体のおおよその初回投与量を計算した¹³、²⁶。サンプルサイズの見積もり及びこの動物モデルに関するこれまでの経験に基づいて0.1 mg/kg、1 mg/kg、及び10 mg/kgと徐々に増加する用量に相当するモル当量の6により群当たり2匹の実験動物において抗菌活性を決定することが可能になり得る³²。動物は全身麻酔下で腹腔内注射により投与され、全ての化合物が適切なpHの無菌注射可能生理食塩水中に構成された。腹腔内注射は尾静脈注射のような他の非経口的方法と比べてげっ歯類動物では投与が簡単であり、且つ、胃腸投与後のシプロフロキサシンの薬物動態が良好な生物学的利用率を示すことから腹腔内注射を活用した。そのような投与の

後に達成される血清中薬品レベルは静脈内投与による血清中薬品レベルよりもわずかに低いが同等であり、初回通過代謝後に実質的な消失が無い³³。薬物療法から1週間後に全ての動物を殺処理し、インプラント周囲の硬組織と軟組織の一括摘出を実施し、微生物負荷量の定量的評価のためにそれらの組織を均質化した。

【0258】

全ての動物が前記薬物療法をよく忍容し、皮膚の注射部位反応も炎症も無かった。治療中に忍容性について大きな問題の兆候は無かった。治療効果を図36に示されるように生きた細菌の減少量の対数（組織グラム当たりのCFUの10を底とする平均対数）として定量的に測定した。

【0259】

インビゴでは6の10mg/kgの用量での単回投与によって細菌数の10の2乗倍の減少（99%の殺菌）、及び投与一回当たりの濃度（mg/kg）が同じであるが複数回にわたって投与されるシプロフロキサシン単体（合計30mg/kgの用量）よりもほぼ一桁高い活性を伴う最高の効力が示された。したがって、6のより大きな分子量（シプロフロキサシンの約2倍）を考慮すると10mg/kgという用量で投与された6の単回用量であれば完全分離を仮定するとおおまかに5mg/kgの有効なシプロフロキサシンが送達可能であり、それは対照シプロフロキサシン群（合計30mg/kg）のシプロフロキサシンのモル用量の6分の1である。複数回投与処方の中のシプロフロキサシン単体により細菌数の10の1乗倍の減少（90%の殺菌）が生じた。0.1mg/kg及び1mg/kgという6の濃度はほとんど効果を持たず、臨床効果には最小用量が必要であること、及びさらなる化学最適化がこの状況下で可能であり得ることが示唆された。

【0260】

動物試験での発見を確認するため、及び統計分析に適したより強い統計力とより大きなサンプルサイズを提供するため、我々は投与計画の割り当てを除いて第1の動物試験とほぼ同一の第2の動物実験を実施した。上記の我々の第1の動物試験に由来する投与データと抗菌成績に基づき、我々は3処置群、すなわち陰性対照（n=5ラット）、10mg/kgという単回高用量の6（n=5ラット）、及び0.3mg/kgを週3回という複数回低用量用法の6（n=2ラット）にこの第2の動物試験の焦点を合わせた。0.1mg/kg及び1mg/kgの投与群はこれまでに効力を示さなかったので除外され、我々の最初の動物試験でも確認されている強固な実績データがシプロフロキサシンの効力について存在することから親抗生物質単体も除外された。回復可能な細菌が存在しないことが治療効果に起因し得るのか、又は実験と標本の誤差に起因し得るのか確認するために複数回投与処方を再度活用した。他の全ての実験パラメーターは第1の動物実験と同一であり、前のようにそれぞれの動物に2個のインプラントが設置されており、それによって動物当たり2例の結果が可能になり、且つ、サンプルサイズの見積もりによって決定されるような統計分析に十分な統計力が提供された。

【0261】

全ての動物が再び治療及び薬物療法をよく忍容し、治療中に忍容性について大きな問題の兆候は無かった。臨床的には、対照群の動物の大多数が処置群の炎症を起こしていないインプラント周囲組織を有する動物の大多数と比較して局所的プロテゼ周囲炎の証拠を示すことが麻酔時及び外科的摘出時に観察された。インプラント保持率は高い保持率である24インプラント中23インプラント（96%）であり、後続の分析に強固な統計力を提供した。この第2の動物実験に由来する定量的抗菌成績が図37に示されている。処置群間でCFUを比較する一元配置ANOVA検定（ $\alpha = 0.05$ ）によって群間での有意性についてp値が0.006になり、独立t検定（ $p = 0.0005$ ； $df = 20$ ）を活用するポストホック検定とダネットの多重比較検定（ $p < 0.05$ ）によって対照と比較した6の単回高用量処置の有意性が示されたが、対照群又は単回高用量処置群と比較すると複数回低用量投与群の有意性は示されなかった（ $p > 0.05$ ）。

【0262】

考察

B P 部分への（分離可能カルバメートリンカーを介した）複合体化による骨への抗生物質の標的化は、骨髓炎バイオフィルムの治療にとって有望なアプローチである。本明細書において提示される A S T 試験の結果と M I C データは、シプロフロキサシンと 6 がプランクトン型黄色ブドウ球菌に対して有効な殺菌活性を有しており、11 の比較的に弱い活性によって証明されているように複合体化のための連結が親薬品の抗菌活性に影響を与えていることを示している（図 3 2）。M I C に到達するために比較的に高濃度の 6 が必要とされた。複合体化は複合体から分離される前の抗生物質の生化学的相互作用を変更する可能性がある化学的改変であるため、このことは予期されたことである。結果として薬力学的効果を含む親薬品の特性がそのような改変によって変更される可能性がある。6 についての M I C の結果は、この分類の複合体が親化合物の抗菌活性よりもわずかに低いレベルではあるがその抗菌活性を保持し得ることを示している以前の文献⁹、¹⁰と一致した。

【0263】

試験した複数の黄色ブドウ球菌株に対して抗菌効果の相違をほとんど示さなかったシプロフロキサシン単体と比較して、同じ株に対する両複合体の M I C 値が広く分布したことが興味深かった（図 1 7）。これらの結果には幾つかの説明が可能である。同種内の異なる細菌株が病毒性及び抗生物質に対する薬剤感受性／耐性に関して顕著な相違を示すことが知られている。株特異的な変動が抗生物質の輸送流出機構、細菌細胞壁密度、酵素活性レベル、耐性機構、及び環境の p H を変更する能力に関して存在することが十分に証明されている³⁴。シプロフロキサシンの殺菌活性は D N A 複製に必要とされる酵素であるトポイソメラーゼ I I 及び I V の細胞内での阻害により生じる³⁵。

【0264】

この分類の完全複合体は顕著な内在性抗菌活性を概ね失っており¹⁸、¹⁹、且つ、どの B P 関連抗菌作用も無視できる程度であることが証明されており、したがって少なくとも部分的な親薬品の分離が 6 について観察されるように顕著な抗菌活性の前提条件である。このことは、前記アッセイにおいて比較的に不安定なカルバメート連結複合体 6 の濃度の 2 ～ 6 4 倍になって同じ抗菌作用を達成した、比較的に安定なアミド結合の点で異なる 11 の低い抗菌活性と一致している。

【0265】

6 の抗菌効果を評価した後に、前記 B P 部分の骨結合機能性を評価しようとして、濃度依存的な前記複合体による H A 球状体への効果的な吸着と保持を見出した。これらの結果は類似する骨親和性を有する B P 部分を含むこの分類の以前に報告された類似体と一致する¹³、¹⁹。次に 6 の活性が異なる p H 条件で変化するか調査し、酸性条件でわずかに改善されたプロファイルが見出された。このことは前記リンカーが p H 7 . 4 よりも p H 5 で不安定であり、したがって比較的に低い p H でより多くのシプロフロキサシンが分離されるという事実によって少なくとも部分的に説明可能である。このことは、宿主の炎症及び破骨細胞形成と共にバイオフィルム病原体が酸性の局所的環境を作り出す骨髓炎への臨床応用にとって有用である可能性があった。しかしながら他の研究者は、感染性生物及び炎症により生じた酸性 p H は骨における幾らかの薬物溶出を引き起こす可能性があるが、顕著な濃度の前記抗菌剤を提供する点でそのような過程の有効性はおぼつかなく、プロドラッグの設計、複合体化スキーム、及び局所的酵素性加水分解に対する感受性がリンカーの切断性と効力に対してより大きな役割を果たすだろうと示唆している¹³。本実施例のデータもそのような結論を裏付けている。

【0266】

6 の時間殺菌カイネティクスの調査では 2 4 時間にわたる持続的殺菌活性と共に試験細菌に対する効率的な殺菌活性率が示され、経時的な安定持続性分離プロファイルを有する親抗生物質の切断活性が裏付けられた。本明細書において観察されたその抗生物質分離カイネティクスは骨髓炎治療のために現在使用されている生物分解性と非生物分解性の送達系について観察されているカイネティクスとは異なる場合があり、後者のカイネティクスは一般的に投与部位において抗生物質の高い放出量を最初に示し、残りの抗生物質が長時間にわたってより少ないパーセンテージで消失する³⁶、³⁷。

【0267】

本実施例は骨髄炎治療向けにインビトロ及びインビボのバイオフィルム関連モデルにおける6などの複合体の抗菌効果の証拠を提示する。骨髄炎バイオフィルム（黄色ブドウ球菌及び緑膿菌）をインビトロでポリスチレン又はHAなどの異なる基材上に増殖させ、その後6で処理すると、ポリスチレンよりもHAが存在する場合に、前記複合体はバイオフィルムに対して効果的であった。このことは、試験される病原体の株及び細菌増殖モード（プランクトン型対バイオフィルム）のような因子に加えて、基材結合特性が抗菌活性に役割を担うことを示している。6がHA上の骨髄炎病原体に対しては効果的であったが、基材としてのポリスチレン上の同じ株に対しては効果的ではなかったという事実は、その基材（例えばHA）に結合して直接的にバイオフィルムの下、又はバイオフィルム内に抗生物質を放出することの方が（親抗生物質単体、又は基材への結合が起こらず、定着した表面バイオフィルムに対する活性が見られなかったポリスチレン上の6の場合のように）バイオフィルム表面に沿って前記抗生物質を流すだけよりも骨髄炎バイオフィルムを効果的に治療するために必要であることを示している。基材としてポリスチレンを使用する設定と比較してHAディスクを使用する実験設定で見出された6の改善された活性は、前記複合体のBP部分がHA構造体に対して高い親和性を有しており、したがって前記ディスクへの6の局在化のために比較的に高濃度の親抗生物質に対してHA付着性の細菌が曝露される可能性があったという事実に起因するようである。また、バイオフィルム細菌細胞の下にある骨での6の切断はこれまでに示されているように²²破骨細胞下でのカルバメート切断に類似している可能性があり、そのことは局所的環境がこの状況で役割を担っていることを示唆しており、且つ、これもまた骨溶解の原因となる細菌の下の環境が骨に存在する破骨細胞の下の環境との類似性を有していることをさらに示しているが、それはこれらの環境は両方ともおそらくはpHと酵素性加水分解の組合せによってアリアルカルバメート結合を切断して活性シプロフロキサシンを分離することが可能であるように考えられるためである。BP（放射性標識）プロスタグランジン複合体を使用するArnsらによる以前の研究²⁷は血流中の前記複合体の半減期が大半のBP³⁸と同様に15分未満であることを示唆している。したがって、前記複合体はその時間の内に骨に結合するか、又は排出されるかのどちらかである。この研究は我々のカルバメートに近い結合を有する骨表面上の前記BPから前記活性薬品（この場合ではプロスタグランジン）が分離する半減期が5日と28日との間であることも示している。本明細書において示される結合は、ここで報告される刺激的なインビボの結果を達成するためには5日の半減期の比較的近くで解離されなければならない。Arnsら²⁷は骨細胞の下では切断機構は酵素性である可能性が最も高いと推測している。鈣物質表面上に細菌が存在する場合、切断機構は酵素ベースの切断である可能性もある。破骨細胞が存在しないインビトロ抗菌試験時についての原稿に既に記されているように、我々のカルバメート系複合体には活性が有るが、我々の切断不可能アミド系複合体には非常に低い活性しかない。

【0268】

黄色ブドウ球菌に対する骨髄炎予防実験においても前記複合体を試験し、完全殺菌作用の達成に関してシプロフロキサシン単体と比較して6は20倍高い活性を有し（図11）、一方で11にはどんな抗菌活性も認められない（図34）ことが分かった。これらの発見は11と比較して効率的な6からの親抗生物質の経時的切断分離機構を裏付けている。効率的なHAへの結合及び親抗生物質の分離は実質的な抗菌効果を示すためのこの分類の複合体の前提条件である。

【0269】

最後に、モデル顎骨病原体Aaを使用する顎骨インプラント周囲骨髄炎ラットモデルにおいて6のインビボ安全性と効力を試験しようとした。我々の動物試験の前に親薬品であるシプロフロキサシンに対するAaの感受性を確認するために我々は本研究において長骨骨髄炎病原体について実施されたようにインビトロASTアッセイとMICアッセイを実施した。Aaは親薬品であるシプロフロキサシンに対して強い感受性を示した。6に対する感受性について（黄色ブドウ球菌及び緑膿菌と同様に）HA上で増殖したAaバイオフ

フィルムも試験し、我々の複合体が効果的な抗菌活性を示すことが分かった（図35）。したがって、インプラント周囲顎骨骨髓炎モデルを利用して2つの連続的な動物実験を実施した。第1のインビボ試験では6の10mg/kgの用量での単回投与によってCFUの10の2乗倍の減少又は99%の殺菌、及び投与一回当たりの濃度（mg/kg）が同じであるが複数回にわたって投与されるシプロフロキサシン単体よりもほぼ一桁高い活性（図36）を伴う最高の効力であって、高用量の曝露であっても比較的に安定な11では観察されず、比較的に不安定な6で観察されたような親抗生物質単体^{18~20}と同等以上の効力が示され、これによって切断が抗菌効果に寄与し、且つ、幾つかの例では切断が抗菌効果に必要であり得ることが確認された。この実験ではより低濃度の6は無効果であった。これらの結果を確認するために我々は対照と比較して有効な6の投与計画（10mg/kg）と6の複数回投与処方に焦点を合わせているより大規模でより統計力が強い第2のインビボ試験を実施した。最大のCFU減少と効力が再び単回高用量（10mg/kg）の複合体において観察された。

【0270】

インビボ実験により、親抗生物質単体の活性が既に消失しているときに定着したAaバイオフィームに対する殺菌活性のために感染したインプラント周囲骨を標的とし、且つ、十分な濃度の親抗生物質を産出する6の能力が安全、且つ、適切な単回用量で確認された。微生物の定量には一括摘除された組織のホモジェネートが関係するため（その方法論はプレート培養及び評価のための表面剥離を含まなかったため）表面病原体ばかりか三次元骨性構造体の細管内のバイオフィーム細菌でさえも分析に含まれる。このことはバイオフィーム細菌のCFUのかなりの減少によって証明されるようなプロテアーゼ周囲骨への有効なBP吸収／吸着と抗生物質の分離を示唆している。

【0271】

複合体は独特の薬効評価パラメーターを有しており、且つ、前記BP部分のために主に骨に局在しているのでこれらの複合体とそれらの親化合物との間の直接的比較はやや恣意的であることもこの分野の他の研究と共にこれらの結果によって示されている。このことは、ヒトでは骨での取り込みよりも筋肉と腱での取り込みのほうがずっと高く³⁹、したがって感受性個体群におけるアキレス腱断裂などの有害事象と相関する親抗生物質（一般的にフルオロキノロンクラス）と対照的である。この分類の複合体のどんな将来的な薬物動態学的モデリング及び薬物動態学的試験にも分布について骨格コンパートメントを数理的に含む必要が出てくるが、それはシプロフロキサシン及び他のほとんどの抗生物質の薬物動態学研究では一般的に行われていない。ヒト集団におけるBP薬品の骨薬物動態を正確に決定するためのそのようなアプローチの重要性が証明されている⁴⁰。そのようなアプローチはこの状況でより正確で必要な薬理学的データを提供し、臨床投与アプローチについての情報も与える。

【0272】

材料と方法

別途明言されない限り全ての操作は窒素雰囲気下で実施された。無水エチルエーテル、無水テトラヒドロフラン、無水クエン酸、クロロホルム、及び硫酸マグネシウムはEMD社から購入された。4-ベンジルオキシベンジルアルコール、プロモトリメチルシラン、4-ニトロフェニルクロロホルマート、塩酸（37%）、無水エタノール、無水N,N-ジメチルホルムアミド、及び塩化チオニルはシグマ・アルドリッチ社から購入された。硫酸ナトリウムはAmresco社から購入された。水素化ナトリウム（57~63%油性分散体）、メチレンジホスホン酸テトライソプロピル、10%パラジウム活性炭素、4（プロモメチル）ベンゾエート、水酸化リチウム一水和物、及びN-エチルジイソプロピルアミンはAlfa Aesar社から購入された。酢酸エチル、ヘキサン、及びジクロロメタンはVWR社から購入された。無水メチルアルコール、トリメチルアミン、及び炭酸ナトリウムはMacron社から購入された。水素ガスはAirgas社から購入された。シプロフロキサシンはEnzo Life Sciences社から購入された。アセトニトリル（HPLCグレード）はSpectrum社から購入された。別途明言されない

限り全ての試薬は受け取られたまま使用された。3 Åのモレキュラーシーブ（20（質量／体積）%）⁴¹を使用して全ての溶媒を乾燥した。シリカゲル（SilicaFlash P60、40～63 Å、40～63 μm、230～400メッシュ）はSilicycle社から購入された。

【0273】

核磁気共鳴スペクトルを、96スピナー試料交換機が装着されたVarian 400-MR 2チャンネルNMRスペクトル計上で記録し、TopSpin及びMestReNovaを使用して分析した。1Hの化学シフト（δ，ppm）は残留溶媒ピークを基準とした。データ取得用にTune Plusバージョン2.0ソフトウェアを使用し、且つ、データ処理用にXcalibur（登録商標）2.0.7を使用してポジティブモード及び／又はネガティブモード下にあるESI源を装着されたThermo-Finnigan LCQ Deca XP Max質量分析計上で質量スペクトルを取得し、m/z形式で報告した。有機元素分析はThermo Fisher Scientific社によってFlash 2000 Elemental Analyzer上で実施された。

【0274】

最終化合物6及び11並びに市販のシプロフロキサシンの純度は95%以上であり、¹Hと³¹PのNMRスペクトル測定、HPLC、及び元素分析計を使用して決定された。最終化合物の分析HPLCはダイオードアレイ検出器が装着されたSHIMADZU HPLCシステム上で実施された。ラボソリューション・ソフトウェアがデータの収集と分析の両方に使用された。HPLC方法A：1.0 mL／分の流速で運用されるPhenomenex Luna 5 μ C18（2） 100 Å分析カラム（250×4.6 mm）を使用した。次の溶媒濃度勾配を使用した：（緩衝液A=0.1 M NH₄OAc（pH 7.53）中の20% ACN、緩衝液B=0.1 M NH₄OAc（pH 7.16）中の70% CAN）0～7分：0% B、7～25分：100% B、25～100分：100% B。

【0275】

1（ベンジルオキシ）-4（ブロモメチル）ベンゼン（1）の合成

4-ベンジルオキシベンジルアルコール（1.00 g、4.67 mmol）を窒素下の炉内乾燥したフラスコ内の無水ジエチルエーテル（25 mL）中に溶解した。フラスコを氷浴中で冷却した。ブromotrimethylsilane（BTMS）（1.26 mL、9.52 mmol、2当量）を注射器によって添加した。フラスコを室温までゆっくりと温めた。17時間攪拌した後に反応混合物を水（50 mL）に投入し、有機相を分離した。水相をジエチルエーテル（2×20 mL）で洗浄し、混合した有機相を塩水（2×20 mL）で洗浄し、そして硫酸ナトリウム上で乾燥した。その溶媒の蒸発によって白色の結晶質の固形物として化合物1を得た（1.23 g、95%の収率）。¹H NMR（400 MHz，CHloroform-d）δ 7.47 – 7.28（m，7H），6.98 – 6.90（m，2H），5.07（s，2H），4.50（s，2H）。

【0276】

テトライソプロピル（2（4（ベンジルオキシ）フェニル）エタン-1，1-ジイル）ビス（ホスホネート）（2）

窒素保護下で無水THF（2 mL）を水素化ナトリウム（鉱物油中に57～63%の分散度）（75 mg、1.80 mmol、1当量）に添加した。室温で攪拌しながらメチレンジホスホン酸テトライソプロピル（570 μL、1.80 mmol、1当量）を滴下して添加した。ガスが放出され、灰色の懸濁固形物が消費されて透明な溶液を残した。混合物をさらに10分間にわたって攪拌した。化合物1（500 mg、1.80 mmol、1当量）を窒素向流下で一度に添加した。その溶液は1分間にわたって透明であり、その後濁った。2時間にわたって攪拌し続け、反応の進行をTLC（100% EtOAc；UV及びモリブデン酸アンモニウムセリウム（CAM）染色により可視化）によりモニターした。その反応混合物を5%クエン酸水溶液（30 mL）に投入し、エーテル（2×30 mL）で抽出し、塩水（30 mL）で洗浄し、そして蒸発処理した。EtOAc：ヘキサ

ン濃度勾配（10～100%）を使用するフラッシュクロマトグラフィーにより残留物を精製して2を無色の油として得た（0.508 g、52%の収率）。¹H NMR（400 MHz, Chloroform-d） δ 7.44–7.27（m, 5H）, 7.18（d, J=8.6 Hz, 2H）, 6.87（d, J=8.7 Hz, 2H）, 5.04（s, 2H）, 4.86–4.63（m, 4H）, 3.15（td, J=16.6, 6.1 Hz, 2H）, 2.44（tt, J=24.2, 6.1 Hz, 1H）, 1.48–1.01（m, 24H）。³¹P NMR（162 MHz, Chloroform-d） δ 21.11.

【0277】

テトライソプロピル（2（4-ヒドロキシフェニル）エタン-1, 1-ジイル）ビス（ホスホネート）（3）

化合物2（0.508 g、0.925 mmol）を13 mLのメタノール中に溶解し、10%パラジウム活性炭素（70 mg、0.066 mmol、0.07当量）を添加した。フラスコを窒素でフラッシングし、その後に水素でフラッシングし、そして水素バルーンを取り付けて一晩にわたって攪拌した。100 mLのメタノールを使用してセライトで反応混合物を濾過した。濾液の蒸発により所望の化合物3がさらに精製されずに使用される薄黄色の油として生じた（0.368 g、88%の収率）。¹H NMR（400 MHz, Chloroform-d） δ 7.07（d, J=8.2 Hz, 2H）, 6.69（d, J=8.2 Hz, 2H）, 4.71（m, 4H）, 3.11（td, J=16.9, 6.0 Hz, 2H）, 2.47（tt, J=24.4, 6.0 Hz, 1H）, 1.32–1.21（m, 24H）。³¹P NMR（162 MHz, Chloroform-d） δ 21.06.

【0278】

4（2, 2-ビス（ジイソプロポキシホスホリル）エチル）フェニル（4-ニトロフェニル）カーボネート（4）

化合物3（7.91 g、15.9 mmol）を150 mLのジクロロメタン中に溶解し、その後にトリエチルアミン（6.70 mL、47.9 mmol、3当量）を添加し、続いてp-ニトロフェニルクロロホルマート（3.54 g、17.6 mmol、1.1当量）を一度に添加した。TLC（EtOAc中の5% MeOH；UVで可視化）でモニターしながら反応混合物を2.5時間にわたって攪拌した。出発物質の消失後に反応を停止し、標的化合物をフラッシュクロマトグラフィー（1：1の酢酸エチル：ヘキサン混液）により精製して化合物4を得た（4.33 g、44%の収率）。¹H NMR（400 MHz, Chloroform-d） δ 8.29（d, J=9.1 Hz, 2H）, 7.46（d, J=9.1 Hz, 2H）, 7.33（d, J=8.5 Hz, 2H）, 7.15（d, J=8.6 Hz, 2H）, 4.84–4.58（m, 4H）, 3.22（td, J=16.5, 6.2 Hz, 2H）, 2.47（tt, J=24.1, 6.2 Hz, 1H）, 1.33–1.14（m, 24H）.

【0279】

7（4（（4（2, 2-ビス（ジイソプロポキシホスホリル）エチル）フェノキシ）カルボニル）ピペラジン-1-イル）-1-シクロプロピル-6-フルオロ-4-オキソ-1, 4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸（5）

シプロフロキサシン（2.76 g、8.34 mmol、1.2当量）をフラスコ中の74.7 mLの水に懸濁した。その後、8.30 mLの1 MのHClを添加し、シプロフロキサシンを溶解するためにフラスコを攪拌し、透明無色の溶液が生じた。Na₂CO₃を添加してpHを8.5に調節し、濃白色の沈殿物が生じた。フラスコを氷浴中に配置し、そして83 mLのTHF中に溶解された化合物4（4.28 g、6.95 mmol、1当量）を約5分間にわたってゆっくりと添加した。その後でフラスコをその氷浴から取り出し、遮光し、そして室温で一晩にわたって攪拌した。その反応混合物を真空下で元の体積の約半分まで濃縮し、そして目の細かいガラス製フリット漏斗に通して濾過した。残留固形物を黄色が残らなくなるまで水で洗浄した。その後、それらの固形物をDCMで溶解し

10

20

30

40

50

てそのフリットから洗い流し、その溶液をフラッシュシリカカラムに負荷し、そしてMeOH:DCM濃度勾配(2~5%)で溶出して化合物5を白色の固形物として得た(3.47g、51.5%の収率)。¹H NMR(400MHz, Methanol-d₄) δ 8.79 (s, 1H), 7.93 (d, J=13.3 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.30 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.05 (d, J=8.5 Hz, 2H), 4.70 (dpd, J=7.4, 6.2, 1.3 Hz, 4H), 3.90 (m, 4H), 3.65 (s, br, 1H), 3.39 (s, br, 4H), 3.18 (td, J=16.6, 6.4 Hz, 2H), 2.65 (tt, J=24.3, 6.3 Hz, 1H), 1.43-1.34 (m, 2H), 1.34-1.19 (m, 24H), 1.18-1.10 (m, 2H)。³¹P NMR(162MHz, Methanol-d₄) δ 20.71. MS (ESI+) m/z: 808.2 (M+H), 830.2 (M+Na) calc. for C₃₈H₅₃FN₃O₁₁P₂+: 808.3.

【0280】

1-シクロプロピル-7(4((4(2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボニル)ピペラジーン-1-イル)-6-フルオロ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(6) 42、43

化合物5(10.0mg、1.24μmol)を1.5mLのガラス製バイアル瓶の中のDCM(200μL)中に溶解し、BTMS(200μL、1.52mmol、122当量)を添加し、そしてすぐにそのバイアル瓶にキャップをし、35℃の油浴の中に浸した。24時間にわたって攪拌した後に溶媒及びBTMSを真空下で除去し、1mLのMeOHを添加し、そしてそのバイアル瓶を一晩にわたって攪拌した。溶媒を真空下で除去して緑色の蛍光を有する薄黄色の固形物として純粋な化合物6を得た(6.82mg、86.1%の収率)。¹H NMR(400MHz, Deuterium Oxide) δ 8.51 (s, 1H), 7.92 (d, J=12.2 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.47 (d, J=8.3 Hz, 2H), 7.10 (d, J=8.3 Hz, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.79 (s, 2H), 3.67 (s, 1H), 3.42 (s, 4H), 3.16 (td, J=15.5, 6.8 Hz, 2H), 2.21 (tt, J=6.9, 21.6 Hz, 1H), 1.37 (d, J=6.9 Hz, 2H), 1.15 (s, 2H)。³¹P NMR(162MHz, Deuterium Oxide) δ 19.16 MS (ESI-) m/z: 638.06 (M-H) calc. for C₂₆H₂₇FN₃O₁₁P₂-: 638.1. HPLC (Method A, UV 190, 274, 330nm): tr=11.62 min.

【0281】

メチル4(2,2-ビス(ジイソプロポキシホスホリル)エチル)ベンゾエート(7) 44

窒素雰囲気下において25mLの丸底フラスコの中で鉱物油中の57~63%水素化ナトリウム分散物(0.163g、4.07mmol、1.4当量)にTHF(5mL)を添加した。攪拌しながらその懸濁液を0℃まで冷却し、メチレンジホスホン酸テトライソプロピル(0.926mL、2.90mmol、1当量)を徐々に添加した。その反応を放置して外界温度にし、水素ガスがその反応混合物から泡立つことを止めたところでその溶液を再び0℃まで冷却した。メチル4(ブロモメチル)ベンゾエート(0.465g、2.03mmol、0.7当量)をTHF(2mL)中に溶解し、それを滴下しながら前記反応に添加した。それにより生じた溶液をゆっくりと外界温度に近づけながら一晩にわたって攪拌した。その後、その反応混合物を0℃まで冷却し、EtOH(1mL)でクエンチした。クエン酸の5%水溶液(30mL)を添加し、混合物をEt₂O(3×30mL)で抽出し、混合した有機物を塩水(50mL)で洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥し、濾過し、減圧したで濃縮し、そしてEtOAc:Hex濃度勾配(10~100%)を使用するシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製してかすかに黄色の油として7を得た(0.371g、37.0%の収率)。¹H NMR(400MHz, Chloroform-d) δ 7.93 (d, J=8.0 Hz, 2H), 7.33 (d, J=8.4

, 2 H), 4.79–4.68 (m, 4 H), 3.88 (s, 3 H), 3.24 (td, J=16.0, 6.4 Hz, 2 H), 2.50 (tt, J=24.0, 6.2 Hz, 1 H), 1.34–1.24 (m, 24 H). ³¹P NMR (162 MHz, Chloroform-d) δ 20.57.

【0282】

4 (2, 2-ビス (ジイソプロポキシホスホリル) エチル) 安息香酸 (8) 44

8ドラムのガラス製バイアル瓶の中のMeOH (1.5 mL) 中の7 (0.131 g、0.278 mmol) の溶液にLiOH・H₂O (0.058 g、1.39 mmol、5当量) を添加し、それにより生じた溶液を一晩にわたって室温で撹拌した。その反応混合物を乾燥するまで蒸発処理し、残留物を水 (30 mL) 中に溶解し、そしてHCl (水溶液) (1 M) を添加してゆっくりとpH 3まで到達させた。それにより生じた混合物をCHCl₃ (3×30 mL) で抽出した。混合した有機物をMgSO₄上で乾燥し、減圧下で濃縮して8を濃厚な透明の油として得た (0.115 g、90.6%の収率)。¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d): δ=7.96 (d, J=8.0, 2 H), 7.37 (d, J=8.0, 2 H), 4.82–4.74 (m, 4 H), 3.28 (td, J=16.6, 6.1, 2 H), 2.60 (tt, J=24.2, 6.2, 1 H), 1.33–1.26 (m, 24 H). ³¹P NMR (162 MHz, Chloroform-d) δ 20.57.

【0283】

テトライソプロピル (2 (4 (クロロカルボニル) フェニル) エタン-1, 1-ジイル) ビス (ホスホネート) (9)

窒素雰囲気下において化合物8 (0.162 g、0.339 mmol) をクロロホルム (1 mL) 中に溶解し、触媒量のDMF (1.30 μL、0.017 mmol、0.05当量) を添加した。塩化チオニル (49.2 μL、0.678 mmol、2当量) をゆっくりと添加し、その反応を2時間にわたって室温で撹拌した。溶媒を真空下で除去して9を透明な油として得た。さらに操作せずに生成物を次の工程にすぐに使用した (定量的収率)。

【0284】

7 (4 (4 (2, 2-ビス (ジイソプロポキシホスホリル) エチル) ベンゾイル) ピペラジン-1-イル) -1-シクロプロピル-6-フルオロ-4-オキソ-1, 4-ジヒドロキノリン-3-カルボキシレート (10)

シプロフロキサシン (0.112 g、0.339 mmol、1当量) をクロロホルム (1 mL) 中に懸濁し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (354 μL、2.03 mmol、6当量) を添加した。新しく作製された化合物9 (168 mg、0.338 mmol、1当量) をクロロホルム (1 mL) 中に溶解し、徐々に前記シプロフロキサシン: DIPEA懸濁液に添加した。その反応混合物をオイルで覆い、一晩にわたって室温で撹拌した。翌日、溶媒を真空下で除去し、それにより生じた粗製物をDCM (5 mL) 中に溶解し、中程度のフリット漏斗に通して濾過し、そしてより多くのDCM (3×5 mL) で洗浄した。濾液を真空下で濃縮し、MeOH: DCM濃度勾配 (0~10%) を使用するシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりさらに精製して徐々に固形化する粘性の有る油として10を得た (0.226 g、65.1%の収率、1.8当量のDIPEA塩)。¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ=8.79 (s, 1 H), 8.06 (d, J=12.8, 1 H), 7.38 (m, 5 H), 4.80–4.73 (m, 4 H), 4.00 (s, br, 4 H), 3.56–3.53 (m, 1 H), 3.33–3.20 (m, 6 H), 2.50 (m, 1 H), 1.45–1.38 (m, 2 H), 1.32–1.25 (m, 24 H), 1.23–1.19 (m, 2 H). ³¹P NMR (162 MHz, Chloroform-d) δ 20.77.

【0285】

1-シクロプロピル-7 (4 (4 (2, 2-ジホスホノエチル) ベンゾイル) ピペラジン-1-イル) -6-フルオロ-4-オキソ-1, 4-ジヒドロキノリン-3-カルボン

酸 (11) 42、43

8ドラムのガラス製バイアル瓶の中で化合物10 (0.108 g、0.136 mmol) をDCM (700 μ L) 中に溶解し、BTMS (686 μ L、5.20 mmol、38 当量) を添加した。そのバイアル瓶にキャップをし、ホイルで覆い、且つ、攪拌しながら 35°Cで一晩にわたって加熱した。翌日、溶媒を真空下で除去し、粗製物をMeOH (2 mL) でクエンチした。それにより生じた溶液を室温で30分間にわたって攪拌した。溶媒を真空下で除去してオレンジ色の油を得た。数滴の水を添加して黄色の固形物を作製した。より多くのMeOH (2 mL) を添加し、中程度のガラス製フリット漏斗を使用して、それにより生じた懸濁液を濾過した。それにより生じた固形物をMeOHでさらに洗浄して11を黄色の粉末として得た (0.070 g、82.0%の収率)。¹H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide, pH 7.5): δ = 8.54 (s, br, 1H), 7.90–7.87 (m, 1H), 7.65–7.63 (m, 1H), 7.54 (d, J = 8.0, 2H), 7.44 (d, J = 8.0, 2H), 4.79 (m, overlap with D₂O, 4H), 4.00 (s, br, 2H), 3.79 (s, br, 2H), 3.47 (s, br, 3H), 3.34 (s, br, 2H), 3.21 (td, J = 14.0, 6.4, 2H), 2.30 (tt, J = 22.0, 6.6, 1H), 1.38–1.33 (m, 2H), 1.15 (s, br, 2H). ³¹P NMR (162 MHz, Deuterium Oxide, pH 7.5) δ 19.12. MS (ESI[−]) m/z: 622.24 (M[−]H) calc. for C₂₆H₂₇F₃N₃O₁₀P₂: 622.12. HPLC (Method A, UV 190, 274, 330 nm): t_r = 4.43 min.

【0286】

ビスホスホネート-シプロフロキサシン複合体の抗菌特性

実験株:

7株のメチシリン感受性プロファイルを有する黄色ブドウ球菌臨床骨髄炎株及びメチシリン耐性プロファイルを有する1株を試験した。これらの病原体はポーランドのヴロツワフ医科大学薬学微生物学寄生虫学科の菌株コレクションの一部である。さらに、次の米国培養細胞系統保存機関 (ATCC) 株、すなわち黄色ブドウ球菌 6538 株と緑膿菌 15442 株を実験目的のために選択した。

【0287】

HAディスク:

特注仕様のディスクの製造のために市販のHA粉末を使用した。結合剤を使用せずに9.6 mmの直径の粉末ペレットをプレス加工した。焼結を900°Cで行った。静的引張試験、圧縮試験、及び曲げ試験用のUniversal Testing System (Instronモデル3384; Instron社、ノーウッド、マサチューセッツ州) を使用してそれらの錠剤を圧縮した。それぞれLEXT OLS4000顕微鏡 (Olympus社、センターバレー、ペンシルバニア州) とMetrotom 1500マイクロトモグラフ (Carl Zeiss社、オーバーコッペン、ドイツ) を使用する共焦点顕微鏡法とマイクロトモグラフィー (マイクロCT) により、製造されたHAディスクの品質を検査した。

【0288】

試験株のシプロフロキサシンに対する感受性を評価するためのディスク拡散テスト:

EUCAST²⁹ガイドラインに従ってこの方法を実施した。簡単に説明すると、0.5マクファーランド (MF) の細菌希釈物をミュラー・ヒントン (MH) 寒天プレート上に広げた。5 mgのシプロフロキサシンを含有するディスクを差し込み、そのプレートを37°Cで24時間にわたってインキュベートした。次に定規を使用して阻止帯を記録した。得られた値 (mm) をEUCASTの表²⁹に由来する適切な阻止帯の値と比較した。

【0289】

分析されたプランクトン型の臨床スタフィロコッカス株に対する試験化合物のMICの評価:

微生物の増殖に対する親抗生物質及び複合体の効果を評価するため、 1×10^5 CFU / ml の密度を有する $100 \mu\text{L}$ の微生物溶液を適切な濃度の試験化合物と共に 96 ウェル検査プレートのウェルに入れた。その直後に分光光度計 (Thermo Scientific Multiscan GO) を 580 nm の波長で使用して溶液の吸光度を測定した。その後、細菌増殖に最適な条件を得るため、及び細菌のバイオフィーム形成を防止するためにプレートを攪拌機の中で 24 時間にわたって 37°C でインキュベートした。インキュベートした後に吸光度を再度測定した。次の対照試料を用意した：陰性対照試料 1：微生物を含まない滅菌培地、陰性対照試料 2：DMSO (ジメチルスルホキシド；シグマ・アルドリッチ社) を 1% (体積／体積) の終濃度になるまで加えた微生物を含まない滅菌培地、陽性対照試料 1：試験化合物を含まない培地＋微生物、陽性対照試料 2：試験化合物を含まないが DMSO を 1% (体積／体積) の終濃度になるまで加えた培地＋微生物。シプロフロキサシンはこの溶媒に効率的に溶解するが、DMSO 濃度が 1% を超えると微生物細胞にとって有害になり得ることが 1% の DMSO を使用する論理的根拠であった。細胞の相対数を評価するために次の計算を行った。対照試料の吸光度の値 (複合体については培地＋微生物、シプロフロキサシンについては培地＋微生物＋DMSO) を 100% と評価した。次に試験化合物と共にインキュベートされた細胞の相対数を以下のように計数した：対照試料吸光度の値／試験試料の値 $\times 100\%$ 。

【0290】

分光光度法評価によって得られた結果を確認するため、処理された細菌溶液を 10 mL の新しい培地に移し、 37°C で 48 時間にわたって放置した。培地の混濁形成の有無がそれぞれ病原体増殖の有無の証拠であった。さらに、適切な安定培地上で細菌溶液を培養した。液体培養物に由来する上記結果と共に細菌コロニーの増殖の有無が分光光度法によって得られた結果の確認として機能した。

【0291】

HA 球状体を添加したトリプチケースソイブロス (TSB) 微生物用培地中の 6 及び 11 の分光分析：

TSB 微生物培地中に懸濁された HA 粉末 (球状体) に様々な複合体濃度を導入した。BP-シプロフロキサシンと HA 球状体を含有する溶液を 24 ウェルプレートのウェルに入れた。粉末の終濃度は $10 \text{ mg} / 1 \text{ mL}$ であり、一方で複合体の終濃度は $0.24 \sim 250 \text{ mg} / \text{L}$ であった。直後に分光光度計 (Thermo Scientific Multiscan GO) を 275 nm の波長で使用して溶液の吸光度を測定した。プレートは測定前に前記分光光度計の中で自動的に攪拌された。次にプレートを攪拌しながら 24 時間にわたって 37°C で放置した。24 時間後に吸光度を再度測定した。0 時間及び 24 時間の時点における前記複合体の相対濃度を評価するために実験の開始時と終了時に測定された吸光度の値を比較した。励起光側スリット、放射光側スリット、積分時間、及び増分を試料の濃度に基づいて最適化した。

【0292】

酸性 pH 及び生理的 pH における黄色ブドウ球菌 ATCC-6538 株のプランクトン型培養物に対する 6 の抗菌物質感受性試験：

KOH 溶液又は HCl 溶液を使用して微生物用培地を pH 7.4 と pH 5 に調節し、そして万能 pH 指示薬 (Merck 社、ポーランド) を使用してその微生物用培地を測定したことを除いてディスク拡散試験についてこれまでに記載されたようにしてこの実験設定を実施した。

【0293】

黄色ブドウ球菌 ATCC-6538 株 (MSSA) 及び臨床 MRSA 株 (MR4-CIP S) に対する 6 の時間殺菌アッセイ：

吸光度の測定 (580 nm の波長) を 0 時間、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、16 時間、及び 24 時間の時点で行ったことを除いて「分析されたプランクトン型の臨床スタフィロкокカス株に対する試験化合物の MIC の評価」の小見出しの下でこれまでに記載されたようにしてこの実験を実施した。

【0294】

黄色ブドウ球菌ATCC-6538株及び緑膿菌ATCC-15442株のバイオフィルムに対して実施された6の抗菌物質感受性試験：

適切な寒天プレート（黄色ブドウ球菌についてはコロンビア寒天プレート；緑膿菌についてはマッコンキー寒天プレート）上で培養された株を液体微生物用培地へ移し、嫌気性条件下において24時間にわたって37℃で培養した。培養後に株を1MFの密度まで希釈した。基材としてのHAディスクを含有する24ウェルプレートのウェルにそれらの微生物希釈物を入れるか、又は底面がバイオフィルム形成用の基材として機能するポリスチレンウェルにそのままそれらの微生物希釈物を入れた。株を37℃で4時間にわたって培養した。次にそれらのウェルから微生物含有溶液を取り除いた。それらの面、HAディスク、及びポリスチレンプレートを静かに洗って接着した細胞を残すと共にプラクトン型又は緩く結合した微生物を除去した。0.24～125mg/Lの6と対照としてのシプロフロキサシンを含む新しいTSB培地の中にこの様にして調製された面を浸した。37℃で24時間のインキュベーションの後に生理食塩水溶液を使用してそれらの面を洗浄し、そして1mLの0.5%サポニン（シグマ・アルドリッチ社、セントルイス、ミズーリ州）に移した。それらの面を1分間にわたってボルテックスミキサーで激しく攪拌して細胞を剥離させた。その後、全ての微生物懸濁液を 10^{-1} ～ 10^{-9} 倍まで希釈した。各希釈物（100mL）を適切な安定培地（緑膿菌と黄色ブドウ球菌についてそれぞれマッコンキーとコロンビア）上で培養し、24時間にわたって37℃でインキュベートした。この後に微生物コロニーを計数し、バイオフィルムを形成する細胞の数を評価した。結果を平方ミリメートルの面当たりの平均CFU数±平均の標準誤差として表した。HAディスクの表面積を計算するためにX線トモグラフィー分析を適用した。検査プレートの底面積を推定するために円の面積の数式である πr^2 を適用した。

【0295】

HAへの黄色ブドウ球菌6538株の接着を抑制する6及び11の抑制能：

TSB微生物培地中に懸濁されたHA粉末（球状体）に様々な濃度の6及び11を導入した。6とHA球状体を含有する溶液を24ウェルプレートのウェルに入れた。粉末の終濃度は10mg/1mLであり、一方で前記複合体の終濃度は0.12～250mg/Lであった。懸濁液を攪拌しながら24時間にわたって37℃で放置した。24時間後にそれらのウェルから懸濁液を取り除き、瞬間的に遠心分離してHA粉末を沈殿させた。次に非常に静かに上清を捨て、 10^5 CFU/mLの密度を有する新しい1mLの黄色ブドウ球菌を前記HA球状体に加えた。その後、この溶液を攪拌し、580nmの波長を使用して吸光度を測定し、そして攪拌しながら24時間にわたって37℃で放置した。インキュベーションの後に吸光度を再度測定し、0時間と24時間の値を比較して対照試料1（球状体を含まない細菌懸濁液）及び対照試料2（複合体が添加されていない細菌懸濁液+球状体）に対する細菌増殖の低下を評価した。さらに、溶液を瞬間的に遠心分離し、静かに上清を捨て、一方で前のように細菌含有HA球状体をプレート上に蒔いて培養し、定量的に評価した。11の試験のためにHA球状体と1～400μg/mLまでを範囲とする比較的に高濃度の11と0.5～400μg/mLまでを範囲とする濃度のシプロフロキサシンを含有する溶液を調製し、バイオフィルム形成を抑制する能力について再び対照試料（HAを含まない細菌懸濁液）とその溶液を比較した。前記カルバメート複合体と比較して弱いアミド複合体の活性が示されていたために比較的に高い濃度の11を試験した。

【0296】

6で前処理されたHA上での24時間のインキュベーション後の黄色ブドウ球菌の生存：

様々な濃度のBP-シプロフロキサシン又はシプロフロキサシン単体を含有する2mLの溶液の中にHAディスクを浸し、それらのディスクを24時間にわたって37℃で放置した。DMSO又はリン酸緩衝液の中でインキュベートされたHAディスクが対照試料として働いた。次にディスクを滅菌水で3回洗浄した。洗浄後にバイオフィルム形成用の基材としてのHAディスクを含有するウェルに2mLの0.5MFの黄色ブドウ球菌ATCC 6538株を入れ、前と同じようにバイオフィルムを形成した。

【0297】

倫理声明：

全ての動物実験のプロトコルと方法は南カリフォルニア大学（USC）の動物実験委員会（IACUC）及び米国獣医師会安楽死研究班の推奨に従って認可及び実施された。USCは米国農務省（USDA）に登録されており、米国国立衛生研究所（NIH）に登録されている完全認可された認証状（第A3518-01号）を有しており、且つ、米国実験動物管理評価認証協会（AAALAC）によって認定されている。IACUCによって認可された我々のプロトコルの標題は「バイオフィーム介在性骨溶解性感染症の治療用骨標的化抗菌剤」であり、そのプロトコル番号は20474である。本明細書において提示される動物実験に関係する全ての動物実験プロトコル並びに研究者及び従事者はUSDA動物福祉規制の中の実験動物の管理と使用に関する指針（CFR1985）及び実験動物の人的管理と使用に関する公衆衛生局方針（1996）を厳守した。

10

【0298】

インビボ動物試験：

本研究のため、それぞれ約200gの体重の12匹の5か月齢未経産のメスSprague-Dawleyラットをこの研究に使用した。12時間毎の明暗サイクル下、22℃の小動物保存室においてケージ当たり2～3匹の動物を収容し、軟質食餌（Purina Laboratory Rodent Chow）を自由に摂取させた。USCにおける動物の使用と管理についてのガイドラインと規制に従って全ての動物を扱った。動物は、毎日それらの動物を直接評価する1日24時間待機している専任の獣医師の監督下にあった。全ての動物実験は、結果の質、信頼性、有効性、及び再現性を確保するために動物実験について報告するためのARRIVEガイドライン⁴⁵を使用して記載されている。

20

【0299】

この動物モデルはバイオフィーム介在性疾患及び宿主応答をインビボで研究するために特異的に設計された自家製の顎骨インプラント周囲骨髄炎モデルである³¹。顎骨骨髄炎病原体Aaのバイオフィームを10⁹CFUで小型チタン製インプラント上に予め形成した。我々の動物試験の前に親薬品であるシプロフロキサシンに対するAaの感受性を確認するため、長骨骨髄炎病原体について記載されたようにバイオフィームHAアッセイに加えてプランクトン型Aaに対してASTアッセイとMICアッセイを実施した。インビトロでバイオフィームがインプラント上に定着した後に各ラットの顎骨にそれらのインプラントを外科的に移植した。手術のため、最初に4%イソフルラン吸入剤を使用し、続いてケタミン（80～90mg/kg）とキシラジン（5～10mg/kg）の腹腔内注射により動物に麻酔をかけた。次に手術部位への0.25%ブピバカインの浸潤注射により局所麻酔を加えた。次に先制鎮痛として持続放出性ブプレノルフィン（1.0～1.2mg/kg）を最初の切開の前に皮下投与した。麻酔されたところで各ラットの頬粘膜を鉤で引っ張り、前口蓋の自然正中離開状態の歯槽堤にパイロットドリルを使用して経粘膜骨切除術を実施した。その後、プラットホームが粘膜の高さになるまで手作業で骨切除術部にインプラントを挿入し、骨に固定した。2個のバイオフィーム接種インプラントを各ラット（n=12ラット）の口蓋骨の両側に設置した。

30

【0300】

手術から1週間後に4%のイソフルランを再度投与してラットに軽く麻酔をかけ、インプラントの安定性を確認し、インプラント及び感染部位における炎症の有無などの臨床的発見を書き留めた。その後、腹腔内注射によりそれらの動物にBP-シプロフロキサシン（単回投与として0.1mg/kg、1mg/kg、又は10mg/kg、及び複数回投与群については0.3mg/kgを週3回の6）又は陽性対照としてシプロフロキサシン単体（これも複数回投与群として10mg/kgを週3回）を投与し、陰性対照として無菌エンドトキシン非含有生理食塩水を投与した。

40

【0301】

ランダム化過程を介して動物の処置群と対照群への割り当てを行った。その週にわたってそれぞれの追加の注射の前に複数回投与群の動物を前に記載したように麻酔した。全て

50

の化合物は薬理学グレードであり、適切な pH の無菌注射可能生理食塩水中に構成された。薬物療法から 1 週間後に全ての動物を CO₂ 室（60～70% の濃度）の中に 5 分間にわたって入れ、その後で頸椎脱臼により安楽死させた。インプラント周囲組織（1 cm²）の摘出を一括実施し、インプラントを取り出した。プロテアーゼ周囲炎の有無などの臨床パラメーターを手術及び摘出時に書き留めた。処置群及び対照群に割り当てられたラットを匿名化し、その微生物データを分析する後の調査者から秘密にした。

【0302】

微生物分析のため、摘除されたインプラント周囲軟組織及び骨を外科的摘出した直後に 1 mL の 0.5% サポニンの中に入れて均質化及び処理し、そして 1 分間にわたってボルテックスミキサーで撹拌した後に段階希釈した。10⁰～10⁻⁹ までの範囲の希釈係数 10（例えば 0.1 mL のサポニン溶液を 0.9 mL の 0.9% 無菌等張生理食塩水溶液に移す）の段階希釈物を調製し、スプレッドプレート法を用いてそれらの希釈物の各々に由来する 0.1 mL の溶液をプレート上に培養した。Aa を培養するための培地は改変 TSB からなり、凍結ストックは 20% グリセロール、80% 改変 TSB の中で -80℃ に維持された。全ての培養は 48 時間にわたって 5% CO₂ 中において 37℃ で実施された。培養された生きている Aa 細菌の数（組織グラム当たりの CFU 数）を手作業で計数し、処置の関数としてのグラム当たりの CFU 数の 10 を底とする平均対数の減少を記録した。Aa 細菌の形態型を確認し、且つ、汚染混入も排除するため、CFU の計数が完了したところでプレートからコロニーをサンプリングすることによりグラム染色と組織学的評価を実施した。

【0303】

統計分析

SPSS 22.0（IBM 社、アーモンク、ニューヨーク州）及び Excel 2016（Microsoft 社、レッドモンド、ワシントン州）を使用して統計計算を行った。実験前にインビトロ試験及びインビボ試験のサンプルサイズの見積もりをするために G Power 3 ソフトウェア⁴⁶ を使用して検定力分析を実施した。データ（パラメトリック又は非パラメトリック）の分布を理解し、且つ、平均値、標準誤差、標準偏差、尖度と歪度、及び 95% 信頼レベルを生成するために各群の実験結果に由来する定量的データをまず記述統計学によって分析した。その後、場合に依じてクラスカル・ウォリス検定又は一元配置 ANOVA を用いてそのデータを分析し、処置群を対照群に比較するときに p < 0.05 で統計学的有意性を受け入れた。さらに、インビボ実験については独立 t 検定を活用するポストホック検定とダネットの多重比較検定を実施した。

【0304】

使用した略語

Aa、アグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンス；AAALAC、米国実験動物管理評価認証協会；ANOVA、分散分析；ARRIVE、動物研究インビボ実験報告規定；AST、抗生物質感受性試験；ATCC、米国培養細胞系統保存機関；BP、ビスホスホネート；BTMS、プロモトリメチルシラン；CFU、コロニー形成単位；CLSI、米国臨床検査標準協会；EUCAST、欧州薬剤感受性試験委員会；HA、ハイドロキシアパタイト；IACUC、動物実験委員会；MBC、平均殺菌濃度；MBIC50、生物の 50% の増殖を抑制するために必要とされる最小バイオフィーム阻止濃度；MF、マクファーランド；MH、ミューラー・ヒントン；MIC50、生物の 50% の増殖を抑制するために必要とされる最小発育阻止濃度；MSSA、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌；Pd/C、パラジウム活性炭素；SD、標準偏差；BTMS、プロモトリメチルシラン；DCM、ジクロロメタン；SOCl₂、塩化チオニル；SEM、走査電子顕微鏡法。

【0305】

実施例 5 の参照先

1. Lew, D. P. ; Walldvogel, F. A. Osteomyelitis. Lancet 2004, 364, 369-379.
2. Desrochers, A. ; St-Jean, G. ; Anderson, D. E

- . Limb amputation and prosthesis. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2014, 30, 143–155, vi.
3. Stoodley, P. ; Ehrlich, G. D. ; Sedghizadeh, P. P. ; Hall–Stoodley, L. ; Baratz, M. E. ; Altman, D. T. ; Sotereanos, N. G. ; Costerton, J. W. ; Demeo, P. Orthopaedic biofilm infections. *Curr. Orthop. Pract.* 2011, 22, 558–563.
4. Huang, C. C. ; Tsai, K. T. ; Weng, S. F. ; Lin, H. J. ; Huang, H. S. ; Wang, J. J. ; Guo, H. R. ; Hsu, C. C. Chronic osteomyelitis increases long-term mortality risk in the elderly: a nationwide population-based cohort study. *BMC Geriatr.* 2016, 16, 72. 10
5. Wolcott, R. D. ; Ehrlich, G. D. Biofilms and chronic infections. *JAMA* 2008, 299, 2682–2684.
6. Junka, A. F. ; Szymczyk, P. ; Smutnicka, D. ; Kos, M. ; Smolina, I. ; Bartoszewicz, M. ; Chlebus, E. ; Turniak, M. ; Sedghizadeh, P. P. Microbial biofilms are able to destroy hydroxyapatite in the absence of host immunity in vitro. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2015, 73, 451–464. 20
7. Panagopoulos, P. ; Drosos, G. ; Maltezos, E. ; Papanas, N. Local antibiotic delivery systems in diabetic foot osteomyelitis: time for one step beyond? *Int. J. Lower Extremity Wounds* 2015, 14, 87–91.
8. Puga, A. M. ; Rey–Rico, A. ; Magarinos, B. ; Alvarez–Lorenzo, C. ; Concheiro, A. Hot melt poly-epsilon-caprolactone/poloxamine implantable matrices for sustained delivery of ciprofloxacin. *Acta Biomater.* 2012, 8, 1507–1518. 30
9. Herczegh, P. ; Buxton, T. B. ; McPherson, J. C. , 3rd ; Kovacs–Kulyassa, A. ; Brewer, P. D. ; Sztaricskai, F. ; Stroebel, G. G. ; Plowman, K. M. ; Farcasiu, D. ; Hartmann, J. F. Osteoadsorptive bisphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 2338–2341. 40
10. Buxton, T. B. ; Walsh, D. S. ; Harvey, S. B. ; McPherson, J. C. , 3rd ; Hartmann, J. F. ; Plowman, K. M. Bisphosphonate–ciprofloxacin bound to Skelite is a prototype for enhancing experimental local antibiotic delivery to injured bone. *Br. J. Surg.* 2004, 91, 1192–1196.
11. Kim, B. N. ; Kim, E. S. ; Oh, M. D. Oral antibiotic treatment of staphylococcal bone and 50

joint infections in adults. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014, 69, 309–322.

12. Reeves, B. D. ; Young, M. ; Grieco, P. A. ; Suci, P. Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm killing by a targeted ciprofloxacin prodrug. *Biofouling* 2013, 29, 1005–1014.

13. Houghton, T. J. ; Tanaka, K. S. ; Kang, T. ; Dietrich, E. ; Lafontaine, Y. ; Delorme, D. ; Ferreira, S. S. ; Viens, F. ; Arhin, F. F. ; Sarmiento, I. ; Lehoux, D. ; Fadhil, I. ; Laquerre, K. ; Liu, J. ; Ostiguy, V. ; Poirier, H. ; Moeck, G. ; Parr, T. R., Jr. ; Far, A. R. Linking bisphosphonates to the free amino groups in fluoroquinolones: preparation of osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 6955–6969.

14. Melchior, M. B. ; Fink-Gremmels, J. ; Gaastra, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 2006, 53, 326–332.

15. Amorena, B. ; Gracia, E. ; Monzon, M. ; Leiva, J. ; Oteiza, C. ; Perez, M. ; Alabart, J. L. ; Hernandez-Yago, J. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999, 44, 43–55.

16. Ceri, H. ; Olson, M. E. ; Stremick, C. ; Read, R. R. ; Morck, D. ; Buret, A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 1771–1776.

17. Olson, M. E. ; Ceri, H. ; Morck, D. W. ; Buret, A. G. ; Read, R. R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 2002, 66, 86–92.

18. Zhang, S. ; Gangal, G. ; Uludag, H. 'Magic bullets' for bone diseases: progress in rational design of bone-seeking medicinal agents. *Chem. Soc. Rev.* 2007, 36, 507–531.

19. Tanaka, K. S. ; Houghton, T. J. ; Kang, T. ; Dietrich, E. ; Delorme, D. ; Ferreira, S. S. ; Caron, L. ; Viens, F. ; Arhin, F. F. ; Sarmiento, I. ; Lehoux, D. ; Fadhil, I. ; Laquerre, K. ; Liu, J. ; Ostiguy, V. ; Poirier, H. ; Moeck, G. ; Parr, T. R., Jr. ; Rafai Far, A. Bisphosphonated fluoroquinolone esters as osteotropic pro

10

20

30

40

50

- drugs for the prevention of osteomyelitis. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 9217–9229.
20. McPherson, J. C., 3rd; Runner, R.; Buxton, T. B.; Hartmann, J. F.; Farcasiu, D.; Bereczki, I.; Roth, E.; Tollas, S.; Ostorhazi, E.; Rozgonyi, F.; Herczegh, P. Synthesis of osteotropic hydroxybisphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials. *Eur. J. Med. Chem.* 2012, 47, 615–618.
21. Cheong, S.; Sun, S.; Kang, B.; Bezouglaia, O.; Elashoff, D.; McKenna, C. E.; Aghaloo, T. L.; Tetradis, S. Bisphosphonate uptake in areas of tooth extraction or periapical disease. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2014, 72, 2461–2468. 10
22. Russell, R. G.; Watts, N. B.; Ebetino, F. H.; Rogers, M. J. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis Int.* 2008, 19, 733–759. 20
23. Guo, X.; Shi, C.; Wang, J.; Di, S.; Zhou, S. pH-triggered intracellular release from actively targeting polymer micelles. *Biomaterials* 2013, 34, 4544–4554.
24. Ghosh, A. K.; Brindisi, M. Organic carbamates in drug design and medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* 2015, 58, 2895–2940.
25. Ossipov, D. A. Bisphosphonate-modified biomaterials for drug delivery and bone tissue engineering. *Expert Opin. Drug Delivery* 2015, 12, 1443–1458. 30
26. Morioka, M.; Kamizono, A.; Takikawa, H.; Mori, A.; Ueno, H.; Kadowaki, S.; Nakao, Y.; Kato, K.; Umezawa, K. Design, synthesis, and biological evaluation of novel estradiolbisphosphonate conjugates as bone-specific estrogens. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 1143–1148.
27. Arns, S.; Gibe, R.; Moreau, A.; Monzur Morshed, M.; Young, R. N. Design and synthesis of novel bone-targeting dual-action prodrugs for the treatment and reversal of osteoporosis. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 2131–2140. 40
28. Tanaka, K. S.; Dietrich, E.; Ciblat, S.; Metayer, C.; Arhin, F. F.; Sarmiento, I.; Meek, G.; Parr, T. R., Jr.; Far, A. R. Synthesis and in vitro evaluation of bisphosphonated glycopeptide prodrugs for the treatment of 50

osteomyelitis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 1355–1359.

29. EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUC> (accessed January 15, 2017).

30. M100–S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement. Clinical Laboratory Standards Institute. The Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.

31. Freire, M. O. ; Sedghizadeh, P. P. ; Schaudinn, C. ; Gorur, A. ; Downey, J. S. ; Choi, J. H. ; Chen, W. ; Kook, J. K. ; Chen, C. ; Goodman, S. D. ; Zadeh, H. H. Development of an animal model for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm-mediated oral osteolytic infection: a preliminary study. *J. Periodontol.* 2011, 82, 778–789.

32. Manrique, P. ; Freire, M. O. ; Chen, C. ; Zadeh, H. H. ; Young, M. ; Suci, P. Perturbation of the indigenous rat oral microbiome by ciprofloxacin dosing. *Mol. Oral. Microbiol.* 2013, 28, 404–414.

33. Oliphant, C. M. ; Green, G. M. Quinolones: a comprehensive review. *Am. Fam. Physician* 2002, 65, 455–464.

34. Redgrave, L. S. ; Sutton, S. B. ; Webber, M. A. ; Piddock, L. J. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 2014, 22, 438–445.

35. Mustaev, A. ; Malik, M. ; Zhao, X. ; Kurepina, N. ; Luan, G. ; Oppegard, L. M. ; Hiasa, H. ; Marks, K. R. ; Kerns, R. J. ; Berger, J. M. ; Drlica, K. Fluoroquinolone–gyrase–DNA complexes: two modes of drug binding. *J. Biol. Chem.* 2014, 289, 12300–12312.

36. Ayre, W. N. ; Birchall, J. C. ; Evans, S. L. ; Denyer, S. P. A novel liposomal drug delivery system for PMMA bone cements. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 2016, 104, 1510–1524.

37. Nandi, S. K. ; Bandyopadhyay, S. ; Das, P. ; Samanta, I. ; Mukherjee, P. ; Roy, S. ; Kundu, B. Understanding osteomyelitis and its treatment through local drug delivery system. *Biotechnol. Adv.* 2016, 34, 1305–1317.

10

20

30

40

50

38. Lin, J. H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 1996, 18, 75–85.
39. Fong, I. W. ; Ledbetter, W. H. ; Vandenbroucke, A. C. ; Simbul, M. ; Rahm, V. Ciprofloxacin concentrations in bone and muscle after oral dosing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986, 29, 405–408.
40. Sedghizadeh, P. P. ; Jones, A. C. ; LaVallee, C. ; Jelliffe, R. W. ; Le, A. D. ; Lee, P. ; Kiss, A. ; Neely, M. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling for assessing risk of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg. Oral Med. Oral. Pathol. Oral Radiol.* 2013, 115, 224–232. 10
41. Williams, D. B. ; Lawton, M. Drying of organic solvents: quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants. *J. Org. Chem.* 2010, 75, 8351–8354.
42. McKenna, C. E. ; Higa, M. T. ; Cheung, N. H. ; McKenna, M. –C. The facile dealkylation of phosphonic acid dialkyl esters by bromotrimethylsilane. *Tetrahedron Lett.* 1977, 18, 155–158. 20
43. McKenna, C. E. ; Schmidhuser, J. Functional selectivity in phosphonate ester dealkylation with bromotrimethylsilane. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1979, 739–739.
44. David, T. ; Kotek, J. ; Kubicek, V. ; Tosner, Z. ; Hermann, P. ; Lukes, I. Bis(phosphonate) – building blocks modified with fluorescent dyes. *Heteroat. Chem.* 2013, 24, 413–425. 30
45. Kilkenney, C. ; Browne, W. J. ; Cuthi, I. ; Emerson, M. ; Altman, D. G. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Vet. Clin. Pathol.* 2012, 41, 27–31.
46. Faul, F. ; Erdfelder, E. ; Buchner, A. ; Lang, A. G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav. Res. Methods* 2009, 41, 1149–1160. 40

【0306】

実施例 6

カルバメート連結ビスホスホネート–シプロフロキサシンが特に感染性骨疾患の標的化治療向けの能力のある抗菌複合体であることを、本明細書において実証する（図14）。

【0307】

ビスホスホネート（BP）はカルシウムと強力な二座配位相互作用及び三座配位相互作用を形成し、そうして（バイオフィルム病原体も常在している）骨表面又はハイドロキシアパタイト（HA）表面を標的とすることが可能である。ビスホスホネート–カルバメー

トシプロフロキサシン（B C C、化合物6）複合体を設計し、合成し、そして一般的な骨バイオフィーム病原体に対してインビトロ及びインビボで試験することに成功することで骨バイオフィーム標的化抗菌アプローチの実現可能性を実証した。我々の結果はB C C（化合物6）が一般的な長骨及び顎骨骨髓炎生物に対してインビトロで、特に微生物の増殖と抗菌試験のためにバイオフィームモデルを基材としてのH Aと共に使用したときに強力な殺菌プロファイルを示すことを示した。B C C（化合物6）が予測可能な速度の持続的分離を示し、且つ、親薬品であるシプロフロキサシン単体と比較して完全殺菌作用の達成に関して20倍高い活性を示す骨髄炎予防実験設定において前記複合体の化学吸着によってH A上でのバイオフィーム増殖が抑制された。顎骨インプラント周囲炎の動物モデルにおいてインビボでアグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンスのバイオフィームに対するB C C（化合物6）の効力と安全性を実証した。インビボでは10 mg/kg（15.6 μmol/Kg）という単回腹腔内用量の前記複合体によって99%のインプラント周囲殺菌効果が生じ、複数回の投与で投与された親抗生物質であるシプロフロキサシン単体（90.6 μmol/Kg；合計で6倍高いシプロフロキサシンの全体的用量）よりも桁高い活性が示された。この10 mg/kgという単回用量ではより高い用量で複数回投与された親抗生物質であるシプロフロキサシンよりも高い効力と疾患の解決がB C C（化合物6）によって示され、バイオフィーム感染部位における骨標的化／骨生体分布の薬物動態学的利点と持続的抗生物質分離の薬力学的利点のために全身毒性又は副作用の可能性が存在しなかった。

【0308】

歯科インプラントは現代の歯科診療の重要な部分であり、最大で3500万人のアメリカ人が一方又は両方の顎の歯の全てを失っていると推定されている。歯の置換と再構成のためのこれらのインプラントの市場全体が2022年までに42億ドルに達すると期待されている。インプラントの大部分が成功する一方で、これらの補綴の中には、インプラント周囲炎のために失敗し、支持骨の破壊に至るものもある。インプラント周囲炎の発生は二峰性であり、初期（12か月未満）障害と後期（5年超）障害を含む。これらの障害臨界点は両方とも主にインプラント上とインプラント周囲の細菌バイオフィーム感染の結果である。インプラント周囲炎はインプラントの失敗の一般的な理由である。歯科インプラントの失敗は生体機械上の理由、又は生物学／微生物学上の理由によって引き起こされることが一般的である。支持骨の破壊につながる最も重篤な形態の微生物関連インプラント疾患であるインプラント周囲炎の有病率は、現在の文献からは確認困難である。しかしながら、インプラント周囲炎が有病率の上昇と共に問題となりつつあることは最近の研究から示されている⁴。150人の患者を5～10年にわたって追跡した最近の研究からそれぞれ約17%と約30%というインプラント周囲炎の割合が示され、インプラント周囲炎が顕著な問題であることが示されている⁵。初期のインプラント失敗又は骨結合の欠如は個々の問題であり、インプラント処置した顎のざっと9%に起こる⁶。これは上顎ではもっとあり⁶、手術中の細菌感染又は近傍の部位からの細菌感染（例えば歯周炎）と関連し、同様に喫煙、糖尿病、過剰なセメント、及び不十分な口腔衛生状態などのよく認識されており、且つ、修復可能な他のリスク要因とも関連する²。

【0309】

バイオフィーム感染はインプラント周囲炎の疾患原因に含まれる可能性がある。バイオフィーム感染には治療について独自の問題があり、診断困難であることが多く、標準的な抗生物質療法に対して耐性であり、宿主免疫応答に対する抵抗力を有し、そして持続的な難治性感染症を引き起こす⁷。細菌はマトリックス支持群落内に生存するという初期の説明^{8、9}以来、バイオフィーム感染仮説が着実に発展してきている。今では慢性感染症の65%超がバイオフィーム中に生存する細菌によって引き起こされると証明されている⁷。このことは米国のおよそ1200万人の人々がこれらの感染症に罹り、毎年ほぼ50万人の人々が米国内で死んでいることを意味する。インプラント周囲炎及び歯周炎は最も一般的なバイオフィーム感染の中に見受けられる。インプラント周囲炎は歯周炎感染症よりも多様ではない群落（及び主要病原体）¹⁰の点で比較的に単純な感染症であることが分か

っている。グラム陰性種が優位を占めることが典型的である¹¹。顎の感染症を含む他の整形外科領域における感染症又は骨感染症も細菌バイオフィーム群落によって引き起こされ¹²、ここで開発された技術がこれらの疾患でも同様に使用できるようになる。

【0310】

現在のところインプラント周囲炎に対する治療アプローチには限界がある。インプラント周囲炎には幾つかの原因があるが、主な病因は細菌バイオフィームである。インプラント周囲炎の治療には普遍的に受け入れられているガイドライン又はプロトコルが無く、細菌性インプラント周囲炎治療の臨床計画の多くが局所的抗生物質送達及び全身的抗生物質送達¹³、並びに代替骨移植片を使用する再建移植を含む病変の外科的切除¹⁴、¹⁵を含む。しかしながら、深いインプラント周囲ポケットの底、及び感染した顎骨まで局所的抗生物質送達装置を進めること、又はバイオフィーム病原体を殺菌するために感染した顎骨に全身投与された抗生物質を適切に浸透させることすら¹⁶難しいことが臨床上の経験から示されており、後者は抗生物質に本質的なその貧弱な骨（及びインプラント周囲）生体分布又は薬物動態¹⁷に主に起因する。これまでの長期研究では感染したインプラントを消毒薬で局所的に清掃し、且つ、抗生物質の全身投与を行ったときでも進行したインプラント周囲炎病変の40%超において支持骨の追加の喪失があった¹⁵。

【0311】

さらに、長期全身抗生物質療法によって全身毒性又は副作用が生じる可能性があり、耐性が生じる可能性もあった。したがって局所送達系を使用して骨において比較的に高い治療抗菌濃度を達成することが臨床医の習慣になっている。例えば、歯科医は局所送達用の骨移植材料¹⁸とミノサイクリン又はドキシサイクリンの粉末（例えばアレスチン（登録商標））又はクロルヘキシジン溶液（例えばペリオチップ（登録商標））の臨床時混合を用いる。そのようなアプローチは単にスラリーであり、BioVincアプローチのような抗生物質と代替骨との間の強力な結合を意味せず、したがってこれまでに考察されたように比較的に早期の流失と効率性が低い薬物動態という難点がある。さらに、研究者は幾つかの生物分解性及び非生物分解性の局所的抗生物質送達系¹⁹も使用してきた。しかしながら、これらのアプローチは幾つかの限界を有しており、例えば、非生物分解性アプローチ（例えばポリメチルメタクリレートセメント）は抗生物質負荷装置を除去するために2回目の手術を必要とし、ある特定の抗生物質と適合せず、そして非効率的な分離カインेटイクスという難点を有し、幾つかの事例では送達された全抗生物質の10%未満しか分離されない¹⁷。ファイバー、ゲル、及びビーズを含む生物分解性材料に対する関心が増しているが、しかしながらインプラント周囲炎の治療に対するそれらの臨床効力はよく分かっていない³。局所的クロルヘキシジン送達などの効果的な抗菌薬／消毒薬を使用して顎のインプラント周囲炎を治療するときでも、有望な動物試験とヒト試験において実証されるような治療結果においてあまり影響がない¹⁵、¹⁷。まとめると、これまでに言及されたような骨における抗生物質の貧弱な薬物動態がこれらのデータによってさらに裏付けられており、骨結合性／骨標的化持続的抗生物質分離戦略の必要性が強調される。

【0312】

B P - 複合体

現在の治療アプローチの限界を考慮すると、骨／バイオフィーム標的化抗菌剤を開発することは、本分野における顕著な進歩である。本明細書において提供される前記B P - 抗生物質（B P - A b）複合体は骨内及び骨結合バイオフィーム内の貧弱な抗生物質薬物動態又は生物学的利用率に関連する多くの難点を克服することが可能である。これらの化合物は「ターゲット・リリースアプローチ」を介して感染を減少させることができ、そのアプローチは全身毒性及び／又は他の（例えば非感染）組織における薬品曝露に関する懸念を低減することができる。前記B P - A b複合体は代替骨移植片に組み込み可能である。前記B P - A bはB P - フルオロキノロン複合体であり得る。幾つかの例では、前記B P - A bは図15に示されるようにビスホスホネートカルバメートシプロフロキサシン（B C C、化合物6）であり得る。図15の例示構造体は本明細書においてB C C（化合物6）とも呼ばれる。骨移植片に組み込まれると前記B P - A b骨移植材料をB P - A b

一骨移植片と呼ぶことも可能である。例えば、その抗生物質がフルオロキノロンであるときにそれをB P - F Q - 骨移植片と呼ぶことも可能である。これらの化合物は効果的にハイドロキシアパタイト（H A）／骨に吸着することが可能であり、且つ、経時的な持続的分離とバイオフィルム病原体に対する抗菌効果を達成することが可能である。本明細書において提供される前記化合物と前記化合物を組み込む移植材料をインプラント周囲炎の補助的治療又は予防のための抗感染性代替骨移植片として使用することが可能である。前記複合体は持続性分離カイネティクスで前記移植材料から局所的に放出され、我々が本明細書中の何処かで提供される他の結果の中でこれまでにインビトロ及びインビボで実証してきたように、細菌活性又は骨破壊活性が存在する中で切断されることになる。この様に前記移植片は現在の送達経路と比較して高い局所的濃度のF Q、例えばシプロフロキサシンを提供することができる。まとめると、本明細書において提供される前記化合物及び骨移植材料は、強力な多座配位静電相互作用を介して前記移植材料中のカルシウム／H Aに結合した安全な、又は薬理学的に不活性の（非骨吸収抑制性）B P部分に複合体化されている抗生物質を含有することが可能であり、その抗生物質は経時的に分離する。それはこの状況で幾つかの現在の臨床アプローチとして既存の骨移植材料と単純に混合されて泥状物になる局所抗生物質を単に表すだけではない。したがって、リン酸カルシウム鉱物質（H A）に結合したこの化学吸着薬品は本分野における大きな進歩であり、バイオフィルム病原体に対する効果的な殺菌活性のためのインプラント周囲骨への抗生物質送達における限界の多くを克服する。

【0313】

活性薬品分子をB Pに連結することで骨を標的とするという全般的な考えが総説論文において考察されている³⁰。しかしながら、この時点でF D Aに認可された薬品は開発されておらず、初期の試みが、たいていファーマコフォア要件に抵触することによって複合体のどちらの構成要素も不活性化することが分かっている全身的に不安定なプロドラッグが切断不可能な複合体のどちらかになって終わった。キノロンの分野では安定なB P連結同類物と複合体化されるとフルオロキノロンの抗菌特性が消失する顕著な例がH e r c z e g hによって述べられた^{31~32}。したがって、ターゲット・リリースリンカー戦略が必要である。

【0314】

近年、安定性が低い連結技術を活用する医薬化学戦略が出現し始めている。他の研究者によってカルボン酸基を介して幾つかの異なるB P部分にフルオロキノロン類が連結された。彼らは抗生物質であるモキシフロキサシン及びガチフロキサシンのグリコールアミドエステルプロドラッグがラット骨髄炎モデルにおいて予防的に使用されると感染症を抑制することを見出した³³。この同じグループはアミン官能基を介して同じ抗生物質を単純なB P系に係留するためにアシルオキシカルバメート系リンカー及びフェニルプロパノン系リンカーを使用した³⁴。彼らは同じ予防的ラットモデルを使用してこれらの複合体が感染症の確立の抑制の点でも親抗生物質よりも良好であることを示している。T a r g a n t aチーム³⁵はこれらのプロドラッグ戦略のうちの幾つかをグリコペプチド抗生物質であるオリタバンシンについて使用している³⁵。この二重機能薬品は感染症の予防の点で幾らか効果的であるように見える。しかしながら、今日まで彼らは確立した感染症を治療することが可能であることを示す研究を公開しておらず、前記プロドラッグの薬物動態も公開していない。彼らの薬品候補選択は部分的に血漿不安定性に基づいているのでこの治療アプローチで完全に成功するにはこれらの類似体は血流中であまりに不安定であると考えられる。したがって、これらのグループによって開発されたこれらの化合物は前記抗生物質の効果的な局所的濃度を達成することができないと考えられる。

【0315】

B C C化合物（図15）はフェニルカルバメートリンカーのフェニル部分を前記分子のB P部分に直接的に組み込むことができる。前記リンカーの傾向性を変更可能な電子吸引基又は供与基によるフェニル環の修飾を介して分離カイネティクスを変更又は調整することが可能である。さらに、前記B Pコアは骨吸収抑制剤としての有効性を欠いており、し

たがって比較的に強力な窒素含有BP薬（例えばゾレドロネート）のような顎の薬物治療関連骨壊死^{39、40}のリスクを持たない。フェニルカルバメートリンカーを使用するこのターゲット・リリース戦略は骨環境中の細菌バイオフィームに直接的に活性薬品を放出する可能性が高いことが本明細書及び本明細書中の他の実施例において証明されている。骨標的化は非常に効果的であるので前記化合物はプラスチック製容器中に増殖したプランクトン型培養物よりもHA骨マトリックス代用物上に増殖したバイオフィームに対してシプロフロキサシンよりもよく効く。前記カルバメートのフェノール性酸素を除外している切断不可能アミド結合を使用して作製された類似複合体（ビスホスホネートアミドシプロフロキサシン；BAC；化合物11）はどんな状況下でも細菌増殖に対してほとんど効果を持たないことが分かり、前記複合体の能動的な切断が抗菌活性に必要であることを示した。

10

【0316】

BCC（化合物6）の合成スキームが図16に示されている。前記化合物の特性が¹H、¹³C、及び³¹PのNMR並びにマスマスペクトロメトリーによって解析された。抗菌活性が主に分離されたシプロフロキサシンによるものであるかどうかの究明に役立てるため、我々は前記複合体からシプロフロキサシンを分離しないように設計されているアミド連結複合体も同様に合成することにした。この化合物の合成は円滑に行き（図31）、妥当な収率で対照化合物BAC（化合物11）を得た。

【0317】

一群の黄色ブドウ球菌（SA）株に対するBCC（化合物6）（「BCC（6）」とも呼ぶ）、BAC（化合物11）（「BAC（11）」とも呼ぶ）、及び親薬品であるシプロフロキサシンの最小阻害濃度（MIC）を決定するために一連のアッセイを実施した。欧州薬剤感受性試験委員会ガイドライン（参照番号43）に従う希釈アッセイを用いてこれらの実験を実施した。それらの3種類の化合物の試験（図17）より、BCC（化合物6）複合体がこれらの病原体に対して顕著な殺菌活性を維持する一方でBAC（化合物11）はその活性の大半を失っていることが示されている。これらの抗生物質感受性試験（AST）データとMICデータは、シプロフロキサシンとBCC（化合物6）がプランクトン型及び臨床的に妥当なSA病原体に対して強力な殺菌活性を有しており、BAC（化合物11）の弱い活性によって証明されているように複合体化のための連結が親薬品の抗菌活性に影響を与えている。これらの株に対する我々のシプロフロキサシンの試験は確定済み臨床ブレイクポイントと一致した。

20

30

【0318】

HAは骨の主要無機成分であるので骨の代用物としての懸濁HAビーズに対する吸着について前記化合物を試験した。ビーズの除去後の上清中の残留複合体の測定によって示されるように我々のBCC（化合物6）は実際にHAビーズによって吸収される（図18）。BCC（化合物6）について決定された λ_{max} である275nmの波長での吸光度を用いて分光光度法により0時間と24時間の時点で上清中の複合体を測定した。これによりBCC（6）がこの骨代用物に結合していることが明確に示される。BAC（化合物11）の結合も同様に引き起こすことになるこのタイプのBPの結合とBCC（化合物6）のデータが一致しなかったので（参照番号35、44）我々はBAC（化合物11）の結合を測定しなかった。

40

【0319】

次のインビトロ試験はBCC（6）の骨代用物標的化活性をSA株に対するMIC活性によって示されるシプロフロキサシンの迅速な分離と組み合わせることであった。この実験のため、指定された濃度の前記複合体又はシプロフロキサシンの溶液でHAディスクを前処理し、続いてそれらのディスクを洗浄して前記化合物溶液を除去した。我々の公開された方法に従ってSA（ATCC-6538株）のバイオフィームを増殖させた。24時間の増殖後にコロニー形成単位（CFU）の定量的計数を実施した。DMSO及びPBSで前処理されたディスクを対照として使用した。BCC（6）が10 μ g/mLで全ての細菌増殖を抑制する（図11）一方で純粋なシプロフロキサシンは100 μ g/mLで完

50

全に抑制的になったことが結果より示された。前記複合体の分子量は純粋なシプロフロキサシンの分子量のおよそ半分であるのでこのことは細菌バイオフィルムの増殖の完全抑制の点でB C C（化合物6）が親薬品よりもざっと20倍強力であることを示した。このことは骨マトリックス環境中で経時的に前記複合体から薬品が分離することを裏付けている。アミド複合体B A C（11）は非常に高い濃度でも代替骨上でバイオフィルムの増殖を抑制せず（データを示さず）、シプロフロキサシンの分離がこの活性にとって重要であり、これまでの文献及びプランクトン型培養物の試験（図18）^{30, 34, 35, 44}と一致することを示した。

【0320】

我々のB C C（6）が殺菌活性を有していることを示す前述の結果について、我々は動物モデルのバイオフィルム感染に対してその活性を試験しようとした。簡単に説明すると、ラットの正常な細菌叢に常在性の細菌ではなく、顎骨感染症に特異的な細菌であるアグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンス（A a；野生型R型株D 7 S-1；a血清型）を 10^9 C F Uで小型チタン製インプラント上に予備培養した。我々の動物試験の前に親薬品であるシプロフロキサシンに対するA aの感受性を確認するために我々は以前に記載された長骨骨髓炎病原体について実施されたようにA S TアッセイとM I CアッセイをA aについて実施した。ディスク拡散阻止帯分析法によって40 mmを超える直径が明らかになり、且つ、M I C⁹⁰は2 mg / mLであり、親薬品であるシプロフロキサシンに対するA aの強い感受性が示された。A aバイオフィルムを担持する接種済みインプラントを12匹のラットの中に設置した（動物当たり2個のインプラント）。このモデルは周囲の顎骨上に特徴がはっきりしたバイオフィルム感染を確実に発症し、炎症及び関連のインプラント周囲炎疾患を引き起こした（参照番号45）。バイオフィルムを発生させた後に動物をランダム化して3処置群（B C C（6）の10 mg / kg用量の単回投与を受ける5匹の動物、B C C（6）の0.3 mg / kg用量の週3回の投与を受ける2匹の動物、及び対照治療w i t h無菌生理食塩水による対照処理を受ける5匹の動物）に分けた。B C C（6）の10 mg / kgでの単回投与は週に3回10 mgの計画で投与される合計30 mg / kgの用量で投与されたシプロフロキサシンとほぼ同様に効果的であることがパイロット実験（2動物／群）により示された（データを示さず）。したがって、我々は動物の利用を減らすためにより大規模な実験ではシプロフロキサシン対照を含めないことにした。全ての動物が処置及び薬物療法をよく忍容し、有害事象は無かった。臨床的には、我々は対照群の動物の大多数が処置群の炎症を起こしていないインプラント周囲組織を有する動物の大多数と比較して局所的プロテアーゼ周囲炎の証拠を示すことを麻酔時及び外科的摘出時に観察し、インプラント保持率は全体で24インプラント中23インプラント（96%）であり、強固な統計分析を提供した。

【0321】

安楽死後の摘除されたインプラント周囲組織（24インプラント中23インプラント）に由来するA aのC F Uを定量的に決定し、この実験で10 mg / kgの用量のB C C（6）の単回投与が約10の6乗単位の殺菌を示し、低用量の複数回投与でさえ10の2～3乗単位（99%～99.9%）の殺菌を示す結果が図19に示されている。この実験について10 mg / kgの用量のB C C（6）の単回投与が最高の効力を示し、対照群と比較すると非常に統計学的に有意であった（ $p=0.0005$ ）。

【0322】

フルオロキノロン類の投与について静脈内経路又は胃腸経路と相対的な生物学的同等性が存在するのでこれらの動物モデルの両方で腹腔内注射によりB C C（6）を送達してその化合物への曝露を確保した。分離可能B P-抗生物質（B P-A b）複合体がインプラント周囲疾患及び関連の骨髓炎の治療のための薬品として使用可能であることがこれらの結果によって示されていると我々は考えている。ここで我々はこれらの結果を利用して前記B P-A b複合体を局所的口腔送達と放出のための歯科代替骨移植片材料に組み込むことを提案する。

【0323】

実施例 7

その他のBP-Ab複合体の設計と合成（図20）

例えば、カルバメート系リンカー（例えばカルバメート、S-チオカルバメート、及びO-チオカルバメート）を介してBP（例えば4-ヒドロキシフェニルエチリデンBP（BP1、図20）、そのヒドロキシ含有類似体（BP2、図20；比較的高い骨親和性を有する）、及びパミドロネート（BP3、図20）に複合体化されているシプロフロキサシン及びモキシフロキサシンを使用して追加のBP-Ab複合体を設計することが可能である。図21はO-チオカルバメートリンカーを含むBP-Ab複合体の合成についての例となる合成スキームを示している。ニューマン・クワート転位を介するO-チオカルバメート結合を有する複合体の異性体化によってS-チオカルバメート結合（易変性がわずかに高い）を有する複合体を得ることができる（参照番号47、48）。これらの標的の急速合成の実現可能性を実証するための予備的な化学が既に実施されている。したがって、骨親和性の付加は α -OH含有性BPを使用してよく実証されている（49）。付加された骨親和性によって骨表面における前記複合体の濃度が上昇し、比較的の高い薬品の局所的濃度が短期及び長期にわたって容易に達成される。 α -OHビスホスホネートエステルはホスホノホスフェートに再構成されやすいので α -OH含有性BP（BP2及びパミドロネート、図20）を有する複合体の合成のためにその α -OHはtert-ブチルジメチルシリル（TBS）基によって保護されてよい（スキーム2、図22）（50）。その後、 α -O-TBS BP2エステルは4-ニトロフェニルクロロホルマートによって活性化され、そして図21に示されているように同様にシプロフロキサシン又はモキシフロキサシンと反応する。 α -O-TBS BP3エステルについては、フェノール基を有するリンカー（例えば、リンカー1（レゾルシノール）、リンカー2（ヒドロキノン）、リンカー3（4-ヒドロキシフェニル酢酸）、図20）を使用してBPと抗菌剤を係留する。ここではリンカー3を使用する合成経路が例として示されている（スキーム3、図23）。全てのBP-Ab複合体を識別するためにそれらの特性を ^1H 、 ^{31}P 、及び ^{13}C のNMR、MS、HPLC、並びに元素分析によって分析する。

【0324】

前記BP-Ab複合体の鉱物質結合親和性を決定する。簡単に説明すると、大粒径（一様に1~2mm）の無機牛骨の重量を正確に量り（1.4~1.6mg）、適切な量のアッセイ緩衝液（0.05%（重量/体積）ツイーン20、10 μM EDTA、及び100mM HEPES pH=7.4）を含有する4mLの透明バイアル瓶の中で3時間にわたって懸濁することができる。その後、量を増やしていったBP-Ab（0、25 μM 、50 μM 、100 μM 、200 μM 、及び300 μM ）と共にこの骨材料をインキュベートすることができる。前記アッセイ緩衝液の中で試料を37 $^{\circ}\text{C}$ で3時間にわたって穏やかに振盪することができる。平衡時間の後にそれらのバイアル瓶を10,000rpmで5分間にわたって遠心分離して固形物と上清に分けることができる。その上清（0.3mL）を収集することができ、Shimadzu UV-VIS分光光度計（275nmの波長）を用いて平衡溶液の濃度を測定する。蛍光発光を用いて結合パラメーターを計算することも可能である。対照としてHAが存在しない状態で同様の方法を用いて非特異的結合を測定することが可能である。投入量と結合後に上清中に回収された量との間の差異からHAに結合した親薬品/BP-Ab複合体の量を推測する。PRISMプログラム（Graphpad社、米国）を使用して結合パラメーター（ K_d と B_{max} はそれぞれ平衡解離定数と最大結合部位数を表す）を計算し、5回の独立した実験でそれらの結合パラメーターを測定することが可能である。20 μM （親BPの約2倍の K_d ）よりも低い平衡解離定数（ K_d ）を有する化合物が好まれ得る。2標本t検定を用いて前記BP-Abの結合パラメーターを評価することが可能である。各群におけるサンプルサイズ（ $n=5$ ）を用いて80%の統計力及び0.05の片側第一種過誤において1.72の効果量を検出することができる。

【0325】

前記BP-Ab複合体の結合安定性を決定することができる。簡単に説明すると、異な

る pH (pH=1、4、7.4、10) とヒト又はイヌの血清を有する PBS 緩衝液において各 BP-Ab 複合体のリンカー安定性を検査することが可能である。400 μ L の上述の PBS、又は 400 μ L の 50% (PBS 中の体積/体積) のヒト又はイヌの血清の中に BP-Ab を懸濁することが可能である。その懸濁液/溶液を 37℃ で 24 時間にわたってインキュベートし、そして 13000 rpm で 2 分間にわたって遠心分離することが可能であり、その上清を回収することが可能である。メタノール (上清に対して 5 倍量) を各上清に添加することが可能であり、分離したフルオロキノロンを抽出するためにその混合物をボルテックスミキサーで 15 分間にわたって攪拌することが可能である。その後、その混合物を 10000 rpm で 15 分間にわたって遠心分離して不溶性物質を沈殿させることが可能である。その抽出されたフルオロキノロンを含有する上清を回収し、乾燥するまで蒸発処理することが可能である。それらの乾燥沈殿物を PBS 中に再懸濁することが可能であり、これまでに記載されたように UV-VIS 測定により分離したフルオロキノロンの量を決定することが可能である。その後、投入量と分離した薬品の測定量に基づいて分離したフルオロキノロン薬品のパーセンテージを計算することができる。分離した薬品が何であるか LC-MS 分析、及び/又は濃度が充分である場合には NMR により確認することができる。

【0326】

HA ディスク上でのバイオフィーム増殖のインビトロ阻害を決定することができる。簡単に説明すると、特注仕様のディスクの製造のために市販の HA 粉末を使用することが可能である。結合剤を使用せずに 9.6 mm の直径の粉末ペレットをプレス加工することが可能である。焼結を 900℃ で行うことが可能である。静的引張試験、圧縮試験、及び曲げ試験用の Universal Testing System (Instron モデル 3384; Instron 社、ノーウッド、マサチューセッツ州) を使用してそれらの錠剤を圧縮することが可能である。それぞれ LEXT OLS 4000 顕微鏡 (Olympus 社、センターバレー、ペンシルバニア州) と Metrotom 1500 マイクロトモグラフ (Carl Zeiss 社、オーバーコッペン、ドイツ) を使用する共焦点顕微鏡法とマイクロトモグラフィー (マイクロ CT) により、製造された HA ディスクの品質を検査することが可能である。その後、次の濃度、すなわち 800 mg/mL、400 mg/mL、200 mg/mL、100 mg/mL、50 mg/mL、25 mg/mL、10 mg/mL、5 mg/mL、及び 1 mg/mL の各 BP-Ab 複合体及びシプロフロキサシン/モキシフロキサシンに HA ディスクを投入し、24 時間にわたって 37℃ で放置することが可能である。インキュベーション後に HA ディスクを取り出し、1 mL の PBS に投入し、軽揺動式攪拌機内で 5 分間にわたって放置することが可能である。後続の 3 回の洗浄をこの様に実施する。洗浄後に 1 mL の Aa 懸濁液をディスクに投入し、24 時間にわたって 37℃ で放置することが可能である。その後、ディスクを洗浄して結合しなかった細菌を除去し、それらのディスクをボルテックスミキサーで激しく攪拌することが可能である。その後、得られた懸濁液の段階希釈物を改変 TSB 寒天プレート上に蒔くことができ、24 時間後にコロニーの増殖を数える。

【0327】

臨界サイズに対する前記 BP-FQ-骨移植片のオッセオインテグレーション効果は骨移植向けの上歯槽インプラント周囲欠損モデルにおいて評価可能である。簡単に説明すると、このスプリットマウスデザインにおいて 6 匹のビーグル犬 (3 匹のオス、3 匹のメス) の下顎の両側の PM2~PM4 を抜き取り、そして 12 週間にわたって治癒させる。歯槽頂切開を行い、続いて粘膜骨膜弁の翻転を行う。骨切除術を実施して 6 mm の上歯槽欠損を作製する。注水装置内臓型ドリルを使用して大量に注水しながら徐々に直径を増やす連続的切削により小臼歯部の各々にインプラント部位骨切除調製部位を作製する。作製された欠損に関して 4 mm 歯槽頂上に向かって、且つ、頬側皮質骨板から同じ距離にインプラントが配置されるようにインプラント (Astra Tech Osseospeed Tx (登録商標) 3×11 mm) を両側の PM2~PM4 の位置に設置する。イヌを無作為に異なる 3 群 (群当たり 2 匹のイヌ) に分ける。

【0328】

第1群：B P－フルオロキノロンを化学吸着させた無機牛骨（1 gで1～2 mmの大粒径）を右側に使用し、コラーゲンプラグ（陰性対照）を左側に使用する。

【0329】

第2群：無機牛骨（1 gで1～2 mmの大粒径；陽性対照）を右側に使用し、コラーゲンプラグ（陰性対照）を左側に使用する。

【0330】

第3群：B P－フルオロキノロンを化学吸着させたB i o－O s s（登録商標）（1 gで1～2 mmの大粒径）を右側に使用し、B i o－O s s（登録商標）（1 gで1～2 mmの大粒径、陽性対照）を左側に使用する。

【0331】

上記の実験の化学と抗菌アッセイの結果はここに記載される全てのインビボ実験に使用される移植材料への吸着向けの前記複合体の理想的な標準的な量の計算についての情報を伝えることができる。予備的な結果に基づいて予測された初期の計算は1 gの移植材料に吸着された5 mg以下の複合体によって試験病原体のMICの2～3桁上の殺菌活性が提供されることを示している。我々のB P－フルオロキノロン複合体は市販の骨移植材料、例えばB i o－O s s（登録商標）を含む広範囲の骨移植材料に適用可能であり、したがって我々は前記複合体の広範な適用の実証のための試験において自家製の無機牛骨とB i o O s sを陽性対照として選択する。標準的な量の生体材料で両側の各インプラントのプラットフォームまで全ての欠損を（上記の群に応じて）充填し、安定性を改善するためにB i o－G i d e（登録商標）膜を使用して移植片とインプラントをカバーする。骨膜減張切開、内側マットレス、そして最後に縁線単純結節用縫合糸（P T F E 4，0，C y t o p l a s t、米国）を使用して引張状態が無いように弁を閉じる。この時点でマイクロCTを取得し、炎症と有害事象について動物を臨床的にモニターする。さらに、後続の実験に記載されているようにこれらの動物は移植材料内の構成成分（例えば、完全な複合体、B P、抗生物質、又はリンカー）に対するあらゆる全身曝露の評価のためにPK試験を受ける。12週間後に動物を殺処理し、下顎を摘除し、且つ、マイクロCTで検査し、続いて組織学用の調製物を作製する。実験後のスキャンとの比較のために顎の基線マイクロCTを撮影する。定量的3D容量測定マイクロCTと組織形態計測分析を実施してインプラント周囲部位に存在する新しい骨の体積、並びに第1骨インプラント間接触部、総欠損領域、再生領域、総欠損領域内の再生領域、再生骨、残留代替骨材料、ミネラル化組織のパーセンテージ、軟組織のパーセンテージ、及び空隙のパーセンテージを調査する。最後に局所的口腔療法に由来する忍容性の問題についての肉眼的及び顕微鏡的兆候に関して内臓と系の死後検査するために剖検を実施する。

【0332】

イヌインプラント周囲炎モデルにおいて前記B P－F Q－骨移植片の抗菌効果を評価することができる。簡単に説明すると、このスプリットマウスデザインにおいて外傷が最小限の方法を用いて8匹のビーグル犬の下顎の両側のP M 2～P M 4を抜き取る（4匹のオス、4匹のメス；合計48個の歯）。3か月の治癒後に顎の両側において粘膜骨膜弁を持ち上げ、注水装置内臓型ドリルを使用して大量に注水しながら徐々に直径を増やす連続的切削により小白歯部の各々に骨切除調製部位を作製する。非埋伏型手法を用いてインプラント（A s t r a T e c h O s s e o s p e e d T x（登録商標）3×11 mm）を各部位に設置する。インプラント設置の順序は両側で同一であるが、コンピューター生成されたランダム化スキームによってイヌとイヌとの間でランダム化される。吸収性縫合糸によって近接させた前記インプラントと弁にヒーリングアバットメントを接続する。その後、歯磨き剤を用いて歯を磨くことを含むブラークコントロール計画を週に4回発動する。インプラント設置から12週間後のちょうど実験的インプラント周囲炎を始める前に無菌ペーパーポイント（D e n t s p l y、サイズ35；M a i l l e f e r社、バレーグ、スイス）を使用して全てのインプラント周囲部位から微生物試料を獲得し、微生物分析のためにエッペンドルフチューブ（S t a r l a b社、アーレンスブルク、ドイツ）の中

10

20

30

40

50

にすぐに入れる。我々が以前に詳細に説明したように（55）DNA抽出と16S rRNAのPCR増幅を介して微生物分析を実施する。Roche 454 GS FLXプラットフォームを使用してPCRアンプリコンの配列を解析し、Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME) ソフトウェアパッケージ（56）によってデータ分析する。以前に記載された我々の第I相試験において決定したように試料からコロニー形成単位数（CFU/mL）を決定する。この時点で実験的インプラント周囲炎を次のように開始する。ラット動物モデルにおける我々の以前の実験において実施され、また我々の以前の動物インプラント周囲炎試験においても実施されたように重要な歯周病原体であるがイヌの細菌叢内には存在しないアグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンス（Aa）のバイオフィルムをインビトロで前記ヒーリングアバットメント上に創始する。それらのバイオフィルム接種ヒーリングアバットメントを前記インプラント上に設置し、インプラント頸部の周囲の辺縁下の位置に綿結紮糸を設置する。10週間の細菌感染の後に細菌の試料採取と分析を前回のよう実施し、マイクロCTスキャンをインプラント周囲炎欠損の基線として撮影する。全層頬舌弁を持ち上げることで全てのインプラント部位を外科的に切除し、エアアブレーション装置を使用してインプラント表面から既存のあらゆる歯石を取り除き、そして0.12%グルコン酸クロルヘキシジン中に浸したガーゼでインプラント表面をぬぐうことによりこの実験的インプラント周囲炎モデルの治療を開始する。それらの動物を異化のような4群（群当たり2匹のイヌ）に分ける。

【0333】

第1群：B Pーフルオロキノロンを化学吸着させた無機牛骨（1gで1～2mmの大粒径）を右側に使用し、コラーゲンプラグ（陰性対照）を左側に使用する。

【0334】

第2群：無機牛骨（1gで1～2mmの大粒径；陽性対照）を右側に使用し、コラーゲンプラグ（陰性対照）を左側に使用する。

【0335】

第3群：B Pーフルオロキノロンを化学吸着させた無機牛骨（1gで1～2mmの大粒径）を右側に使用し、抗菌剤放出器具（100mg局所ミノサイクリン、陽性対照）を左側に使用する。

【0336】

第4群：B Pーフルオロキノロン（陽性対照）を化学吸着させたBio-Oss（登録商標）（1gで1～2mmの大粒径）を右側に使用し、抗菌剤放出器具（100mg局所ミノサイクリン、陽性対照）を左側に使用する。

【0337】

処置群への割り当てはデータ分析を行う予定の研究者に対して隠される。標準的、且つ、同等の量の抗菌剤を処置群に使用する。治療後に弁の位置を戻し、縫合し（PTFE 4, 0, Cytoplast、米国）、縫合糸の除去から1週間後に口腔衛生手段を再開する。臨床検査及びマイクロCTスキャン検査を手術から3か月後の時点で再度実施し、上に記載したような分析のためにこの時点で微生物試料も取得する。インプラント周囲炎手術から6か月後に動物を安楽死させ、マイクロCTスキャンを実施し、そして「臨界サイズ歯槽上インプラント周囲欠損モデル」の項で詳細に説明したように組織学的パラメーターの評価のために顎を摘除する。臨床所見及びX線所見との相関について以前に詳細に説明されたように（参照番号57）組織学切片から炎症スコアを決定する。

【0338】

統計分析：

SPSS 22.0（IBM社、アーモンク、ニューヨーク州）及びExcel 2016（Microsoft社、レッドモンド、ワシントン州）を使用して統計計算を行う。全ての動物試験についてサンプルサイズの見積もりをするためにG Power 3ソフトウェア⁵⁸を使用して検定力分析を実施した。これらの動物試験からのデータ収集の後にデータ（パラメトリック又は非パラメトリック）の分布を理解し、且つ、平均値、標準誤差

10

20

30

40

50

、標準偏差、尖度と歪度、及び95%信頼レベルを生成するために定量結果をまず記述統計学によって分析する。場合に応じてクラスカル・ウォリス検定、ANOVA、又は混合線形モデルを用いてそのデータを分析し、群と群とを比較するときに $\alpha = 0.05$ のレベルで統計学的有意性を実施する。所見をさらに確認するために独立t検定を活用するポストホック検定とダネットの多重比較検定も実施する。全ての動物実験は、結果の質、信頼性、有効性、及び再現性を確保するために動物実験について報告するためのARRIVEガイドライン⁵⁹を使用して記載されている。

【0339】

前記薬品化合物と構成成分の安定性及びBCC(6)のインビトロADMEを評価することができる。このデータはヒトの代謝と実験的動物との間で大きな差異が存在する可能性はあるか確定するのに役立ち得る。ヒト、ラット、及びイヌの肝臓ミクロソーム及び肝細胞と6のインキュベーションとその後の代謝混合物のLC/MS分析を実施する。シプロフロキサシンの代謝プロファイル⁶²、⁶³が知られているので我々は前記分子のBP部分及び前記親のあらゆる代謝物(例えばシプロフロキサシンについて知られているようなピペラジン環切断)に焦点を当てる。代謝物がインビトロで決定されたところで上記の他のインビボ実験の血漿試料を使用してインビボのこれらの化合物を定常状態で決定する。

【0340】

BCC(6)の毒物学をラット及びイヌで評価してNOAELを決定することができる。ラット及びイヌにおけるNOAELと最大忍容投与量(MTD)を決定するために我々は用量範囲探索試験を最初に実施する。6匹のラット(3匹のオス、3匹のメス)からなる群に対して6を10mg/kgの用量で、又はその時点での我々の最良評価に基づいて単回静脈内投与する。急性毒性が認められる(MTD)まで用量を倍増し、その後で効果が見られなくなるまでこの用量を20%ずつ順次減少させていってこの用量がその化合物のNOAELになる。毒性を軽度、中程度、又は重度と評価し、2匹以上の動物における中程度の毒性又は1匹以上の動物における重度の毒性がMTDと定義される⁶⁴。5日間にわたって体重と臨床観察について動物を追跡調査する。5日後に動物を安楽死させ、内臓重量と組織学を評価するために剖検を実施する(臨床BP毒性学に基づいて肝臓と腎臓を含めるために15切片)。同様の用量範囲探索試験をイヌ(性別ごとに1匹;ラットの体重を250g、イヌの体重を10kgと仮定して相対成長率から決定される4mg/kgという等価の用量から開始する)において実施し、その試験はラットと同様に同じ終末試験に加えて血液学と臨床化学を含む。この実験は合計で4~6コホートを用いることが可能である。

【0341】

トキシコキネティクス並びにNOAEL及びMTDにおける回復試験を含む拡大急性毒性試験を動物群に実施することができる。各用量の毒性評価に性別ごとに10匹ずつ、トキシコキネティクスのために性別ごとに9匹ずつ、そして回復試験のために性別ごとに5匹ずつのラットを含む48匹のラット群を使用することができる。6タイムポイント(オス又はメスから無作為に各時点につき3匹のラットを選択する)においてトキシコキネティクスを実施し、続いて各用量を投与する。タイムポイントは投与後5分、30分、60分、120分、12時間、及び24時間である。動物の回復を14日間にわたって観察し、その後で上記の試験のように内臓重量と組織学を評価する。トキシコキネティクス試験から非コンパートメント分析(NCA)によってCmax、AUC、及び半減期を含むPKパラメーターを決定する。全部で10匹の動物(投与のために性別ごとに3匹、回復試験のために性別ごとに2匹)を含むことを除いて同一の実験をイヌにおいて実施し、ラットと同じ時点で各動物から血液採取する。イヌのNOAELにおけるAUCを使用して目的2において記載される骨移植/BP-フルオロキノロン複合体の最大許容曝露量を計算し、イヌにおけるPK実験を用いてこのレベルの1/100を超える全身曝露が存在するか決定する。

【0342】

母集団解析のために臨床的に確認されているBP薬物動態のユニークな3コンパートメ

10

20

30

40

50

ント（血液／尿／骨）数理モデル⁶⁵を現在のプロジェクトに適用する。イヌ試験から、我々はBP及びフルオロキノロン濃度の決定のために安楽死時点の各動物において骨（顎と大腿部）、腱（腓腹筋）を試料採取する。我々はこれらのデータ及び我々のモデルを組み合わせてイヌにおけるタイムコースを説明する。このモデルから我々は交互投与又は反復投与されたBPとフルオロキノロンの両方に対する骨と軟骨の予期される曝露をシミュレートすることができる。これにより後続のヒト投与についての情報を伝えることができる。これまでに記載されたように^{66～68}、R向けのPmetricsパッケージ（Laboratory of Applied Pharmacokinetics and Bioinformatics、ロサンゼルス、カリフォルニア州）内に実装されている適応ガンマ付きノンパラメトリック適応型グリッド（NPAG）アルゴリズムを全てのPKモデルフィッティング法に使用する。測定された濃度の関数として誤差多項式を使用することの理由はアッセイ誤差（SD）であり、赤池の情報基準、予想濃度に対する観察濃度の回帰、PKパラメーター共変数回帰の視覚的プロット、及び節約則を用いて性能比較評価を完了する。

【0343】

実施例8

前記BP-Ab複合体を移植片及び移植器具に組み込むことができる。複数の実施形態において、ほんのわずかな例を挙げるとBioOss（登録商標）（Geistlich Pharma AG社、スイス）又はMinerOss（登録商標）（BioHorizons社、バーミングハム、アラバマ州）の牛骨材料など、既に認可されている骨移植製品に前記BP-Ab複合体のうちの1又は複数を組み込むことができる。歯科代替骨移植片として使用される支持材料と前記BP-Ab複合体を混合することが可能である。その製品は無機牛骨材料に吸着された前記複合体を含むことになる。この材料によって骨移植片移植領域への抗生物質の局所送達が行われて細菌感染率とインプラント周囲炎及び他の感染症などの関連の歯科病理が減少する。我々の製品の歯科応用にはインプラント周囲炎の治療ばかりか抜歯窩の維持、堤又は洞底の拳上術、歯周炎の予防又は治療、骨髄炎又は骨壊死の治療又は予防、又はそのような骨移植片が有益であり得る他の口腔歯周外科用途が含まれ得るだろう。前記BP-フルオロキノロン複合体材料は本質的に代替骨移植片に吸着されることになり、我々の予備的データは感染症の場合では骨破壊領域への持続的放出を示しており、それによって我々の製品は抗生物質を感染部位へより効果的に送達することができる、前記複合体化合物のどちらの成分に対する全身曝露も無視できる。

【0344】

前記移植材料は洞底移植術などの非歯科移植術にとっても有益であり得る。

【0345】

実施例6～8の参照先

1. http://www.aaaid.com/about/press_room/dental_implants_faq.html
2. Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clinical Oral Implants Research*. 2002;13(1):1-19. doi: 10.1034/j.1600-0501.2002.130101.x. PubMed PMID: 12005139.
3. Norowski PA, Jr., Bumgardner JD. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;88(2):530-43. doi: 10.1002/jbm.b.31152. PubMed PMID: 18698626.
4. Salvi GE, Cosgarea R, Sculean A. Prevalence and Mechanisms of Peri-implant Disease

s. J Dent Res. 2016. doi: 10.1177/0022034516667484. PubMed PMID: 27680028.

5. Meijer HJA, Raghoobar GM, de Waal YCM, Vissink A. Incidence of peri-implant mucositis and peri-implantitis in edentulous patients with an implant-retained mandibular overdenture during a 10-year follow-up period. *Journal of Clinical Periodontology*. 2014;41(12):1178-83. doi: 10.1111/jcpe.12311. PubMed PMID: 25229397.

6. Jemt T, Olsson M, Stenport VF. Incidence of First Implant Failure: A Retrospective Study of 27 Years of Implant Operations at One Specialist Clinic. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2015;17:E501-E10. doi: 10.1111/cid.12277. PubMed PMID: 25536273.

7. Wolcott RD, Ehrlich GD. Biofilms and chronic infections. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2008;299(22):2682-4. doi: 10.1001/jama.299.22.2682. PubMed PMID: 18544729.

8. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. 1987;41:435-64. PubMed PMID: 3318676.

9. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Scientific American*. 1978;238(1):86-95. PubMed PMID: 635520.

10. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol*. 2012;39(5):425-33. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01856.x. PubMed PMID: 22417294; PubMed Central PMCID: PMC3323747.

11. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(10):975-82. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01566.x. PubMed PMID: 18828812.

12. Stoodley P, Ehrlich GD, Sedghizadeh PP, Hall-Stoodley L, Baratz ME, Altman DT, Soteranos NG, Costerton JW, DeMeo P. Orthopaedic Biofilm Infections. *Curr Orthop Pract*. 2011;22(6):558-63. PubMed PMID: 22323927; PubMed Central PMCID: PMC3272669.

13. Javed F, AlGhamdi AST, Ahmed A, Mikami T, Ahmed HB, Tenenbaum HC. Clinical efficacy of antibiotics in the treatment of peri-implantitis. *International Dental Journal*. 2013;63 (4) :169–76. doi: 10.1111/idj.12034. PubMed PMID: 23879251.
14. Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammacher C, Stein JM. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis – a review. *Head Face Med*. 2014;10. doi: 10.1186/1746-160x-10-34. PubMed PMID: 25185675; PubMed Central PMCID: PMC4164121.
15. Leonhardt A, Dahlen G, Renvert S. Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following treatment of peri-implantitis in man. *J Periodontol*. 2003;74 (10) :1415–22. doi: 10.1902/jop.2003.74.10.1415. PubMed PMID: 14653386.
16. Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 2002;28:177–89. PubMed PMID: 12013341.
17. Levison ME, Levison JH. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. *Infect Dis Clin North Am*. 2009;23 (4) :75–89. doi: 10.1016/j.idc.2009.06.008. PubMed PMID: 24484576; PubMed Central PMCID: PMC4079031
18. Kaur K, Sikri P. Evaluation of the effect of allograft with doxycycline versus the allograft alone in the treatment of infrabony defects: A controlled clinical and radiographical study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2013;10 (2) :238–46. PubMed PMID: 23946743; PubMed Central PMCID: PMC3731967.
19. Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials*. 2016;81:58–71. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.12.012. PubMed PMID: 26724454.
20. Schmitt CM, Moest T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Anorganic bovine bone (ABB) vs. autologous bone (AB) plus ABB in maxillary sinus grafting. A prospective non-randomized clinical and histomorphometrical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26 (9) :1043–50. doi: 10.1111/clr.12396. PubMed PMID: 24730602.
21. Kluin OS, van der Mei HC, Busscher HJ, Neut D. Biodegradable vs non-biodegradable a

10

20

30

40

50

- ntibiotic delivery devices in the treatment of osteomyelitis. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013;10 (3) :341–51. doi: 10.1517/17425247.2013.751371. PubMed PMID: 23289645.
22. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/019537s073,020780s030lbl.pdf
23. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RGG, Ebetino FH. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*. 2006;38 (5) :617–27. doi: 10.1016/j.bone.2005.05.003. PubMed PMID: 16046206.
24. Russell RGG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008;19 (6) :733–59. doi: 10.1007/s00198-007-0540-8. PubMed PMID: 18214569.
25. Kavanagh KL, Guo KD, Dunford JE, Wu XQ, Knapp S, Ebetino FH, Rogers MJ, Russell RGG, Oppermann U. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as anti osteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103 (20) :7829–34. doi: 10.1073/pnas.0601643103. PubMed PMID: 16684881; PubMed Central PMCID: PMC1472530.
26. Kashemirov BA, Bala JLF, Chen X, Ebetino FH, Xia Z, Russell RGG, Coxon FP, Roelofs AJ, Rogers MJ, McKenna CE. Fluorescently labeled risedronate and related analogues: "magic linker" synthesis. *Bioconjug Chem*. 2008;19 (12) :2308–10. doi: 10.1021/bc800369c. PubMed PMID: 19032080.
27. Junka AF, Szymczyk P, Smutnicka D, Kos M, Smolina I, Bartoszewicz M, Chlebus E, Turniak M, Sedghizadeh PP. Microbial biofilms are able to destroy hydroxyapatite in the absence of host immunity in vitro. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015;73 (3) :451–64. doi: 10.1016/j.joms.2014.09.019. PubMed PMID: 25544303.
28. Sedghizadeh PP, Kumar SKS, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66 (4) :767–75. doi: 10.1016/j.joms.2007.11.035. PubMed PMID: 18355603.

10

20

30

40

50

29. Sedghizadeh PP, Kumar SKS, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW. Microbial biofilms in osteomyelitis of the jaw and osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy. *J Am Dent Assoc.* 2009;140(10):1259–65. PubMed PMID: 19797556.
30. Zhang SF, Gangal G, Uludag H. 'Magic bullets' for bone diseases: progress in rational design of bone-seeking medicinal agents. *Chem Soc Rev* 2007;36(3):507–31. doi: 10.1039/b512310k. PubMed PMID: 17325789. 10
31. Herczegh P, Buxton TB, McPherson JC, Kovacs-Kulyassa A, Brewer PD, Sztaricskai F, Stroebel GG, Plowman KM, Farcasiu D, Hartmann JF. Osteoadsorptive bisphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials. *J Med Chem.* 2002;45(11):2338–41. doi: 10.1021/jm0105326. PubMed PMID: 12014972.
32. Buxton TB, Walsh DS, Harvey SB, McPherson JC, Hartmann JF, Plowman KM. Bisphosphonate-ciprofloxacin bound to Skelite (TM) is a prototype for enhancing experimental local antibiotic delivery to injured bone. *British Journal of Surgery.* 2004;91(9):1192–6. doi: 10.1002/bjs.4644. PubMed PMID: 15449273. 20
33. Tanaka KSE, Houghton TJ, Kang T, Dietrich E, Delorme D, Ferreira SS, Caron L, Viens F, Arhin FF, Sarmiento I, Lehoux D, Fadhil I, Laquerre K, Liu J, Ostiguy V, Poirier H, Moeck G, Parr TR, Far AR. Bisphosphonated fluoroquinolone esters as osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(20):9217–29. doi: 10.1016/j.bmc.2008.09.010. PubMed PMID: 18815051. 30
34. Houghton TJ, Tanaka KSE, Kang T, Dietrich E, Lafontaine Y, Delorme D, Ferreira SS, Viens F, Arhin FF, Sarmiento I, Lehoux D, Fadhil I, Laquerre K, Liu J, Ostiguy V, Poirier H, Moeck G, Parr TR, Far AR. Linking Bisphosphonates to the Free Amino Groups in Fluoroquinolones: Preparation of Osteotropic Prodrugs for the Prevention of Osteomyelitis. *J Med Chem.* 2008;51(21):6955–69. doi: 10.1021/jm801007z. PubMed PMID: 18834106. 40
35. Tanaka KSE, Dietrich E, Ciblat S, Metayer C, Arhin FF, Sarmiento I, Moeck G, Parr TR, Far AR. Synthesis and in vitro evaluation of bisphosphonated glycopeptide prodrugs for the treatment of osteomyelitis. *Bioorg Med* 50

Chem Lett. 2010;20 (4) :1355-9. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.01.006. PubMed PMID: 20097069.
36. Arns S, Gibe R, Moreau A, Morshed MM, Young RN. Design and synthesis of novel bone-targeting dual-action pro-drugs for the treatment and reversal of osteoporosis. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2012;20 (6) :2131-40. doi: 10.1016/j.bmc.2012.01.024. PubMed PMID: 22341574.

37. Liu CC, Hu S, Chen G, Georgiou J, Arns S, Kumar NS, Young RN, Grynepas MD. Novel EP4 Receptor Agonist-Bisphosphonate Conjugate Drug (C1) Promotes Bone Formation and Improves Vertebral Mechanical Properties in the Ovariectomized Rat Model of Postmenopausal Bone Loss. J Bone Miner Res. 2015;30 (4) :670-80. doi: 10.1002/jbmr.2382. PubMed PMID: 25284325.

38. Morioka M, Kamizono A, Takikawa H, Mori A, Ueno H, Kadowaki SI, Nakao Y, Kato K, Umezawa K. Design, synthesis, and biological evaluation of novel estradiol-bisphosphonate conjugates as bone-specific estrogens. Bioorg Med Chem. 2010;18 (3) :1143-8. doi: 10.1016/j.bmc.2009.12.041. PubMed PMID: 20071185

39. Katsarelis H, Shah NP, Dhariwal DK, Pazi anas M. Infection and Medication-related Osteonecrosis of the Jaw. J Dent Res. 2015;94 (4) :534-9. doi: 10.1177/0022034515572021. PubMed PMID: 25710950.

40. Lee SH, Chan RC, Chang SS, Tan YL, Chang KH, Lee MC, Chang HE, Lee CC. Use of bisphosphonates and the risk of osteonecrosis among cancer patients: a systemic review and meta-analysis of the observational studies. Support Care Cancer. 2014;22 (2) :553-60. doi: 10.1007/s00520-013-2017-y. PubMed PMID: 24203085.

41. Moura LA, Ribeiro FV, Aiello TB, Duek EAD, Sallum EA, Nociti FH, Casati MZ, Sallum AW. Characterization of the release profile of doxycycline by PLGA microspheres adjunct to non-surgical periodontal therapy. J Biomater Sci Polym Ed 2015;26 (10) :573-84. doi: 10.1080/09205063.2015.1045249. PubMed PMID: 25917501

42. <https://www.govtrack.us/congress/bills/114/hr34/text>

43. EUCAST breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2015. <http://www.eucast.org>

10

20

30

40

50

p://www.eucast.org/

44. McPherson JC, Runner R, Buxton TB, Hartmann JF, Farcasiu D, Bereczki I, Roth E, Tollas S, Ostorhazi E, Rozgonyi F, Herczegh P. Synthesis of osteotropic hydroxybisphosphonate derivatives of fluoroquinolone antibacterials. *Eur J Med Chem.* 2012;47:615–8. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.10.049. PubMed PMID: 22093760.

45. Freire MO, Sedghizadeh PP, Schaudinn C, Gorur A, Downey JS, Choi JH, Chen W, Kook JK, Chen C, Goodman SD, Zadeh HH. Development of an Animal Model for Aggregatibacter Actinomycetemcomitans Biofilm-Mediated Oral Osteolytic Infection: A Preliminary Study. *J Periodontol.* 2011;82(5):778–89. doi: 10.1902/jop.2010.100263. PubMed PMID: 21222546.

46. Vacondio F, Silva C, Lodola A, Fioni A, Rivara S, Duranti A, Tontini A, Sanchini S, Clapper JR, Piomelli D, Mor M, Tarzia G. Structure-property relationships of a class of carbamate-based fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors: chemical and biological stability. *ChemMedChem.* 2009;4(9):1495–504. doi: 10.1002/cmdc.200900120. PubMed PMID: 19554599; PubMed Central PMCID: PMC3517974.

47. Lloyd-Jones GC, Moseley JD, Renny JS. Mechanism and application of the Newman-Kwart O → S rearrangement of O-aryl thiocarbonates. *Synthesis-Stuttgart.* 2008(5):661–89. doi: 10.1055/s-2008-1032179.

48. Moseley JD, Sankey RF, Tang ON, Gilday JP. The Newman-Kwart rearrangement re-evaluated by microwave synthesis. *Tetrahedron.* 2006;62(19):4685–9. doi: 10.1016/j.tet.2005.12.063.

49. Ebetino FH, Hogan AM, Sun S, Tsoumpra MK, Duan X, Triffitt JT, Kwaasi AA, Dunford JE, Barnett BL, Oppermann U, Lundy MW, Boyde A, Kashemirov BA, McKenna CE, Russell RG. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone.* 2011;49(1):20–33. doi: 10.1016/j.bone.2011.03.774. PubMed PMID: 21497677.

50. Vachal P, Hale JJ, Lu Z, Streckfuss EC, Mills SG, MacCoss M, Yin DH, Algayer K, Manser K, Kesisoglou F, Ghosh S, Alani LL. Synthesis and study of alendronate derivatives as potential prodrugs of alendronate sodium for

10

20

30

40

50

the treatment of low bone density and osteoporosis. *J Med Chem.* 2006;49 (11) :3060–3. doi: 10.1021/jm060398v. PubMed PMID: 16722624.

51. Lopez-Piriz R, Sola-Linares E, Rodriguez-Portugal M, Malpica B, Diaz-Gumes I, Enciso S, Esteban-Tejeda L, Cabal B, Granizo JJ, Moya JS, Torrecillas R. Evaluation in a Dog Model of Three Antimicrobial Glassy Coatings: Prevention of Bone Loss around Implants and Microbial Assessments. *Plos One.* 2015;10 (10). doi: 10.1371/journal.pone.0140374. PubMed PMID: 26489088; PubMed Central PMCID: PMC4619200

52. Orti V, Bousquet P, Tramini P, Gaitan C, Mertens B, Cuisinier F. Benefits of mineralized bone cortical allograft for immediate implant placement in extraction sites: an in vivo study in dogs. *J Periodontal Implant Sci.* 2016;46 (5) :291–302. doi: 10.5051/jpis.2016.46.5.291. PubMed PMID: 27800212; PubMed Central PMCID: PMC5083813.

53. Reizner W, Hunter JG, O'Malley NT, Southgate RD, Schwarz EM, Kates SL. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *European Cells & Materials.* 2014;27:196–212. PubMed PMID: 24668594; PubMed Central PMCID: PMC4322679.

54. Wancket LM. Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. *Vet Pathol* 2015;52 (5) :842–50. doi: 10.1177/0300985815593124. PubMed PMID: 26163303.

55. Saber MH, Schwarzberg K, Alonaiyan FA, Kelley ST, Sedghizadeh PP, Furlan M, Levy TA, Simon JH, Slots J. Bacterial Flora of Dental Periradicular Lesions Analyzed by the 454-Pyrosequencing Technology. *J Endod.* 2012;38 (11) :1484–8. doi: 10.1016/j.joen.2012.06.037. PubMed PMID: 23063222.

56. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttenhower G, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Tumbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods.* 2010;7 (5) :335–6. doi: 10.1038/nmeth.

f. 303. PubMed PMID: 20383131.

57. Battula S, Lee JW, Wen HB, Papanicolaou S, Collins M, Romanos GE. Evaluation of Different Implant Designs in a Ligature-Induced Peri-implantitis Model: A Canine Study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2015;30 (3) :534-45. doi: 10.11607/jomi.3737. PubMed PMID: 26009904.

58. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods*. 2009;41 (4) :1149-60. doi: 10.3758/brm.41.4.1149. PubMed PMID: 19897823.

10

59. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol*. 2010;160 (7) :1577-9. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x. PubMed PMID: 20649561; PubMed Central PMCID: PMC2936830.

20

60. Salvi GE, Lang NP. Diagnostic parameters for monitoring peri-implant conditions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19:116-27. PubMed PMID: 15635952.

61. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM072193.pdf>

62. Jaehde U, Zurcher J, Sorgel F, Naber K, Schunack W. Metabolism of Ciprofloxacin in Humans following Oral and Intravenous Administration. *Reviews of Infectious Diseases*. 1989;11:S1135.

30

63. Vancebryan K, Guay DRP, Rotschafer JC. Clinical pharmacokinetics of ciprofloxacin. *Clin Pharmacokinet* 1990;19 (6) :434-61. PubMed PMID: 2292168.

64. Baumans V, Brain PF, Brugere H, Clausing P, Jeneskog T, Perretta G. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and Distress accepted by the FELASA Board of Management November 1992. *Laboratory Animals*. 1994;28 (2) :97-112. doi: 10.1258/002367794780745308. PubMed PMID: 8035572.

40

65. Sedghizadeh PP, Jones AC, LaVallee C, Jelliffe RW, Le AD, Lee P, Kiss A, Neely M. Population pharmacokinetic and pharmacodynami

50

c modeling for assessing risk of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013;115 (2) :224-32. doi: 10.1016/j.oooo.2012.08.455. PubMed PMID: 23246224; PubMed Central PMCID: PMC3545087.

66. O'Donnell JN, Gulati A, Lavhale MS, Sharma SS, Patel AJ, Rhodes NJ, Scheetz MH. Pharmacokinetics of centhaquin citrate in a rat model. *J Pharm Pharmacol*. 2016;68 (1) :56-62. doi: 10.1111/jphp.12498. PubMed PMID: 26725913.

67. Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, Schumitzky A, Jelliffe RW. Accurate Detection of Outliers and Subpopulations With Pmetrics, a Nonparametric and Parametric Pharmacometric Modeling and Simulation Package for R. *Ther Drug Monit*. 2012;34 (4) :467-76. doi: 10.1097/FTD.0b013e31825c4ba6. PubMed PMID: 22722776 PubMed Central PMCID: PMC3394880

68. Tatarinova T, Neely M, Bartroff J, van Guilder M, Yamada W, Bayard D, Jelliffe R, Leary R, Chubatiuk A, Schumitzky A. Two general methods for population pharmacokinetic modeling: non-parametric adaptive grid and non-parametric Bayesian. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2013;40 (2) :189-99. doi: 10.1007/s10928-013-9302-8. PubMed PMID: 23404393; PubMed Central PMCID: PMC3630269.

69. Wachha H, Wagner D, Schafer V, Knothe H. Concentration of ciprofloxacin in bone tissue after single parenteral administration to patients older than 70 years. *Infection*. 1990;18 (3) :173-6. PubMed PMID: 2365470.

【0346】

実施例9

本実施例は様々なBP複合体化合物及び合成スキームを示す。BP-カルバメート-シプロフロキサシンBP複合体及び合成スキームが図16及び関連の説明において示されている。BP-カルバメート-モキシフロキサシンBP複合体及び合成スキームが図38において示されている。図39はBP-カルバメート-ガチフロキサシンBP複合体及び合成スキームを示している。図40はBP-p-ヒドロキシフェニル酢酸-シプロフロキサシンBP複合体及び合成スキームを示している。図41はBP-OH-シプロフロキサシンBP複合体及び合成スキームを示している。図42はBP-O-チオカルバメート-シプロフロキサシンBP複合体及び合成スキームを示している。図43はBP-S-チオカルバメート-シプロフロキサシンBP複合体及び合成スキームを示している。図44はBP-レゾルシノール-シプロフロキサシンBP複合体及び合成スキームを示している。図45はBP-ヒドロキノン-シプロフロキサシンBP複合体及び合成スキームを示している。

【0347】

図46はWがO又はS又はNであり得、XがO、S、N、CH₂O、CH₂N、又はCH₂Sであり得、YがH、CH₃、NO₂、F、Cl、Br、I、又はCO₂Hであり得、ZがH、CH₃、OH、NH₂、SH、F、Cl、Br、又はIであり得、且つ、nが1～5であり得るBP-フルオロキノロン複合体の構造の1実施形態を示している。図47は様々なBP-フルオロキノロン複合体を示している。

【0348】

図48はXがH、CH₃、OH、NH₂、SH、F、Cl、Br、又はIであり得、YがPO₃H₂、又はCO₂Hであり得、ZがOH、NH₂、SH、又はN₃であり得、且つ、nが1又は2であり得るアリール基含有ホスホネート類の構造の1実施形態を示している。図49はXがF、Cl、Br、又はIであり得、且つ、nが1又は2であり得る様々なBPを示している。

10

【0349】

図50は末端一級アミンを有する様々なBPを示している。図51は末端ヒドロキシル基とアミン官能基を含有するリンカーに結合した様々なBPであって、Rがリセドロネート、ゾレドロネート、ミノドロネート、パミドロネート、又はアレンドロネートであり得るものを示している。図52は様々なBP-パミドロネート-シプロフロキサシン複合体を示している。図53は様々なBP-アレンドロネート-シプロフロキサシン複合体を示している。

【0350】

実施例10

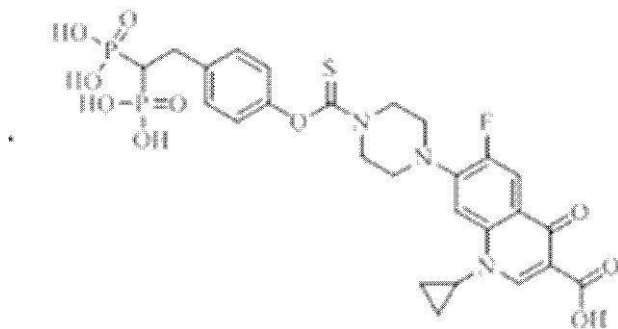
20

チオカルバメートBP複合体(13)の抗菌特性を評価した。

【0351】

化合物13 (O-チオカルバメートBP複合体)

【化41】



30

【0352】

化合物13を1-シクロプロピル-7(4((4(2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボノチオイル)ピペラジン-1-イル)-6-フルオロ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸と呼ぶこともできる。化合物13を次のように合成した。テトライソプロピル(2(4-ヒドロキシフェニル)エタン-1,1-ジイル)ビス(ホスホネート)(0.10mmol)を激しく攪拌しながら水の中で乳状にし、そして氷浴中で冷却した。1,1'-チオカルボニルジイミダゾール(0.12mmol)を添加し、1時間にわたって攪拌した。次にその氷浴を取り外し、攪拌を室温でさらに1時間にわたって継続した。その後でシプロフロキサシン(0.12mmol)を添加し、遮光のためにホイルで覆って反応を室温で一晩にわたって攪拌した。翌日、フリット漏斗を使用して白色のペーストを濾過し、固形物を水で洗浄し、次にエーテルで洗浄した。それらの固形物を収集し、MeOH:CHCl₃濃度勾配を使用するシリカカラムクロマトグラフィーにより精製してわずかに灰色がかった白色の固形物を得た。その固形物をDCM中に溶解し、プロモトリメチルシラン(BTMS)(4.00mmol)を添加し、そして油浴中で一晩にわたって35℃で加熱した。溶媒及びBTMSを蒸発処理によって除去し、そしてMeOHを添加し、室温で30分間にわたって攪拌した。ロータリーエバポレーター上で溶媒を除去し、生成物を冷MeOH中に沈殿させた。フリット漏斗を使用してそ

40

50

の懸濁液を濾過し、そして追加の MeOH で洗浄した。固形物を収集し、過剰な溶媒を蒸発させて標的化合物を得た。

【0353】

図24はプランクトン型黄色ブドウ球菌 ATCC-6538 株に対する O-チオカルバメート BP 複合体の MIC についての評価の結果を表すグラフと画像を示している。陰性対照＝培地＋複合体処理されていない微生物；陽性対照＝微生物を含まない滅菌培地。

【0354】

図25は複合体基材としてのポリスチレン上に形成された黄色ブドウ球菌 ATCC-6538 株のバイオフィルムに対する前記チオカルバメートの抗菌活性又は細菌量減少についての評価の結果を表すグラフを示している。陰性対照＝複合体処理されていない細菌希釈物；陽性対照＝微生物を含まない滅菌希釈物。

【0355】

図26は基材としてのハイドロキシアパタイト上の黄色ブドウ球菌 ATCC-6538 の形成済みバイオフィルムに対して試験された O-チオカルバメート BP 複合体の抗菌活性の評価の結果を表すグラフを示している。陰性対照＝複合体処理されていない細菌希釈物。（* $p < 0.05$ 、クラスカル・ウォリス検定；三回の複製実験；対照薬＝対照）。

【0356】

図27は黄色ブドウ球菌 ATCC 6538 のバイオフィルム形成を防止する能力を評価する O-チオカルバメート BP 複合体処理済みハイドロキシアパタイトディスクを使用する試験の結果を表すグラフを示している。陰性対照＝複合体処理されていない細菌希釈物。（* $p < 0.05$ 、クラスカル・ウォリス検定；三回の複製実験；対照薬＝対照）。

【0357】

図28は黄色ブドウ球菌 ATCC 6538 のバイオフィルム形成を防止する能力を評価する O-チオカルバメート BP 複合体処理済みハイドロキシアパタイトパウダーを使用する試験の結果を表すグラフを示している。陰性対照＝複合体処理されていない細菌希釈物。（* $p < 0.05$ 、クラスカル・ウォリス検定；三回の複製実験；対照薬＝対照）。

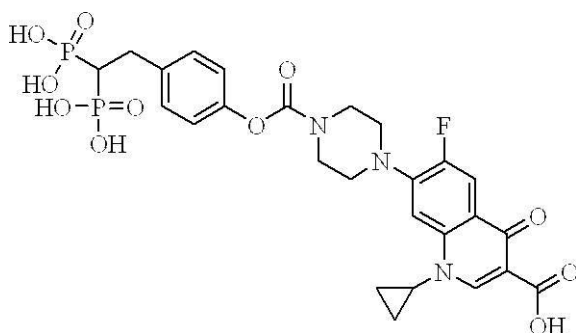
【0358】

実施例 11

追加の例となる BP-複合体とそれらの合成を本実施例において説明する。

【0359】

【化42】



【0360】

1-シクロプロピル-7-(4-(4-(2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボニル)ピペラジン-1-イル)-6-フルオロ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(6)

【0361】

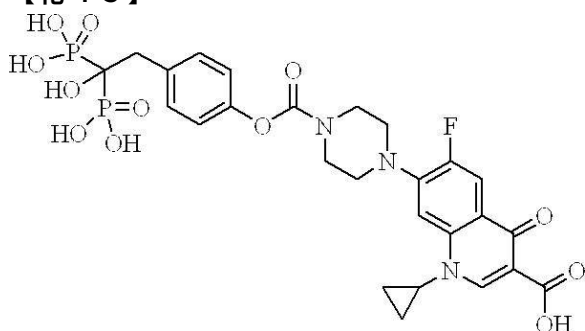
シプロフロキサシン (0.12 mmol) を水の中に懸濁し、 Na_2CO_3 を使用して pH を 8.5 に調節した。その懸濁液を氷浴中で冷却し、THF 中に溶解した 4-(2,2-ビス(ジイソプロポキシホスホリル)エチル)フェニル(4-ニトロフェニル)カーボネート (0.10 mmol) を滴下して添加した。その後、反応混合物を氷浴から取り出し、遮光し、そして室温で一晩にわたって攪拌した。翌日、反応混合物を水で希釈し、そ

して目の細かいガラス製フリット漏斗に通して濾過した。残留固形物を黄色が残らなくなるまで水で洗浄した。その後、その固形物を溶解し、DCMを使用してフリット漏斗から洗い流した。回収された粗製物がMeOH:DCM濃度勾配を使用するシリカカラム上でさらに精製された。標記化合物が白色の固形物として産出され、それをDCM中に溶解し、ブロモトリメチルシラン(BTMS)(4.00mmol)を添加し、そして油浴で一晩にわたって35℃で加熱した。溶媒及びBTMSを蒸発処理によって除去し、そしてMeOHを添加し、室温で30分間にわたって攪拌した。ロータリーエバポレーター上で溶媒を除去し、生成物を冷MeOH中に沈殿させた。フリット漏斗を使用してその懸濁液を濾過し、そして追加のMeOHで洗浄した。固形物を収集し、過剰な溶媒を蒸発させて除去して標的化合物を得た。

10

【0362】

【化43】



20

【0363】

1-シクロプロピル-6-フルオロ-7-(4((4(2-ヒドロキシ-2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボニル)ピペラジン-1-イル)-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(12)

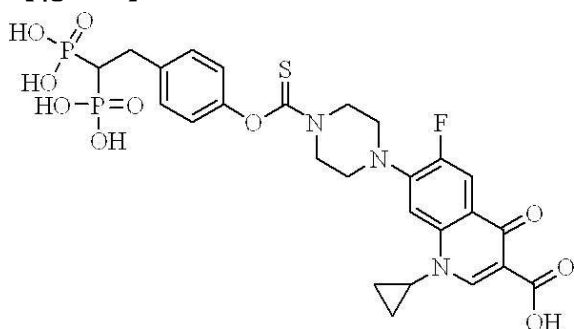
【0364】

(1-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシフェニル)エタン-1,1-ジイル)ビス(ホスホン酸)(0.10mmol)を激しく攪拌しながら水中に溶解し、そして氷浴中で冷却した。1,1'-カルボニルジイミダゾール(0.12mmol)を添加し、1時間にわたって攪拌した。次にその氷浴を取り外し、攪拌を室温でさらに1時間にわたって続けた。その後でシプロフロキサシン(0.12mmol)を添加し、遮光のためにホイルで覆って反応を室温で一晩にわたって攪拌した。翌日、溶媒を蒸発処理により除去し、MeOHを添加して生成物を沈殿させた。フリット漏斗を使用してその懸濁液を濾過し、そして追加のMeOHで洗浄した。固形物を収集し、過剰な溶媒を蒸発させて標的化合物を得た。

30

【0365】

【化44】



40

【0366】

1-シクロプロピル-7-(4((4(2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボノチオイル)ピペラジン-1-イル)-6-フルオロ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(13)

50

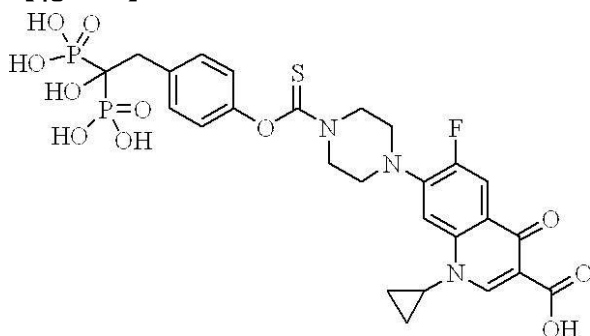
【0367】

テトライソプロピル（2（4-ヒドロキシフェニル）エタン-1，1-ジイル）ビス（ホスホネート）（0.10 mmol）を激しく攪拌しながら水の中で乳状にし、そして氷浴中で冷却した。1，1'-チオカルボニルジイミダゾール（0.12 mmol）を添加し、1時間にわたって攪拌した。次にその氷浴を取り外し、攪拌を室温でさらに1時間にわたって継続した。その後でシプロフロキサシン（0.12 mmol）を添加し、遮光のためにホイルで覆って反応を室温で一晩にわたって攪拌した。翌日、フリット漏斗を使用して白色のペーストを濾過し、固形物を水で洗浄し、次にエーテルで洗浄した。それらの固形物を収集し、MeOH：CHCl₃濃度勾配を使用するシリカカラムクロマトグラフィーにより精製してわずかに灰色がかった白色の固形物を得た。その固形物をDCM中に溶解し、プロモトリメチルシラン（BTMS）（4.00 mmol）を添加し、そして油浴中で一晩にわたって35℃で加熱した。溶媒及びBTMSを蒸発処理によって除去し、そしてMeOHを添加し、室温で30分間にわたって攪拌した。ロータリーエバポレーター上で溶媒を除去し、生成物を冷MeOH中に沈殿させた。フリット漏斗を使用してその懸濁液を濾過し、そして追加のMeOHで洗浄した。固形物を収集し、過剰な溶媒を蒸発させて標的化合物を得た。

10

【0368】

【化45】



20

【0369】

1-シクロプロピル-6-フルオロ-7（4（（4（2-ヒドロキシ-2，2-ジホスホノエチル）フェノキシ）カルボノチオイル）ピペラジン-1-イル）-4-オキソ-1，4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸（14）

30

【0370】

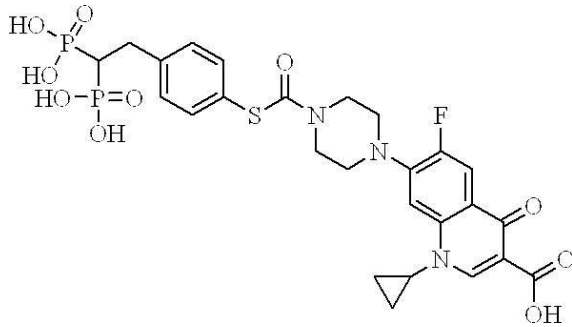
（1-ヒドロキシ-2（4-ヒドロキシフェニル）エタン-1，1-ジイル）ビス（ホスホン酸）（0.10 mmol）を激しく攪拌しながら水中に溶解し、そして氷浴中で冷却した。1，1'-チオカルボニルジイミダゾール（0.12 mmol）を添加し、1時間にわたって攪拌した。次にその氷浴を取り外し、攪拌を室温でさらに1時間にわたって継続した。その後でシプロフロキサシン（0.12 mmol）を添加し、遮光のためにホイルで覆って反応を室温で一晩にわたって攪拌した。翌日、溶媒を蒸発処理により除去し、MeOHを添加して生成物を沈殿させた。フリット漏斗を使用してその懸濁液を濾過し、そして追加のMeOHで洗浄した。固形物を収集し、過剰な溶媒を蒸発させて標的化合物を得た。

40

【0371】

50

【化 4 6】



10

【0 3 7 2】

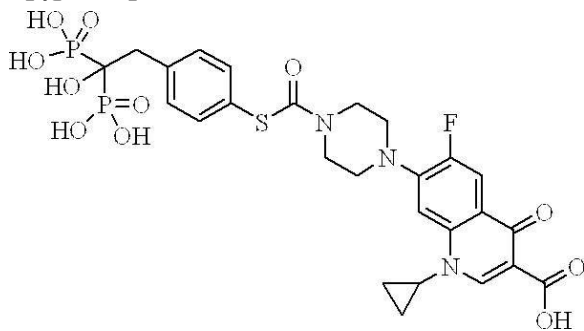
1-シクロプロピル-7-(4((4(2,2-ジホスホノエチル)フェニル)チオ)カルボニル)ピペラジン-1-イル)-6-フルオロ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(15)

【0 3 7 3】

電子レンジ用バイアル瓶の中で化合物13をNMP中に懸濁し、マイクロ波反応器の中で20分間にわたって290℃で加熱した。その懸濁液を濾過し、MeOHで洗浄して標的化合物を得た。

【0 3 7 4】

【化 4 7】



20

【0 3 7 5】

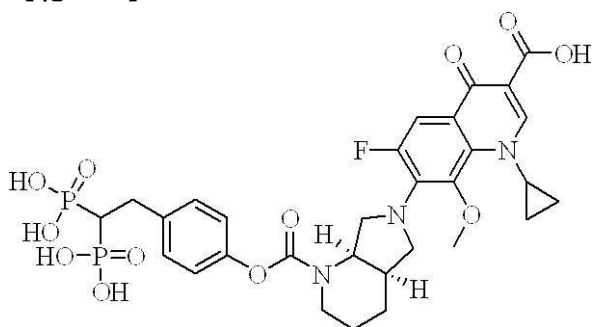
1-シクロプロピル-6-フルオロ-7-(4((4(2-ヒドロキシ-2,2-ジホスホノエチル)フェニル)チオ)カルボニル)ピペラジン-1-イル)-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(16)

【0 3 7 6】

電子レンジ用バイアル瓶の中で化合物14をNMP中に懸濁し、マイクロ波反応器の中で20分間にわたって290℃で加熱した。その懸濁液を濾過し、MeOHで洗浄して標的化合物を得た。

【0 3 7 7】

【化 4 8】



40

【0 3 7 8】

1-シクロプロピル-7((4aR,7aR)-1((4(2,2-ジホスホノエチル)

50

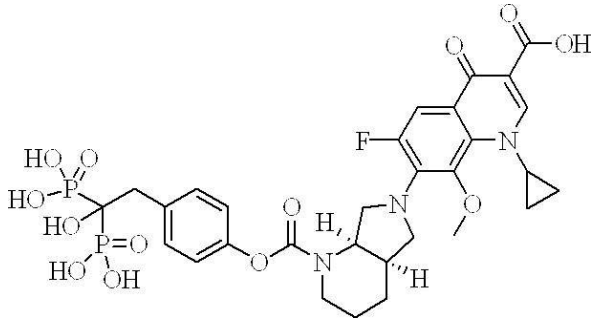
フェノキシ) カルボニル) オクタヒドロ-6H-ピロロ[3, 4-b]ピリジン-6-イル)-6-フルオロ-8-メトキシ-4-オキソ-1, 4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(17)

【0379】

シプロフロキサシンをモキシフロキサシンで置き換え、化合物6について記載された方法に従って化合物17を合成した。

【0380】

【化49】



10

【0381】

1-シクロプロピル-6-フルオロ-7((4aR, 7aR)-1((4(2-ヒドロキシ-2, 2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボニル)オクタヒドロ-6H-ピロロ[3, 4-b]ピリジン-6-イル)-8-メトキシ-4-オキソ-1, 4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(18)

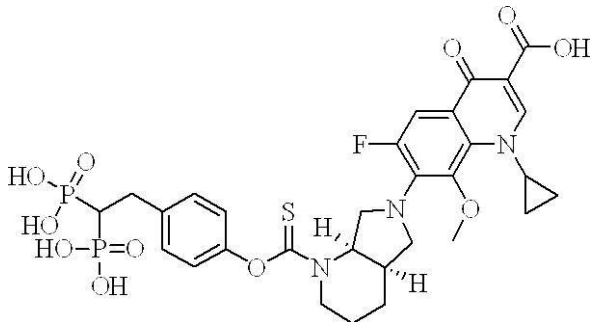
20

【0382】

シプロフロキサシンをモキシフロキサシンで置き換え、化合物12について記載された方法に従って化合物18を合成した。

【0383】

【化50】



30

【0384】

1-シクロプロピル-7((4aR, 7aR)-1((4(2, 2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボチオイル)オクタヒドロ-6H-ピロロ[3, 4-b]ピリジン-6-イル)-6-フルオロ-8-メトキシ-4-オキソ-1, 4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(19)

40

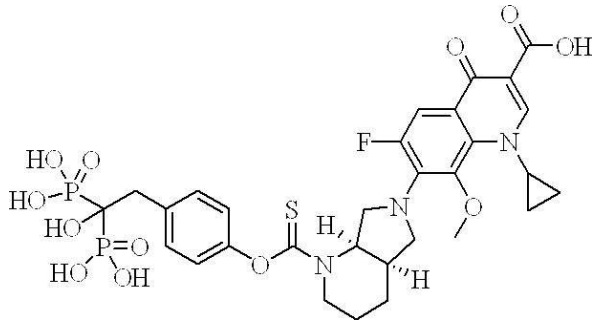
【0385】

シプロフロキサシンをモキシフロキサシンで置き換え、化合物13について記載された方法に従って化合物19を合成した。

【0386】

50

【化 5 1】



10

【 0 3 8 7】

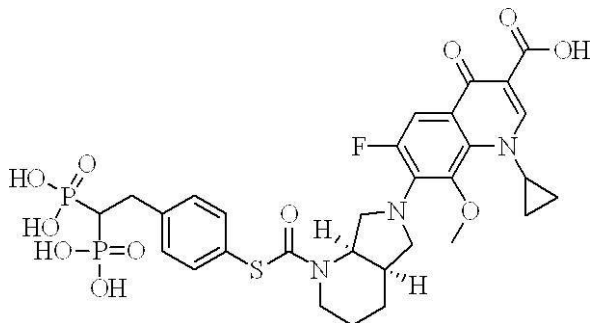
1-シクロプロピル-6-フルオロ-7((4aR, 7aR)-1((4(2-ヒドロキシ-2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボノチオイル)オクタヒドロ-6H-ピロロ[3,4-b]ピリジン-6-イル)-8-メトキシ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(20)

【 0 3 8 8】

シプロフロキサシンをモキシフロキサシンで置き換え、化合物14について記載された方法に従って化合物20を合成した。

【 0 3 8 9】

【化 5 2】



20

【 0 3 9 0】

1-シクロプロピル-7((4aR, 7aR)-1((4(2,2-ジホスホノエチル)フェニル)チオ)カルボニル)オクタヒドロ-6H-ピロロ[3,4-b]ピリジン-6-イル)-6-フルオロ-8-メトキシ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(21)

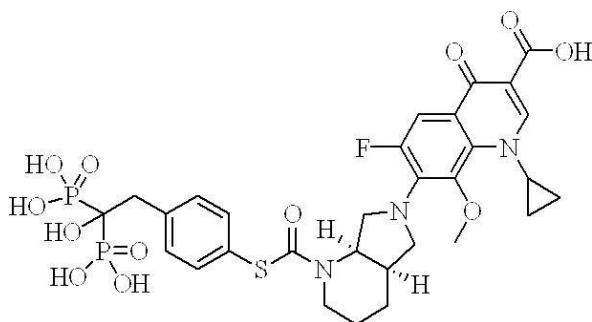
30

【 0 3 9 1】

電子レンジ用バイアル瓶の中で化合物19をNMP中に懸濁し、20分間にわたって290℃で加熱した。その懸濁液を濾過し、MeOHで洗浄して標的化合物を得た。

【 0 3 9 2】

【化 5 3】



40

【 0 3 9 3】

1-シクロプロピル-6-フルオロ-7((4aR, 7aR)-1((4(2-ヒドロ

50

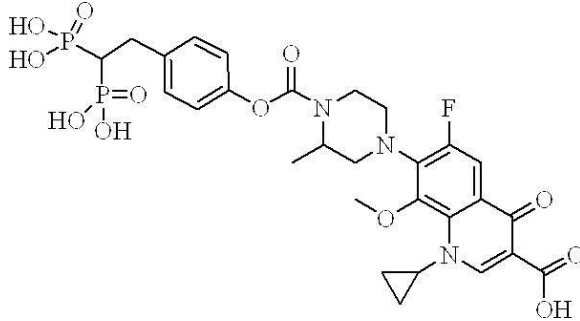
キシ-2,2-ジホスホノエチル)フェニル)チオ)カルボニル)オクタヒドロ-6H-ピロロ[3,4-b]ピリジン-6-イル)-8-メトキシ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(22)

【0394】

電子レンジ用バイアル瓶の中で化合物20をNMP中に懸濁し、20分間にわたって290℃で加熱した。その懸濁液を濾過し、MeOHで洗浄して標的化合物を得た。

【0395】

【化54】



10

【0396】

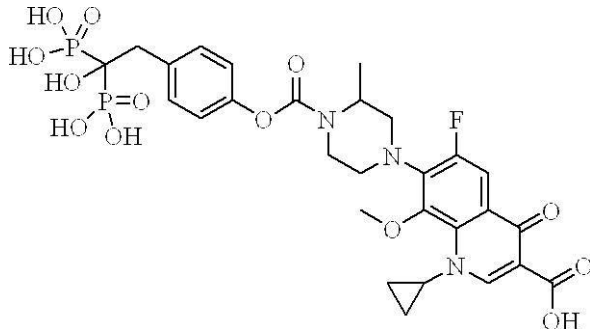
1-シクロプロピル-7-(4-(4-(2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボニル)-3-メチルピペラジン-1-イル)-6-フルオロ-8-メトキシ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(23)

【0397】

シプロフロキサシンをガチフロキサシンで置き換え、化合物6について記載された方法に従って化合物23を合成した。

【0398】

【化55】



30

【0399】

1-シクロプロピル-6-フルオロ-7-(4-(4-(2-ヒドロキシ-2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボニル)-3-メチルピペラジン-1-イル)-8-メトキシ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(24)

【0400】

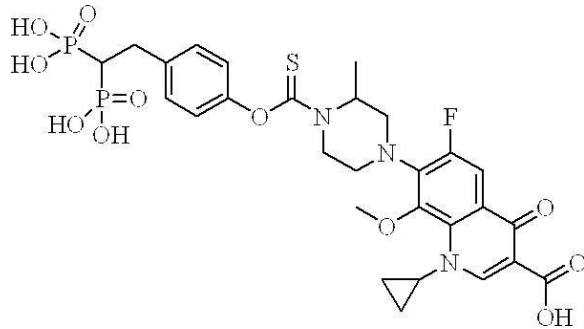
シプロフロキサシンをガチフロキサシンで置き換え、化合物12について記載された方法に従って化合物24を合成した。

【0401】

40

50

【化 5 6】



10

【0 4 0 2】

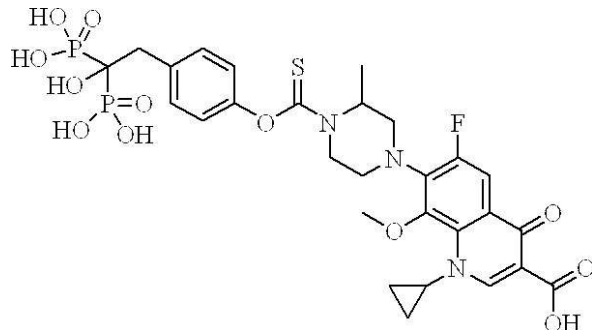
1-シクロプロピル-7-(4-(4-(2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボノチオイル)-3-メチルピペラジン-1-イル)-6-フルオロ-8-メトキシ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(25)

【0 4 0 3】

シプロフロキサシンをガチフロキサシンで置き換え、化合物13について記載された方法に従って化合物25を合成した。

【0 4 0 4】

【化 5 7】



20

30

【0 4 0 5】

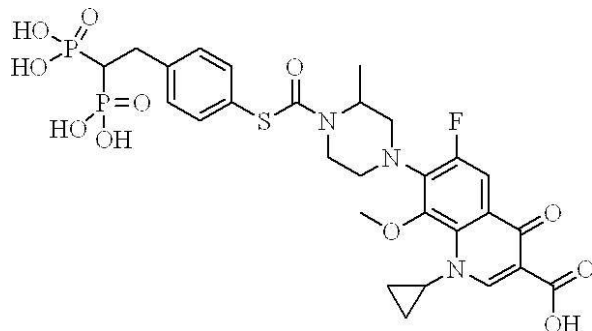
1-シクロプロピル-6-フルオロ-7-(4-(4-(2-ヒドロキシ-2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボノチオイル)-3-メチルピペラジン-1-イル)-8-メトキシ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(26)

【0 4 0 6】

シプロフロキサシンをガチフロキサシンで置き換え、化合物14について記載された方法に従って化合物26を合成した。

【0 4 0 7】

【化 5 8】



40

【0 4 0 8】

50

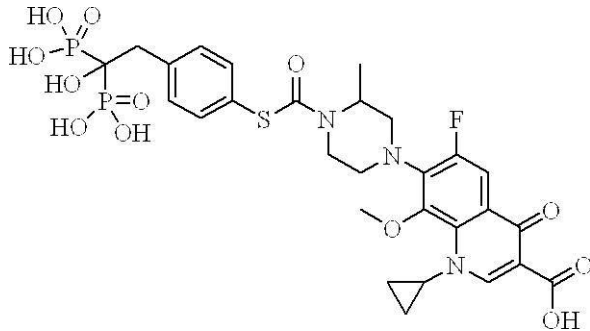
1-シクロプロピル-7-(4((4(2,2-ジホスホノエチル)フェニル)チオ)カルボニル)-3-メチルピペラジン-1-イル)-6-フルオロ-8-メトキシ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(27)

【0409】

電子レンジ用バイアル瓶の中で化合物25をNMP中に懸濁し、20分間にわたって290℃で加熱した。その懸濁液を濾過し、MeOHで洗浄して標的化合物を得た。

【0410】

【化59】



10

【0411】

1-シクロプロピル-6-フルオロ-7-(4((4(2-ヒドロキシ-2,2-ジホスホノエチル)フェニル)チオ)カルボニル)-3-メチルピペラジン-1-イル)-8-メトキシ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(28)

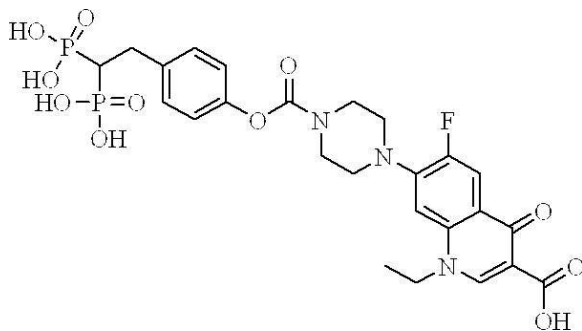
20

【0412】

電子レンジ用バイアル瓶の中で化合物26をNMP中に懸濁し、20分間にわたって290℃で加熱した。その懸濁液を濾過し、MeOHで洗浄して標的化合物を得た。

【0413】

【化60】



30

【0414】

7-(4((4(2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボニル)ピペラジン-1-イル)-1-エチル-6-フルオロ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(29)

40

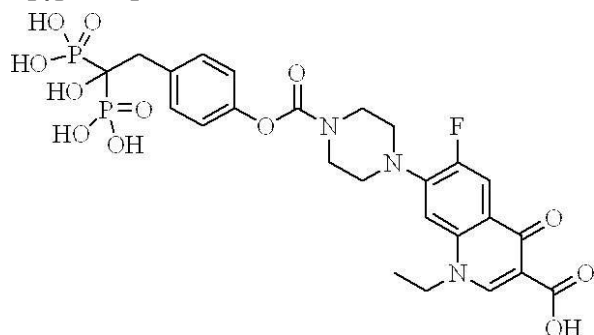
【0415】

シプロフロキサシンをノルフロキサシンで置き換え、化合物6について記載された方法に従って化合物29を合成した。

【0416】

50

【化 6 1】



10

【 0 4 1 7】

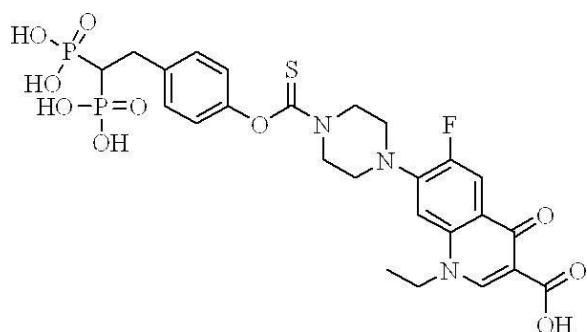
1-エチル-6-フルオロ-7-(4-(4-(2-ヒドロキシ-2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボニル)ピペラジン-1-イル)-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸 (30)

【 0 4 1 8】

シプロフロキサシンをノルフロキサシンで置き換え、化合物 12 について記載された方法に従って化合物 30 を合成した。

【 0 4 1 9】

【化 6 2】



20

30

【 0 4 2 0】

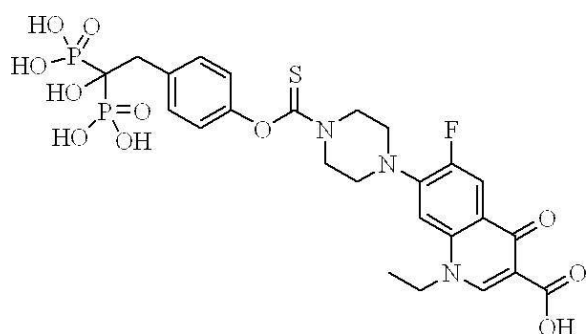
7-(4-(4-(2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボノチオイル)ピペラジン-1-イル)-1-エチル-6-フルオロ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸 (31)

【 0 4 2 1】

シプロフロキサシンをノルフロキサシンで置き換え、化合物 13 について記載された方法に従って化合物 31 を合成した。

【 0 4 2 2】

【化 6 3】



40

【 0 4 2 3】

50

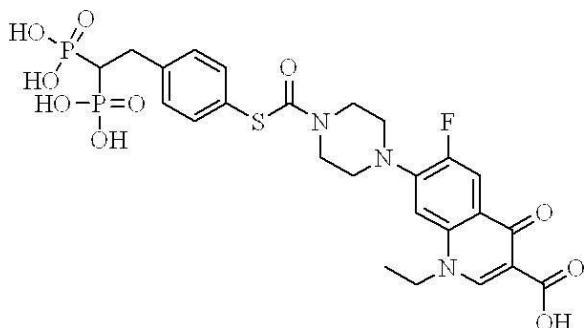
1-エチル-6-フルオロ-7-(4((4(2-ヒドロキシ-2,2-ジホスホノエチル)フェノキシ)カルボノチoil)ピペラジン-1-イル)-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(32)

【0424】

シプロフロキサシンをノルフロキサシンで置き換え、化合物14について記載された方法に従って化合物32を合成した。

【0425】

【化64】



10

【0426】

7-(4((4(2,2-ジホスホノエチル)フェニル)チオ)カルボニル)ピペラジン-1-イル)-1-エチル-6-フルオロ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(33)

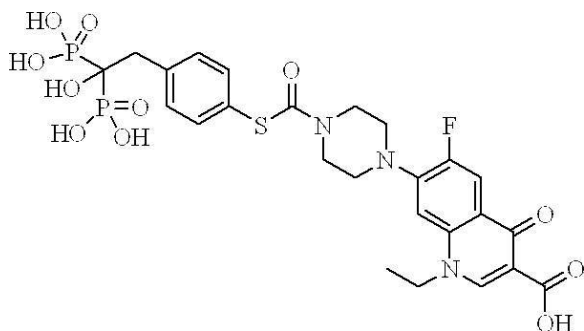
20

【0427】

電子レンジ用バイアル瓶の中で化合物31をNMP中に懸濁し、20分間にわたって290℃で加熱した。その懸濁液を濾過し、MeOHで洗浄して標的化合物を得た。

【0428】

【化65】



30

【0429】

1-エチル-6-フルオロ-7-(4((4(2-ヒドロキシ-2,2-ジホスホノエチル)フェニル)チオ)カルボニル)ピペラジン-1-イル)-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(34)

40

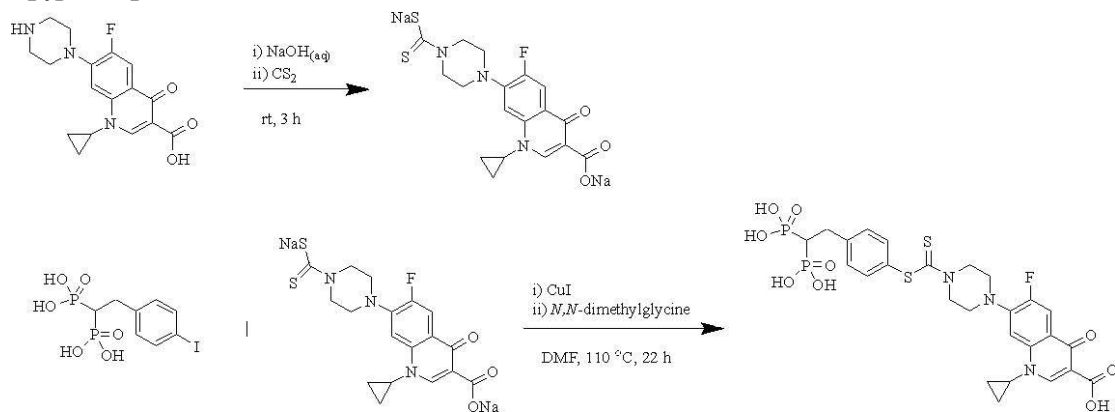
【0430】

電子レンジ用バイアル瓶の中で化合物32をNMP中に懸濁し、20分間にわたって290℃で加熱した。その懸濁液を濾過し、MeOHで洗浄して標的化合物を得た。

【0431】

50

【化 6 6】



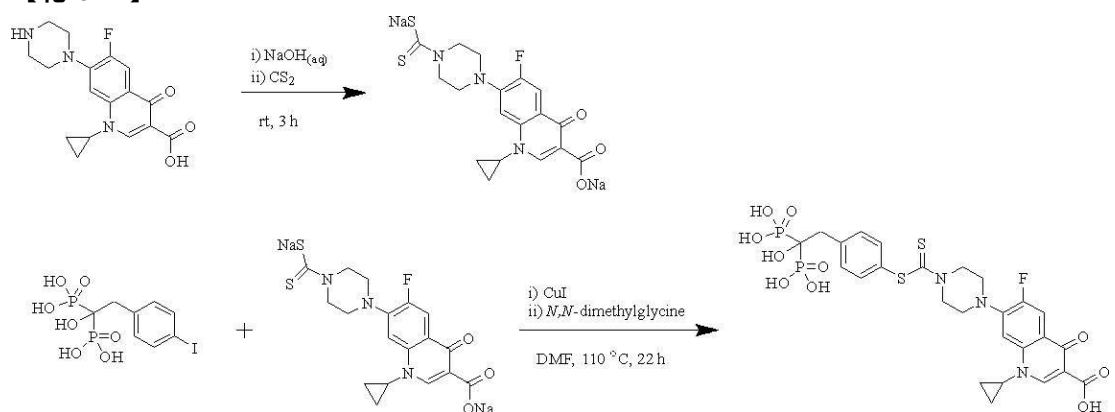
10

【 0 4 3 2】

1-シクロプロピル-7(4((4(2,2-ジホスホノエチル)フェニル)チオ)カルボノチオイル)ピペラジン-1-イル)-6-フルオロ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(35)

【 0 4 3 3】

【化 6 7】



20

【 0 4 3 4】

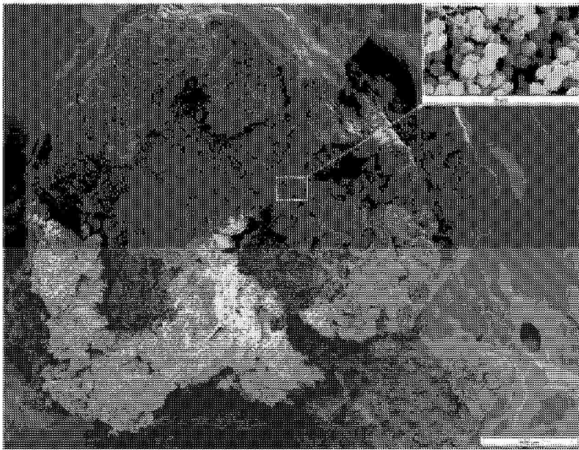
1-シクロプロピル-6-フルオロ-7(4((4(2-ヒドロキシ-2,2-ジホスホノエチル)フェニル)チオ)カルボノチオイル)ピペラジン-1-イル)-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボン酸(36)

30

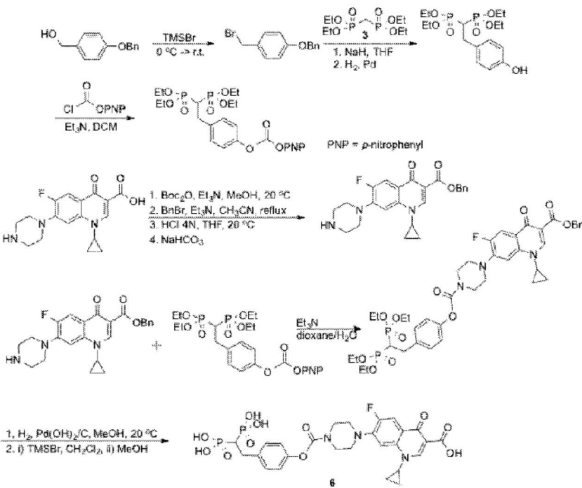
40

50

【図面】
【図 1】

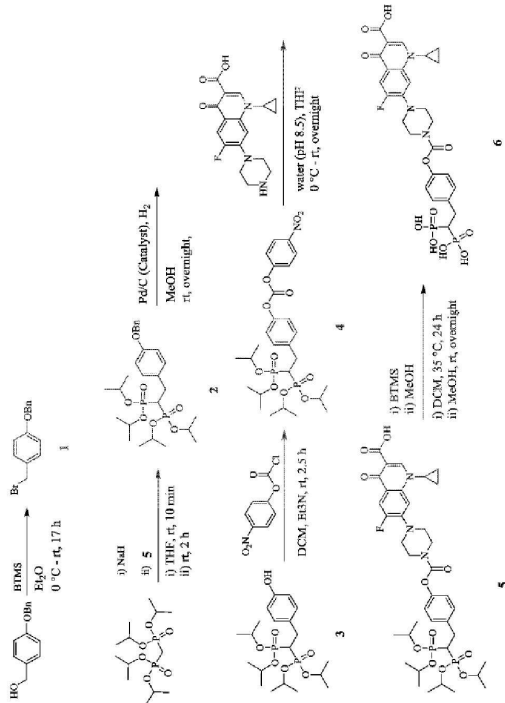


【図 2 A】



10

【図 2 B】



【図 3】

Staphylococcus aureus strain #	*Sensitivity (S) or Resistance (R)	MIC for ciprofloxacin [mcg/mL]	MIC for BP-ciprofloxacin [mcg/mL]
1	S	1	3.9
2	S	0.25	0.49
3	S	0.25	0.49
4	S	1	3.9
5	S	0.5	1.9
6	S	1	7.8
7	S	0.5	0.98
8	S	1	3.9
9	S	1	3.9
10	S	0.75	1.9
11	S	0.5	1.9
12	S	1	7.8
ATCC-6538	S	1	31.2
MR4-CIPS	S	1	15.6

* According to EUCAST references from disc diffusion inhibition zone assays

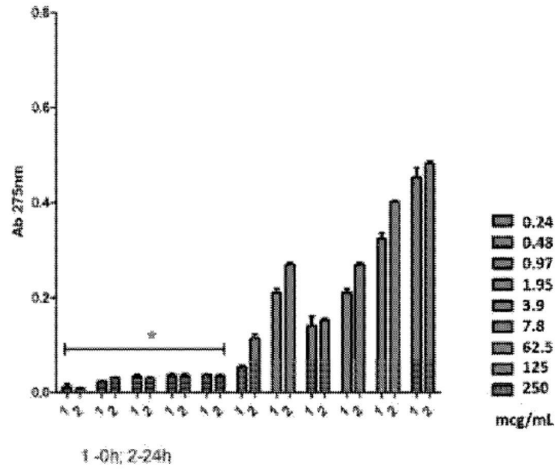
20

30

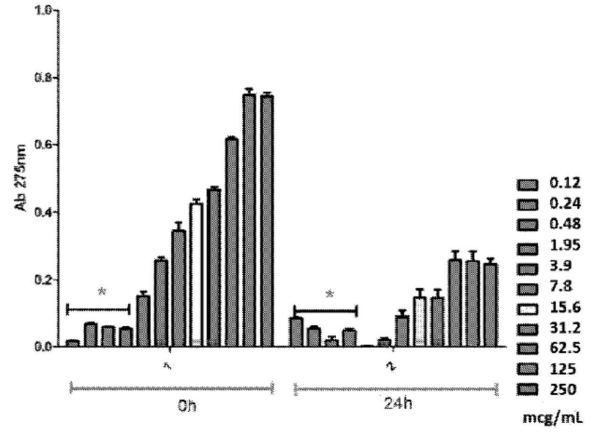
40

50

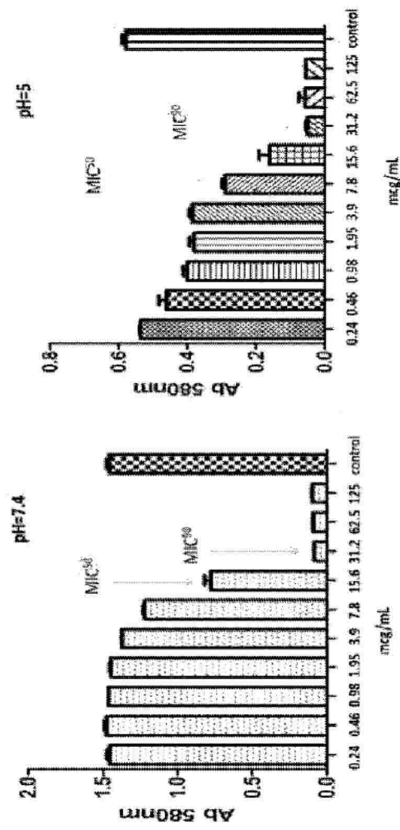
【図 4】



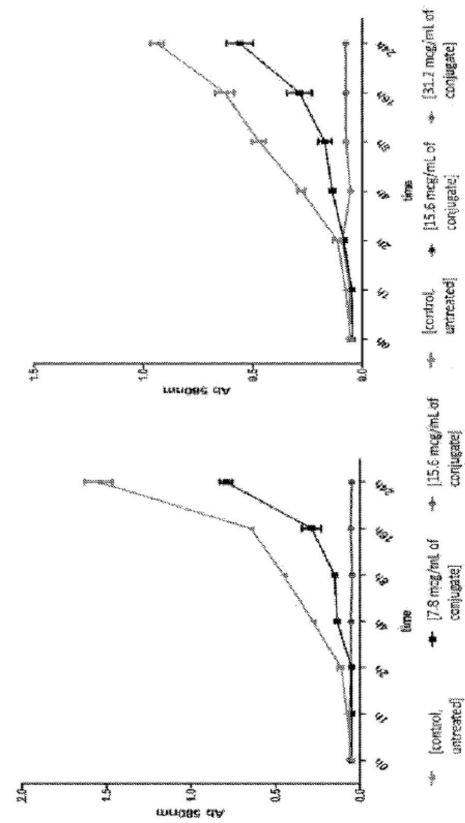
【図 5】



【図 6】



【図 7】



10

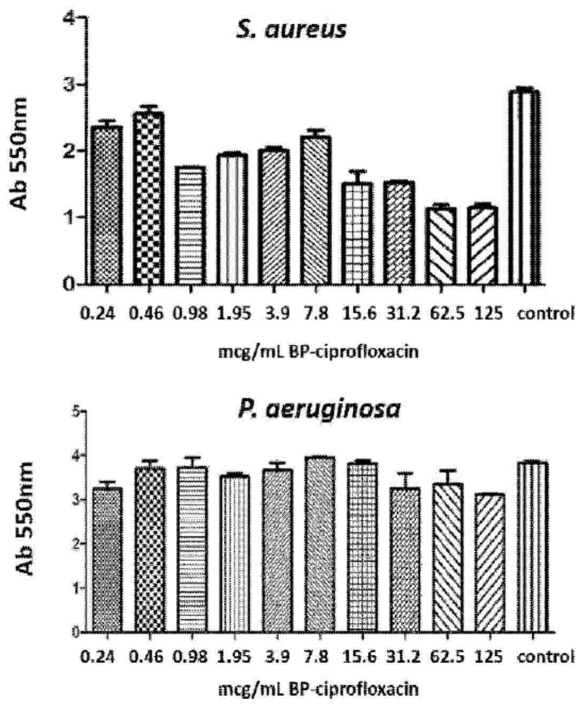
20

30

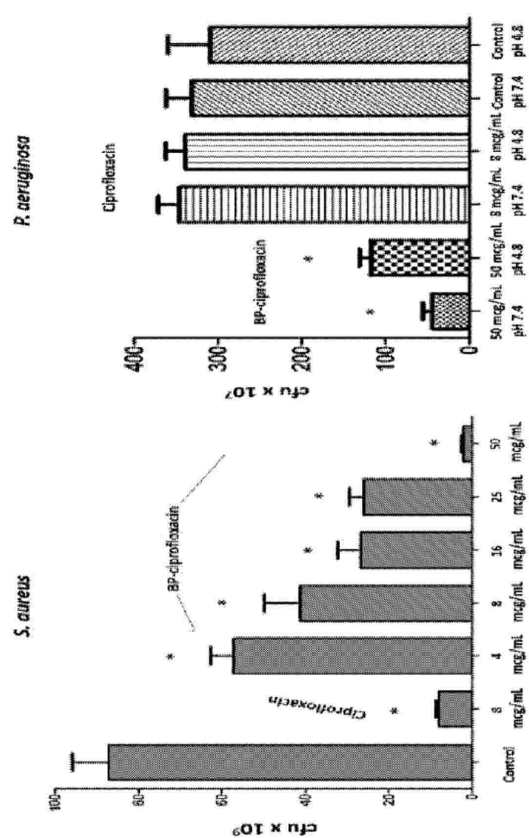
40

50

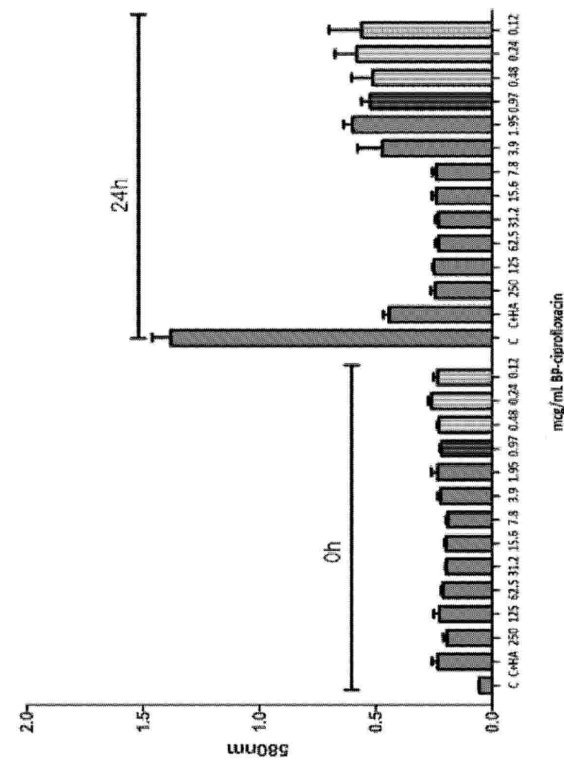
[8]



[9]



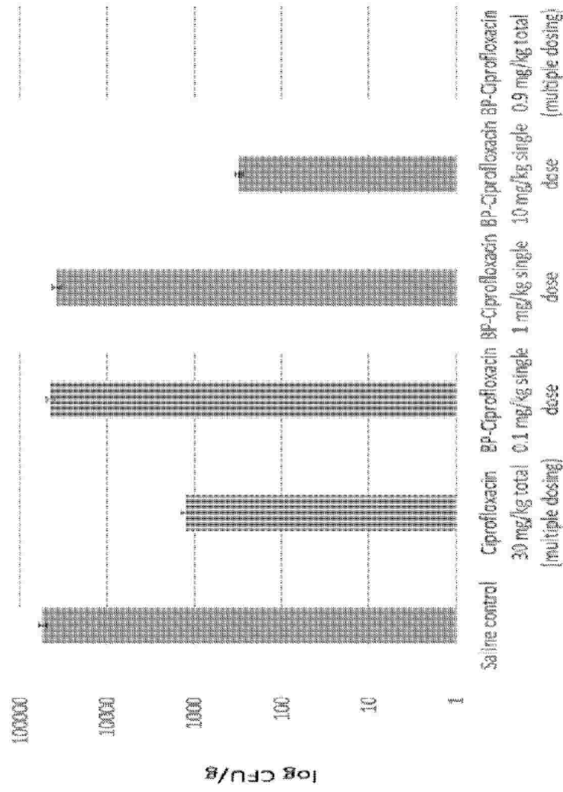
[10]



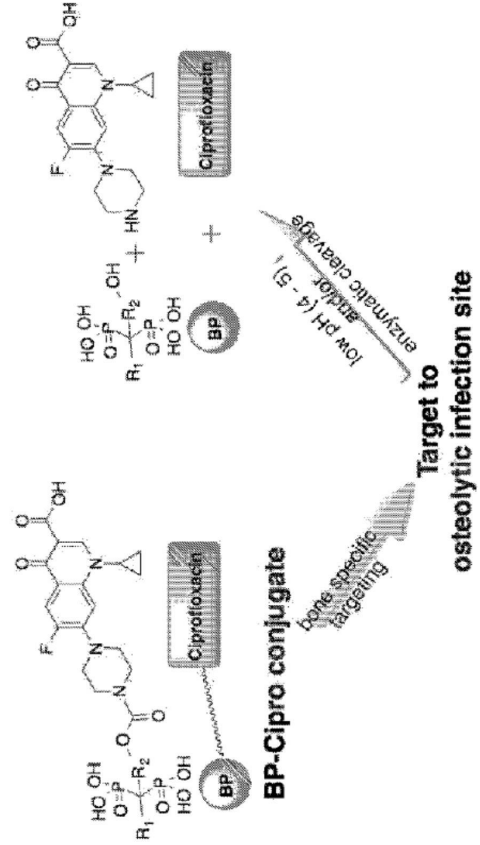
[11]

Compound	Concentration [μg/mL]									
	1	5	10	25	50	100	200	400	0 (Control discs in DMSO)	0 (Control discs in PBS)
6	7.1x10 ⁸	3.3x10 ⁸	No growth	No growth	No growth	No growth	No growth	No growth	Not applicable	4.5x10 ⁸
Ciprofloxacin	5.5x10 ⁸	9.2x10 ⁸	3.7x10 ⁸	8.9x10 ⁷	No growth	No growth	No growth	No growth	8.1x10 ⁸	Not applicable

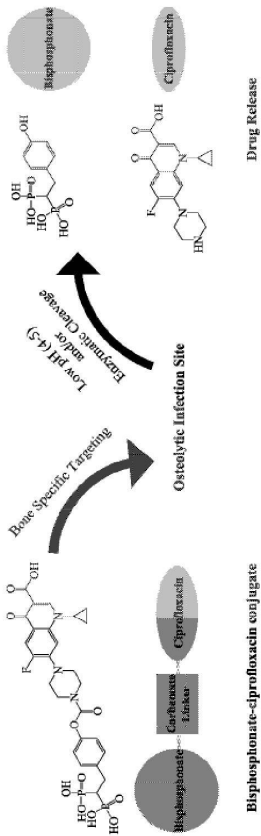
【図 1 2】



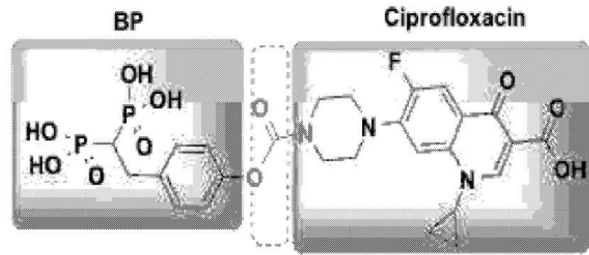
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



10

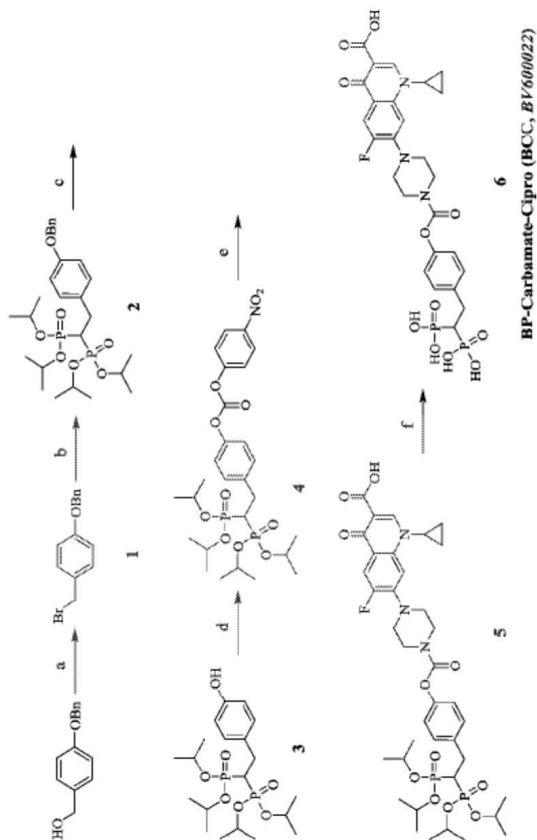
20

30

40

50

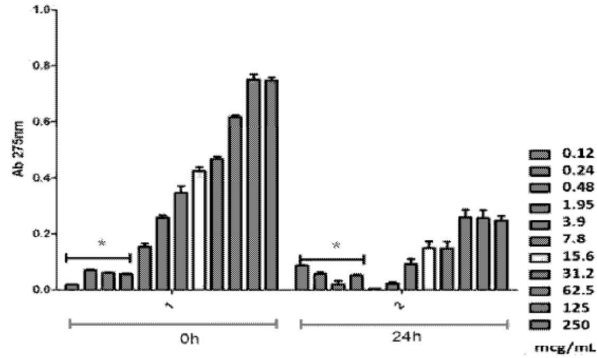
【図 16】



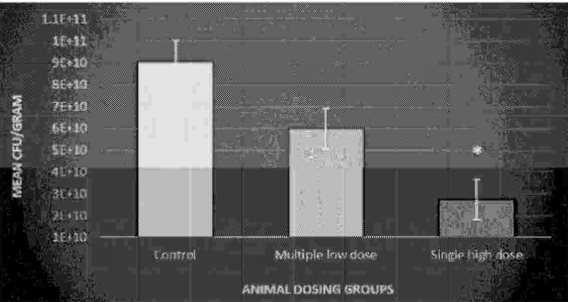
【図 17】

<i>S. aureus</i> strain	Antibiotic Sensitivity (S) or Resistance (R)	MIC for ciprofloxacin [mg/ml]	MIC for BCC [mcg/ml]	MIC for BAC [mcg/ml]
MSSA 1	S	1	3.9	31.2
MSSA 2	S	0.25	0.49	31.2
MSSA 3	S	0.25	0.49	15.6
MSSA 4	S	1	3.9	62.5
MSSA 5	S	0.5	1.9	7.8
MSSA 6	S	1	7.8	15.6
MSSA ATCC-6538	S	1	31.2	62.5
MRSA MR3-CIPS	S	1	15.6	Not tested

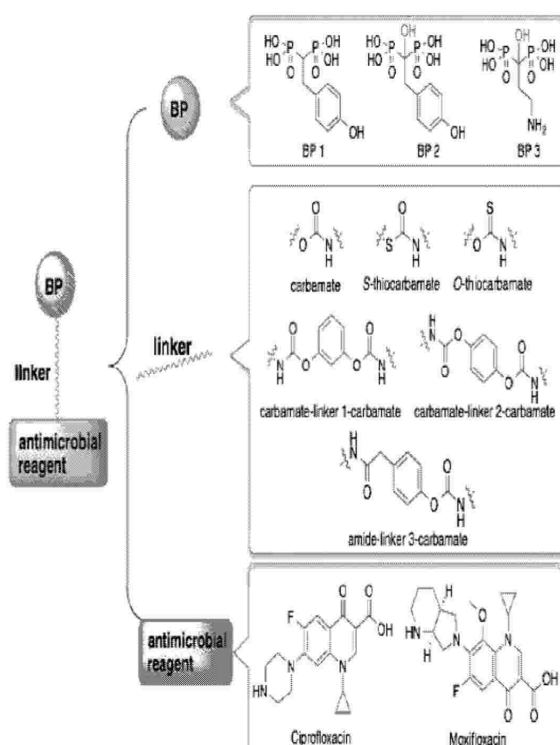
【図 18】



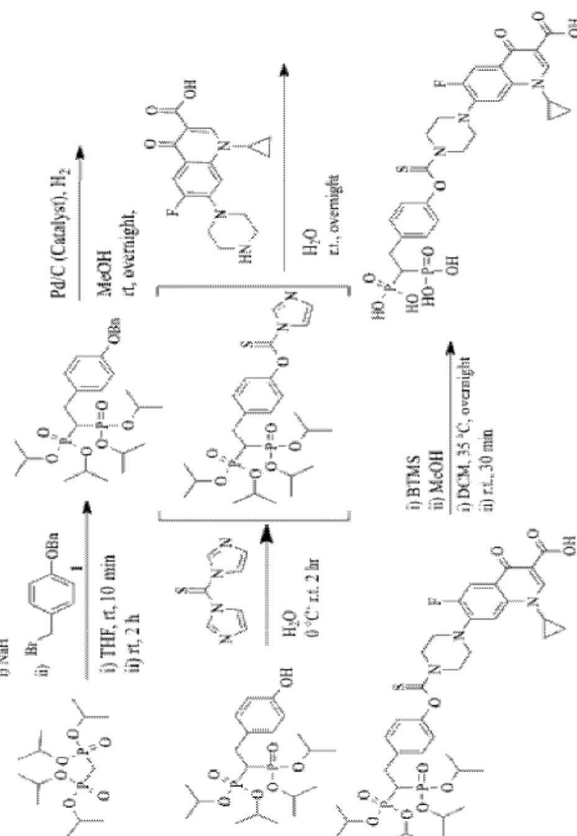
【図 19】



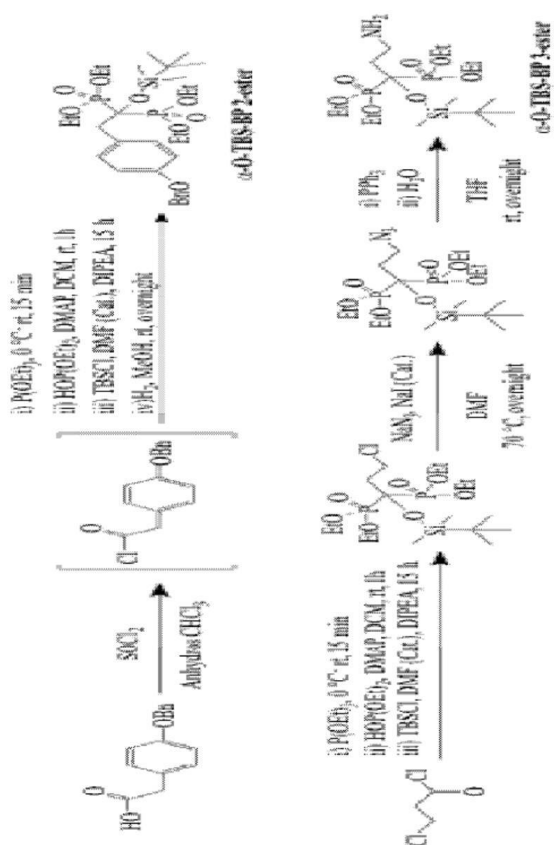
【図 20】



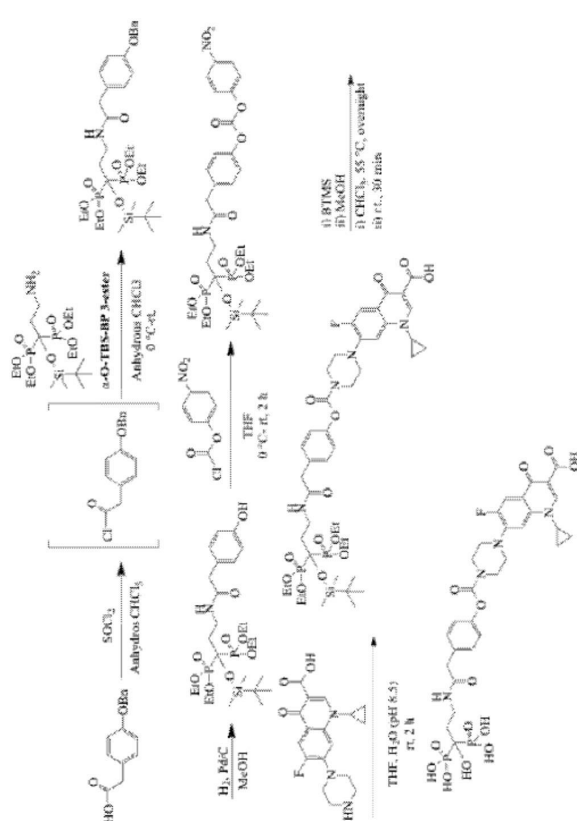
【図 2 1】



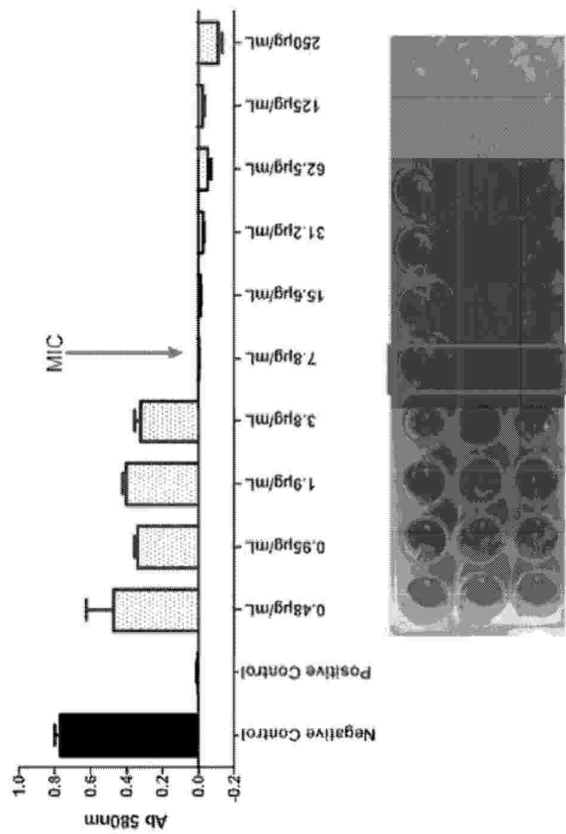
【圖 22】



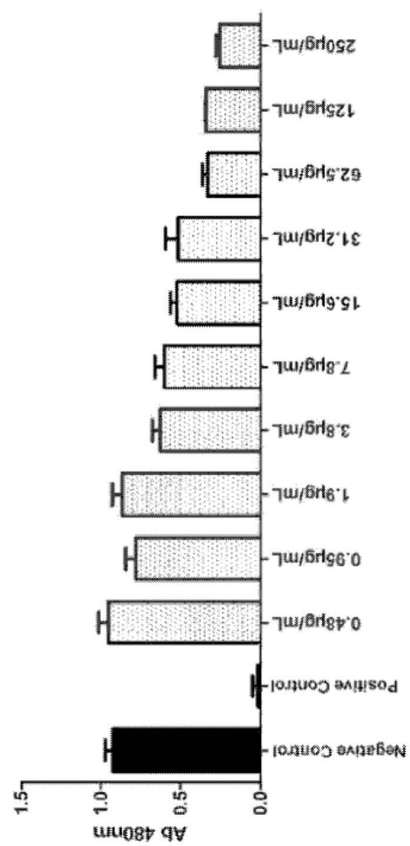
【圖 23】



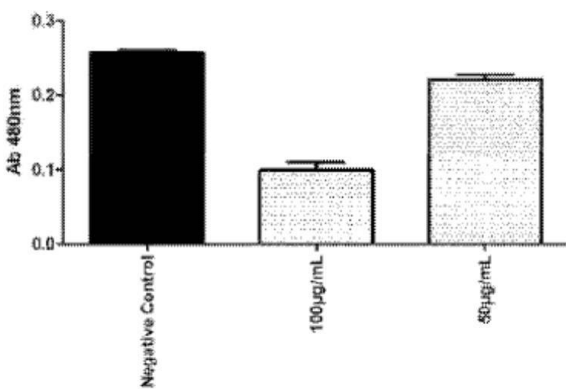
【図 2 4】



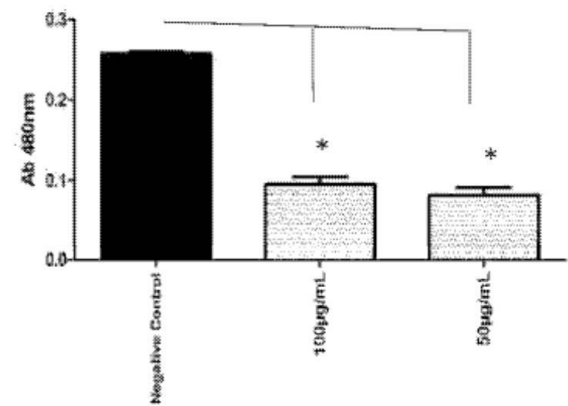
【図 2 5】



【図 2 6】



【図 2 7】



10

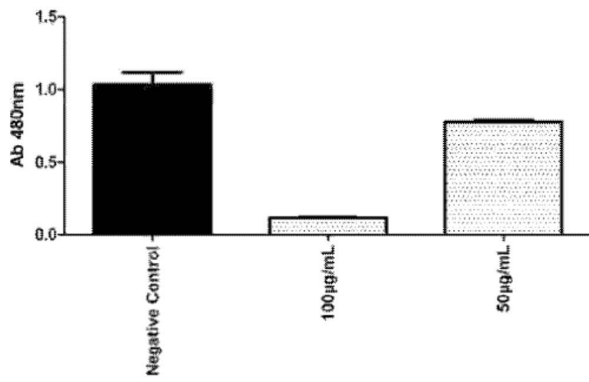
20

30

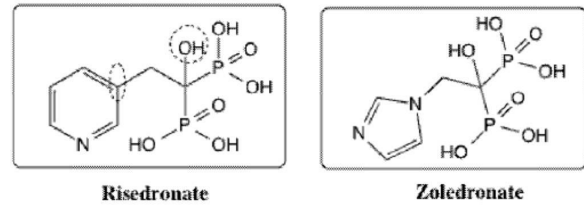
40

50

【図 28】

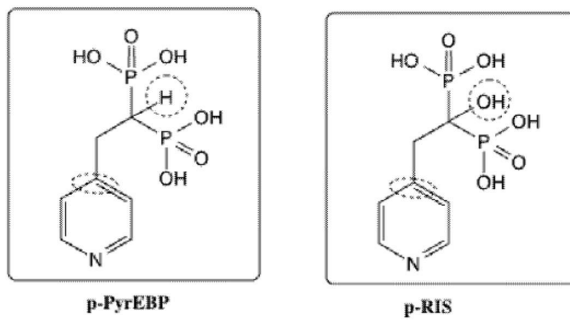


【図 29】

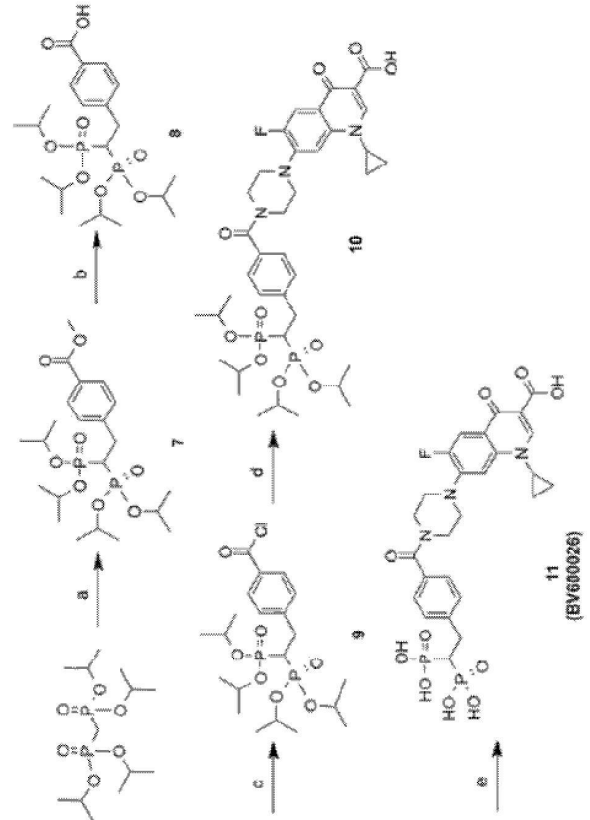


10

【図 30】



【図 31】



20

30

40

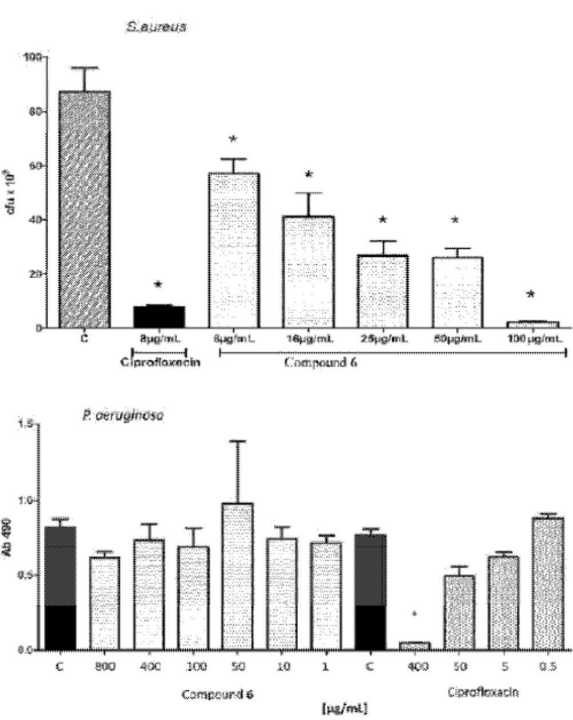
50

【 3 2 】

<i>S. aureus</i> strain	antibiotic sensitivity (S) or resistance (R)	MIC for ciprofloxacin [μg/mL]	MIC for 6 [μg/mL]	MIC for 11 [μg/mL]
MSSA1	S	1	3.9	31.2
MSSA2	S	0.25	0.49	31.2
MSSA3	S	0.25	0.49	15.6
MSSA4	S	1	3.9	62.5
MSSA5	S	0.5	1.9	7.8
MSSA6	S	1	7.8	15.6
MSSA-ATCC-6538	S	1	31.2	62.5
MRSA-MR4-CIPS	S	1	15.6	Not tested

^aMSSA = methicillin-susceptible *S. aureus*; MRSA = methicillin-resistant *S. aureus*.

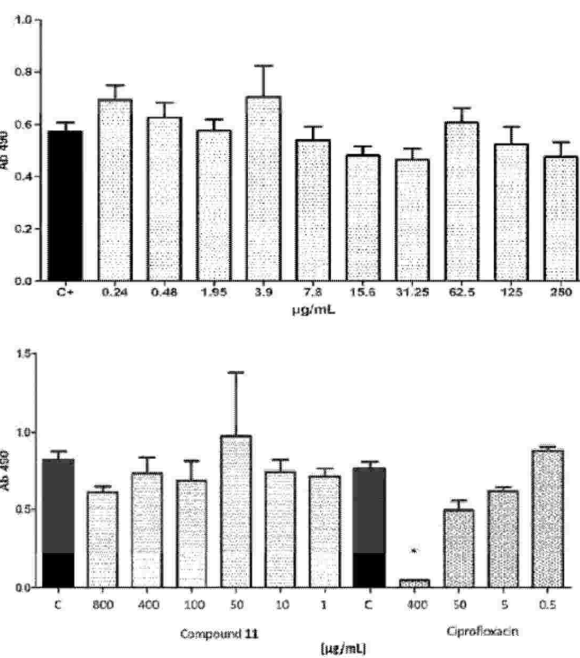
【 3 3 】



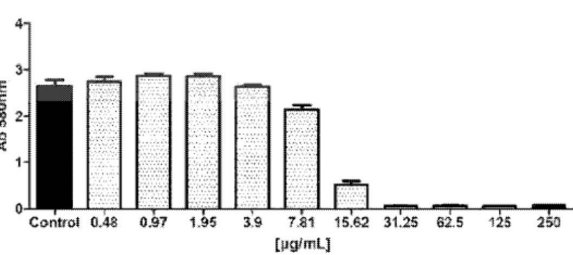
10

20

【 3 4 】



【 3 5 】

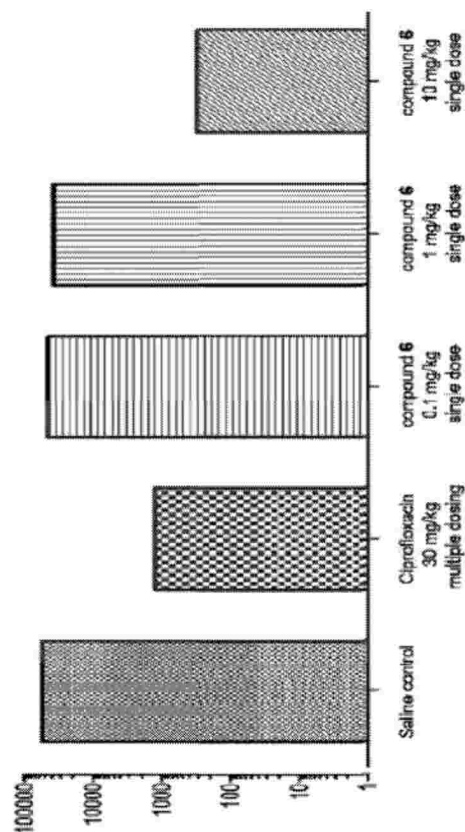


30

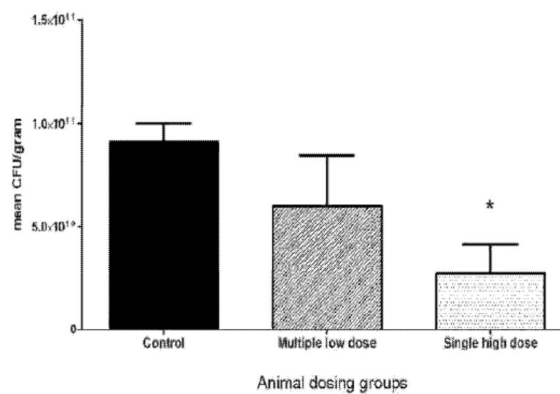
40

50

【図 3 6】



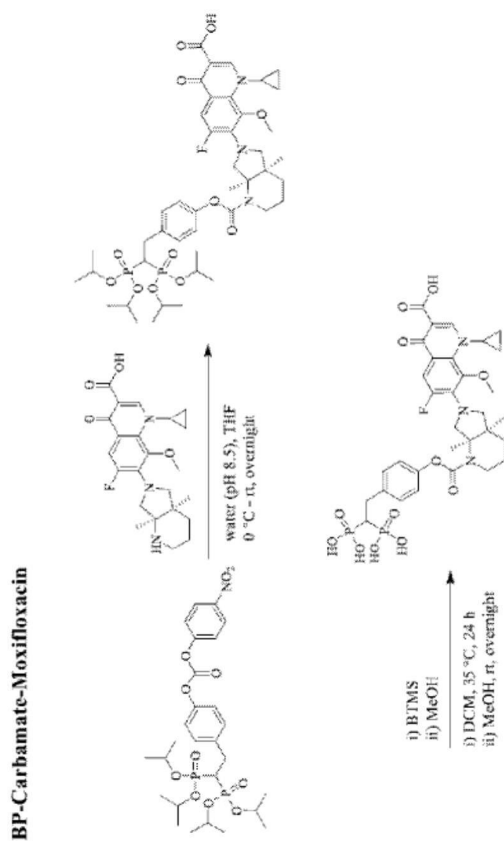
【図 3 7】



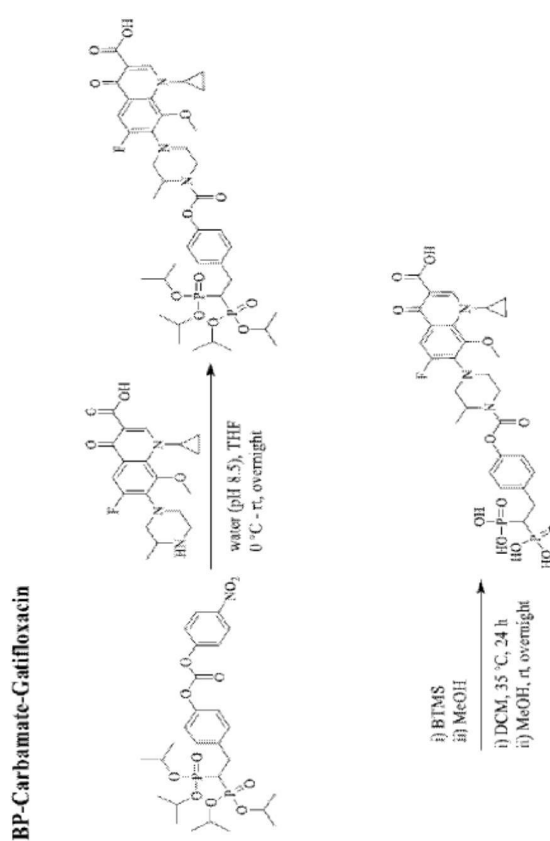
10

20

【図 3 8】



【図 3 9】

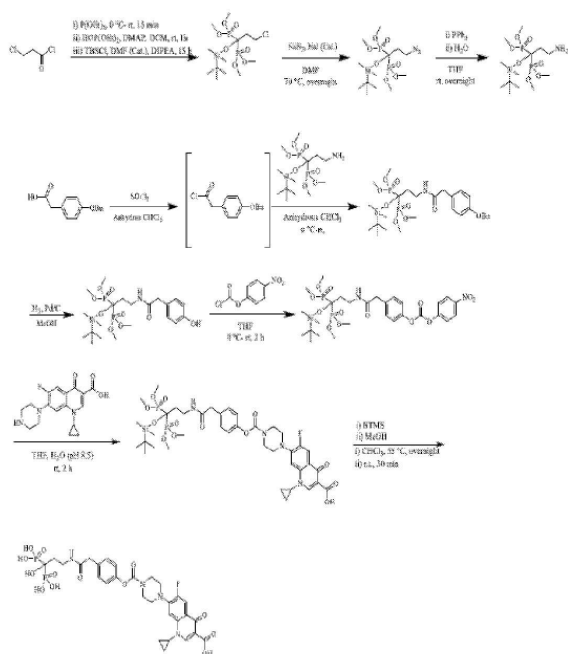


30

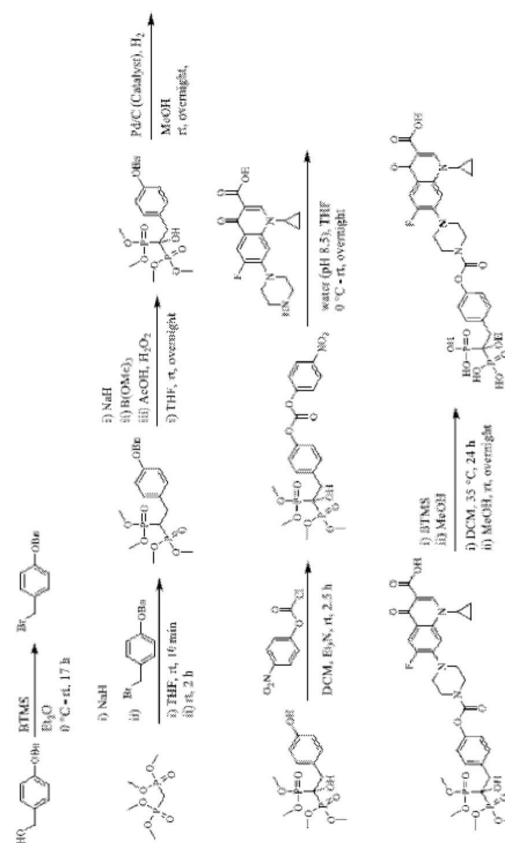
40

50

【図 40】

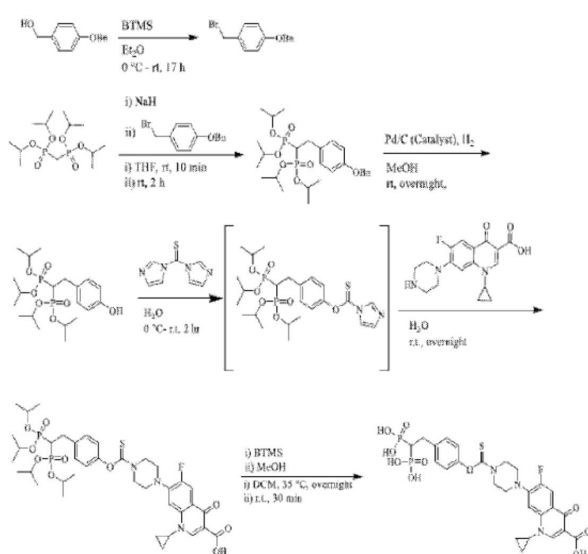
BP₅-Hydroxyphenyl Acrylic Acid-Cipm

【図 4 1】



【図 4 2】

BP-O-Thiocarbamate-Cipro

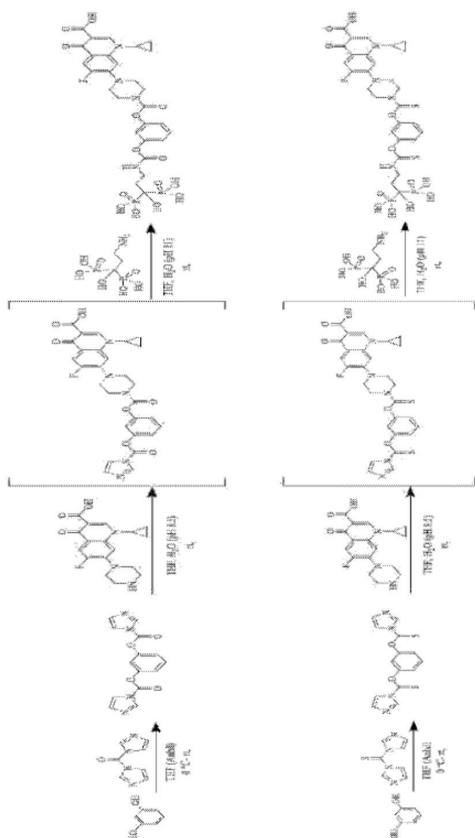


【図 4 3】

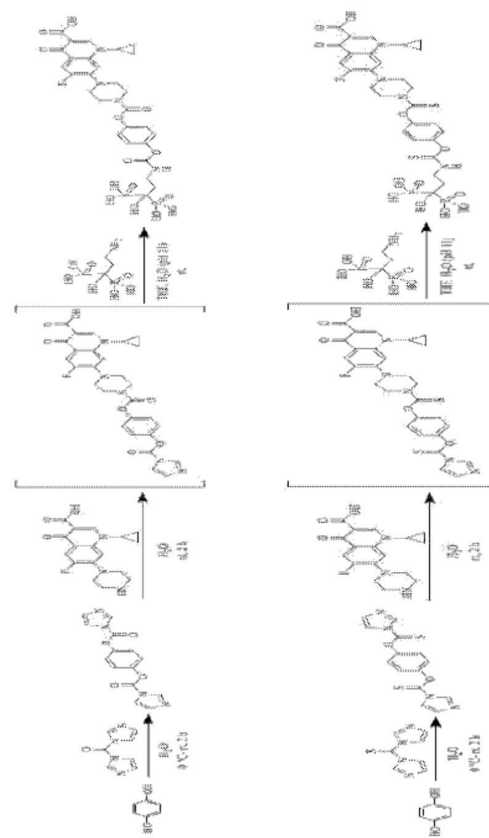


BP-S-Thiocarbamate-Cipro

【図 4 4】



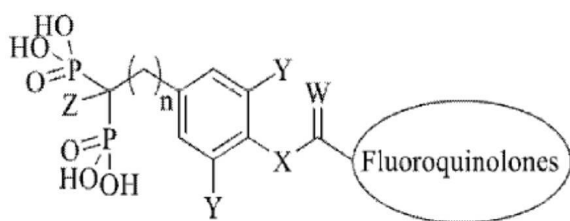
【図 4 5】



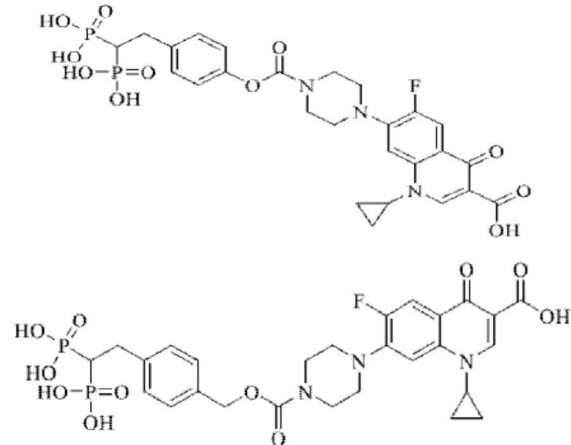
10

20

【図 4 6】



【図 4 7 - 1】

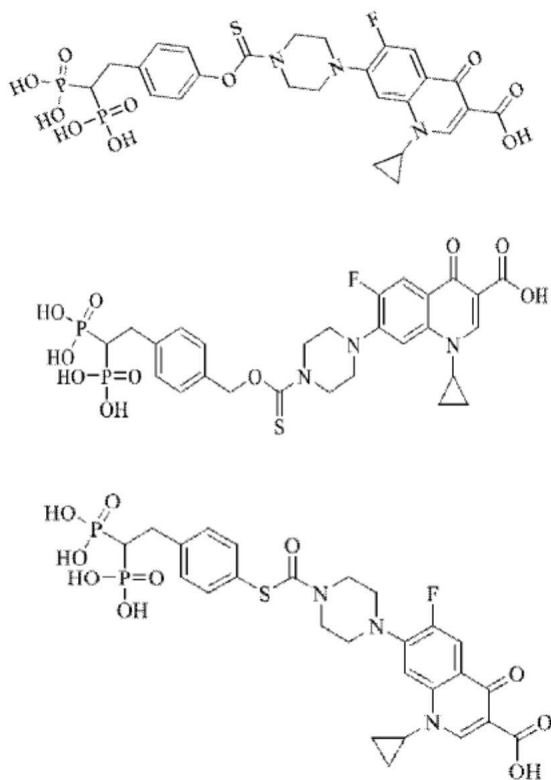


30

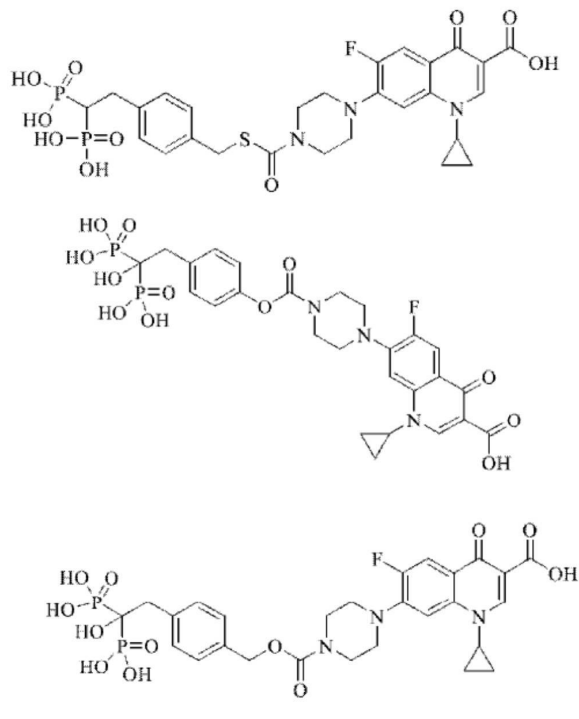
40

50

【図 47-2】



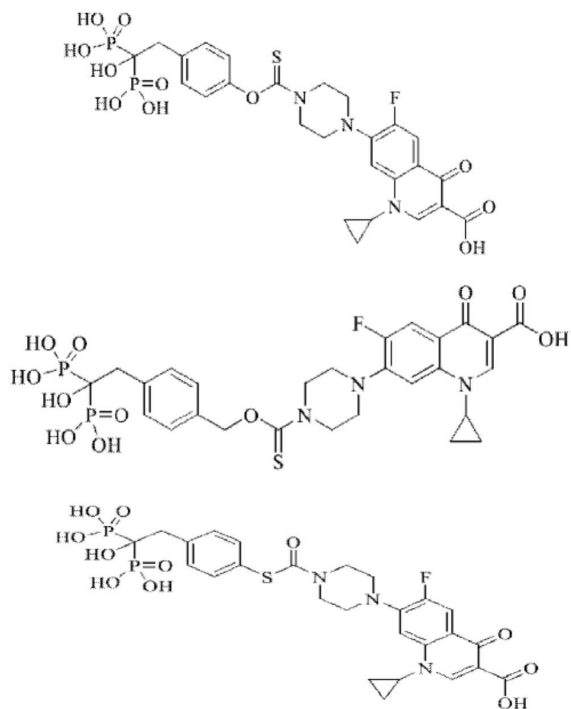
【図 47-3】



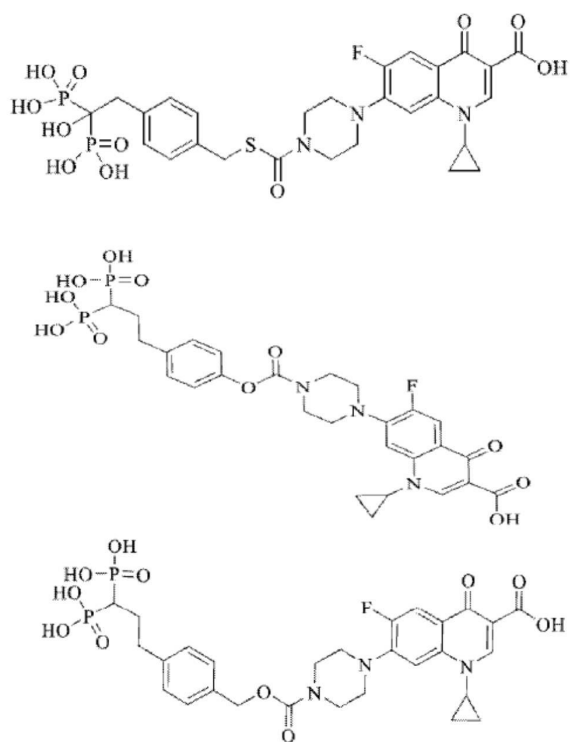
10

20

【図 47-4】



【図 47-5】

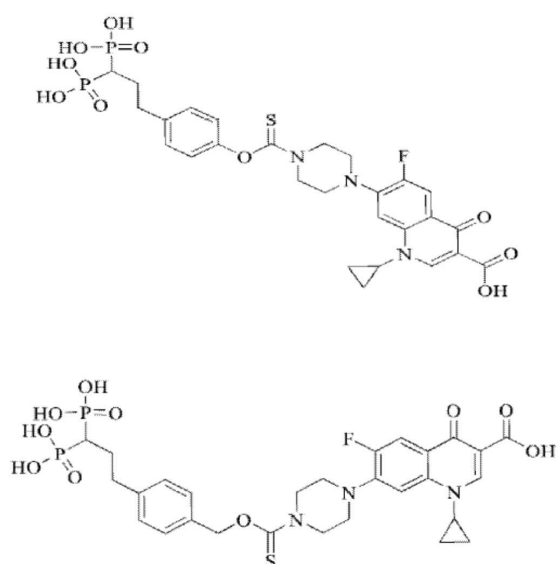


30

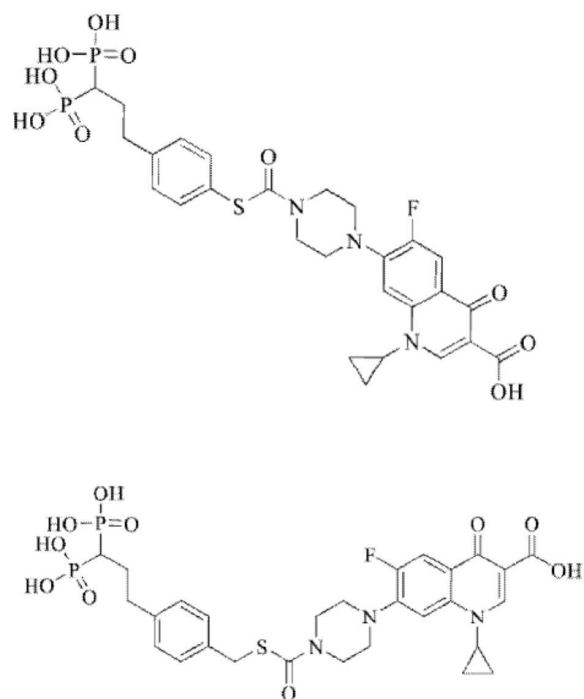
40

50

【図 47-6】



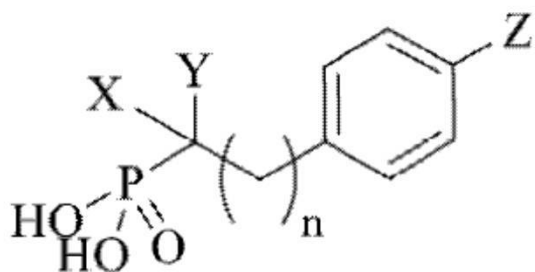
【図 47-7】



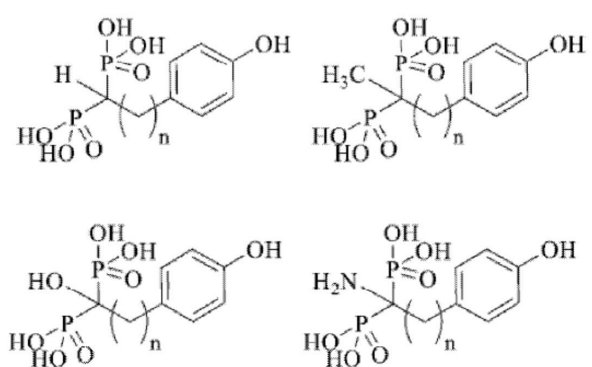
10

20

【図 48】



【図 49-1】

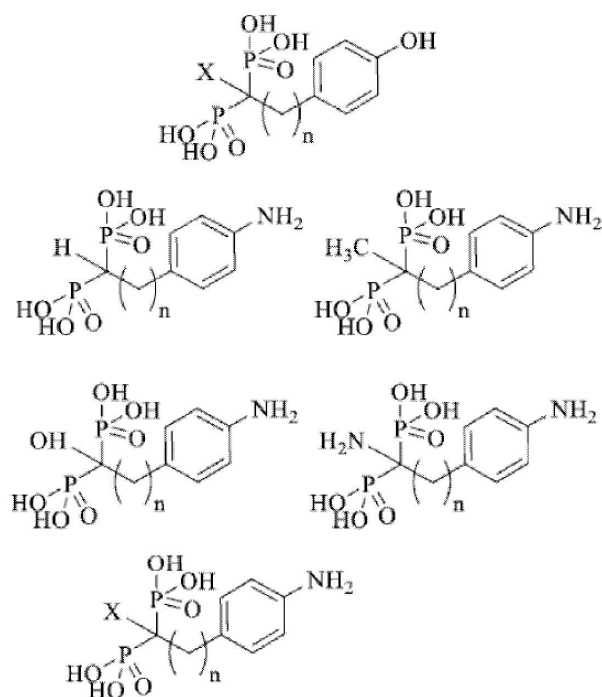


30

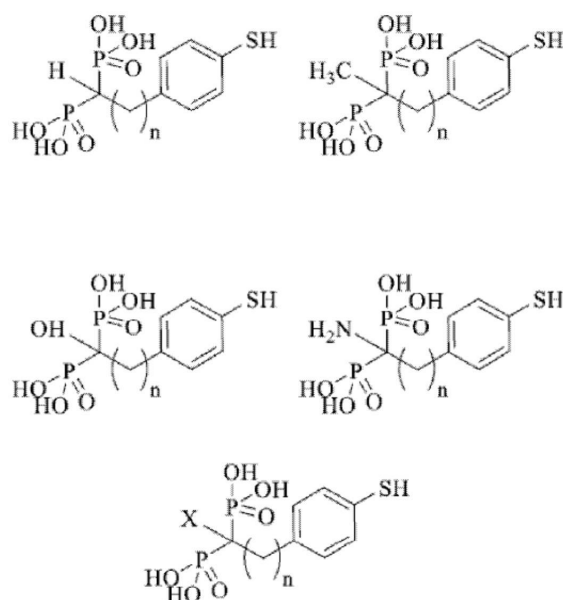
40

50

【図 49-2】



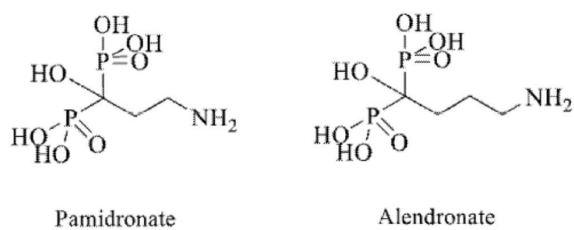
【図 49-3】



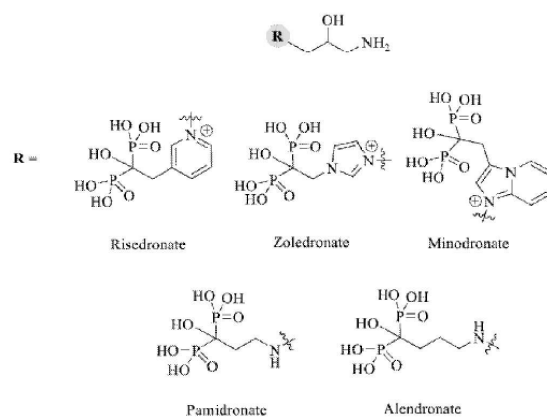
10

20

【図 50】



【図 51】

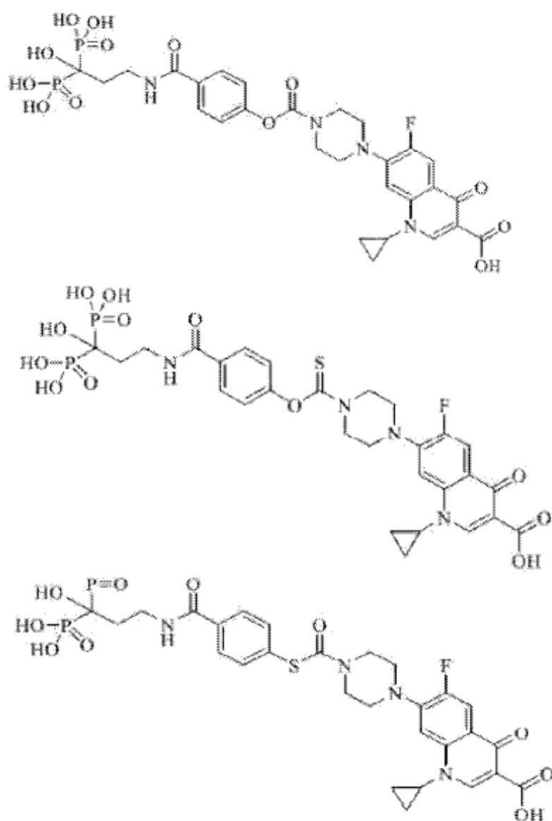


30

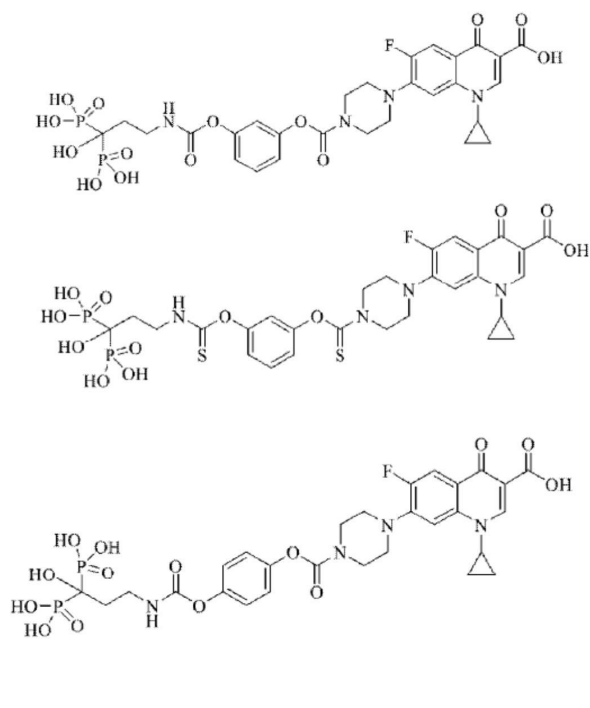
40

50

【図 5 2 - 1】



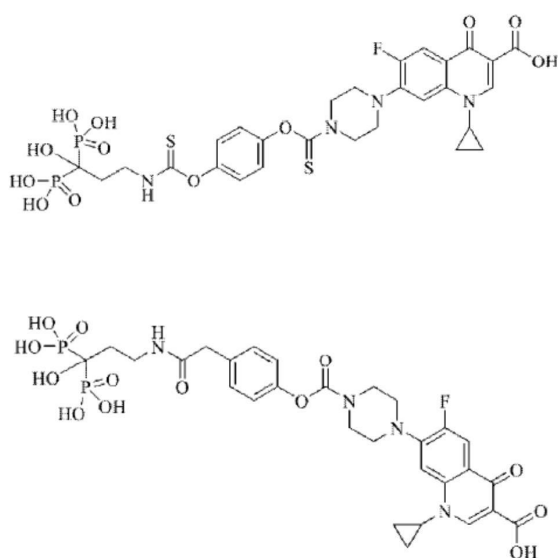
【図 5 2 - 2】



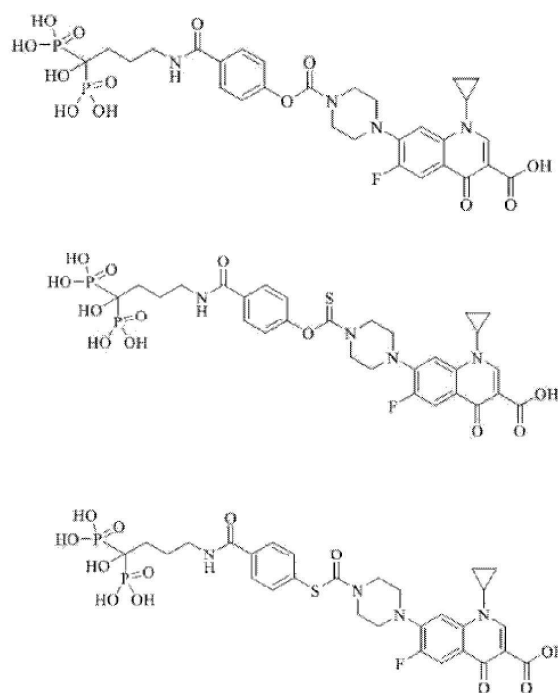
10

20

【図 5 2 - 3】



【図 5 3】



30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P 1/04 (2006.01)

A 6 1 P 1/04

A 6 1 P 19/00 (2006.01)

A 6 1 P 19/00

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/04

A 6 1 Q 11/00 (2006.01)

A 6 1 Q 11/00

C 0 7 F 9/38 (2006.01)

C 0 7 F 9/38

E

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/357,727

(32)優先日 平成28年7月1日(2016.7.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/448,060

(32)優先日 平成29年1月19日(2017.1.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

ニア州 パサデナ イースト フットヒル ブールバード 2 2 6 5

(72)発明者 スン、 シュティン

アメリカ合衆国 9 1 1 0 7 カリフォルニア州 パサデナ イースト フットヒル ブールバード 2 2 6 5

(72)発明者 ランディ、 マーク、 ダブリュ.

アメリカ合衆国 9 1 1 0 7 カリフォルニア州 パサデナ イースト フットヒル ブールバード 2 2 6 5

(72)発明者 マッケンナ、 チャールズ、 イー.

アメリカ合衆国 9 1 1 0 7 カリフォルニア州 パサデナ イースト フットヒル ブールバード 2 2 6 5

(72)発明者 リチャード、 エリック

アメリカ合衆国 9 1 1 0 7 カリフォルニア州 パサデナ イースト フットヒル ブールバード 2 2 6 5

(72)発明者 セドギザデー、 パリッシュ

アメリカ合衆国 9 0 0 8 9 カリフォルニア州 ロサンゼルス ウェスト 3 4 ストリート ナンバー 4 1 1 0 9 2 5 ユーエスシー センター フォー バイオフィルムズ ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア ディレクター

(72)発明者 サドレラフィ、 ケイバン

アメリカ合衆国 9 1 1 0 7 カリフォルニア州 パサデナ イースト フットヒル ブールバード 2 2 6 5

合議体

審判長 阪野 誠司

審判官 小石 真弓

審判官 野田 定文

(56)参考文献 特表2008-536911 (JP, A)

国際公開第98/015560 (WO, A1)

Journal of Medicinal Chemistry, 2008年, 51 (21), p. 6955-6969

新実験化学講座15, 1976年, 丸善株式会社, 1074頁

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07D,A61K

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)