

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-509306

(P2010-509306A)

(43) 公表日 平成22年3月25日 (2010.3.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 D 225/02 (2006.01)	C O 7 D 225/02 C S P	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/395 (2006.01)	A 6 1 K 31/395 Z N A	4 B O 6 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 33/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/06	4 C O 3 4
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 92 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-535815 (P2009-535815)
 (86) (22) 出願日 平成19年11月9日 (2007.11.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年7月2日 (2009.7.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2007/050679
 (87) 国際公開番号 W02008/056188
 (87) 国際公開日 平成20年5月15日 (2008.5.15)
 (31) 優先権主張番号 0622342.4
 (32) 優先日 平成18年11月9日 (2006.11.9)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 0720875.4
 (32) 優先日 平成19年10月24日 (2007.10.24)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 505012977
 バイオチカ テクノロジー リミテッド
 グレートブリテン及び北アイルランド連合
 王国 C B 1 O 1 X L エセックス ノ
 ル サッフロン ワルデン リトル チェ
 スターフォード チェスターフォード リ
 サーチ パーク
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規化合物及びそれらの製造方法

(57) 【要約】

本発明は、例えば、癌、B-細胞性悪性疾患、マラリア、真菌感染症、中枢神経系疾患及び神経変性疾患、血管新生依存性疾患、自己免疫疾患の治療、又は癌の予防的前処置において有用である、アンサマイシン類似体に関する。本発明は、これらの化合物の製造方法、及びそれらの医薬品における使用も提供する。

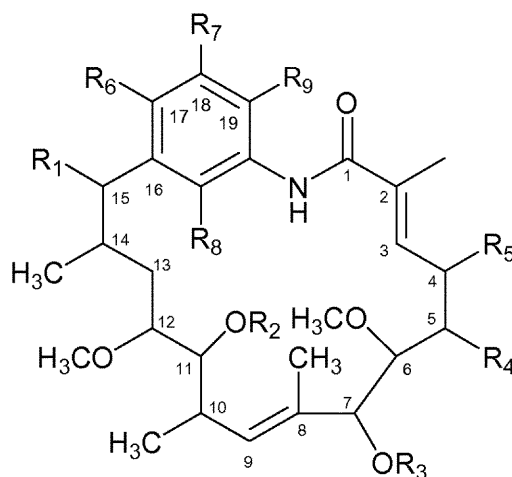
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式(I)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩：

【化 1】



(I)

(式中、

R_1 は、H、OH、OMeを表し；

R_2 は、H又はMeを表し；

R_3 は、H又はCONH₂を表し；

R_4 及び R_5 は、両方ともHを表すか、又はこれらは一緒に結合を表す(すなわち、C4-C5は二重結合である)かのいずれかであり；

R_6 は、H、F、OH、OMe、Br、Cl、CF₃、CH₃、SH、CH₂CH₃又はNR_{10a}R_{11a}を表し；

R_7 は、H、F、OH、OMe、Br、Cl、CF₃、CH₃、SH、CH₂CH₃又はNR_{10b}R_{11b}を表し；

R_8 は、H、F、OH、OMe、Br、Cl、CF₃、CH₃、SH、CH₂CH₃又はNR_{10c}R_{11c}を表し；

R_9 は、H、F、OH、OMe、Br、Cl、CF₃、CH₃、SH、CH₂CH₃又はNR_{10d}R_{11d}を表し；

R_{10a} 、 R_{11a} 、 R_{10b} 、 R_{11b} 、 R_{10c} 、 R_{11c} 、 R_{10d} 、 R_{11d} は、独立に、H、CH₃又はCH₂CH₃を表し；

但し：

(i) R_6 がHを表し、 R_7 がOHを表し、及び R_8 がOHを表す場合、 R_9 はHを表さず；

(ii) R_7 がOHを表し、 R_8 がHを表し、及び R_9 がHを表す場合、 R_6 はH、OH又はOMeを表さず；及び、

(iii) R_7 がOMeを表し、 R_8 がHを表し、及び R_9 がHを表す場合、 R_6 はOMeを表さない)。

【請求項 2】

(iv) 前記 R_6 がH、OH又はOMeを表し、 R_7 がHを表し、及び R_8 がHを表す場合、 R_9 はOH、Cl又はNH₂を表さず；及び、

(v) 前記 R_6 がH、OH又はOMeを表し、 R_8 がHを表し、及び R_9 がHを表す場合、 R_7 はNH₂を表さない、請求項1記載の化合物。

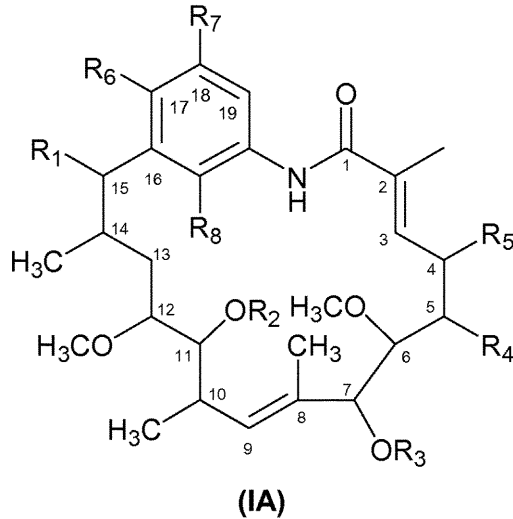
【請求項 3】

(vi) 前記 R_6 がH又はOHを表す場合、 R_7 、 R_8 及び R_9 はすべてがHを表すわけではない、請求項1又は請求項2記載の化合物。

【請求項 4】

式(IA)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩である請求項1記載の化合物：

【化 2】



10

(式中、 R_1 は、H、OH、OMeを表し；

R_2 は、H又はMeを表し；

R_3 は、H又はCONH₂を表し；

R_4 及び R_5 は両方ともHを表すか、又はこれらは一緒に結合を表す(すなわち、C4-C5は二重結合である)かのいずれかであり；

20

R_6 は、H、OH、OMe又はFを表し；

R_7 は、H又はFを表し；

R_8 は、H又はFを表し；

R_9 は、Hを表す。)

【請求項 5】

前記 R_1 が、Hを表す、請求項1～4のいずれか1項記載の化合物。

【請求項 6】

前記 R_1 が、OHを表す、請求項1～4のいずれか1項記載の化合物。

【請求項 7】

前記 R_2 が、Hを表す、請求項1～6のいずれか1項記載の化合物。

30

【請求項 8】

前記 R_3 が、CONH₂を表す、請求項1～7のいずれか1項記載の化合物。

【請求項 9】

前記 R_4 及び R_5 が、一緒に結合を表す、請求項1～8のいずれか1項記載の化合物。

【請求項 10】

前記 R_4 及び R_5 が、各々Hを表す、請求項1～8のいずれか1項記載の化合物。

【請求項 11】

前記 R_6 、 R_7 及び R_8 はすべてがHを表すわけではない、請求項1～10のいずれか1項記載の化合物。

40

【請求項 12】

前記 R_6 、 R_7 及び R_8 がすべて、Hを表す、請求項1～10のいずれか1項記載の化合物。

【請求項 13】

前記 R_1 がHを表し、 R_2 がHを表し、 R_3 がCONH₂を表し、 R_4 及び R_5 がHを表し、 R_6 がHを表し、並びに R_7 がHを表す場合、 R_8 はHを表さない、請求項1～11のいずれか1項記載の化合物。

【請求項 14】

前記 R_1 がHを表し、 R_2 がHを表し、 R_3 がCONH₂を表し、並びに R_4 及び R_5 が各々Hを表す、請求項1～4のいずれか1項記載の化合物。

【請求項 15】

前記 R_1 がOHを表し、 R_2 がHを表し、及び R_3 がCONH₂を表し、並びに R_4 及び R_5 が各々Hを表

50

す、請求項1～4のいずれか1項記載の化合物。

【請求項16】

前記R₆がH又はFを表す、請求項1～10のいずれか1項記載の化合物。

【請求項17】

前記R₇がH又はFを表す、請求項1～10及び16のいずれか1項記載の化合物。

【請求項18】

前記R₇がOHを表す、請求項1～10及び16のいずれか1項記載の化合物。

【請求項19】

前記R₈がH又はFを表す、請求項1～10及び16～18のいずれか1項記載の化合物。

【請求項20】

前記R₉がHを表す、請求項1～10及び16～19のいずれか1項記載の化合物。

10

【請求項21】

前記R_{10a}、R_{11a}、R_{10b}、R_{11b}、R_{10c}、R_{11c}、R_{10d}、R_{11d}がHを表す、請求項1～10及び16～20のいずれか1項記載の化合物。

【請求項22】

前記R₁がHを表し、R₂がHを表し、R₃がCONH₂を表し、R₄及びR₅が各々Hを表し、並びにR₆がOHを表す、請求項1～4のいずれか1項記載の化合物。

【請求項23】

前記R₁がHを表し、R₂がHを表し、R₃がCONH₂を表し、R₄、R₅、R₆、R₇及びR₈が各々Hを表す、請求項4記載の化合物。

20

【請求項24】

前記R₁がHを表し、R₂がHを表し、R₃がCONH₂を表し、R₄及びR₅が各々Hを表し、R₆がOHを表し、並びにR₇及びR₈が各々Hを表す、請求項4記載の化合物。

【請求項25】

前記R₁がHを表し、R₂がHを表し、R₃がCONH₂を表し、R₄及びR₅が各々Hを表し、R₆がFを表し、並びにR₇及びR₈が各々Hを表す、請求項4記載の化合物。

【請求項26】

前記R₁がOHを表し、R₂がHを表し、R₃がCONH₂を表し、R₄及びR₅が各々Hを表し、R₆がFを表し、並びにR₇及びR₈が各々Hを表す、請求項4記載の化合物。

【請求項27】

前記R₁がHを表し、R₂がHを表し、R₃がCONH₂を表し、R₄及びR₅が各々Hを表し、R₆がHを表し、R₇がFを表し、並びにR₈がHを表す、請求項4記載の化合物。

30

【請求項28】

前記R₁がHを表し、R₂がHを表し、R₃がCONH₂を表し、R₄及びR₅が各々Hを表し、R₆がOHを表し、R₇がFを表し、並びにR₈がHを表す、請求項4記載の化合物。

【請求項29】

前記R₁がOHを表し、R₂がHを表し、R₃がCONH₂を表し、R₄及びR₅が各々Hを表し、R₆がHを表し、R₇がFを表し、並びにR₈がHを表す、請求項4記載の化合物。

【請求項30】

前記R₁がHを表し、R₂がHを表し、R₃がCONH₂を表し、R₄及びR₅が各々Hを表し、R₆及びR₇が各々Fを表し、並びにR₈がHを表す、請求項4記載の化合物。

40

【請求項31】

前記R₁がOHを表し、R₂がHを表し、R₃がCONH₂を表し、R₄及びR₅が各々Hを表し、R₆及びR₇が各々Fを表し、並びにR₈がHを表す、請求項4記載の化合物。

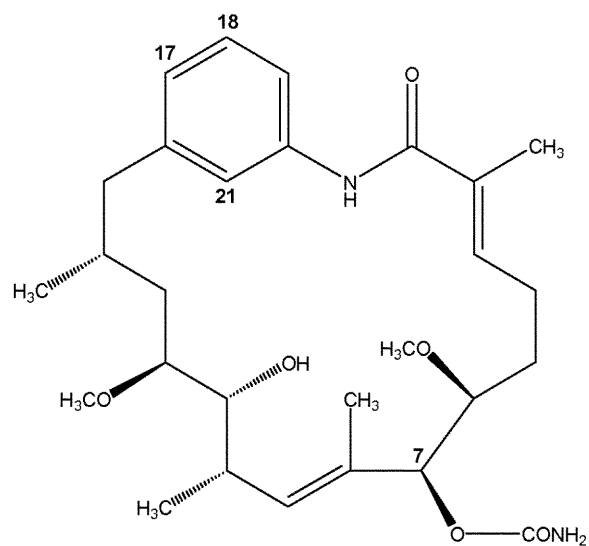
【請求項32】

前記R₁がHを表し、R₂がHを表し、R₃がCONH₂を表し、R₄及びR₅が各々Hを表し、R₆、R₇及びR₈が各々Fを表す、請求項4記載の化合物。

【請求項33】

下記式、又はそれらの医薬として許容し得る塩である、請求項4記載の化合物：

【化 3】



10

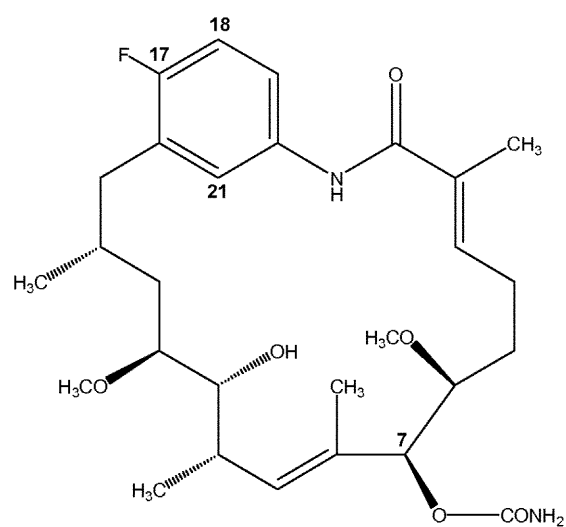
。

【請求項 3 4】

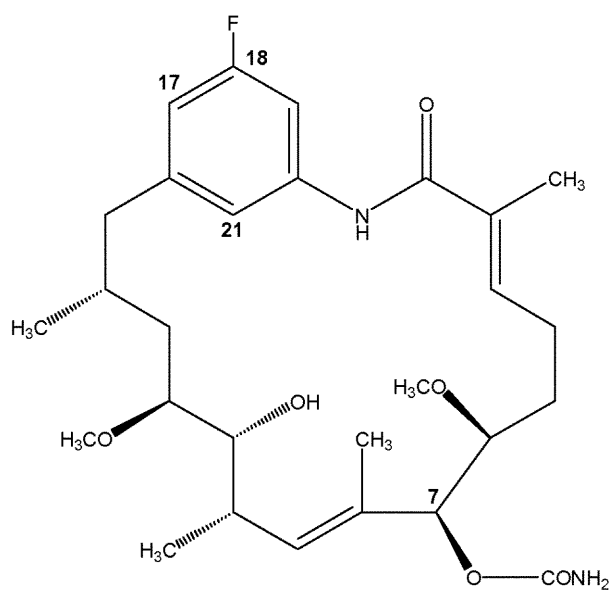
下記式、及びそれらのいずれか1つの医薬として許容し得る塩から選択される、請求項4記載の化合物：

20

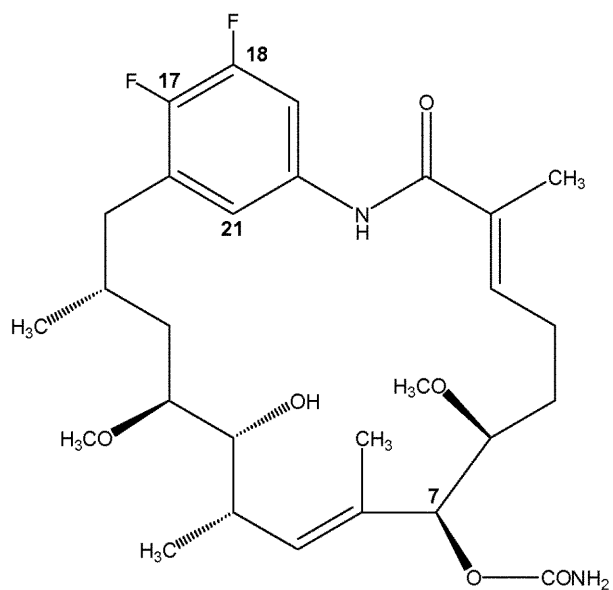
【化 4】



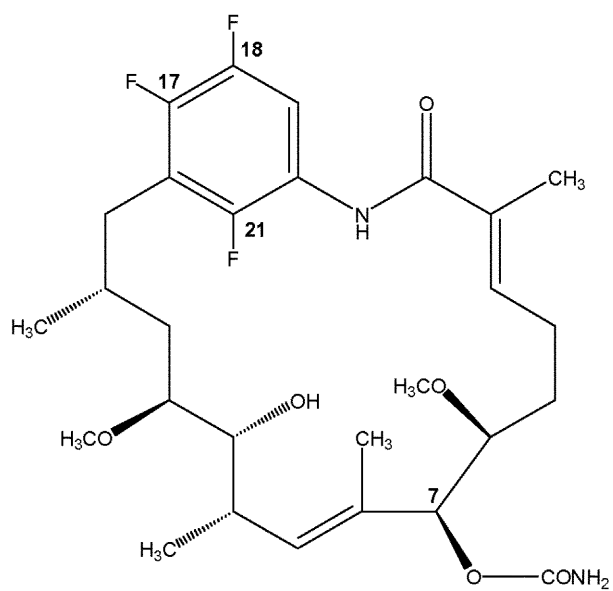
30



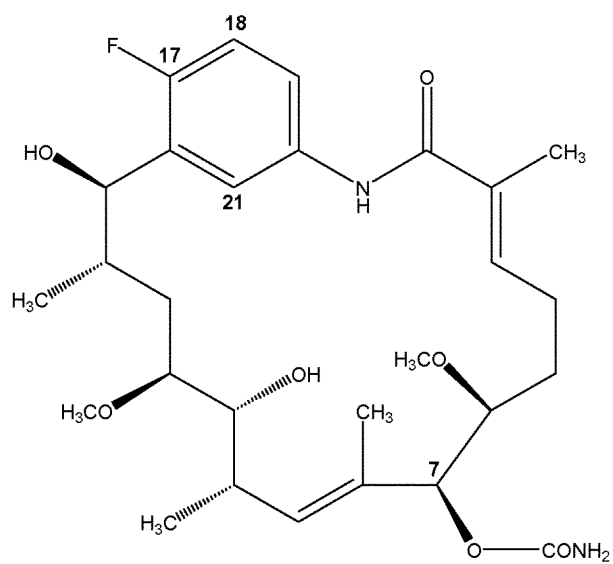
10



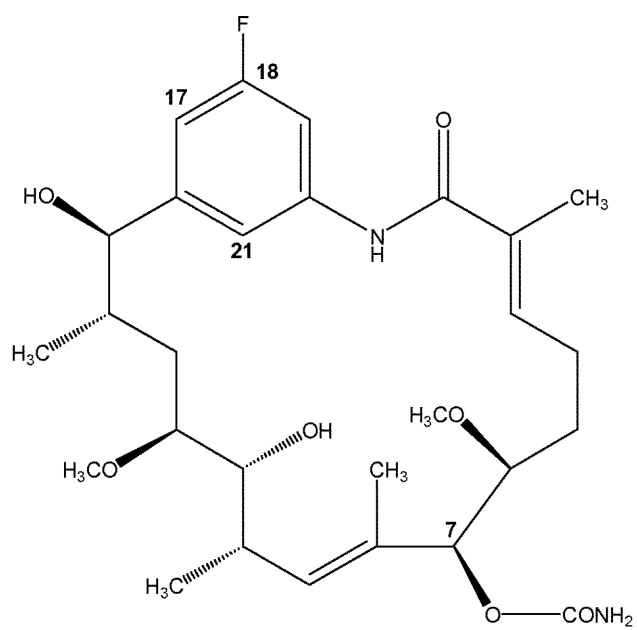
20



40

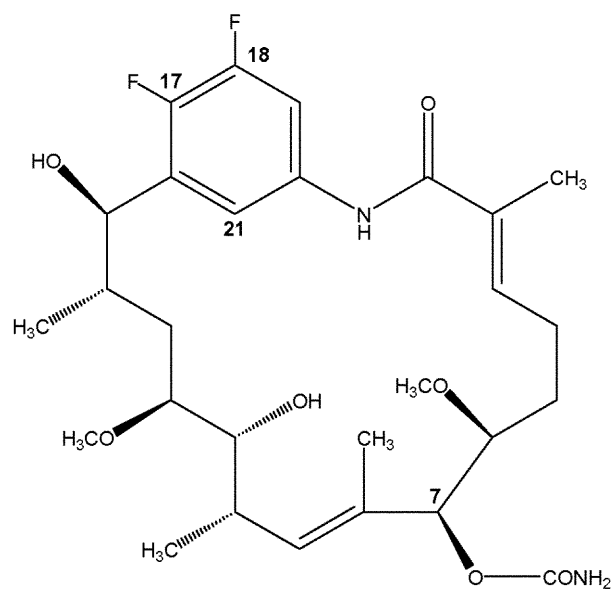


10

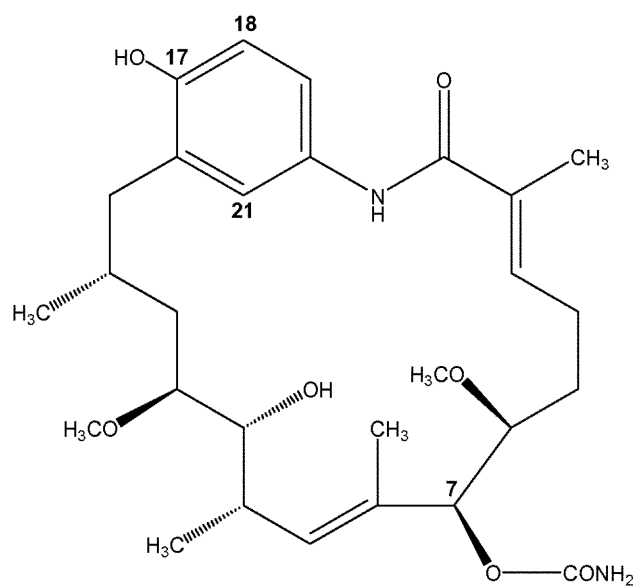


20

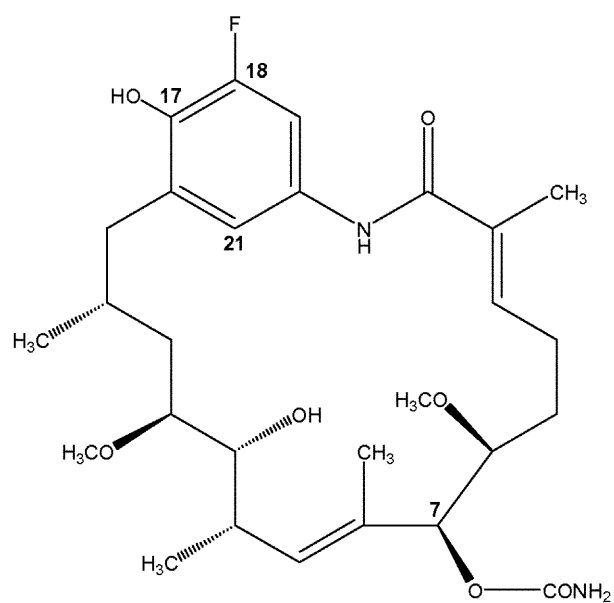
30



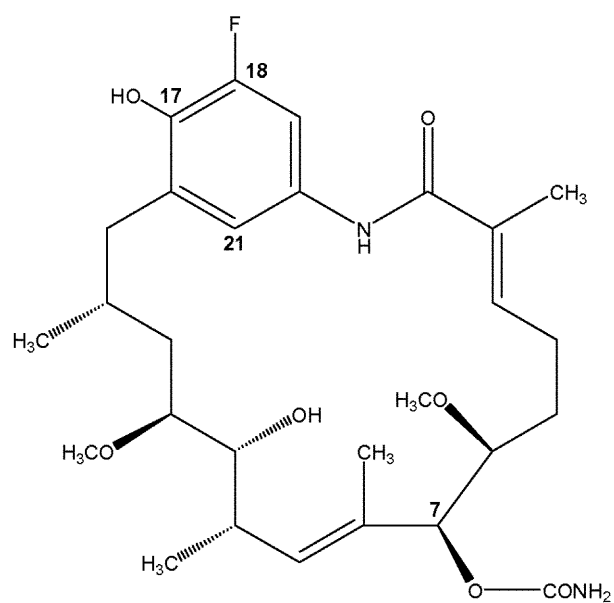
10



20



30

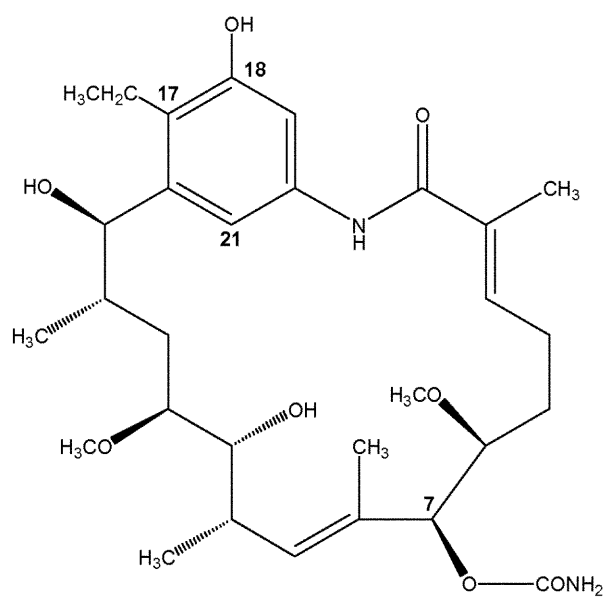
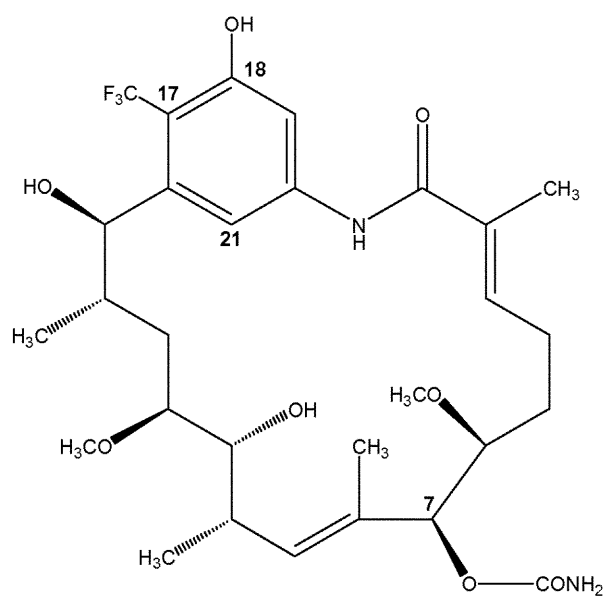


40

。

【化 5】



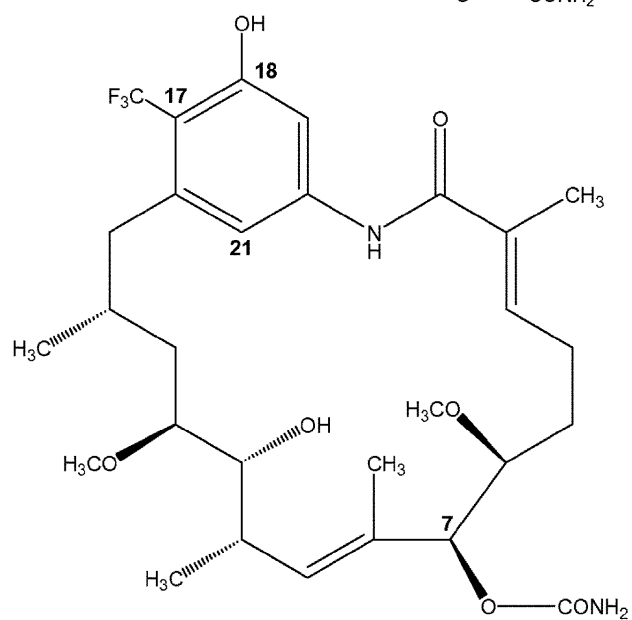
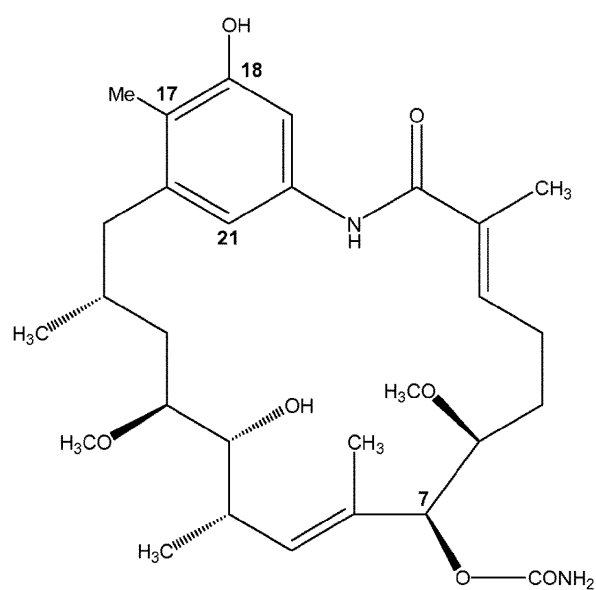
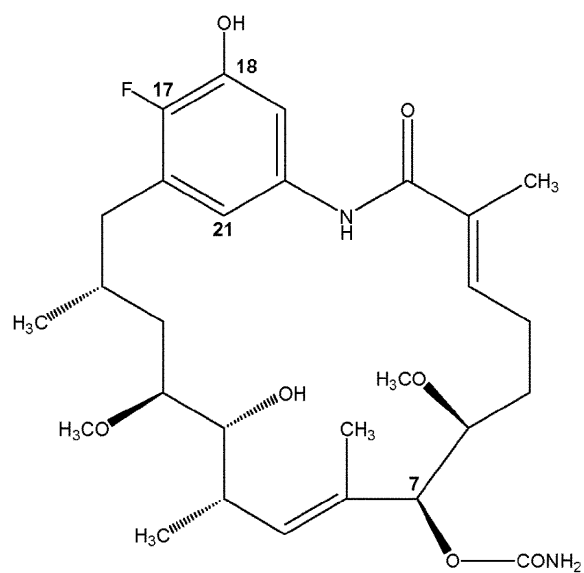


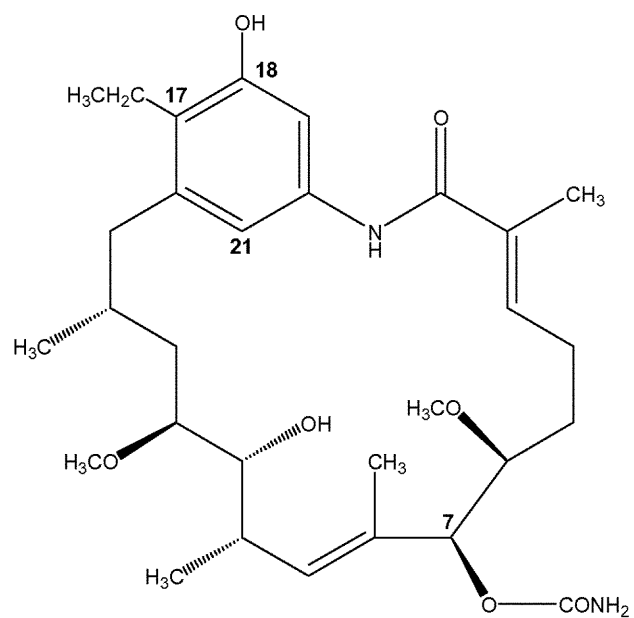
。

【請求項 36】

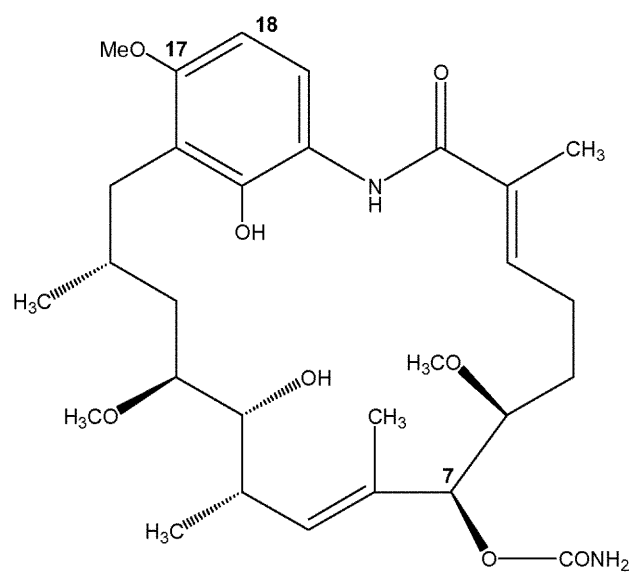
下記式、及びそれらのいずれか1つの医薬として許容し得る塩から選択される、請求項1記載の化合物：

【化 6】

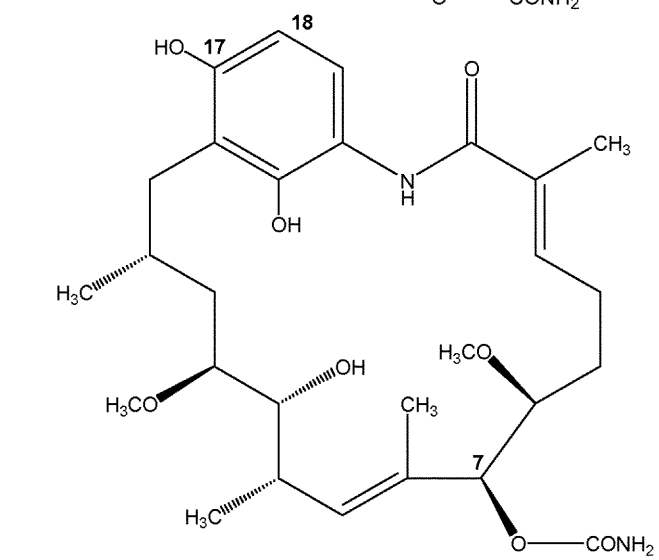




10



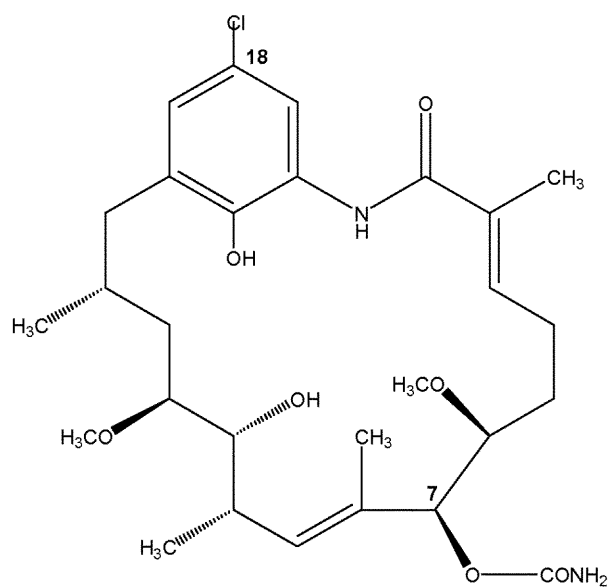
20



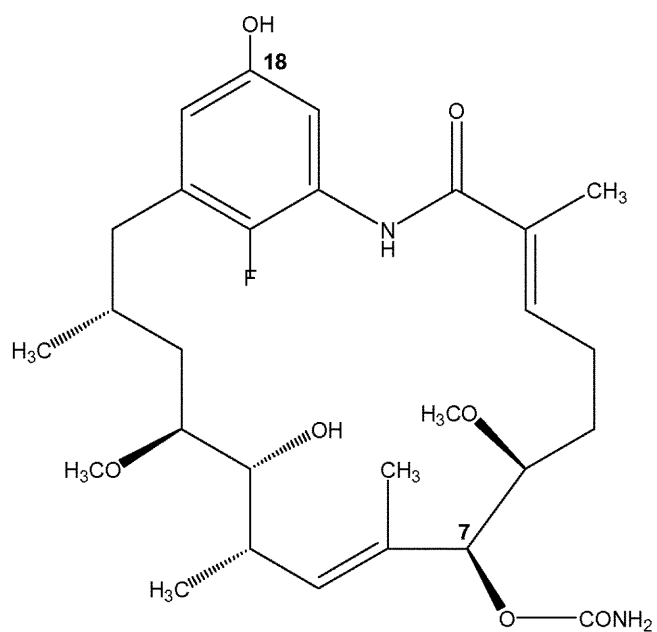
40



30

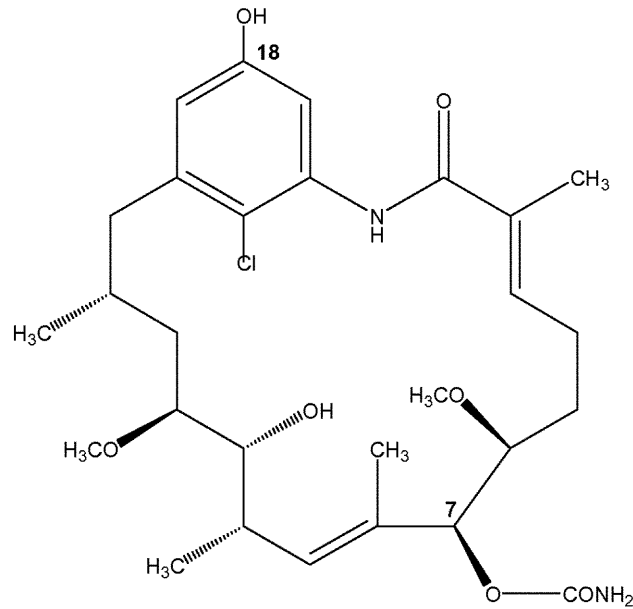


10

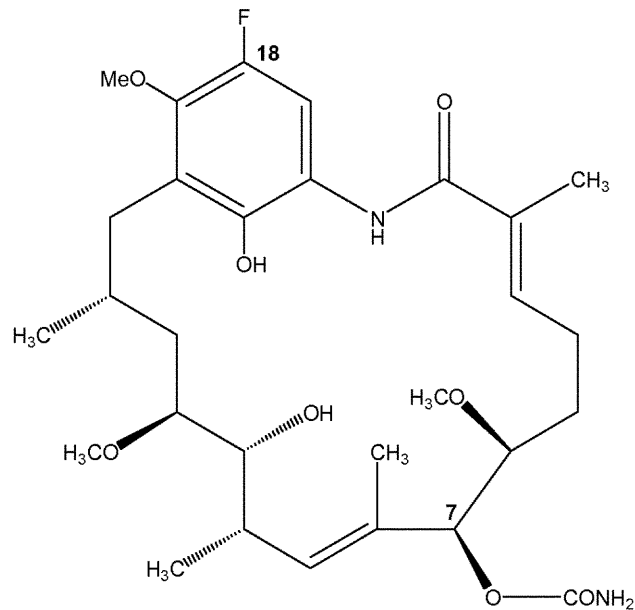


20

30



10



20

30

。

【請求項 37】

図4に示される通りの化合物28、29、30、31、32、36及び37、並びにそれらのいずれか1つの医薬として許容し得る塩から選択される、請求項1記載の化合物。

【請求項 38】

a) 好適な条件下で培養した場合に、アンサマイシン又はその類似体を生成する菌株を提供する工程；

b) 前記菌株へAHBAではないスターターユニットを、該スターターユニットが前記アンサマイシン類似体に組込まれるように供給する工程；

c) 前記菌株を、アンサマイシン類似体の生成に適した条件下で培養する工程；及び

d) 任意に、生成された化合物を単離する工程：を含む、アンサマイシン類似体の製造方法。

40

【請求項 39】

前記工程(b)で供給されるスターターユニットが、3-アミノ安息香酸ではない、請求項38記載の製造方法。

【請求項 40】

50

前記工程(b)で供給されるスターターユニットが、3,5-ジアミノ安息香酸、3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸又は3-アミノ-4-クロロ安息香酸ではない、請求項38又は39記載の製造方法。

【請求項 4 1】

前記a)の菌株が、1種以上のAHBA生合成遺伝子が欠失又は不活化されている菌株であることを特徴とする、請求項38～40のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項 4 2】

前記a)の菌株が、AHBA生合成の効率を低下させるように変異されている、請求項38～40のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項 4 3】

前記工程c)の条件が、AHBA生合成の効率が最適状態に及ばないようなものである、請求項38～40又は42のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項 4 4】

前記菌株により、AHBAが、それにもかかわらず、前記供給される非天然スターターユニットの組込みを可能にするレベルまで生成される、請求項43記載の製造方法。

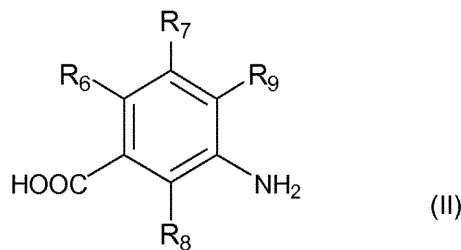
【請求項 4 5】

前記供給された非天然スターターユニットの組込み量が、全スターターユニットの組込みの20%超、好ましくは50%超である、請求項44記載の製造方法。

【請求項 4 6】

前記スターターユニットが、

【化 7】



(式中、 R_6 、 R_7 、 R_8 及び R_9 は、請求項1～37のいずれか1項で定義された通りである)、又は該式中の酸部分が誘導体化されている類似体から選択される、請求項38～45のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項 4 7】

前記 R_6 、 R_7 、 R_8 及び R_9 がすべてHを表すわけではない、請求項46記載の製造方法。

【請求項 4 8】

前記 R_6 、 R_7 、 R_8 及び R_9 が、すべてHを表す、請求項46記載の製造方法。

【請求項 4 9】

前記菌株がアンサマイシン産生株であり、かつ前記スターターユニットが、該菌株が18,21-ジデスオキシアンサマイシン類似体を生成するように選択される、請求項38～48のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項 5 0】

前記スターターユニットが、前記菌株がフッ素で置換されていてもよい18,21-ジデスオキシアンサマイシン類似体を生成するように選択される、請求項49記載の製造方法。

【請求項 5 1】

前記スターターユニットが、前記菌株がフッ素で置換されている18,21-ジデスオキシアンサマイシン類似体を生成するように選択される、請求項50記載の製造方法。

【請求項 5 2】

前記菌株がアンサマイシン産生株であり、かつ前記スターターユニットが、該菌株がベンゼン環の18又は21位で置換されていないアンサマイシン類似体を生成するように選択される、請求項49～51のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項 5 3】

(i) 工程(d)の生成物を化学修飾又は生物変換の処理に供する工程、任意にその後、生じた化合物を単離する工程を更に含むか、あるいは(ii) 工程(c)の生成物を工程(d)に先立って化学修飾又は生物変換の処理に供する工程を更に含む、請求項38～52のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項 5 4】

a) 任意に1種以上のポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されている、かつ/又は1種以上のスターターユニット生合成遺伝子が欠失又は不活化されている適切な条件下で培養した場合に、アンサマイシン又はその類似体を生成する第一の宿主菌株を提供する工程；

b) 前記菌株に非天然のスターターユニットを供給する工程；

c) 前記修飾された宿主菌株を、アンサマイシン類似体の生成に適した条件下で培養する工程；及び

d) 任意に、生成された化合物を単離する工程：を含む、アンサマイシン類似体の製造方法。

10

【請求項 5 5】

前記スターターユニットが、3,5-ジアミノ安息香酸、3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸又は3-アミノ-4-クロロ安息香酸ではない、請求項54記載の製造方法。

【請求項 5 6】

前記スターターユニットが、3-アミノ安息香酸ではない、請求項54又は請求項55記載の製造方法。

20

【請求項 5 7】

前記供給されるスターターユニットが、スターター酸である、請求項38～56のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項 5 8】

請求項38～57のいずれか1項記載の方法によって得ることのできるアンサマイシン類似体。

【請求項 5 9】

請求項1～37及び58のいずれか1項記載のアンサマイシン類似体又はそれらの医薬として許容し得る塩を、1種以上の医薬として許容し得る希釈剤又は担体と共に含有する、医薬組成物。

30

【請求項 6 0】

医薬品として使用するための、請求項1～37及び58のいずれか1項記載のアンサマイシン類似体又はそれらの医薬として許容し得る塩。

【請求項 6 1】

癌、B-細胞性悪性疾患、マラリア、真菌感染症、中枢神経系疾患及び神経変性疾患、血管新生依存性疾患、自己免疫疾患の治療、並びに/又は癌の予防的前処置のための医薬品の製造における、請求項1～37及び58のいずれか1項記載のアンサマイシン類似体又はそれらの医薬として許容し得る塩の使用。

【請求項 6 2】

癌、B-細胞性悪性疾患、マラリア、真菌感染症、中枢神経系疾患及び神経変性疾患、血管新生依存性疾患、自己免疫疾患の治療、並びに/又は癌の予防的前処置のための医薬品として使用するための、請求項1～37及び58のいずれか1項記載のアンサマイシン類似体又はそれらの医薬として許容し得る塩。

40

【請求項 6 3】

請求項1～37及び58のいずれか1項記載のアンサマイシン類似体又はそれらの医薬として許容し得る塩の有効量を、それを必要とする患者へ投与することを含む、癌、B-細胞性悪性疾患、マラリア、真菌感染症、中枢神経系疾患及び神経変性疾患、血管新生依存性疾患、自己免疫疾患の治療、又は癌の予防的前処置の方法。

【請求項 6 4】

アンサマイシン類似体又はそれらの医薬として許容し得る塩が、他の治療と組合せて投

50

与される、請求項1～63のいずれか1項記載のアンサマイシン類似体又はそれらの医薬として許容し得る塩、組成物、使用又は方法。

【請求項65】

前述の他の治療が、ブレオマイシン、カペシタビン、シスプラチン、シタラビン、シクロホスファミド、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、ロイコボリン、メトトレキサート、ミトキサントン、パクリタキセル及びドセタキセルを含むタキサン類、ビンクリスチン、ビンブラスチン及びビンORELビン；ホルモン療法、アナストロゾール、ゴセレリン、酢酸メゲストロール、プレニゾン、タモキシフェン及びトレミフェン；モノクローナル抗体療法、例えばトラスツズマブ(抗-Her2)、セツキシマブ(抗-EGFR)及びペバシズマブ(抗-VEGF)など；並びに、プロテインキナーゼ阻害剤、例えばイマチニブ、ダサチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ラパチニブ、テムシロリムスなど；プロテアソーム阻害剤、例えばボルテゾミブなど；ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤、例えばボリノスタットなど；血管新生阻害剤、例えばスニチニブ、ソラフェニブ、レナリドマイドなど、放射線治療及び手術からなる群から選択される、請求項64記載のアンサマイシン類似体又はそれらの医薬として許容し得る塩、組成物、使用又は方法。

10

【請求項66】

a) 好適な条件下で培養した場合に、アンサマイシン又はそれらの類似体を生成する第一の宿主菌株を提供する工程；
b) 前記菌株へ非天然のスターターユニットを供給する工程；
c) 前記宿主菌株を、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体の生成に適した条件下で培養する工程；及び
d) 任意に、生成された化合物を単離する工程：を含む、請求項1～37及び58のいずれか1項記載の18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体又はそれらの医薬として許容し得る塩の製造方法。

20

【請求項67】

a) 適切な条件下で培養した場合に、ゲルダナマイシン又はその類似体を生成する第一の宿主菌株を提供する工程；
b) 前記菌株に非天然のスターターユニットを供給する工程；
c) 前記宿主菌株を、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体を生成するのに適した条件下で培養する工程；及び
d) 任意に、生成された化合物を単離する工程：を含む、請求項66記載の18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体又はその医薬として許容し得る塩の製造方法。

30

【請求項68】

更に、e) 1種以上のスターターユニット生合成遺伝子、又はそれらの相同体を欠失又は不活化する工程を含み、前記工程が通常、工程c)の前に行われる、請求項66又は67記載の製造方法。

【請求項69】

更に、f) 1種以上のポスト-PKS遺伝子を欠失又は不活化する工程を含み、前記工程が通常、工程c)の前に行われる、請求項66～68のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項70】

前記工程b)の非天然のスターターユニットが、3-アミノ-安息香酸である、請求項66～69のいずれか1項記載の製造方法。

40

【請求項71】

前記工程b)の非天然のスターターユニットが、5-アミノ-2-フルオロ安息香酸である、請求項66～69のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項72】

前記工程b)の非天然のスターターユニットが、5-アミノ-3-フルオロ安息香酸である、請求項66～69のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項73】

前記工程b)の非天然のスターターユニットが、5-アミノ-2,3-ジ-フルオロ安息香酸であ

50

る、請求項66～69のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項74】

前記工程b)の非天然のスターターユニットが、5-アミノ-2,3,6-トリ-フルオロ安息香酸である、請求項66～69のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項75】

工程(a)において、前記菌株が、アンサマイシン産生株である、請求項66～74のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項76】

工程(a)において、前記菌株が、ゲルダナマイシン産生株である、請求項75記載の製造方法。

【請求項77】

工程(a)において、前記菌株が、ハービマイシン産生株である、請求項75記載の製造方法。

【請求項78】

工程(a)において、前記菌株が、1種以上のスターターユニット生合成遺伝子が欠失又は不活化されているアンサマイシン産生株を基にした操作された菌株である、請求項66～77のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項79】

工程(a)において、前記菌株が、1種以上のスターターユニット生合成遺伝子が欠失又は不活化されているゲルダナマイシン産生株を基にした操作された菌株である、請求項78記載の製造方法。

【請求項80】

工程(a)において、前記菌株が、1種以上のポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているアンサマイシン産生株を基にした操作された菌株である、請求項66～79のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項81】

工程(a)において、前記菌株が、1種以上のポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているゲルダナマイシン産生株を基にした操作された菌株である、請求項80記載の製造方法。

【請求項82】

工程(a)において、前記菌株が、1種以上のポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているハービマイシン産生株を基にした操作された菌株である、請求項80記載の製造方法。

【請求項83】

工程(a)において、前記菌株が、gdmM相同体及び任意に更にポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているアンサマイシン産生株を基にした操作された菌株である、請求項66～82のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項84】

工程(a)において、前記菌株が、前記gdmM及び任意に更にポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているゲルダナマイシン産生株を基にした操作された菌株である、請求項83記載の製造方法。

【請求項85】

工程(a)において、前記菌株が、前記gdmM相同体及び任意に更にポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているハービマイシン産生株を基にした操作された菌株である、請求項83記載の製造方法。

【請求項86】

工程(a)において、前記菌株が、前記gdmM相同体が欠失又は不活化されているアンサマイシン産生株を基にした操作された菌株である、請求項83記載の製造方法。

【請求項87】

工程(a)において、前記菌株が、前記gdmMが欠失又は不活化されているゲルダナマイシン産生株を基にした操作された菌株である、請求項86記載の製造方法。

【請求項88】

10

20

30

40

50

工程(a)において、前記菌株が、前記gdmM相同体が欠失又は不活化されているハービマイシン産生株を基にした操作された菌株である、請求項86記載の製造方法。

【請求項 89】

gdmM又はその相同体及び1種以上のスターターユニット生合成遺伝子、並びに任意に更にポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているアンサマイシン産生株を基にした操作された菌株。

【請求項 90】

S. ハイグロスコピカスAM3602のahba-Bクラスターの全遺伝子、又は他の菌株中の相同体が欠失又は不活化されている、請求項89記載の菌株。

【請求項 91】

ゲルダナマイシン産生株である、請求項89又は請求項90記載の菌株。

【請求項 92】

ハービマイシン産生株である、請求項89又は請求項90記載の菌株。

【請求項 93】

gdmOが欠失又は不活化されている、請求項91記載の菌株。

【請求項 94】

hbmOが欠失又は不活化されている、請求項92記載の菌株。

【請求項 95】

前記アンサマイシン産生株が、ストレプトマイセス科放線菌である、請求項89～94のいずれか1項記載の操作された菌株。

【請求項 96】

ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌスNRRL3602又はストレプトマイセス種DSM4137又はストレプトマイセス・ピオラセウスニガーDSM40699であるゲルダナマイシン産生株である、請求項95記載の操作された菌株。

【請求項 97】

アンサマイシン類似体又はその医薬として許容し得る塩の製造における、請求項89～96のいずれか1項記載の操作された菌株の使用。

【請求項 98】

前記アンサマイシン類似体が、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体である、請求項97記載の操作された菌株の使用。

【請求項 99】

18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体が、請求項1～37のいずれか1項により規定される、請求項98記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば、癌、B-細胞性悪性疾患、マラリア、真菌感染症、中枢神経系疾患及び神経変性疾患、血管新生依存性疾患、自己免疫疾患の治療において、又は癌の予防的前処置として有用であるアンサマイシン類似体に関する。本発明は、また、これらの化合物の製造方法、及び医薬品におけるそれらの使用を提供する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

毒性が低く、かつ好ましい薬物動態特性を有する高度に特異的な抗癌薬の開発は、抗癌療法における大きな課題を含む。

【0003】

90kDa熱ショックタンパク質(Hsp90)は、タンパク質の折り畳み及び集合に関連した豊富な分子シャペロンであり、その多くはシグナル伝達経路に参与している(総説については、Neckersの論文、2002;Sreedharらの論文、2004a;Wegeleらの論文、2004、及びそれらの中の参考文献を参照されたい)。これまでに、これらのいわゆるクライアントタンパク質

10

20

30

40

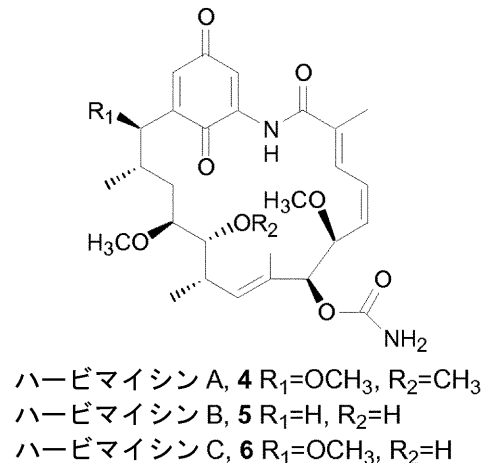
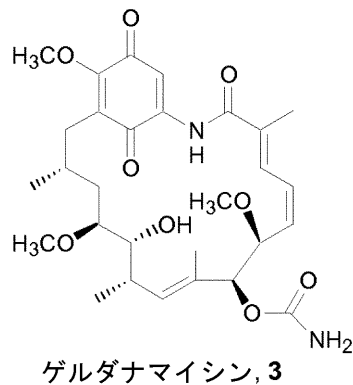
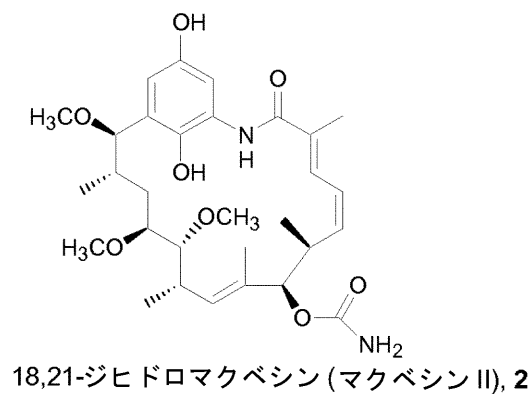
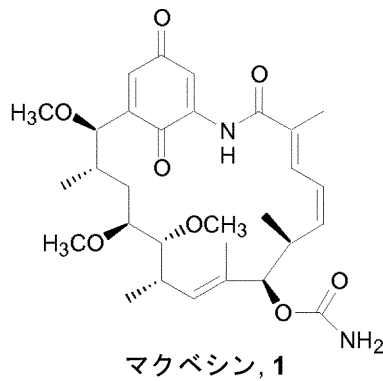
50

のほぼ50種が同定されており、かつこれらは、ステロイド受容体、例えばsrcファミリーのような非受容体型チロシンキナーゼ、例えばcdk4及びcdk6のようなサイクリン依存性キナーゼ、腫瘍性膜貫通型制御因子、一酸化窒素合成酵素などを含む(Donze及びPicardの論文、1999;McLaughlinらの論文、2002;Chiosisらの論文、2004;Wegeleらの論文、2004;http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf)。更にHsp90は、ストレス反応及び変異の影響に対する細胞の保護において重要な役割を果たす(Bagatell及びWhitesellの論文、2004;Chiosisらの論文、2004)。Hsp90の機能は複雑であり、かつこれは動的酵素複合体(dynamic multi-enzyme complex)の形成に関与している(Bohenの論文、1998;Liuらの論文、1999;Youngらの論文、2001;Takahashiらの論文、2003;Sreedharらの論文、2004;Wegeleらの論文、2004)。Hsp90は、阻害剤の標的であり(Fangらの論文、1998;Liuらの論文、1999;Blagosklonnyの論文、2002;Neckersの論文、2003;Takahashiらの論文、2003;Belia
10
akoff及びWhitesellの論文、2004;Wegeleらの論文、2004)、結果クライアントタンパク質の分解、細胞周期の異常調節/又は正常化及びアポトーシスを生じる。より最近になって、Hsp90は、腫瘍浸潤の重要な細胞外メディエーターとして同定された(Eustaceらの論文、2004)。Hsp90は癌療法の新たな主要な治療標的として同定され、このことは、Hsp90機能に関する活発で詳細な研究(Blagosklonnyらの論文、1996;Neckersの論文、2002;Workman
20
及びKayeの論文、2002;Beliaakoff及びWhitesellの論文、2004;Harrisらの論文、2004;Jezらの論文、2003;Leeらの論文、2004)、及びハイスループットスクリーニングアッセイの開発(Carrerasらの論文、2003;Rowlandsらの論文、2004)において反映されている。Hsp90阻害剤は、アンサマイシン、マクロライド、プリン、ピラゾール、クマリン抗生物質などの化合物クラスを含む(総説については、Bagatell及びWhitesellの論文、2004;Chiosisらの論文、2004、及びそれらの中の参考文献を参照されたい)。

【0004】

ベンゼノイドアンサマイシンは、芳香族環構造のいずれかの側に連結された長さが変動する脂肪族環を特徴とする化学構造の広範なクラスである。天然のアンサマイシンは、マクベシン及び18,21-ジヒドロマクベシン(各々、マクベシンI及びマクベシンIIとしても公知)(1及び2;Tanidaらの論文、1980)、ゲルダナマイシン(3;DeBoerらの論文、1970;DeBoer
30
及びDietzの論文、1976;WO 03/106653及びそれらの中の参考文献)、並びにハービマイシンファミリー(4;5、6、Omuraらの論文、1979;Iwaiらの論文、1980;及び、Shibataらの論文、1986a、WO 03/106653、及びそれらの中の参考文献)を含む。

【化 1】



【 0 0 0 5 】

アンサマイシンは、当初それらの抗菌活性及び抗ウイルス活性について同定されたが、最近抗癌剤としてのこれらの利用の可能性に関心が高まってきている (Beliakoff 及び Whitesell の論文、2004)。現在多くの Hsp90 阻害剤が、臨床試験において評価中である (Csermely 及び Soti の論文、2003; Workman の論文、2003)。特にゲルダナマイシンは、ナノモルの効能及び異常なプロテインキナーゼ依存型腫瘍細胞に対する明白な特異性を有する (Chiosis らの論文、2003; Workman の論文、2003)。

【 0 0 0 6 】

Hsp90 阻害剤による治療は、放射線による腫瘍細胞死滅の誘導を増強することが示されており、並びに Hsp90 阻害剤の細胞傷害性薬物との組合せによる増大した細胞殺傷能 (例えば、乳癌、慢性骨髄性白血病及び非-小細胞肺癌) も明らかにされている (Neckers の論文、2002; Beliakoff 及び Whitesell の論文、2004)。抗-血管新生活性の可能性も、関心があり：Hsp90 クライアントタンパク質 HIF-1 は、固形腫瘍の進行において重要な役割を果たす (Hur らの論文、2002; Workman 及び Kaye の論文、2002; Kaur らの論文、2004)。

【 0 0 0 7 】

Hsp90 阻害剤は、免疫抑制薬としても機能し、かつ Hsp90 阻害後のいくつかの腫瘍細胞型の補体が誘導した溶解に関与している (Sreedhar らの論文、2004)。Hsp90 阻害剤による治療は、免疫細胞が媒介した溶解 (Sreedhar らの論文、2004) に関連したスーパーオキシド生成の誘導も生じることができる (Sreedhar らの論文、2004a)。Hsp90 阻害剤の抗-マラリア薬としての使用の可能性が議論されている (Kumar らの論文、2003)。更にゲルダナマイシンは、複合糖鎖形成された哺乳類のプリオンタンパク質 PrP^C の形成を妨げることが示されている (Winkelhofer らの論文、2003)。

【 0 0 0 8 】

前述のように、アンサマイシンは、潜在的抗癌剤及び抗-B-細胞性悪性疾患化合物とし

て関心があるが、しかし現在入手可能なアンサマイシンの薬理学的特性又は医薬特性は不良であり、例えばこれらは、水溶解度が低く、代謝安定性が不良であり、生物学的利用能が悪く、又は製剤能が不良である (Goetzらの論文、2003; Workmanの論文、2003; Chiosisの論文、2004)。ハービマイシンA及びゲルダナマイシンは両方共、それらの強力な肝毒性のために、臨床試験の候補として不良であることが確定され (総説Workmanの論文、2003)、並びにゲルダナマイシンは、肝毒性のために臨床試験第I相から取り下げられた (Supkoらの論文、1995; WO 03/106653)。

【 0 0 0 9 】

ゲルダナマイシンは、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス (*Streptomyces hygroscopicus*) の培養濾液から単離され、インビトロにおいて原虫に対し強力な活性を示し、並びに細菌及び真菌に対し弱い活性を示す。1994年に、ゲルダナマイシンのHsp90との関連が示された (Whitesellらの論文、1994)。ゲルダナマイシン生合成遺伝子クラスターが、クローン化され、かつ配列決定された (Allen及びRitchieの論文、1994; Rascherらの論文、2003; WO 03/106653)。そのDNA配列は、NCBIアクセッション番号AY179507で入手可能である。遺伝子操作されたゲルダナマイシン産生株の単離は、*S. ハイグロスコピカス* 亜種デュマイセチカスJCM4427に由来し、並びに4,5-ジヒドロ-7-0-デスカルバモイル-7-ヒドロキシゲルダナマイシン及び4,5-ジヒドロ-7-0-デスカルバモイル-7-ヒドロキシ-17-0-デメチルゲルダナマイシンの単離は、最近説明された (Hongらの論文、2004)。ゲルダナマイシンを、ハービマイシン産生株ストレプトマイセス・ハイグロスコピカスAM-3672へ供給することにより、化合物15-ヒドロキシゲルダナマイシン、三環系ゲルダナマイシン類似体KOSN-1633及びメチル-ゲルダナマイシネートが単離された (Huらの論文、2004)。2種の化合物17-ホルミル-17-デメトキシ-18-0-21-0-ジヒドロゲルダナマイシン及び17-ヒドロキシメチル-17-デメトキシゲルダナマイシンは、*S. ハイグロスコピカス* K279-78から単離された。*S. ハイグロスコピカス* K279-78は、ハービマイシン産生株ストレプトマイセス・ハイグロスコピカスAM-3672由来の様々な遺伝子を含む44kbp挿入断片を有する、コスミドpKOS279-78を含む、*S. ハイグロスコピカス* NRRL 3602である (Huらの論文、2004)。アシル基転移酵素ドメインの置換が、ゲルダナマイシン生合成クラスターのポリケチド合成酵素の4種のモジュールにおいて作出されている (Patelらの論文、2004)。AT置換は、モジュール1、4及び5において実行され、完全にプロセシングされた類似体14-デスメチル-ゲルダナマイシン、8-デスメチル-ゲルダナマイシン及び6-デスメトキシ-ゲルダナマイシン並びに完全にプロセシングされない4,5-ジヒドロ-6-デスメトキシ-ゲルダナマイシンを導いている。モジュール7のATの置換は、3種の2-デスメチル化合物KOSN1619、KOSN1558及びKOSN1559の生成につながり、そのひとつ (KOSN1559) であるゲルダナマイシンの2-デメチル-4,5-ジヒドロ-17-デメトキシ-21-デオキシ誘導体は、ゲルダナマイシンよりも4-倍大きい結合親和性で、及び17-AAGよりも8-倍大きい結合親和性で、Hsp90へ結合する。しかしこのことは、SKBr3を用いる IC_{50} 測定値の改善には反映されない。別の類似体である新規非ベンゾキノイドゲルダナマイシンは、KOS-1806と称され、これはモノフェノール構造を有する (Rascherらの論文、2005)。KOS-1806に関する活性データは、示されていない。

【 0 0 1 0 】

1979年に、アンサマイシン抗生物質ハービマイシンAが、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス株AM-3672の発酵ブロスから単離され、その強力な除草活性に従い命名された。その抗腫瘍活性は、細胞の形質転換された形態に復帰する薬物のスクリーニングのためにラウス肉腫ウイルス (RSV) の温感性変異体に感染されたラット腎臓系細胞を使用することにより確立された (総説はUeharaの論文、2003を参照されたい)。ハービマイシンAは、保存されたシステイン残基への直接結合ではなく、Hsp90シャペロンタンパク質への結合を介して主に作用するとして仮定され、及び後続のキナーゼ不活化も考察された (Ueharaの論文、2003)。

【 0 0 1 1 】

化学誘導体が単離され、並びにベンゾキノ核のC19に変更された置換基を持つ化合物及びアンサ鎖がハロゲン化された化合物は、ハービマイシンAよりもより低い毒性及びよ

り高い抗腫瘍活性を示した(Omuraらの論文、1984;Shibataらの論文、1986b)。ハービマイシン合成遺伝子クラスターの配列は、WO 03/106653及び最新の論文(Rascherらの論文、2005)において確定された。

【 0 0 1 2 】

アンサマイシン化合物マクベシン(1)及び18,21-ジヒドロマクベシン(2)(C-14919E-1及びC-14919E-1)は、それらの抗真菌活性及び抗原虫活性について同定されたが、これらは、ノカルジア種C-14919(アクチノシンネマ・プレチオスム(*Actinosynnema pretiosum*)亜種プレチオスムATCC 31280)の培養物上清から単離された(Tanidaらの論文、1980;Muroiらの論文、1980;Muroiらの論文、1981;US 4,315,989及びUS 4,187,292)。18,21-ジヒドロマクベシンは、ジヒドロキノンの核を含むことを特徴としている。マクベシン及び18,21-ジヒドロマクベシンの両方とも、同様の抗菌活性、及びマウス白血病P388細胞株のような癌細胞株に対する抗腫瘍活性を有することが示された(Onoらの論文、1982)。逆転写酵素及びターミナルデオキシヌクレオチジル転移酵素の活性は、マクベシンにより阻害されなかった(Onoらの論文、1982)。マクベシンのHsp90阻害機能が、文献において報告されている(Bohenの論文、1998;Liuらの論文、1999)。微生物培養ブロスへの添加後の、マクベシン及び18,21-ジヒドロマクベシンの、ある位置又は複数の位置でメトキシ基の代わりにヒドロキシ基を伴う化合物への変換は、特許US 4,421,687及びUS 4,512,975に開示されている。

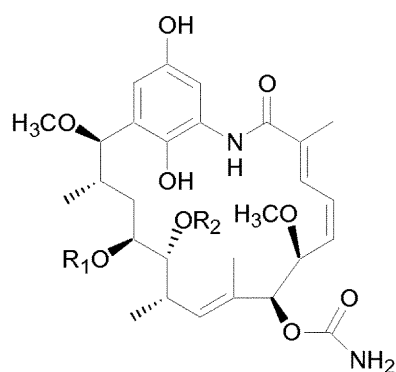
10

【 0 0 1 3 】

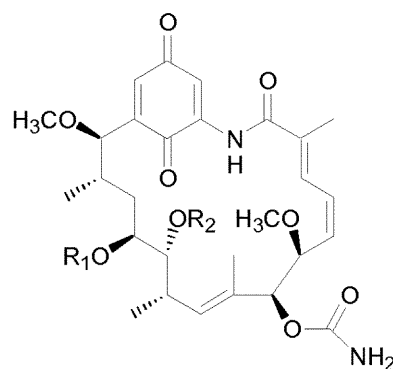
多種多様な土壌微生物のスクリーニング時に、化合物TAN-420A～Eが、ストレプトマイセス属に属する産生株から同定された(7-11, EP 0 110 710)。

20

【 化 2 】



TAN-420A, **7** R₁=H, R₂=H
 TAN-420C, **9** R₁=H, R₂=CH₃
 TAN-420E, **11** R₁=CH₃, R₂=CH₃



TAN-420B, **8** R₁=H, R₂=H
 TAN-420D, **10** R₁=H, R₂=CH₃

30

【 0 0 1 4 】

2000年に、ストレプトマイセス種S6699の細胞培養物からのゲルダナマイシンに関連した、非-ベンゾキノナンサマイシン代謝産物レブラスタチンの単離、及び関節リウマチの治療におけるその潜在的治療的価値が、説明された(Steadらの論文、2000)。

40

【 0 0 1 5 】

更に化学的に無関係のベンゾキノナンサマイシンとは異なるHsp90阻害剤は、ラディシコール(モノルデン)であり、これは真菌モノポリウム・ボノルデン(*Monosporium bonorden*)からその抗真菌活性について当初発見され(総説については、Ueharaの論文、2003を参照されたい)、並びにその構造は、ネクトリア・ラディシコール(*Nectria radiculicola*)から単離された14-員マクロライドと同じであることがわかった。これは、その抗真菌活性、抗菌活性、抗原虫活性及び細胞傷害活性に加え、Hsp90シャペロンタンパク質の阻害剤として後に同定された(総説については、Ueharaの論文、2003;Schulteらの論文、1999を参照されたい)。ラディシコールの抗-血管新生活性(Hurらの論文、2002)及びそれらの

50

半-合成誘導体(Kurebayashiらの論文、2001)も、説明されている。

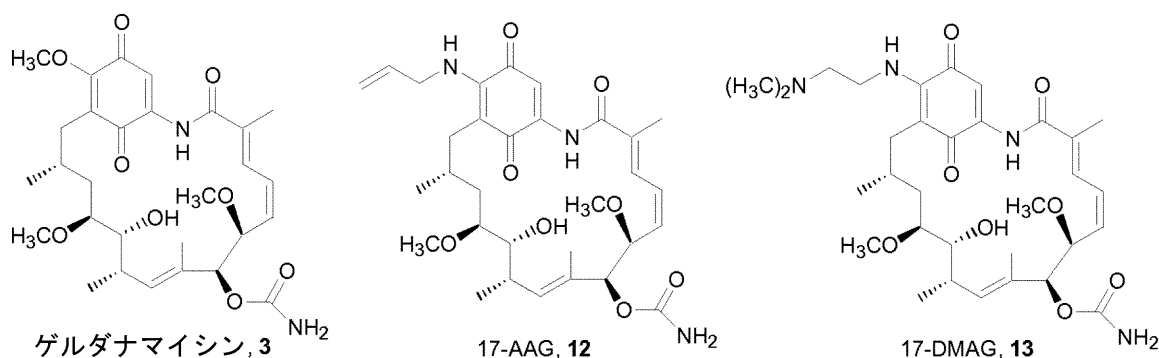
【0016】

最近の関心は、新規生成アンサマイシン抗癌化合物としてのゲルダナマイシンの17-アミノ誘導体(Bagatell及びWhitesellの論文、2004)、例えば、17-(アリルアミノ)-17-デスメトキシゲルダナマイシン(17-AAG, 12)(Hosteinらの論文、2001;Neckersの論文、2002;Nimmanapalliらの論文、2003;Vasilevskayaらの論文、2003;Smith-Jonesらの論文、2004)及び17-デスメトキシ-17-N,N-ジメチルアミノエチルアミノ-ゲルダナマイシン(17-DMAG, 13)(Egorinらの論文、2002;Jezらの論文、2003)に集まっている。より最近になってゲルダナマイシンは、17-位置で誘導体化され、17-ゲルダナマイシンのアミド、カルバメート、尿素及び17-アリールゲルダナマイシンを作出している(Le Brazidecらの論文、2003)。60種を超える17-アルキルアミノ-17-デスメトキシゲルダナマイシン類似体のライブラリーが報告されており、かつそれらのHsp90への親和性及び水溶解度について試験された(Tianらの論文、2004)。ゲルダナマイシンの毒性を低下する更なるアプローチは、腫瘍-標的化モノクローナル抗体との複合による、活性ゲルダナマイシン化合物の悪性細胞への選択的標的化及び送達である(Mandlerらの論文、2000)。

10

【0017】

【化3】



20

【0018】

これらの誘導体の多くは低下した肝毒性を示すが、これらは依然限定された水溶解度を有する。例えば17-AAGは、それら自身一部の患者において副作用を起こし得る可溶化担体(例えば、Cremophore(登録商標)、DMSO-卵レシチン)の使用を必要とする(Huらの論文、2004)。

30

【0019】

Hsp90阻害剤のアンサマイシンクラスのほとんどは、タンパク質、グルチチオンなどの求核物質と容易に共有結合を形成することができるマイケル受容体である、ベンゾキノンである、共通の構造部分を有する。ベンゾキノン部分は、酸素ラジカルが形成される間に、ジヒドロキノンとのレドックス平衡も受け、このことは更なる非特異的毒性を生じる(Dikalovらの論文、2002)。

【0020】

従って癌及び/又はB-細胞性悪性疾患の治療に利用性がある新規アンサマイシン誘導体を同定する必要性が依然存在しており、そのようなアンサマイシンは、改善された水溶解度、投与に関して改善された薬理学的プロファイル及び軽減された副作用プロファイルを有することが好ましい。本発明は、親産生株の生体内変換及び任意の遺伝子操作により作出される新規アンサマイシン類似体を開示している。特に本発明は、新規な18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体及びその他のアンサマイシン類似体を開示しており、これらは一般に、現在利用可能なアンサマイシンに比べ改善された医薬特性を有することができ;特にこれらは、下記の特性の1つ以上に関して改善を示すことが期待される:様々な癌亜型に対する活性、毒性、水溶解度、代謝安定性、生物学的利用能及び製剤能。アンサマイシン類似体(18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体など)は、改善された生物学的

40

50

利用能を示すことが好ましい。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0021】

(発明の要旨)

本発明において、非天然のスターターユニットの取り込みにより形成される新規アンサマイシン類似体を生成するために、ゲルダナマイシンのポスト-PKS修飾の原因である遺伝子の標的化された不活化又は欠失と任意に組合せて、及びポスト-PKS修飾をもたらすのに適切なポスト-PKS遺伝子の導入と任意に組合せて、例えば、フッ素又はその他の置換基で置換されていてもよい18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン化合物をもたらす非天然のスターターユニットが、ゲルダナマイシン産生株に供給される。任意に、スターターユニット(スターター酸)の生合成に寄与する遺伝子又は制御因子を、標的化された不活化もしくは欠失、又は細胞のUV照射への曝露のような他の手段による修飾、並びにスターターユニットの生合成が破壊されていることを示す表現型の選択により、操作することができる。該方法は、オートリチマイシン(autolytimycin)に加え、ハービマイシン及びレブラスタチン(reblastatin)などの他のアンサマイシン類に適用できる。ポスト-PKS遺伝子の任意の標的化は、例えば、ポスト-PKS遺伝子のすべて又は一部を含むゲルダナマイシンクラスター領域の組込み、標的化された欠失、任意にそれに続く遺伝子(類)の挿入、又はポスト-PKS遺伝子もしくはそれらのコードされた酵素を非-機能性とするその他の方法、例えば細胞の化学阻害、部位特異的変異誘発又はUV照射などの使用による変異誘発などの様々な機序により引き起こすことができる。更に、ゲルダナマイシンクラスター、あるいは限定はされないが、マクベシン、ハービマイシン、レブラスタチン又はTANクラスターなどの別のアンサマイシンクラスターに由来するポスト-PKS遺伝子を再導入して、特定のポスト-PKS修飾をもたらすことができる。結果的に、本発明は、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体などのアンサマイシン類似体、これらの化合物の製造方法、及び医薬品における、又は更なる化合物の生成における中間体としてのこれら化合物の使用方法を提供する。

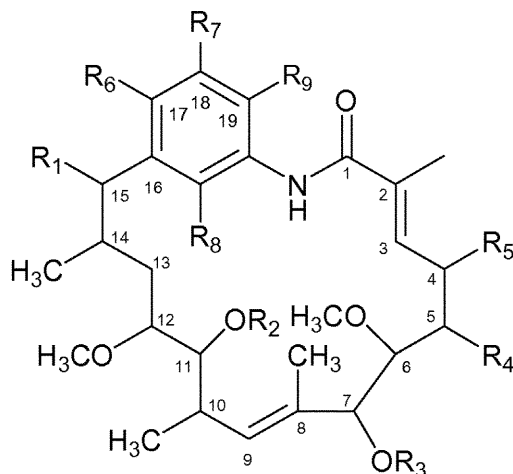
【0022】

従って、第一の態様において、本発明は、通常スターターユニットを欠き、代わりに、例えばフッ素又は他の置換基で置換されていてもよい18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン化合物を生じるスターターユニットが取り込まれている、ゲルダナマイシンの類似体又は他のアンサマイシン類を提供する。

【0023】

従って、本発明の一態様において、式(1)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩が提供される：

【化 4】



(I)

10

(式中、

 R_1 は、H、OH、OMeを表し； R_2 は、H又はMeを表し； R_3 は、H又はCONH₂を表し； R_4 及び R_5 は、両方ともHを表すか、又はこれらは一緒に結合を表す(すなわち、C4-C5は二重結合である)かのいずれかであり； R_6 は、H、F、OH、OMe、Br、Cl、CF₃、CH₃、SH、CH₂CH₃又はNR_{10a}R_{11a}を表し； R_7 は、H、F、OH、OMe、Br、Cl、CF₃、CH₃、SH、CH₂CH₃又はNR_{10b}R_{11b}を表し； R_8 は、H、F、OH、OMe、Br、Cl、CF₃、CH₃、SH、CH₂CH₃又はNR_{10c}R_{11c}を表し； R_9 は、H、F、OH、OMe、Br、Cl、CF₃、CH₃、SH、CH₂CH₃又はNR_{10d}R_{11d}を表し； R_{10a} 、 R_{11a} 、 R_{10b} 、 R_{11b} 、 R_{10c} 、 R_{11c} 、 R_{10d} 、 R_{11d} は、独立に、H、CH₃又はCH₂CH₃を表し；

但し：

(i) R_6 がHを表し、 R_7 がOHを表し、及び R_8 がOHを表す場合、 R_9 はHを表さず；(ii) R_7 がOHを表し、 R_8 がHを表し、及び R_9 がHを表す場合、 R_6 はH、OH又はOMeを表さず；及び(iii) R_7 がOMeを表し、 R_8 がHを表し、及び R_9 がHを表す場合、 R_6 はOMeを表さない)。

【0024】

条件(i)の化合物は、既知化合物である18,21-ジヒドロゲルダナマイシンである。

【0025】

条件(ii)及び(iii)の化合物は、国際公開第2005/061461号に開示されている。

【0026】

好適には：

(iv) R_6 がH、OH又はOMeを表し、 R_7 がHを表し、及び R_8 がHを表す場合、 R_9 はOH、Cl又はNH₂を表さず；及び(v) R_6 がH、OH又はOMeを表し、 R_8 がHを表し、及び R_9 がHを表す場合、 R_7 はNH₂を表さない。

【0027】

好適には

(vi) R_6 がH又はOHを表す場合、 R_7 、 R_8 及び R_9 はすべてがHを表すわけではない。条件(vi)の化合物は、Kimらの論文、ChemBioChem(2007)8、1491-1494中に開示されている。しかし、それらの化合物は、本発明者らが提出した以前の特許出願中にも開示されている。

【0028】

より特定の態様において、本発明は、下記式(IA)に記載の18,21-ジデスオキシ-アンサ

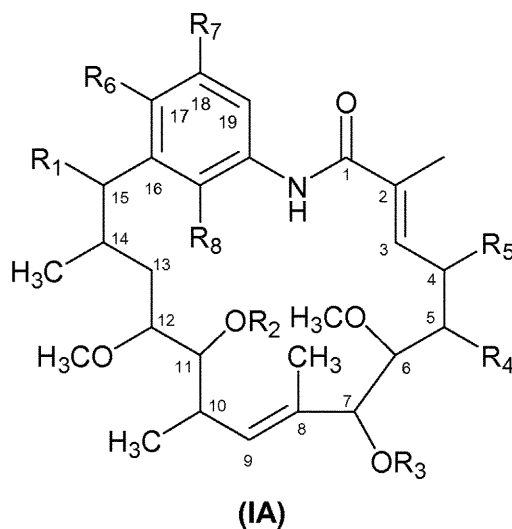
30

40

50

マイシン類似体、又はそれらの医薬として許容し得る塩を提供する：

【化 5】



10

(式中、

R_1 は、H、OH、OMeを表し；

R_2 は、H又はMeを表し；

R_3 は、H又はCONH₂を表し；

R_4 及び R_5 は、両方ともHを表すか、又はこれら是一緒に結合を表す(すなわち、C4-C5は二重結合である)かのいずれかであり；

R_6 は、H、OH、OMe又はFを表し；

R_7 は、H又はFを表し；

R_8 は、H又はFを表す)。

20

【0029】

18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体などのアンサマイシン類似体は、本明細書において「本発明の化合物」とも称され、これらの用語は本明細書において互換的に使用される。

30

【0030】

前記構造は、代表的互変異性体を示し、本発明は、例えばエノール化合物が図示された場合のケト化合物、又はその逆のような、式(1)の化合物の互変異性体のすべてを包含している。

【0031】

本発明は、先に示された構造(1)により定義された化合物の立体異性体のすべてを包含している。

【0032】

更なる態様において、本発明は、医薬として使用するために、式(1)の化合物のようなアンサマイシン類似体又はそれらの医薬として許容し得る塩を提供する。

40

【0033】

(定義)

冠詞「ある(a, an)」とは、冠詞の文法上の対象の1つ又は2つ以上(すなわち少なくとも1つ)を意味するように、本明細書において使用される。例として、「ある類似体」は、1つの類似体又は2つ以上類似体をいう。

【0034】

本明細書において使用される用語「類似体(類)」とは、別のものに構造的に類似しているが、組成がわずかに異なる(1個の原子の別の原子との交換又は特定の官能基の存在もしくは非存在として)化合物をいう。

【0035】

50

本出願において使用される用語「18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体」とは、式(IA)に記載の化合物をいう。

【0036】

本明細書において使用される用語「相同体(類)」とは、異なるマクベシン産生株由来の代替のマクベシン生合成クラスターのいずれか由来の本明細書に開示された遺伝子もしくは遺伝子によりコードされたタンパク質の相同体、又は代替のアンサマイシン生合成遺伝子クラスター由来の、例えばゲルダナマイシン、ハービマイシン、オートリチマイシンもしくはレブラスタチン由来の相同体をいう。同じ機能を発揮するタンパク質をコードしているこのような相同体(類)はそれ自身、マクベシン又は関連したアンサマイシンポリケチドの合成において該遺伝子又はタンパク質と同じ機能を発揮する。好ましくはそのような相同体(類)は、本明細書に開示された特定の遺伝子の配列と、少なくとも40%の配列同一性、好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%又は少なくとも95%の配列同一性を有する(表3、配列番号:11、これはクラスターの遺伝子のすべての配列であり、これから特定の遺伝子の配列を推定することができる)。%同一性は、NCBIウェブサイトから入手可能なBLASTn又はBLASTpなどの、当業者に公知の任意のプログラムを使用し計算することができる。

10

【0037】

本明細書において使用される用語「癌」とは、皮膚内の細胞、又は例えば非限定的に乳房、前立腺、肺、腎臓、脾臓、脳、胃もしくは腸などの体内臓器内の細胞の良性又は悪性の新たな増殖をいう。癌は、隣接組織へ浸潤し、かつ例えば骨、肝臓、肺又は脳などの遠位臓器に広がる(転移する)傾向がある。本明細書において使用される用語癌は、非限定的にメラノーマ、リンパ腫、白血病、線維肉腫、横紋筋肉腫及び肥満細胞腫などの転移性腫瘍細胞型、並びに非限定的に結腸直腸癌、前立腺癌、小細胞肺癌及び非-小細胞肺癌、乳癌、脾臓癌、膀胱癌、腎臓癌、胃癌、グリア芽細胞腫、原発性肝癌及び卵巣癌などの組織癌型の両方を含む。

20

【0038】

本明細書において使用される用語「B-細胞性悪性疾患」は、慢性リンパ性白血病(CLL)、多発性骨髄腫、及び非ホジキンリンパ腫(NHL)を含む障害群を含む。これらは、血液及び造血臓器の新生物疾患である。これらは、骨髄及び免疫系の機能障害を引き起こし、このことは宿主を感染症に罹り易く、出血し易くする。

30

【0039】

本明細書において使用される用語「生物学的利用能」とは、薬物又は他の物質が、投与後生物学的に活性のある部位で、吸収されるか、又は利用可能となり始める程度又は割合をいう。この特性は、化合物の溶解度、消化管の吸収速度、タンパク質結合の程度及び代謝など多くの要因により左右される。当業者にはよく知られている生物学的利用能に関する様々な試験は、Egorinらの論文(2002)に説明されている。

【0040】

本出願において使用される用語「水溶解度」は、例えばpH7.3のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)のような、水性媒体への溶解度を意味する。

40

【0041】

本出願において使用される用語「アンサマイシン産生株」とは、菌株、例えば、ゲルダナマイシン産生株、ハービマイシン産生株、レブラスタチン産生株及びオートリチマイシン産生株などのストレプトマイセス科放線菌により例示されるような野生型菌株をいう。従って、例としては、例えば天然のスターター供給材料3-アミノ-5-ヒドロキシ安息香酸を供給した場合など、好適な条件下で培養した場合に、ゲルダナマイシン又はハービマイシン類(例えば、ハービマイシンA、B又はC)などのアンサマイシン類を産生するストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダナスNRRL3602又はストレプトマイセス種DSM4137又はストレプトマイセス・ピオラセウスニガーDSM40699、及びレブラスタチン又はオートリチマイシンなどのアンサマイシン類を産生するストレプトマイセス種S6699又はストレプトマイセス・オートリチカスJX-47が挙げられる。

50

【 0 0 4 2 】

従って、本出願において使用される用語「ゲルダナマイシン産生株」とは、菌株、例えば天然のスターター供給材料3-アミノ-5-ヒドロキシ安息香酸を供給した場合など、好適な条件下で培養した場合に、ゲルダナマイシンを産生する、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス垂種ゲルダナスNRRL3602又はストレプトマイセス種DSM4137又はストレプトマイセス・ピオラセウスニガーDSM40699などのストレプトマイセス科放線菌により例示されるような野生型菌株をいう。

【 0 0 4 3 】

本出願において使用される用語「ハービマイシン産生株」とは、菌株、例えば天然のスターター供給材料3-アミノ-5-ヒドロキシ安息香酸を供給した場合など、好適な条件下で培養した場合に、ハービマイシン類、例えばハービマイシンA、B又はCを産生するストレプトマイセス・ハイグロスコピカスAM-3672により例示されるような野生型菌株をいう。

【 0 0 4 4 】

本明細書において使用される用語「ポスト-PKS遺伝子(類)」とは、例えば非限定的にモノオキシゲナーゼ、O-メチル基転移酵素及びカルバモイル基転移酵素などの、ポリケチドのポスト-ポリケチド合成酵素修飾に必要とされる遺伝子をいう。具体的には、マクベシンシステムにおいて、これらの修飾遺伝子は、mbcM、mbcN、mbcP、mbcMT1、mbcMT2及びmbcP450を含む。

【 0 0 4 5 】

本明細書において使用される用語「スターターユニット生合成遺伝子(類)」とは、天然に取り込まれるスターターユニットである3-アミノ-5-ヒドロキシ安息香酸(AHBA)の産生に必要とされる遺伝子をいう。具体的には、マクベシンシステムにおいてこれらのスターターユニット生合成遺伝子は、AHk(AHBAキナーゼ)、Adh(aDHQデヒドロゲナーゼ)、AHs(AHBA合成酵素)、OX(酸化還元酵素)、PH(ホスファターゼ)を含む。具体的には、ゲルダナマイシンシステムでは、遺伝子gdmOが、AHBA合成に必要とされるアミノデヒドロキナ酸合成酵素をコードするように企画され(Rascherらの論文、2003)、ハービマイシンシステムでは、hbmOが同定されている(Rascherらの論文、2005)。AHBAを産生する他の菌株も、AHBA生合成遺伝子を含む。

【 0 0 4 6 】

式(1)の化合物などの、本発明の化合物の医薬として許容し得る塩は、医薬として許容し得る無機又は有機の酸又は塩基から形成される通常の塩、更には第4級アンモニウム塩、酸付加塩を含む。好適な酸性塩のより詳細な例は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ギ酸、乳酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、パルモン酸(palmoic)、マロン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ヒドロキシナフトエ酸、ヨウ化水素酸、リンゴ酸、ステロイド酸(steroidic)、タンニン酸などの塩を含む。シュウ酸などの他の酸は、それら自身医薬として許容し得るものではないが、本発明の化合物及びそれらの医薬として許容し得る塩を得るための中間体として有用な塩の調製において有用なことがある。好適な塩基性塩のより詳細な例は、ナトリウム、リチウム、カリウム、マグネシウム、アルミニウム、カルシウム、亜鉛、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、N-メチルグルカミン及びプロカインの塩を含む。以後本発明の化合物の言及は、式(1)の化合物及びそれらの医薬として許容し得る塩の両方を含む。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 7 】

【 図 1 】ゲルダナマイシンの代表的生合成であり、ゲルダナマイシンへの最初の推定酵素フリー中間体プロゲルダナマイシン、及びポスト-PKSのプロセッシングを示す。図中のPKSプロセッシング工程のリストは、事象の順番を表すことは意図されていない。クラスター内の特定の遺伝子について、下記略号を使用する:ALO - AHBA負荷ドメイン;ACP - アシルキヤ

リヤタンパク質;KS - -ケト合成酵素;AT - アシル基転移酵素;DH - 脱水酵素;ER - エノイルレダクターゼ;KR - -ケトレダクターゼ。

【図2】ゲルダナマイシンを生成するための、プロ-ゲルダナマイシンのポスト-PKSプロセッシング部位の説明。

【図3】実施例中で説明される化合物(14~25)の構造。

【図4】実施例中で説明される化合物(26~37)の構造。

【発明を実施するための形態】

【0048】

(発明の説明)

本発明は、前述のようなアンサマイシン類似体、これらの化合物の製造方法、医薬品中のこれらの化合物の使用法、更なる半-合成誘導体化のための中間体又は鑄型としてのこれらの化合物の使用を提供する。

【0049】

好適には R_1 は、H又はOHを表す。ひとつの実施態様において、 R_1 は、Hを表す。別の実施態様において、 R_1 は、OHを表す。

【0050】

好適には R_2 は、Hを表す。

【0051】

好適には R_3 は、 CONH_2 を表す。

【0052】

ひとつの実施態様において、好適には、 R_4 及び R_5 は、一緒に結合を表す。

【0053】

別の実施態様において、好適には、 R_4 及び R_5 は、各々Hを表す。

【0054】

ひとつの実施態様において、好適には、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、並びに R_4 及び R_5 は各々Hを表す。

【0055】

ひとつの実施態様において、好適には、 R_1 はOHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、並びに R_4 及び R_5 は各々Hを表す。

【0056】

ひとつの実施態様において、好適には、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、並びに R_6 はOHを表す。

【0057】

好適には R_6 は、H、F、Me、Br、Cl、OH、OMe、 NH_2 を、より好適にはH、F、Me、Br、Cl、OH又はOMeを、更により好適にはH又はFを表す。

【0058】

あるいは好適には R_6 は、 CF_3 又は CH_2CH_3 を表す。

【0059】

好適には R_7 は、H、F、OH、OMe、Br、Cl又は NH_2 を、より好適にはH、F、OH、OMe、Br又はClを、より更に好適にはH、F、OH又はOMeを、特にOH(又は代わりにH又はF)を表す。

【0060】

好適には R_8 は、H、F、Me、Cl、Br、OH又は NH_2 を、より好適にはH、F、Me、Cl、Br又はOHを、更により好適にはH又はFを表す。

【0061】

好適には R_9 は、H、F、Me、Cl、Br、OH又は NH_2 を、より好適にはH、F、Me、Cl、Br又はOHを、更により好適にはH又はFを、特にHを表す。

【0062】

好適には R_{10a} 、 R_{11a} 、 R_{10b} 、 R_{11b} 、 R_{10c} 、 R_{11c} 、 R_{10d} 、 R_{11d} は、Hを表す。

【0063】

好適には、 R_7 がOHを表す場合、 R_6 、 R_8 又は R_9 の1つ以上は、F、Br、Me又は NH_2 を表し、

10

20

30

40

50

及び残りはHを表す。

【 0 0 6 4 】

好適には、 R_6 がMeを表すなら、 R_7 は、OH、H、又はFを表し、並びに R_8 及び R_9 はHを表す。

【 0 0 6 5 】

好適には、 R_6 が CF_3 を表すなら、 R_7 は、OH、H、又はFを表し、並びに R_8 及び R_9 はHを表す。

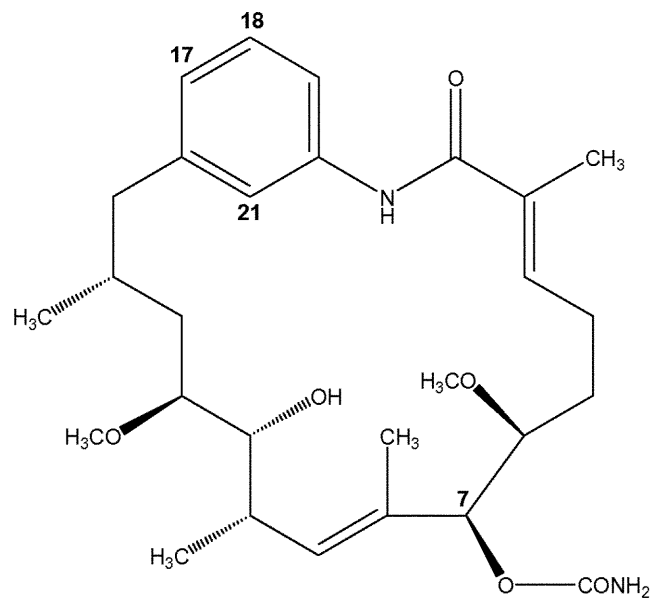
【 0 0 6 6 】

好適には、 R_6 が CH_2CH_3 を表すなら、 R_7 は、OH、H又はFを表し、並びに R_8 及び R_9 はHを表す。

【 0 0 6 7 】

本発明のひとつの好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は $CONH_2$ を表し、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 及び R_8 は各々Hを表す：

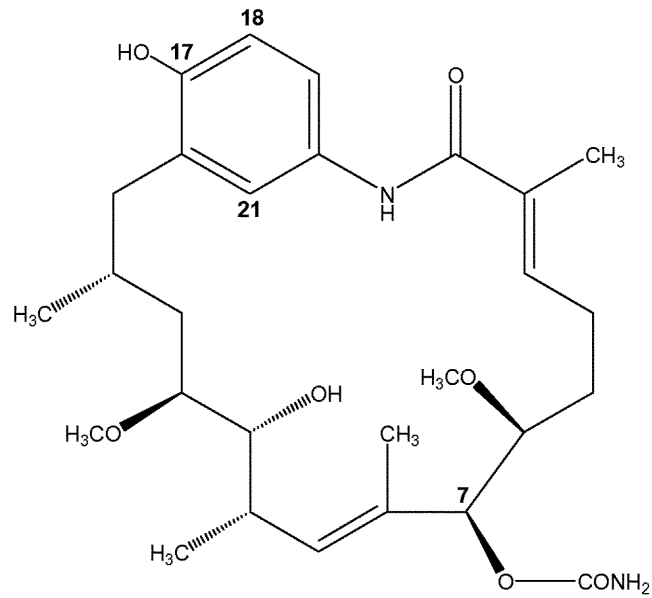
【 化 6 】



【 0 0 6 8 】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は $CONH_2$ を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はOHを表し、並びに R_7 及び R_8 は各々Hを表す：

【化 7】



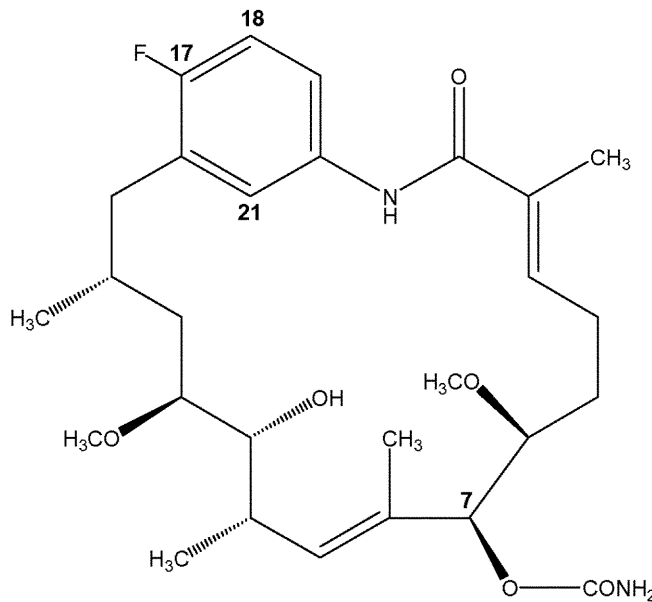
10

【 0 0 6 9 】

20

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はFを表し、並びに R_7 及び R_8 は各々Hを表す：

【化 8】



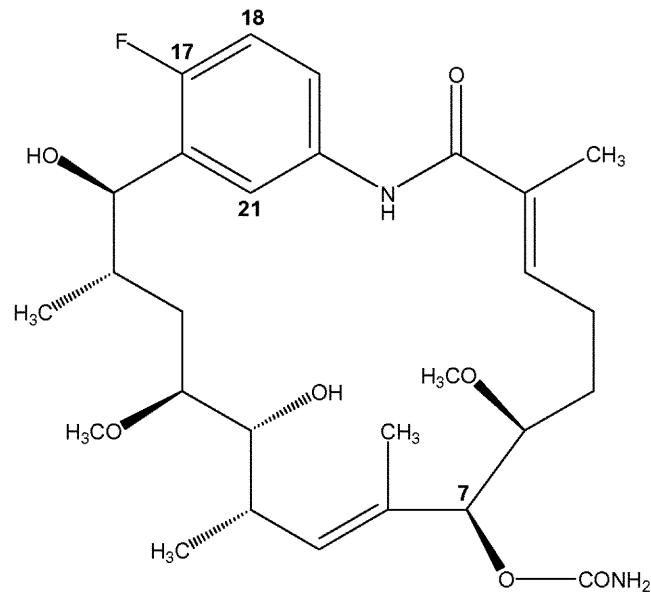
30

40

【 0 0 7 0 】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はOHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はFを表し、並びに R_7 及び R_8 は各々Hを表す：

【化 9】



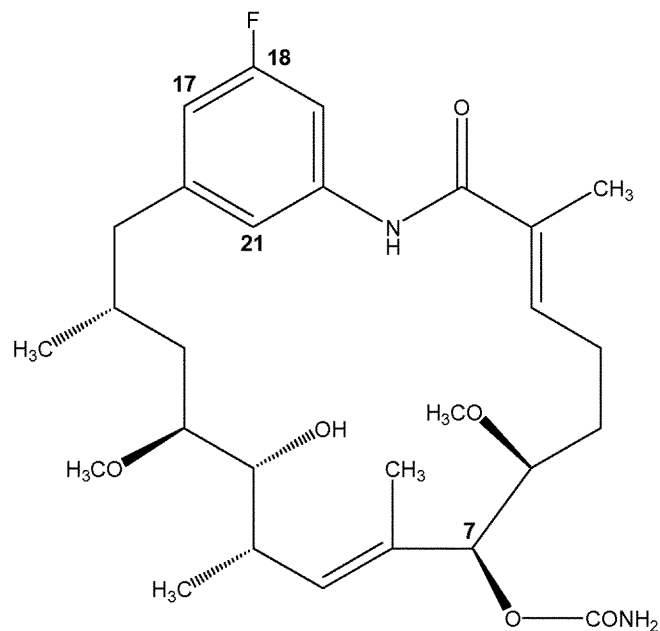
10

【 0 0 7 1 】

20

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はHを表し、 R_7 はFを表し、並びに R_8 はHを表す：

【化 1 0】



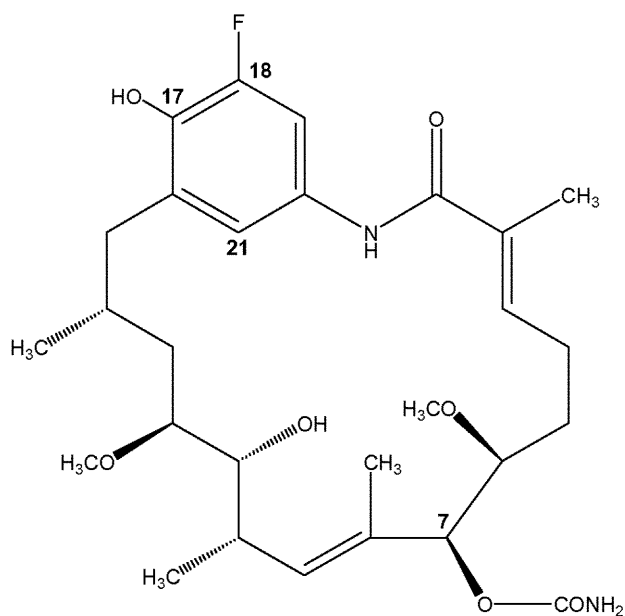
30

40

【 0 0 7 2 】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はOHを表し、 R_7 はFを表し、並びに R_8 はHを表す：

【化 1 1】



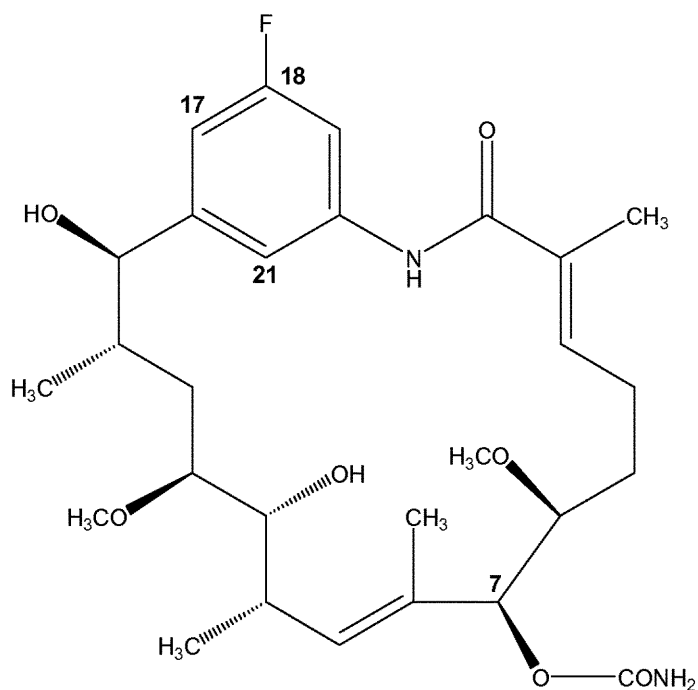
10

【 0 0 7 3 】

20

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はOHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は $CONH_2$ を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はHを表し、 R_7 はFを表し、並びに R_8 はHを表す：

【化 1 2】



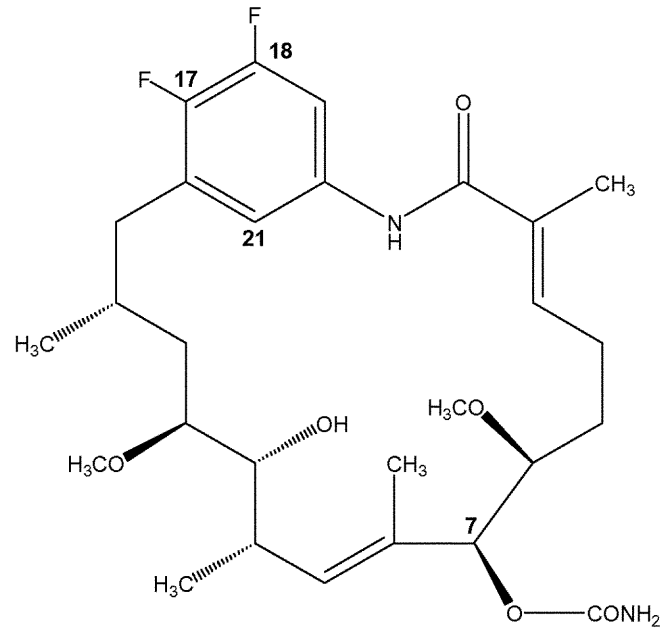
30

40

【 0 0 7 4 】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造のように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 及び R_7 は各々Fを表し、並びに R_8 はHを表す：

【化 1 3】



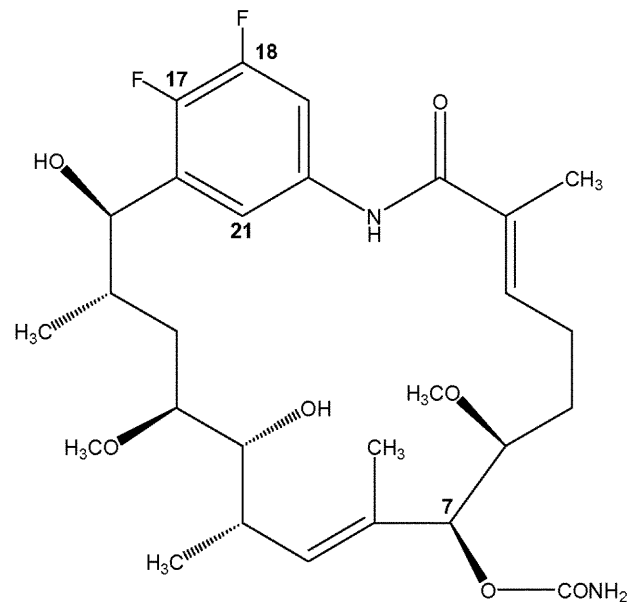
10

【 0 0 7 5】

20

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はOHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 はCONH₂を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 及び R_7 は各々Fを表し、並びに R_8 はHを表す：

【化 1 4】



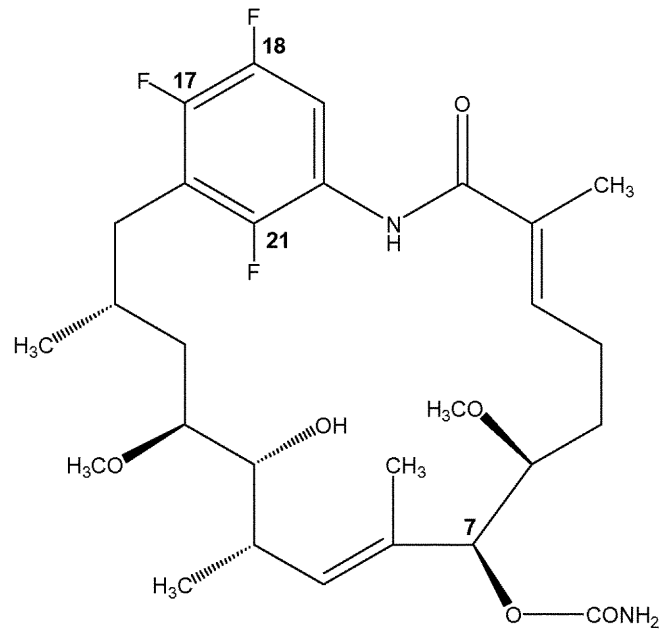
30

40

【 0 0 7 6】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 はCONH₂を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 、 R_7 及び R_8 は各々Fを表す：

【化 1 5】



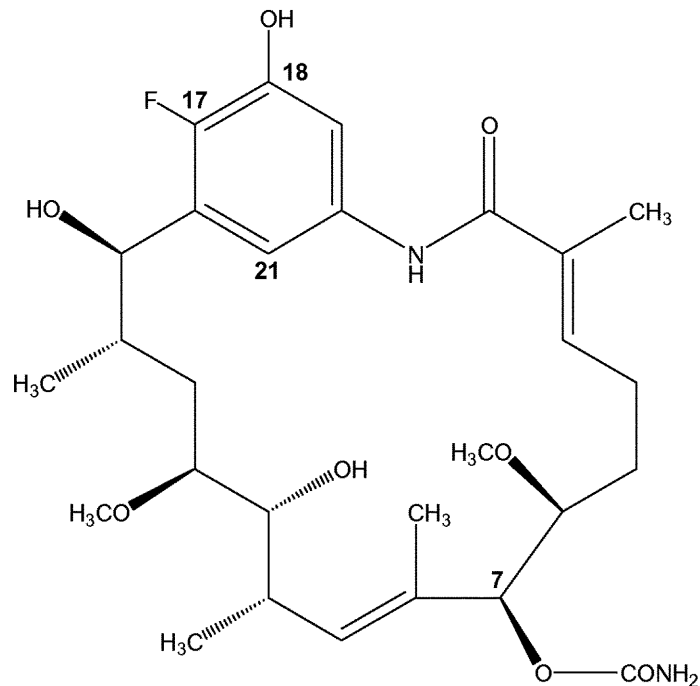
【 0 0 7 7 】

本発明のひとつの実施態様において、R₆、R₇及びR₈はすべてがHを表すわけではなく、並びに特にR₆、R₇及びR₈の少なくとも1つはFを表す。

【 0 0 7 8 】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、R₁はOHを表し、R₂はHを表し、R₃はCONH₂を表し、R₄及びR₅は各々Hを表し、R₆はFを表し、R₇はOHを表し、並びにR₈はHを表す：

【化 1 6】

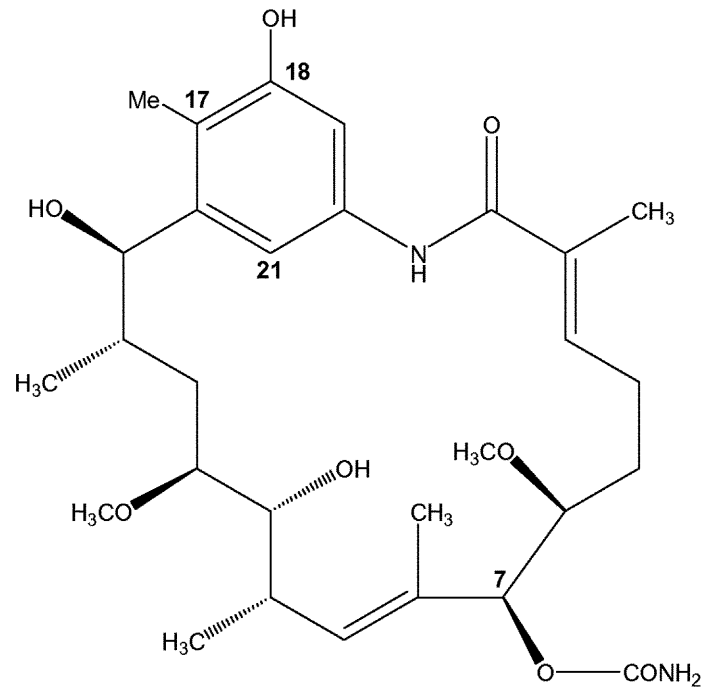


【 0 0 7 9 】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、R₁はOHを表し、R₂はHを表し、R₃はCONH₂を表し、R₄及びR₅は各々Hを表し、R₆はMeを表し、R₇はOHを

表し、並びに R_8 はHを表す：

【化 1 7】



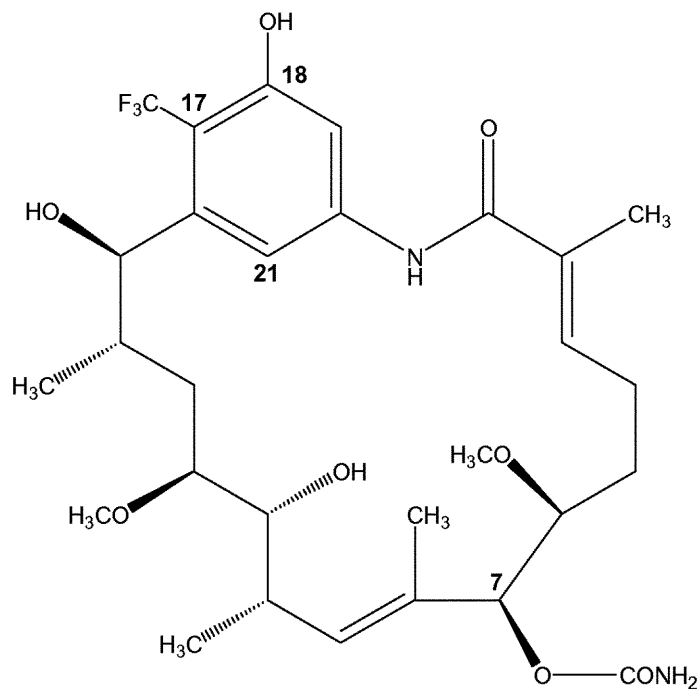
10

20

【 0 0 8 0 】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はOHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 はCONH₂を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はCF₃を表し、 R_7 はOHを表し、並びに R_8 はHを表す：

【化 1 8】



30

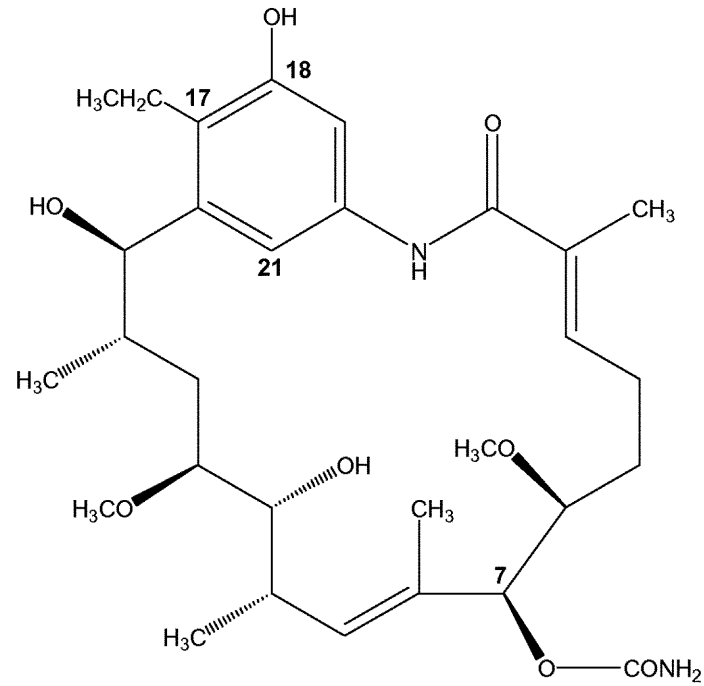
40

【 0 0 8 1 】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はOHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 はCONH₂を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はCH₂CH₃を表し、 R_7 はOHを表し、並びに R_8 はHを表す：

50

【化 1 9】



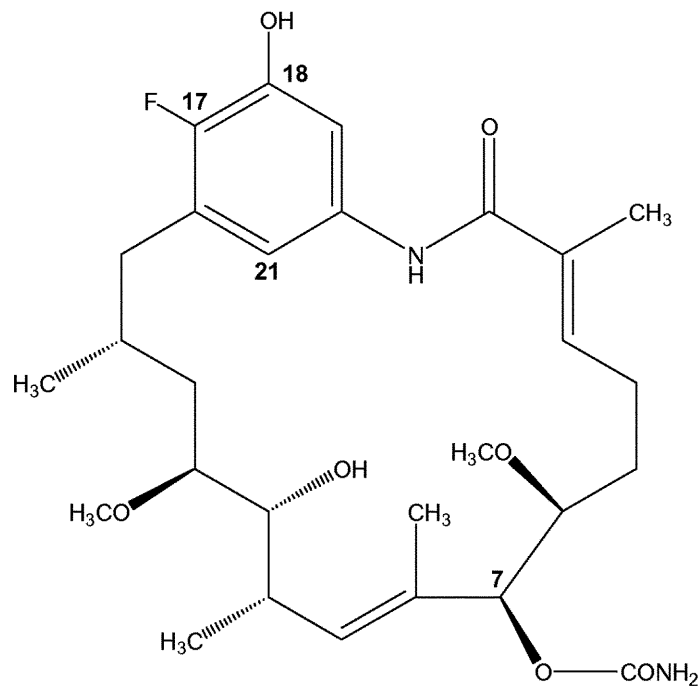
10

20

【 0 0 8 2】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はFを表し、 R_7 はOHを表し、並びに R_8 はHを表す：

【化 2 0】



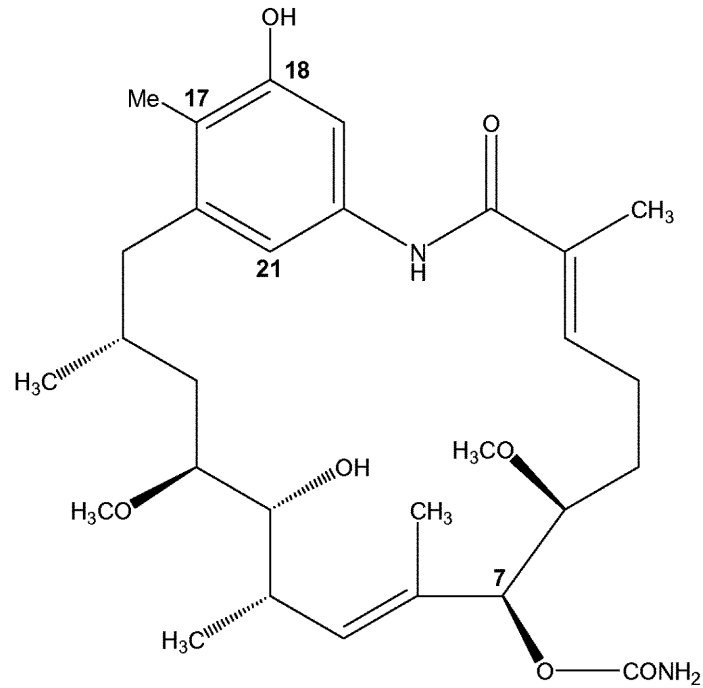
30

40

【 0 0 8 3】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はMeを表し、 R_7 はOHを表し、並びに R_8 はHを表す：

【化 2 1】



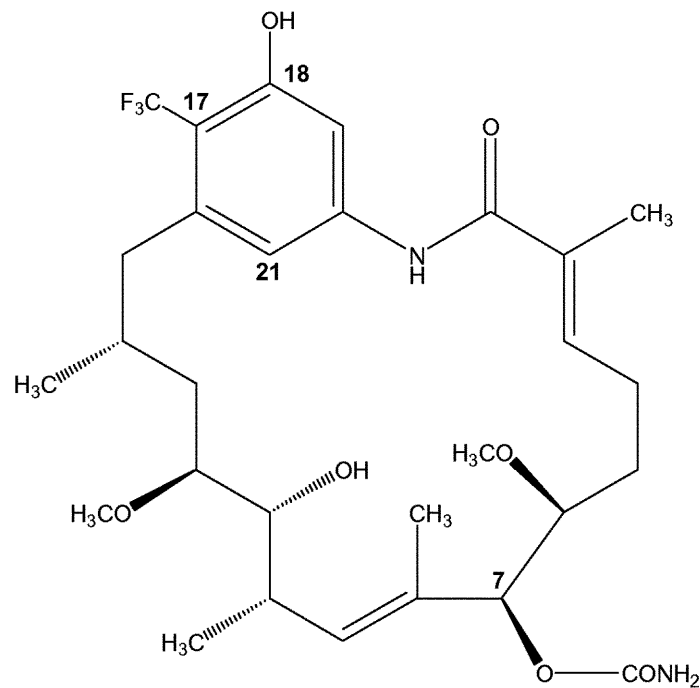
10

20

【 0 0 8 4 】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 はCONH₂を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はCF₃を表し、 R_7 はOHを表し、並びに R_8 はHを表す：

【化 2 2】



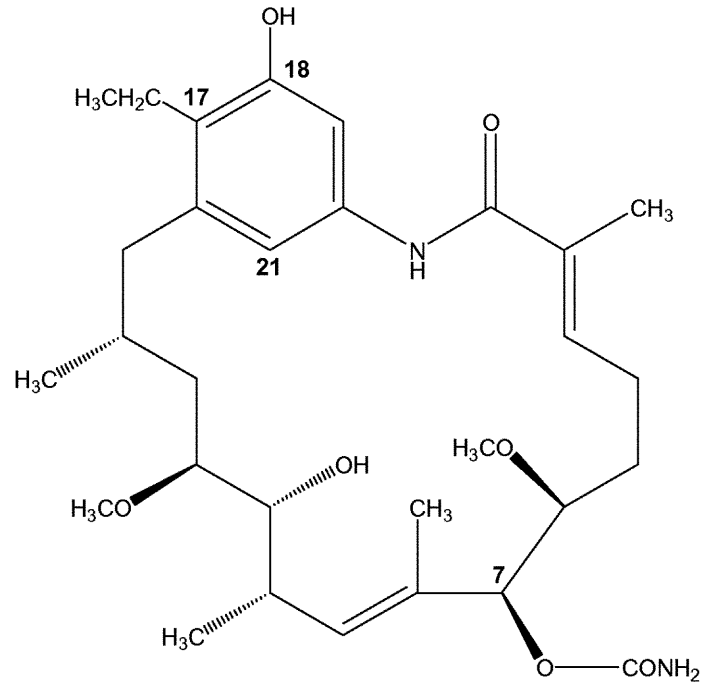
30

40

【 0 0 8 5 】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 はCONH₂を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はCH₂CH₃を表し、 R_7 はOHを表し、並びに R_8 はHを表す：

【化 2 3】



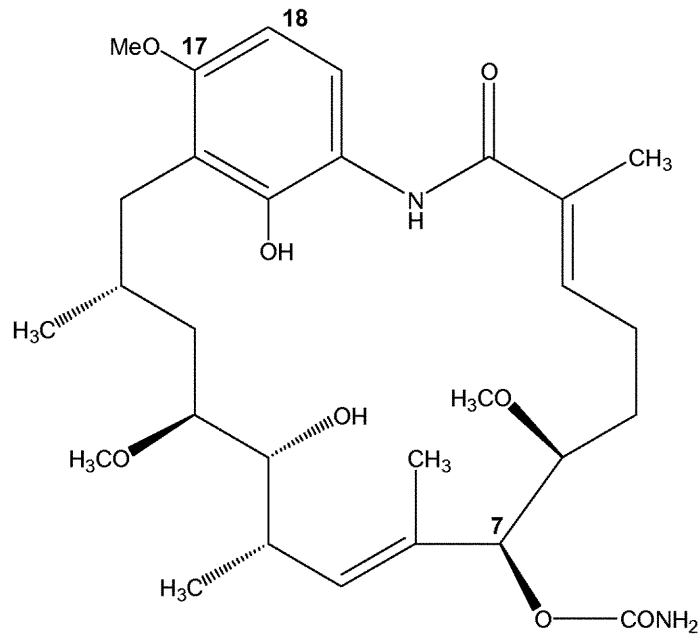
10

20

【 0 0 8 6】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はOMeを表し、 R_7 はHを表し、並びに R_8 はOHを表す：

【化 2 4】



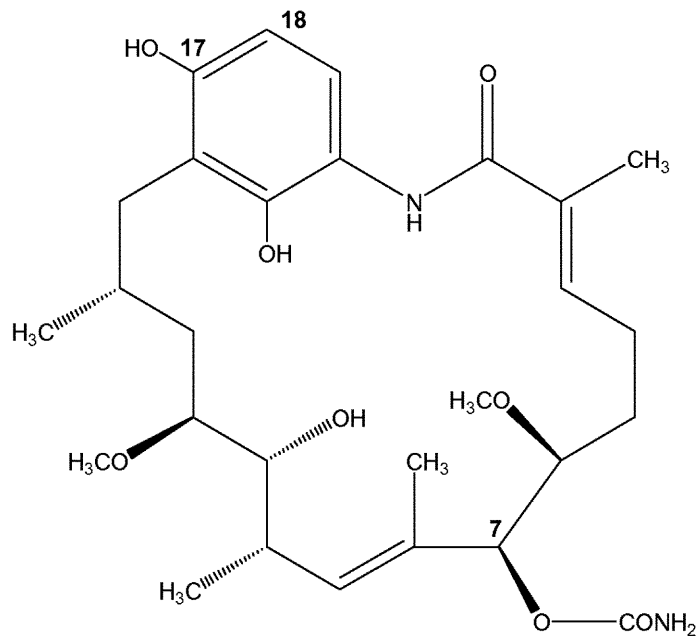
30

40

【 0 0 8 7】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はOHを表し、 R_7 はHを表し、並びに R_8 はOHを表す：

【化 2 5】



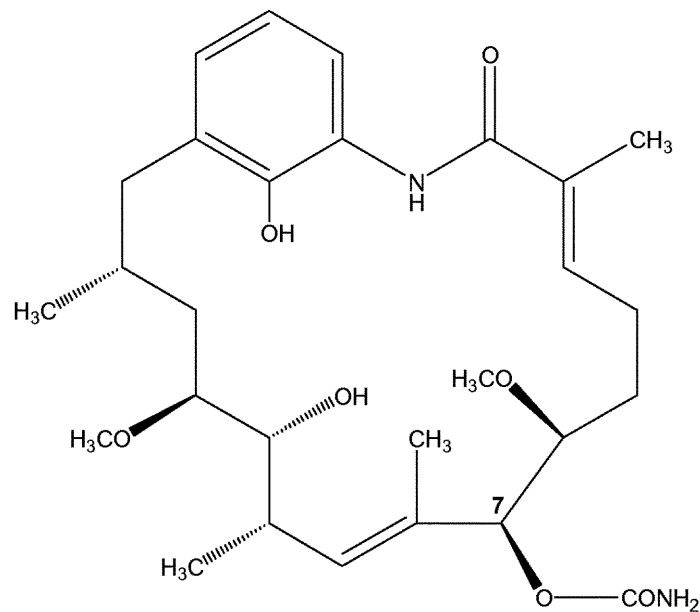
10

20

【 0 0 8 8 】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はHを表し、 R_7 はHを表し、並びに R_8 はOHを表す：

【化 2 6】



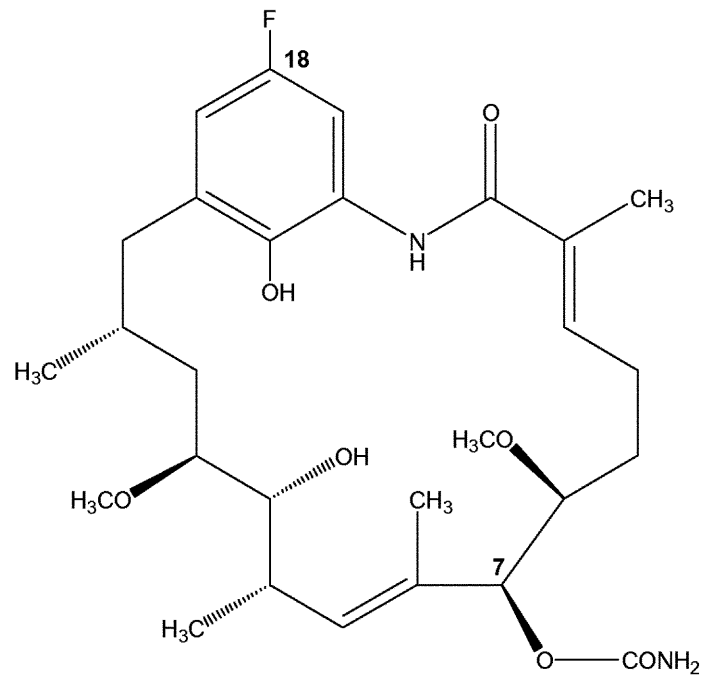
30

40

【 0 0 8 9 】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はHを表し、 R_7 はFを表し、並びに R_8 はOHを表す：

【化 2 7】



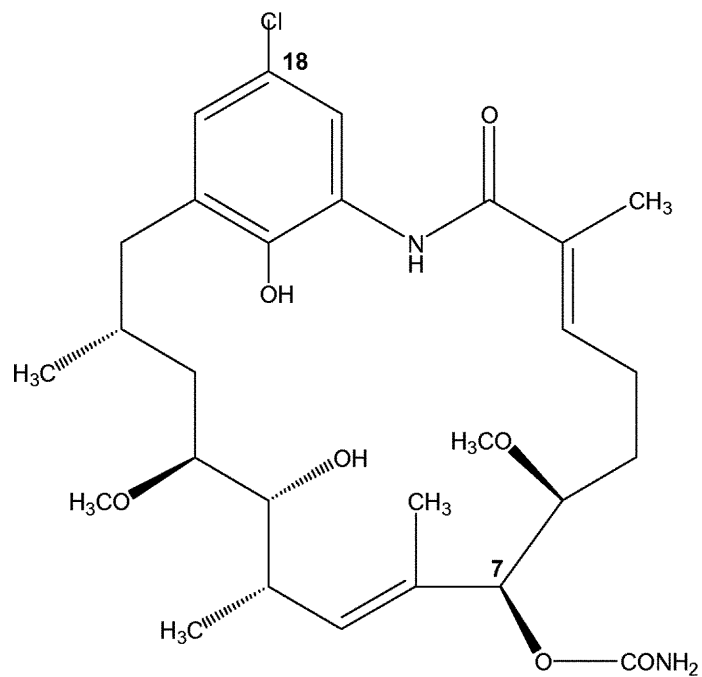
10

20

【 0 0 9 0】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、R₁はHを表し、R₂はHを表し、R₃はCONH₂を表し、R₄及びR₅は各々Hを表し、R₆はHを表し、R₇はClを表し、並びにR₈はOHを表す：

【化 2 8】



30

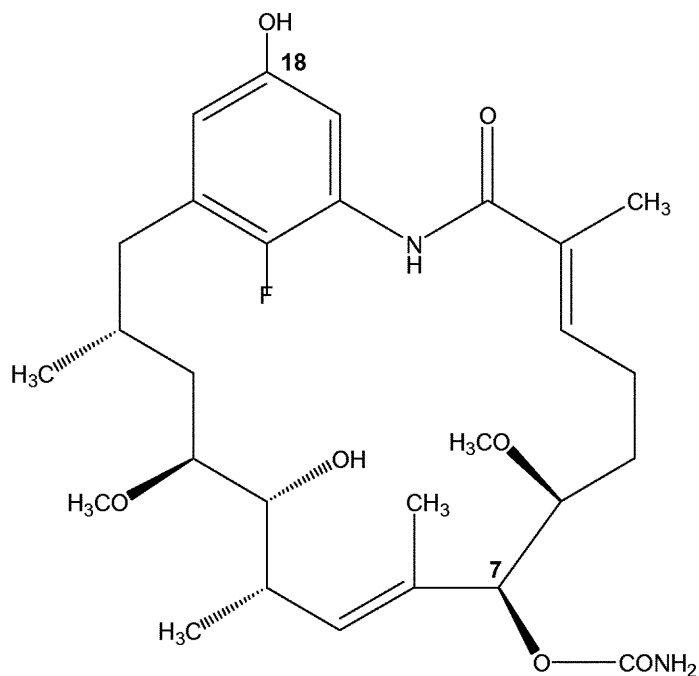
40

【 0 0 9 1】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、R₁はHを表し、R₂はHを表し、R₃はCONH₂を表し、R₄及びR₅は各々Hを表し、R₆はHを表し、R₇はOHを表し、並びにR₈はFを表す：

50

【化 2 9】



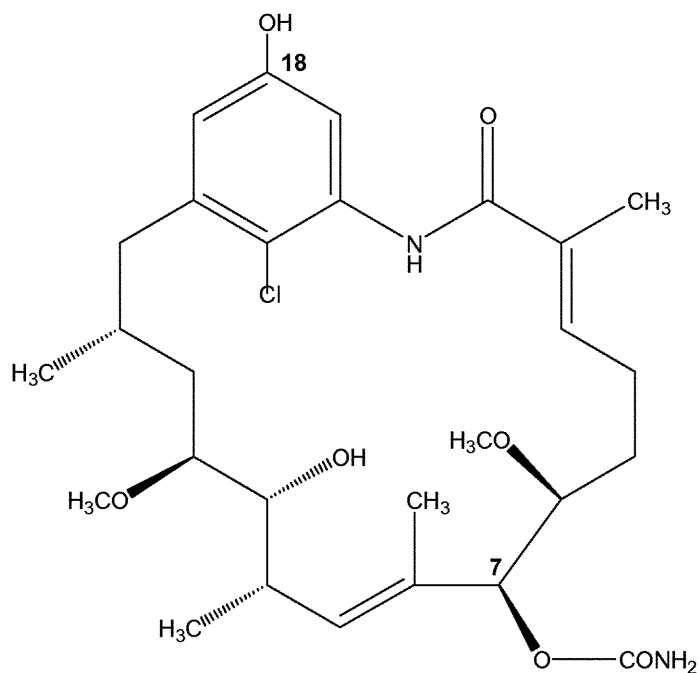
10

20

【 0 0 9 2】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はHを表し、 R_7 はOHを表し、並びに R_8 はClを表す：

【化 3 0】



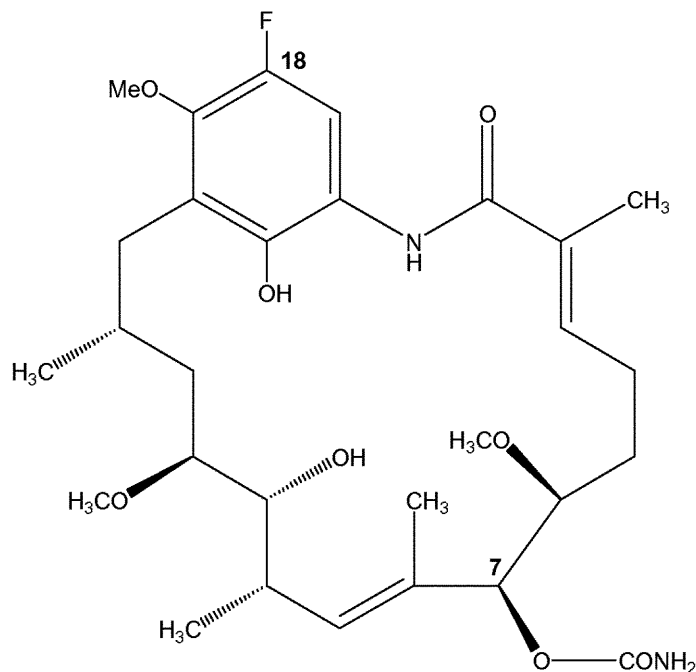
30

40

【 0 0 9 3】

本発明の別の好適な実施態様において、例えば下記構造で表されるように、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 は CONH_2 を表し、 R_4 及び R_5 は各々Hを表し、 R_6 はOMeを表し、 R_7 はFを表し、並びに R_8 はOHを表す：

【化 3 1】



10

20

【0094】

本発明の別の実施態様において、 R_6 、 R_7 及び R_8 はすべて、Hを表す。

別の実施態様において、 R_7 及び R_8 はOHを表さず、 R_9 はHを表し、並びに R_6 、 R_7 及び R_8 のひとつ以上は、Fを表す。

本発明の別の実施態様において、 R_1 がHを表し、 R_2 がHを表し、 R_3 がCONH₂を表し、 R_4 及び R_5 がHを表し、 R_6 がHを表し、並びに R_7 がHを表す場合、 R_8 はHを表さない。

【0095】

更なる好適な実施態様は、実施例中で説明され、並びに図3及び4に図示される。

【0096】

アンサ環への非-水素側鎖の好ましい立体化学を、下記図1及び2に示す(すなわち、好ましい立体化学は、ゲルダナマイシンのそれに従う)。

30

【0097】

本発明は、アンサマイシン類似体の、生体内変換か又は合成化学のいずれかによる更なる修飾のための基質としての使用も提供する。ひとつの態様において、本発明は、医薬品として使用するためのアンサマイシン類似体を提供する。詳細な実施態様において、本発明は、癌、B-細胞性悪性疾患、マラリア、真菌感染症、中枢神経系疾患及び神経変性疾患、血管新生依存性疾患、自己免疫疾患の治療、並びに/又は癌の予防的前処置に使用するための、アンサマイシン類似体を提供する。

【0098】

別の態様において、本発明は、医薬品の製造におけるアンサマイシン類似体の使用を提供する。詳細な実施態様において、本発明は、癌、B-細胞性悪性疾患、マラリア、真菌感染症、中枢神経系疾患及び神経変性疾患、血管新生依存性疾患、自己免疫疾患の治療、並びに/又は癌の予防的前処置のための医薬品の製造におけるアンサマイシン類似体の使用を提供する。

40

【0099】

更なる実施態様において、本発明は、癌、B-細胞性悪性疾患、マラリア、真菌感染症、中枢神経系疾患及び神経変性疾患、血管新生依存性疾患、自己免疫疾患の治療、又は癌の予防的前処置の方法を提供し、前記方法は、アンサマイシン類似体の治療的有効量をそれを必要とする患者へ投与することを含む。

【0100】

50

前述のように、本発明の化合物は、癌及びB-細胞性悪性疾患の治療に有用であると予想することができる、本発明の化合物、及び特に、Hsp90に対する改善された選択性及び/又は改善された毒性学的プロファイル及び/又は改善された薬物動態を有する可能性のある化合物は、例えば、マラリア、真菌感染症、中枢神経系疾患及び神経変性疾患、血管新生依存性疾患、関節リウマチのような自己免疫疾患などであるが、これらに限定されるものではない他の適応症の治療において、又は癌の予防的前処置としても有効であることができる。

【0101】

中枢神経系疾患及び神経変性疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、プリオン病、球脊髄性筋萎縮症(SBMA)及び筋萎縮性側索硬化症(ALS)を含むが、これらに限定されるものではない。

10

【0102】

血管新生依存性疾患は、加齢黄斑変性症、糖尿病性網膜症及び様々な他の眼科疾患、アテローム硬化症及び関節リウマチを含むが、これらに限定されるものではない。

【0103】

自己免疫疾患は、関節リウマチ、多発性硬化症、1型糖尿病、全身性紅斑性狼瘡及び乾癬を含むが、これらに限定されるものではない。

【0104】

「患者」は、ヒト対象及び他の動物(特に哺乳類)対象を、好ましくはヒト対象を包含している。従って、本発明のアンサマイシン類似体の方法及び使用は、ヒト用医薬品及び獣医学用医薬品、好ましくはヒト用医薬品で使用される。

20

【0105】

前述の本発明の化合物又はそれらの製剤は、いずれかの通常の方法により投与することができ、例えばこれらは、非経口的(静脈内投与を含む)、経口、局所的(口腔内、舌下又は経皮を含む)、医療用具を介して(例えばステント)、吸入によるか、又は注射により(皮下又は筋肉内)投与されるが、これらに限定されるものではない。本治療は、単回投与又はある期間に渡った反復投与によりなることができる。

【0106】

本発明の化合物は単独で投与することが可能であるが、これは、1種以上の許容し得る希釈剤又は担体と一緒に医薬製剤として存在することが好ましい。従って、本発明の化合物を、1種以上の医薬として許容し得る希釈剤又は担体と一緒に含有する医薬組成物が提供される。希釈剤(類)又は担体(類)は、本発明の化合物と相溶性がありかつそれらのレシピエントに有害でないという意味で、「許容でき」なければならない。好適な担体の例は、以下により詳細に説明される。

30

【0107】

本発明の化合物は、単独で又は他の治療薬と組合せて投与されてよい。2種(又はそれよりも多い)薬剤の同時投与は、使用される各々の投与量を著しく低くすることができ、これにより認められる副作用を軽減する。1種以上の医薬として許容し得る希釈剤又は担体と一緒に、本発明の化合物及び更なる治療薬を含有する医薬組成物も提供される。

【0108】

更なる態様において、本発明は、例えば癌又はB-細胞性悪性疾患の治療のための、第二の薬剤との併用における本発明の化合物の使用を提供する。

40

【0109】

ひとつの実施態様において、本発明の化合物は、別の治療薬、例えば、癌又はB-細胞性悪性疾患の治療のための治療薬と同時投与される。好ましい薬剤には、ブレオマイシン、カペシタビン、シスプラチン、シタラビン、シクロホスファミド、ドキシソルビシン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、ロイコボリン、メトトレキサート、ミトキサントン、パクリタキセル及びドセタキセルをはじめとするタキサン類、ビンクリスチン、ビンブラスチン及びピノレルビンなどの通常の化学療法薬;ホルモン療法、アナストロゾール、ゴセレリン、酢酸メゲストロール、プレニゾン、タモキシフェン及びトレミフェン;トラスツ

50

ズマブ(抗-Her2)、セツキシマブ(抗-EGFR)及びペバシズマブ(抗-VEGF)などのモノクローナル抗体療法;イマチニブ、ダサチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ラパチニブ、テムシロリムスなどのプロテインキナーゼ阻害剤;ボルテゾミブなどのプロテアソーム阻害剤;ポリノスタットなどのヒストンデアセチラーゼ(histone deacetylase)(HDAC)阻害剤;スニチニブ、ソラフェニブ、レナリドマイドなどの血管新生阻害剤;が含まれるが、これらに限定されるものではない。加えて本発明の化合物は、非限定的に放射線治療又は手術を含む、他の療法と組合せて投与されてよい。

【0110】

本製剤は好都合なことに、単位剤形であってよく、及び調剤技術分野において周知の任意の方法により調製されてよい。このような方法は、活性成分(本発明の化合物)の、1種以上の補助成分を構成する担体との会合をもたらし工程を含む。一般に本製剤は、活性成分の液体担体又は微細化された固形担体又は両方との会合を均質かつ密接にし、その後必要ならば生成物を造形することで、調製される。

10

【0111】

本発明の化合物は、任意に、医薬として許容し得る剤形中の無毒の有機もしくは無機の酸もしくは塩基、付加塩の形態で活性成分を含有する医薬製剤の形態で、通常、経口又は任意に非経口経路により投与される。治療される障害及び患者に加え、投与経路に応じて、本組成物は変動する投与量で投与することができる。

【0112】

例えば、本発明の化合物は、即時-、遅延-又は制御された放出の適用のために、矯味矯臭剤又は着色剤を含有してよい、錠剤、カプセル剤、卵形剤(ovule)、エリキシル剤、液剤又は懸濁剤の形態で、経口、口腔内、又は舌下へ投与することができる。

20

【0113】

このような錠剤は、微晶質セルロース、ラクトース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素カルシウム及びグリシンなどの賦形剤、デンプン(好ましくはトウモロコシ、ジャガイモ又はタピオカデンプン)、デンプングリコール酸ナトリウム、クロスカルメロースナトリウム及びある種の複合シリカのような崩壊剤、並びにポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ヒドロキシ-プロピルセルロース(HPC)、ショ糖、ゼラチン及びアカシアゴムなどの造粒結合剤を含んでよい。加えて、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ベヘン酸グリセリル及びタルクなどの滑沢剤を含んでよい。

30

【0114】

同様の型の固形組成物も、ゼラチンカプセル剤中の充填剤として利用することができる。これに関する好ましい賦形剤は、ラクトース、デンプン、セルロース、乳糖又は高分子量ポリエチレングリコールを含む。水性懸濁剤及び/又はエリキシル剤に関して、本発明の化合物は、様々な甘味剤又は矯味矯臭剤、着色物質又は染料と一緒に、乳化剤及び/又は懸濁化剤と一緒に、並びに水、エタノール、プロピレングリコール及びグリセリンなどの希釈剤と一緒に、並びにそれらの組合せと一緒にすることができる。

【0115】

錠剤は、任意に1種以上の補助成分と共に、圧縮又は成形により作製することができる。圧縮錠は、任意に、結合剤(例えば、ポビドン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース)、滑沢剤、不活性希釈剤、保存剤、崩壊剤(例えば、デンプングリコール酸ナトリウム、架橋したポビドン、架橋したカルボキシメチルセルロースナトリウム)、表面活性剤又は分散剤と混合された、粉末又は顆粒などの自在流動形の活性成分を、好適な装置において圧縮することにより調製することができる。成形錠は、不活性液体希釈剤で湿潤された粉末化された化合物の混合物を好適な装置において成形することにより作製することができる。これらの錠剤は、任意にコートされるか又は刻み目を入れることができ、かつ所望の放出プロファイルを提供するために例えば変動する割合でヒドロキシプロピルメチルセルロースを使用し、活性成分の遅延放出又は制御放出を提供するために製剤することができる。

40

50

【0116】

経口投与に適した本発明の製剤は、各々予め決定された量の活性成分を含有する、カプセル剤、カシェ剤又は錠剤などの個別の単位として；散剤又は顆粒剤として；水性液体又は非水性液体中の液剤又は懸濁剤として；もしくは、水中油型液体乳剤又は油中水型液体乳剤として、提供されてよい。本活性成分は、ポーラス、舐剤又はペースト剤としても提供されてよい。

【0117】

口内の局所投与に好適な製剤は、通常、ショ糖及びアカシアゴム又はトラガカントガムの香料基剤中に活性成分を含有するトローチ剤；ゼラチン及びグリセリン、又はショ糖及びアカシアゴムなどの不活性基剤中に活性成分を含有する香錠；並びに、好適な液体担体中に活性成分を含有する含嗽剤；を含む。

10

【0118】

本発明の製剤は、前述の特定の構成成分に加え、問題の剤型に関する当該技術分野において通常の他の作用物質を含有することができることは理解されなければならない、例えば、経口投与に適したものは、矯味矯臭剤を含有してよい。

【0119】

局所投与に適合された医薬組成物は、軟膏剤、クリーム剤、懸濁剤、ローション剤、散剤、液剤、ペースト剤、ゲル剤、含浸包帯、スプレー剤、エアロゾル剤又は油剤、経皮デバイス、粉剤などとして製剤されてよい。これらの組成物は、活性物質を含む通常の方法により調製されてよい。従ってこれらは、相溶性のある通常の担体及び添加剤、例えばクリーム剤又は軟膏剤中の保存剤、薬物の透過を補助する溶媒、緩和剤など、並びにローション剤中のエタノール又はオレイルアルコールなどを含有することもできる。このような担体は、組成物の約1%から最大約98%で存在してよい。より一般的には、これらは組成物の最大約80%を形成する。単なる例証として、クリーム剤又は軟膏剤は、所望の稠度を有するクリーム剤又は軟膏剤を作製するのに十分な量で、化合物を約5~10重量%含有する、親水性物質及び水の十分な量を混合することにより調製される。

20

【0120】

経皮投与に適合された医薬組成物は、長時間、レシピエントの表皮と密接に接触し続けることが意図された個別の貼付剤として提供されてよい。例えば、活性物質は、イオン導入法により貼付剤から送達されてよい。

30

【0121】

例えば口及び皮膚のような外部組織への適用に関して、本組成物は、局所用軟膏剤又はクリーム剤として適用されることが好ましい。軟膏剤として製剤される場合、活性物質は、パラフィン系又は水混和性のいずれかの軟膏基剤と共に使用することができる。

【0122】

あるいは、この活性物質は、水中油型クリーム基剤又は油中水型基剤と共に、クリーム剤に製剤されてもよい。

【0123】

非経口的投与に関して、活性成分、並びに無菌ビヒクル、例えば水、アルコール、ポリオール、グリセリン及び植物油など(水が好ましい)であるが、これらに限定されないものを用いて、流体単位剤形が調製される。この活性成分は、使用されるビヒクル及び濃度に応じて、ビヒクル中に懸濁されるか又は溶解されるかのいずれかであることができる。溶液の調製において、活性成分は、注射用水に溶解され、濾過滅菌され、その後好適なバイアル又はアンプルに充填され、密封される。

40

【0124】

有利なことに、局所麻酔薬、保存剤及び緩衝剤などの作用物質を、このビヒクルに溶解することができる。安定性を増強するために、本組成物は、バイアルへの充填後に凍結し、かつ真空下で水を除去することができる。次に無水の凍結乾燥された粉末は、バイアル中で密封され、使用前に液体を再構成するように、注射用水のバイアルを伴って供給されてよい。

50

【0125】

非経口懸濁剤は、活性成分が、溶解される代わりにビヒクル中に懸濁されること及び滅菌を濾過により実現できないこと以外は、液剤と実質的に同じ様式で調製される。本活性成分は、無菌ビヒクル中へ懸濁される前に、エチレンオキシドへ曝露することにより滅菌することができる。有利なことに、活性成分の均質な分布を促進するために、本組成物中に界面活性剤又は湿潤剤が含まれる。

【0126】

本発明の化合物は、当該技術分野において公知の医療用具を用いて投与されてもよい。例えばひとつの実施態様において、本発明の医薬組成物は、US 5,399,163;US 5,383,851;US 5,312,335;US 5,064,413;US 4,941,880;US 4,790,824;又は、US 4,596,556に開示された装置などの、無針皮下注射装置により投与することができる。本発明において有用な周知のインプラント及びモジュールの例は、以下のものを含む:US 4,487,603は、投薬を制御された速度で分配するための、埋込み可能な微量注入ポンプを開示している;US 4,486,194は、皮膚を通る医薬品の投与のための治療装置を開示している;US 4,447,233は、正確な注入速度で投薬を送達するための投薬用注入ポンプを開示している;US 4,447,224は、連続薬物送達のための可変流量の埋込み可能な注入器具を開示している;US 4,439,196は、マルチ-チャンパーコンパートメントを備える浸透圧式薬物送達システムを開示している;並びに、US 4,475,196は、浸透圧式薬物送達システムを開示している。多くの他のインプラント、送達システム、及びモジュールが、当業者に公知である。

【0127】

本発明の化合物の投与される用量は、特定の化合物、関連する疾患、対象、並びに疾患の性質及び重症度、並びに対象の生理的状态、並びに選択された投与経路に従い変動する。適量は、当業者により容易に決定され得る。

【0128】

本組成物は、投与方法に応じて、本発明の化合物を0.1重量%以上、好ましくは5~60%、より好ましくは10~30重量%含有する。

【0129】

当業者により、本発明の化合物の最適用量及び個々の投薬の間隔は、治療される状態の性質及び程度、剤型、投与経路及び部位、並びに治療される特定の対象の年齢及び状態により決定されること、並びに医師が使用されるべき適量を最終的に決定することは認められるであろう。この投薬は、適当なだけ繰り返すことができる。副作用が出現した場合には、通常の臨床の実践に従い、投薬の量及び/又は頻度を変更又は減少することができる。

【0130】

更なる態様において、本発明は、アンサマイシン類似体の製造方法を提供する。

【0131】

アンサマイシンポリケチド類、例えばゲルダナマイシン及びハービマイシンは、当技術分野で周知であるポリケチド生合成クラスターにより合成される。ゲルダナマイシンは、2段階で生合成されると考えることができる。第一段階において、コア-PKS遺伝子は、単純なカルボン酸前駆体の反復された構築により、マクロライドコアを集成し、ポリケチド鎖を生じ、これを次に環化し、最初の酵素-フリー中間体「プロゲルダナマイシン」を形成する(図1参照)。第二段階において、一連の「ポスト-PKS」を仕立てる酵素(例えば、シトクロムP450モノオキシゲナーゼ、メチル基転移酵素、FAD-依存性オキシゲナーゼ及びカルバモイル基転移酵素)は、様々な追加の基をプロゲルダナマイシン鑄型に付加するように作用し、最終の親化合物構造を生じる(図2参照)。アンサマイシン類似体は、同様の様式で生合成することができる。この生合成的生成は、新規化合物の生成を生じるのに適した産生株の遺伝子操作と任意に組合せられた、生体内変換により活用されてよい。

【0132】

驚くべきことに、本発明者らは、アンサマイシン産生株を非天然のスターターユニット(スターター酸、又はそれらの類似体、例えばエステルなど)と共に供給することにより、これらのスターターユニットをアンサマイシン構造中に取り込み、新規なアンサマイシン

類似体を生成できることを発見した。

【0133】

従って、本発明により、アンサマイシン類似体の製造方法が提供され、該方法は以下の工程を含む：

- a) 適切な条件下で培養した場合に、ゲルダナマイシン、ハービマイシン(ハービマイシンA、B又はC)又はそれらの類似体などのアンサマイシンを生成する菌株を提供する工程；
- b) 前記菌株へAHBAではないスターターユニットを、該スターターユニットが前記アンサマイシン類似体中に取り込まれるように供給する工程；
- c) 前記菌株を、アンサマイシン類似体の生成に適した条件下で培養する工程；及び
- d) 任意に、生成された化合物を単離する工程。

10

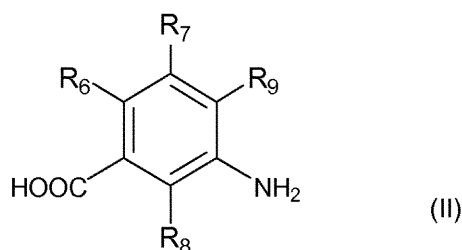
【0134】

好適には、a)の菌株は、1つ以上のAHBA生合成遺伝子が欠失又は不活化されている菌株であることを特徴とする。このことが、AHBAによる収率を低下させる非天然スターターユニットの取り込みに関する競合を防止できる。別法として、a)の菌株を、AHBA生合成の効率を低下させるように変異させることができる。好適には工程c)の条件は、AHBA生合成の効率が最適状態に及ばないような条件である。従って、望ましくは、AHBAは、該菌株により、それでも供給された非天然のスターターユニットの取り込みを可能にするレベルまで生成される。典型的には、供給される非天然スターターユニットの取り込み量は、全スターターユニット取り込みの20%超、好ましくは50%超である。

20

好適には、スターターユニットは、

【化32】



(式中、 R_6 、 R_7 、 R_8 及び R_9 は上で定義した通りである)、又はその酸部分がエステル(例えば、メチル又はエチルエステル)などの誘導体化されている類似体から選択される。

30

【0135】

好適にはスターターユニットは、3,5-ジアミノ安息香酸、3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸又は3-アミノ-4-クロロ安息香酸ではない。

【0136】

ひとつの実施態様において、スターターユニットは、 R_6 、 R_7 、 R_8 及び R_9 がすべてHを表す式(II)の化合物である。

【0137】

別の実施態様において、スターターユニットは、 R_6 、 R_7 、 R_8 及び R_9 のすべてがHを表すわけではない式(II)の化合物である。

40

【0138】

更なる例示的なスターターユニットには、後の表4及び5の第二縦欄に示される化合物、及びその適切な誘導体(塩及びエステルなど)が含まれるが、それらに限定されるものではない。

【0139】

ひとつの実施態様において、菌株は、アンサマイシン産生株(例えば、ゲルダナマイシン又はハービマイシン産生株)であり、スターターユニットは、該菌株が18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体を産生するように選択される。

【0140】

ひとつの実施態様において、スターターユニットは、該菌株が、フッ素で置換されてい

50

てもよい18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体を産生するように選択される。

【0141】

ひとつの実施態様において、スターターユニットは、該菌株が、フッ素で置換されている18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体を産生するように選択される。

【0142】

別の実施態様において、菌株は、マクベシン産生株であり、スターターユニットは、該菌株が、ベンゼン環の18又は21の位置で置換されていないマクベシン類似体を産生するように選択される。

【0143】

好適には該方法は、(i)工程(d)の生成物を、化学修飾又は生体内変換のプロセスに、任意に続いて、生じた化合物を単離する工程に供する工程を更に含むか、あるいは(ii)工程(c)の生成物を、工程(d)に先立って化学修飾又は生体内変換のプロセスに供する工程を更に含む。

【0144】

本発明の別の態様によれば、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体などの類似体の製造方法が提供され、前記方法は：

- a) 任意に1種以上のポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されている、及び/又は1種以上のスターターユニット生合成遺伝子が欠失又は不活化されている好適な条件下で培養した場合に、アンサマイシン又はその類似体を生成する第一の宿主菌株を提供する工程；
- b) 前記菌株へ非天然のスターターユニットを供給する工程；
- c) 前記修飾された宿主菌株を、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体などのアンサマイシン類似体の生成に適した条件下で培養する工程；及び
- d) 任意に、生成された化合物を単離する工程：を含む。

【0145】

好適には、供給されるスターターユニットは、スターター酸である。

【0146】

特に、本発明は、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体の製造方法を提供し、前記方法は：

- a) 適切な条件下で培養した場合に、ゲルダナマイシン、ハービマイシン類(例えば、ハービマイシンA、B又はC)又はそれらの類似体などのアンサマイシンを生成する第一の宿主菌株を提供する工程；
- b) 前記菌株へ非天然のスターター酸を供給する工程；
- c) 前記菌株を、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体の生成に適した条件下で培養する工程；及び
- d) 任意に、生成された化合物を単離する工程：を含む。

【0147】

好適には、該方法は、加えて、

- e) 1種以上のスターターユニット生合成遺伝子又はそれらの相同体を欠失又は不活化する工程(通常、工程c)に先立って行われる)を含む。

【0148】

好適には、該方法は、加えて又は代わりに、

- f) 1種以上のポスト-PKS遺伝子を欠失又は不活化する工程(通常、工程c)に先立って行われる)を含む。

【0149】

工程(a)において、「ゲルダナマイシン、ハービマイシン類(例えば、ハービマイシンA、B又はC)又はそれらの類似体などのアンサマイシンを生成する宿主菌株」には、ゲルダナマイシン、ハービマイシン(例えば、ハービマイシンA、B又はC)などのアンサマイシン、あるいは適切な条件下で培養した場合に、 $R_1 \sim R_{11}$ の定義によって包含されるアンサマイシン化合物を生成する菌株が含まれる。適切な条件(及び工程(c)に適した条件)には、好適なスターター供給材料及び好適な組成の増殖培地(これは当業者に公知であるか、又

はそれ自身公知の方法により決定され得る)の提供が含まれる。

【0150】

例えば、工程(a)において、第一の宿主菌株は、適切な条件下で培養した場合に、ゲルダナマイシン又はその類似体を生成できる。

【0151】

好適には、非天然のスターター供給材料は、置換された安息香酸(天然のスターター酸である3-アミノ-5-ヒドロキシ-安息香酸ではない)、最も好適には、その環が任意に更に置換されている3-アミノ-安息香酸である。好適には、非天然のスターター供給材料は、ゼロ、1、2又は3個のフッ素原子により置換されている3-アミノ-安息香酸である。

【0152】

好適な実施態様において、非天然のスターター酸供給材料は、3-アミノ安息香酸である。

【0153】

別の好適な実施態様において、非天然のスターター酸供給材料は、5-アミノ-2-フルオロ安息香酸である。

【0154】

別の好適な実施態様において、非天然のスターター酸供給材料は、5-アミノ-3-フルオロ安息香酸である。

【0155】

別の好適な実施態様において、非天然のスターター酸供給材料は、5-アミノ-2,3-ジ-フルオロ安息香酸である。

【0156】

別の好適な実施態様において、非天然のスターター酸供給材料は、5-アミノ-2,3,6-トリ-フルオロ安息香酸である。

【0157】

当業者は、同じ化合物(類)、例えば非限定的に、置換された安息香酸のメチルエステル、エチルエステル、N-アセチル-システアミンチオエステル、並びに例えばN-アセチル-システアミンチオエステルのような、取り込みのために適宜活性化された生合成中間体のジケチド類似体などを生成するために、宿主菌株へ供給することができる、別の非天然のスターターユニットが存在することを理解するであろう。酸化合物は、対応する塩の形態として供給されてもよい。

【0158】

宿主菌株は、例えば、ゲルダナマイシン産生株又はハービマイシン産生株などのアンサマイシン産生株であってよい。あるいは、宿主菌株は、1種以上のスターターユニット生合成遺伝子が欠失又は不活化されているゲルダナマイシン産生株(又はハービマイシン産生株)などのアンサマイシン産生株を基にした操作された菌株である。更なる実施態様において、宿主菌株は、1種以上のポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているアンサマイシン産生株を基にした操作された菌株である。

【0159】

更なる実施態様において、宿主菌株は、gdmMが欠失又は不活化されているアンサマイシン産生株を基にした操作された菌株である。

【0160】

更なる実施態様において、宿主菌株は、gdmM相同体及び任意に更にポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているアンサマイシン産生株を基にした操作された菌株である。

【0161】

本発明のひとつの実施態様において、宿主菌株は、ゲルダナマイシン産生株である。

【0162】

代替の実施態様において、宿主菌株は、1種以上のスターターユニット生合成遺伝子が欠失又は不活化されているゲルダナマイシン産生株を基にした操作された菌株である。

【0163】

10

20

30

40

50

更なる実施態様において、宿主菌株は、1種以上のポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているゲルダナマイシン産生株を基にした操作された菌株である。

【0164】

更なる実施態様において、宿主菌株は、gdmMが欠失又は不活化されているゲルダナマイシン産生株を基にした操作された菌株である。

【0165】

更なる実施態様において、宿主菌株は、gdmM及び任意に更にポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているゲルダナマイシン産生株を基にした操作された菌株である。

【0166】

更なる実施態様において、宿主菌株は、1種以上のポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化され、その後、特定のポスト-PKS修飾をもたらすようにポスト-PKS遺伝子が再導入されているゲルダナマイシン産生株を基にした操作された菌株である。ゲルダナマイシンクラスターに、あるいは非限定的にマクベシン又はハービマイシンクラスターなどの別のアンサマイシンクラスターに由来するポスト-PKS遺伝子を使用できる。

【0167】

更なる実施態様において、宿主菌株は、ハービマイシン(例えば、ハービマイシンA、B又はC)産生株である。

【0168】

更なる実施態様において、宿主菌株は、オートリチマイシン産生株である。

【0169】

更なる実施態様において、宿主菌株は、レブラスタチン産生株である。

【0170】

更なる実施態様において、宿主菌株は、gdmM相同体が欠失又は不活化されているハービマイシン産生株を基にした操作された菌株である。

【0171】

更なる実施態様において、宿主菌株は、gdmM相同体及び任意に更にポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているハービマイシン産生株を基にした操作された菌株である。

【0172】

欠失又は不活化されていてもよいスターターユニット生合成遺伝子には、例えば、ゲルダナマイシン産生株S.ハイグロスコピカスAM3602中のahba-Bクラスターのahba-3、ahba-1c、ahba-4、ahba-b、ahba-1a、ahba-1bとして知られている遺伝子(Rascherらの論文、2005参照)、あるいはマクベシン産生株アクチノシンネマ・プレチオスムATCC31280中の遺伝子PH、OX、Ahs、Adh及びAHk(表3参照)、並びに類似の機能を有するその他菌株中のそれらの相同体が含まれる。例えば、ゲルダナマイシン産生株S.ハイグロスコピカスAM3602中のahba-Bクラスターのすべての遺伝子が、欠失又は不活化されていてもよい。

【0173】

前述の欠失を組合せることができ、例えば、宿主菌株は、gdmM又はその相同体、並びに1種以上のスターターユニット生合成遺伝子及び任意で更にポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているアンサマイシン産生株(例えば、ゲルダナマイシン又はハービマイシン産生株)を基にした操作された菌株であってよい。

【0174】

好適には、1種以上のスターターユニット生合成遺伝子又はポスト-PKS遺伝子は、選択的に欠失又は不活化される。

【0175】

更なる実施態様において、1種以上のスターターユニット生合成遺伝子又はポスト-PKS遺伝子は、前述の操作された菌株において、機能タンパク質が生成されないようにDNAをその遺伝子(類)に組込むことにより不活化される。代替の実施態様において、1種以上の該スターターユニット生合成遺伝子又はポスト-PKS遺伝子は、標的化された欠失をなすことにより、該操作された菌株において欠失される。更なる実施態様において、1種以上のスターターユニット生合成遺伝子又はポスト-PKS遺伝子は、部位特異的変異誘発により、

10

20

30

40

50

該操作された菌株において不活化される。更なる実施態様において、ゲルダナマイシン産生宿主菌株は、変異誘発性の化学物質又はUVに供され、並びに1種以上のスターターユニット合成酵素又はポスト-PKS酵素が機能しないように修飾された菌株が選択される。本発明は、1種以上のポスト-PKS遺伝子の発現を制御する制御因子の変異も包含しており、当業者は、制御因子の欠失又は不活化は、その遺伝子の欠失又は不活化と同じ結果を有し得ることを理解するであろう。ポスト-PKS遺伝子は、適切なプロモーターの下で該宿主細胞に導入され得る。好ましい実施態様において、1種以上の欠失された遺伝子は、ストレプトマイセスファージphiBT1の染色体ファージ結合部位に導入され得る(Gregoryらの論文、2003)。当業者は、トランスでの補完は、このファージ結合部位、又は実際に、ある結合部位の使用に限定されないことを理解するであろう。従って、欠失された補助遺伝子の補完は、また、限定はされないが、1種以上の補助遺伝子を適切なプロモーターの下で、ストレプトマイセスファージphiC31に対する結合部位などの他のファージ結合部位中に、例えば、pSET152の誘導体を使用することによって導入することによりもたらされ得る(Biermanらの論文、1992)。当業者は、既知の更なるファージが存在すること、及びより多くのファージが、宿主菌株に遺伝子を導入するのに使用できる更なるシステムを作出するのに好適なプロモーターと一緒に送達ベクターに移入できる可能性のある組み込み機能を含むと予想できることを認識するであろう(Smovkinaらの論文、1990;Matsuuraらの論文、1996;Van Mellaertらの論文、1998;Leeらの論文、1991)。多くのファージが特徴付けられているので、同様に使用できる可能性のある更に利用可能なインテグラーゼが存在するはずであると予想される。適切なプロモーターの下でのポスト-PKS遺伝子の導入は、また、限定はされないが、染色体中の中性位置への相同組換え、染色体中の非中性位置への相同組換えによりもたらされ得る(例えば、選択された遺伝子を破壊するために)。自己複製ベクター、例えば、限定はされないがpSG5(例えば、pKC1139、Biermanらの論文、1992)、pIJ101(例えば、pIJ487、Kieserらの論文、2000)及びSCP2*(例えば、pIJ698、Kieserらの論文、2000)由来の複製のストレプトマイセス起源を含むベクターも使用できる。

10

20

【0176】

更なる実施態様において、1種以上のポスト-PKS遺伝子が前述のように欠失又は不活化されている操作された菌株は、これに、別のゲルダナマイシン産生株に由来する1種以上の同じポスト-PKS遺伝子又はそれらの相同体を再導入している。

30

【0177】

更なる実施態様において、1種以上の遺伝子が欠失又は不活化されている操作された菌株は、リファマイシン、アンサマイシン、マクベシン又はハービマイシンの生合成を指示するクラスターを含むが、これらに限定されるものではない、異種PKSクラスターに由来する1種以上のポスト-PKS遺伝子により補完される。

【0178】

ポスト-PKS遺伝子の選択的欠失又は不活化の方法は:

- (i) 関心対象の遺伝子の配列を基にした特定のオリゴをデザインし、PCRを使用して好適なゲルダナマイシン産生株から関心対象の遺伝子の内部断片を単離する工程;
- (ii) この断片を含むプラスミドを、同じ又は異なるのいずれかのゲルダナマイシン産生株へ組み込み、引き続き相同組換えし、これが標的化された遺伝子の破壊を生じる工程;
- (iii) こうして作出される菌株を、アンサマイシン類似体の生成に適した条件下で培養する工程:を含む。

40

【0179】

当業者は、同等の菌株が、例えば以下のような、先に説明された方法の代替方法を用い実現され得ることを理解するであろう:

- ・ 関心対象の遺伝子の相同体(類)を基にした縮重オリゴを、デザインすることができ(例えば、リファマイシン、マクベシン又はハービマイシン生合成クラスター及び/又はその他の利用できる配列から)、関心対象の遺伝子の内部断片は、PCRを使用して好適なゲルダナマイシン産生株から単離できる。ゲルダナマイシン産生株又はそれらの相同体を産生する菌株のポスト-PKS遺伝子又はその相同体の適切な領域をうまく増幅する様々な縮重オリ

50

ゴをデザインできる。

・ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌスNRRL3602株の遺伝子の配列を使用し、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌスNRRL3602の遺伝子に特異的である可能性のあるオリゴを作出し、その後この内部断片を、任意のゲルダナマイシン産生株、例えばストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌスNRRL3602又はストレプトマイセス種DSM4137又はストレプトマイセス・ピオラセウスニガーDSM40699から増幅することができる。

・ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌスNRRL3602株の遺伝子の配列を、相同遺伝子(例えば、ストレプトマイセス種DSM4137又はストレプトマイセス・ピオラセウスニガーDSM40699のゲルダナマイシン生合成クラスターに由来する)の配列と共に使用し、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌスNRRL3602の遺伝子への縮重オリゴを作出し、その後その内部断片を、任意のゲルダナマイシン産生株、例えばストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌスNRRL3602又はストレプトマイセス種DSM4137又はストレプトマイセス・ピオラセウスニガーDSM40699から増幅することができる。

10

【0180】

図2は、ゲルダナマイシン生合成クラスターにおけるポスト-PKS遺伝子の活性を示す。従って当業者は、関心対象の化合物(類)を生成する菌株に達するために、どの追加のポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されることが必要かを、確定することができるであろう。

【0181】

これらのシステムにおいて、不活化又は欠失を含む説明された方法の一つの結果として、1種以上のポスト-PKS遺伝子が機能しない菌株が作出される場合に、2種以上のアンサマイシン類似体が産生され得ることが観察される可能性がある。これに関して、当業者に理解される可能性のある理由が数多く存在する。例えば、ポスト-PKS工程の好ましい順番があり、並びにひとつの活性の除去は、すべての後続の工程が関連した酵素にとって天然でない基質上で実行されることにつながる。これは、ポスト-PKS酵素に提示された新規基質に対する効率が低下したために中間体が培養プロセス中で構築されること、又は恐らく工程の順番が変更されたために残りの酵素にとってもはや基質でない生成物へ短絡することにつながり得る。

20

【0182】

当業者は、混合物中に観察された化合物の比は、増殖条件の変化量を使用することにより操作することができることを理解するであろう。

30

【0183】

当業者は、生合成クラスターにおいて、一部の遺伝子は、オペロン内で組織化され、及びひとつの遺伝子の破壊は、同じオペロンの後続遺伝子の発現に対し作用を有することが多いことを理解するであろう。

【0184】

化合物の混合物が認められる場合に、これらは、その一部は下記実施例において説明されているような標準技術を用い、容易に分離することができる。

【0185】

アンサマイシン類似体は、本明細書に説明された多くの方法によりスクリーニングされてよく、並びに単独の化合物が良好なプロファイルを示す状況において、菌株は、好ましくはこの化合物を生成するように操作することができる。これが不可能である通常でない状況においては中間体が生成され、これは次に所望の化合物を生成するように生体内変換される。

40

【0186】

本発明は、アンサマイシンポリケチド又はその類似体、例えばゲルダナマイシン又はその類似体を産生する菌株を培養することによって作出される新規アンサマイシン類似体を提供し、該菌株は、任意に、PKS遺伝子クラスターからの1種以上のポスト-PKS遺伝子の選択された欠失又は不活化を有し、スターターユニットとして取り込むための酸供給材料を

50

提供する。特に本発明は、非天然のスターターユニットを、ゲルダナマイシンPKS遺伝子クラスターからの1種以上のポスト-PKS遺伝子の選択された欠失又は不活化と任意に組合せたゲルダナマイシン産生株へ供給することによって生成される新規アンサマイシン類似体に関する。加えて、アンサマイシン生合成クラスターからの1種以上のポスト-PKS遺伝子を再導入できる。

【0187】

当業者は、遺伝子は遺伝子産物が非-機能性とされるために完全に欠失されることは必要ではないこと、結果的に本明細書において使用される用語「欠失又は不活化された」は、以下を含むが、これらに限定されるものではない、遺伝子産物が非-機能性とされる任意の方法を包含することを理解するであろう：遺伝子のそれ全体の欠失、遺伝子の一部の欠失、標的遺伝子への挿入による不活化、発現されないか又は不活性タンパク質を生じるように発現されるかのいずれかの遺伝子を生じる部位特異的変異誘発、発現されないか又は不活性タンパク質を生じるように発現されるかのいずれかの遺伝子を生じる宿主菌株の変異誘発(例えば、放射線又は変異誘発性化学物質への曝露、プロトプラスト融合又はトランスポゾン変異誘発による)。あるいは活性遺伝子産物の機能は、阻害剤により化学的に損なうことができ、例えばメタピロン(metapyrone)(2-メチル-1,2-ジ(3-ピリジル-1-プロパノン)の別名、EP 0 627 009)及びアンシミドールは、オキシゲナーゼの阻害剤であり、並びにこれらの化合物は、類似体を生成するために生産培地に添加することができる。加えてシネフンギンは、同様にしかしメチル基転移酵素活性の阻害のためにはインビボで

【0188】

代替的实施態様において、すべてのポスト-PKS遺伝子は、欠失又は不活化されてよく、その後1種以上のこれらの遺伝子は、補完により(例えば、自己-複製プラスミド上の結合部位で、又は染色体の相同領域への挿入により)再度導入されてよい。従って、特定の实施態様において、本発明は：

- a)適切な条件下で培養した場合に、ゲルダナマイシンを生成する第一の宿主菌株を提供する工程；
- b)任意に、すべてのポスト-PKS遺伝子を選択的に欠失又は不活化する工程；
- c)前記菌株へ非天然のスターターユニットを供給する工程；
- d)前記修飾された宿主菌株を、アンサマイシン類似体の生成に適した条件下で培養する工程；及び
- e)任意に、生成された化合物を単離する工程：を含む、アンサマイシン類似体(例えば、18,21-ジデスオキシアンサマイシン類似体)の製造方法に関する。

【0189】

代替的实施態様において、1種以上の欠失されたポスト-PKS遺伝子が再導入される。更なる实施態様において、異なる産生微生物に由来するゲルダナマイシンクラスターからの1種以上のポスト-PKS遺伝子が再導入される。更なる实施態様において、マクベシン生合成クラスターから選択される1種以上のポスト-PKS遺伝子が導入され、mbcM、mbcN、mbcP、mbcMT1、mbcMT2及びmbcP450からなる群が再導入される。更なる实施態様において、mbcM、mbcN、mbcP、mbcMT1、mbcMT2及びmbcP450からなる群から選択される2種以上のポスト-PKS遺伝子が、再導入される。更なる实施態様において、mbcM、mbcN、mbcP、mbcMT1、mbcMT2及びmbcP450からなる群から選択される3種以上のポスト-PKS遺伝子が、再導入される。更なる实施態様において、mbcM、mbcN、mbcP、mbcMT1、mbcMT2及びmbcP450からなる群から選択される4種以上のポスト-PKS遺伝子が、再導入される。更に別の实施態様において、mbcM、mbcN、mbcP、mbcMT1、mbcMT2及びmbcP450からなる群から選択される5種以上のポスト-PKS遺伝子が、再導入される。

【0190】

加えて、ポスト-PKS遺伝子の部分集合は、欠失又は不活化されてよく、並びに任意に該ポスト-PKS遺伝子のより小さい部分集合は、非天然のスターターユニットが供給された場

合に、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体などのアンサマイシン類似体を生成する菌株に達するように再導入されてよいことは当業者に明らかである。

【0191】

従って、好ましい実施態様において、本発明は：

- a)適切な条件下で培養した場合に、ゲルダナマイシンを生成する第一の宿主菌株を提供する工程；
- b)gdmMを選択的に欠失又は不活化する工程；
- c)前記菌株へ非天然のスターターユニットを供給する工程；
- d)前記修飾された宿主菌株をアンサマイシン類似体(例えば、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体)の生成に適した条件下で培養する工程；及び
- e)任意に、生成された化合物を単離する工程：を含む、アンサマイシン類似体(例えば、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体)の製造方法に関する。

10

【0192】

更に好ましい実施態様において、本発明は：

- a)適切な条件下で培養した場合に、ゲルダナマイシンを生成する第一の宿主菌株を提供する工程；
- b)gdmMを選択的に欠失又は不活化する工程；
- c)任意に、更にポスト-PKS遺伝子を選択的に欠失又は不活化する工程；d)前記菌株へ非天然のスターターユニットを供給する工程；
- e)前記修飾された宿主菌株をアンサマイシン類似体(例えば、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体)の生成に適した条件下で培養する工程；及び
- f)任意に、生成された化合物を単離する工程：を含む、アンサマイシン類似体(例えば、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体)の製造方法に関する。

20

【0193】

ポリケチド遺伝子クラスターは、異種宿主において発現され得ることは当業者に周知である(Pfeifer及びKhoslaの論文、2001)。従って、本発明は、耐性遺伝子及び制御遺伝子を伴い又は伴わずに、そうでなければ完全な欠失又は欠失を含むかのいずれかの、アンサマイシンポリケチド生合成クラスター、例えばゲルダナマイシン生合成遺伝子クラスターの異種宿主への移入を含む。あるいは、完全なアンサマイシンポリケチド生合成クラスター、例えば完全なゲルダナマイシン生合成クラスターは、耐性遺伝子及び制御遺伝子を伴う又は伴わずに、異種宿主に移入することができ、その後これは、1種以上のポスト-PKS遺伝子又はスターターユニット生合成遺伝子を欠失又は不活化するために本明細書中に説明された方法により操作することができる。そのようなDNAの大きい断片の先に定義されたような移入のための方法及びベクターは、当該技術分野において周知であるか(Rawlingsの論文,2001;Staunton及びWeissmanの論文,2001)、又は開示された方法で本明細書において提示される。この状況において、好ましい宿主細胞株は、原核細胞であり、より好ましくは放線菌又は大腸菌であり、更により好ましくは、アクチノシンネマ・ミルム(*A.mirum*)、アクチノシンネマ・プレチオスム亜種プレチオスム(*A.pretiosum*)、*S.ハイグロスコピカス*、*S.ハイグロスコピカス*種、*S.ハイグロスコピカス*変種(var.)アスコマイセチカス、ストレプトマイセス・ツクバエンシス、ストレプトマイセス・ピオラセウスニガー(*streptomyces violaceusniger*)、ストレプトマイセス・コエリカラー、ストレプトマイセス・リビダンス、サッカロポリスボラ・エリスラエラ、ストレプトマイセス・フラディアエ、ストレプトマイセス・アベルミティリス、ストレプトマイセス・シンナモネンシス、ストレプトマイセス・リモーサス、ストレプトマイセス・アルプス、ストレプトマイセス・グリセオフュスカス、ストレプトマイセス・ロンギスボロフラバス、ストレプトマイセス・ベネズエラエ、ストレプトマイセス・アルプス、ミクロモノスボラ(*Micromonospora*)種、ミクロモノスボラ・グリセオルビダ、アミコラトプシス・メディテラネイ(*Amycolatopsis mediterranei*)、又はアクチノブラネス種N902-109を含むが、これらに限定されるものではない。

30

40

【0194】

50

ひとつの実施態様において、生合成クラスター全体が移入される。別の実施態様において、PKS全体が、関連したスターターユニット生合成遺伝子及び/又はポスト-PKS遺伝子のいずれかを伴わずに、移入される。

【0195】

更なる実施態様において、ゲルダナマイシン生合成クラスターの全体が、移入され、その後本明細書の説明に従い操作される。

【0196】

更なる実施態様において、PKS全体が、関連したスターターユニット生合成遺伝子及び/又はポスト-PKS遺伝子のいずれかを伴わずに移入され、選択されたポスト-PKS遺伝子、例えば限定はされないが、gdmN、mbcN、hbmN、gdmL及び/又はmbcP450が、新たな宿主に導入される。

【0197】

別の本発明の態様において、本発明のアンサマイシン類似体(類)は、更に好適な菌株との生体内変換によりプロセッシングされる。好適な菌株は、例えばアクチノシンネマ・ミルム、アクチノシンネマ・プレチオスム亜種プレチオスム、S.ハイグロスコピカス、S.ハイグロスコピカス種、ストレプトマイセス・ピオラセウスニガーなどであるが、これらに限定されるものではない利用可能な野生型菌株のいずれかである。あるいは好適な菌株は、特定のポスト-PKS酵素、例えば非限定的に、mbcM、mbcN、mbcP、mbcMT2、mbcP450(本明細書で定義される)、gdmN、gdmM、gdmL、gdmPによりコードされた酵素(Rascherらの論文、2003)、ゲルダナマイシンO-メチル基転移酵素、hbmN、hbmL、hbmPによりコードされた酵素(Rascherらの論文、2005)、ハービマイシンO-メチル基転移酵素及び更にハービマイシンモノ-オキシゲナーゼ、asm7、asm10、asm11、asm12、asm19及びasm21によりコードされた酵素(Cassadyらの論文、2004;Spitellerらの論文、2003)などにより、生体内変換が可能ないように操作されてよい。遺伝子が依然同定されていないか又は配列がパブリックドメインにない場合は、そのような配列を常法により獲得することは当業者にとって慣習である。例えば、ゲルダナマイシンO-メチル基転移酵素をコードしている遺伝子の配列は、パブリックドメインにはないが、当業者は、同様のO-メチル基転移酵素を使用する異種プローブ、又は入手可能な相同遺伝子から縮重プライマーをデザインすることによる相同プローブのいずれかのプローブを作出し、ゲルダナマイシン産生株においてサザンブロットを実行し、その結果生体内変換システムを生じるためにこの遺伝子を獲得することができる。

【0198】

特定の実施態様において、本菌株は、その未変性のポリケチドクラスターにより産生されたポリケチド産生を妨害するために、全体的もしくは一部のいずれかが欠失された、又はそうでなければ不活化された、該未変性のポリケチドクラスターを1種以上有することができる。該操作された菌株は、例えば、アクチノシンネマ・ミルム、アクチノシンネマ・プレチオスム亜種プレチオスム、S.ハイグロスコピカス、S.ハイグロスコピカス種、S.ハイグロスコピカス変種アスコマイセチカス、ストレプトマイセス・ツクバエンシス、ストレプトマイセス・ピオラセウスニガー、ストレプトマイセス・コエリカラー、ストレプトマイセス・リビダンス、サッカロポリスボラ・エリスラエラ、ストレプトマイセス・フラディアエ、ストレプトマイセス・アベルミティリス、ストレプトマイセス・シンナモネンシス、ストレプトマイセス・リモーサス、ストレプトマイセス・アルプス、ストレプトマイセス・グリセオフュスカス、ストレプトマイセス・ロンギスポロフラバス、ストレプトマイセス・ベネズエラエ、ミクロモノスボラ種、ミクロモノスボラ・グリセオルビダ、アミコラトプシス・メディテラネイ、又はアクチノブラネス種N902-109を含むが、これらに限定されるものではない群から選択されてよい。

【0199】

他のアンサマイシンポリケチド生合成クラスター、例えばハービマイシン、レブラスタチン又はTANクラスターを、本発明の化合物を作出するのに等しく使用できる可能性があることを、当業者は認識するであろう。

【0200】

10

20

30

40

50

ハービマイシン産生株、例えば限定はされないが、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカスAM3672(Rascherらの論文、2005)、又はハービマイシン類似体を生成する菌株、例えば限定はされないが1種以上のポスト-PKS遺伝子又はスターターユニット生合成遺伝子が失活又は欠失され、任意に1種以上の相同又は異種ポスト-PKS遺伝子が再導入され、本明細書に記載のスターター酸を供給された、操作されたストレプトマイセス・ハイグロスコピカスAM-3672を使用することによって。ハービマイシンPKSクラスターの配列は、ジーンバンクに寄託されている(寄託番号AY947889)(Rascherらの論文、2005)。この配列中に位置していない遺伝子が要求される場合、それらは、本明細書に記載の相同配列を使用する縮重オリゴをデザインすることにより作出される相同又は異種プローブを使用して配置される。

10

【0201】

レブラスタチン産生株、例えば限定はされないがストレプトマイセス種S6699(Steadらの論文、2000)、又はレブラスタチン類似体を産生する菌株、例えば限定はされないがその1種以上のポスト-PKS遺伝子又はスターターユニット生合成遺伝子が不活化又は欠失され、任意に1種以上の相同又は異種ポスト-PKS遺伝子が再導入され、本明細書に記載のスターター酸を供給された、操作されたストレプトマイセス種S6699を使用することによって、レブラスタチンクラスターを、本発明の化合物を作出するのに等しく使用できる可能性があることを、当業者は認識するであろう。

【0202】

当業者は、本発明の方法を適用すると、本発明の化合物を製造するのに使用できる天然物を生成する複数の更なる菌株が存在することを認識するであろう。

20

【0203】

先に説明されたような本発明のアンサマイシン類似体の調製プロセスは、実質的に又は全体が生合成によるが、標準の合成化学法を含むプロセスにより、本発明のアンサマイシン類似体を生成又は相互変換することを排除するものではない。

【0204】

ゲルダナマイシンPKS遺伝子クラスターの遺伝子操作を可能にするために、ジーンバンクに寄託された遺伝子クラスター配列(アクセッション番号AY179507)を使用した(Rascherらの論文、2003)。この配列中に配置されていない遺伝子が要求される場合、それらは、本明細書に記載の相同配列を使用する縮重オリゴをデザインすることにより作出される相同又は異種プローブを使用して配置される。

30

【0205】

マクベシンクラスターのポスト-PKS遺伝子を使用するために、マクベシン遺伝子クラスターが、実施例1に記載されるアクチノシンネマ・プレチオスム亜種プレチオスムから配列決定されたが、当業者は、例えば非限定的にアクチノシンネマ・ミルムなどの、マクベシンを生成する代替の菌株が存在することを理解するであろう。これらの菌株由来のマクベシンPKS遺伝子クラスターは、アクチノシンネマ・プレチオスム亜種プレチオスムについて本明細書において説明されたように配列決定されてよく、その情報を使用して、同等の菌株を作出する。

【0206】

本発明の更なる態様は、以下を含む：

-gdmM相同体及び任意に更にポスト-PKS遺伝子が欠失もしくは不活化されているアンサマイシン産生株(例えば、ゲルダナマイシン又はハービマイシン(例えば、ハービマイシンA、B又はC)産生株)を基にした操作された菌株、特にgdmM相同体が欠失又は不活化されるように操作された菌株。好適にはアンサマイシン産生株は、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌスNRRL3602又はストレプトマイセス種DSM4137又はストレプトマイセス・ピオラセウスニガーDSM40699などのストレプトマイセス科放線菌である。

-1種以上のスターターユニット生合成遺伝子が欠失もしくは不活化されているアンサマイシン産生株、例えばgdmOが欠失又は不活化されているゲルダナマイシン産生株、又は例えばhbmOが欠失又は不活化されているハービマイシン産生株を基にした操作された菌株。

50

-gdmM又はその相同体、及び1種以上のスターターユニット生合成遺伝子、及び任意に更にポスト-PKS遺伝子が欠失又は不活化されているアンサマイシン産生株(例えば、ゲルダナマイシン又はハービマイシン産生株)を基にして操作された菌株。例えば、ゲルダナマイシン産生株、S. ハイグロスコピカスAM3602(又は他の菌株中の相同体)中のahba-Bクラスターの全遺伝子は、欠失又は不活化されていてもよい。別法として、ゲルダナマイシン産生株、S. ハイグロスコピカスAM3602(又は他の菌株中の相同体)中のahba-Bクラスターのいくつかは、欠失又は不活化されていてもよく、そのことは、AHBAの生合成が低減又は排除されている菌株を生じ、このことは、このような菌株へAHBAを供給することがゲルダナマイシン又は他のアンサマイシンの良好な生成を保持する場合に実験によって確認できる。

- アンサマイシン類似体(例えば、18,21-ジデスオキシ-アンサマイシン類似体)の調製におけるこのような操作された菌株の使用。

- 前述の方法の任意のものによって得られた又は得ることのできるアンサマイシン類似体。

【0207】

本発明の化合物は、次の特性の1種以上を有することを期待することができる点が利点である:Hsp90への強い結合、Hsp90への結合の迅速なオンレート(on-rate)、良好な溶解度、良好な安定性、良好な製剤能、良好な経口での生物学的利用能、良好な薬物動態特性(低いグルクロン酸化、良好な細胞内取り込み、良好な脳内薬物動態、赤血球への低い結合を含むが、これらに限定されない)、良好な毒性学的プロファイル、良好な肝毒性プロファイル、良好な腎毒性プロファイル、低い副作用及び低い心臓副作用。

【実施例】

【0208】

(実施例)

(全般的方法)

(培地1-MAM)

蒸留水1L中:

【表1】

コムギデンプン	10g
トウモロコシ浸漬固形物	2.5g
酵母エキス	3g
CaCO ₃	3g
硫酸鉄	0.3g
寒天	20g

121 のオートクレーブで20分間滅菌。

(培地2-R6)

700mLの蒸留水に対して

【表 2】

シヨ糖	200g
粉末デキストリン	10g
カサミノ酸	1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05g
*微量元素	1mL
K ₂ SO ₄	0.1g
寒天	20g

10

*微量元素は、それぞれ1g/LのFeSO₄·7H₂O、MnCl₂·4H₂O及びZnSO₄·7H₂O

121 のオートクレーブで20分間滅菌。

滅菌に続いて次の滅菌溶液を添加(注、グルタミン酸は濾過滅菌)

【表 3】

L-グルタミン酸モノナトリウム塩(0.65M)	100mL
CaCl ₂ ·2H ₂ O (0.48M)	100mL
MOPS (pH7.2) (0.1M)	100mL

20

【0209】

(LCMS分析のための培養ブrossの抽出)

培養ブross(1mL)及び酢酸エチル(1mL)を、15～30分間激しく混合し、引き続き10分間遠心分離した。有機層0.5mLを収集し、蒸発乾固させ、その後メタノール0.25mLに再溶解した。

【0210】

(LCMS分析手順)

30

分析的LCMSを、陽イオン及び/又は陰イオンモードで操作するBruker Daltonics Esquire 3000+エレクトロスプレー式質量分析計と組合せたAgilent HP1100 HPLCシステム上で、LCMS法1を用いて行った。LCMS法1:クロマトグラフィーは、Phenomenex Hypercloneカラム(C₁₈ BDS、粒子サイズ3μm、150×4.6mm)上で、下記勾配溶出プロセスを使用し、流量1mL/分で溶出し、実行した:T=0、10%B;T=2、10%B;T=20、100%B;T=22、100%B;T=22.05、10%B;T=25、10%B。移動相A=水+0.1%ギ酸;移動相B=アセトニトリル+0.1%ギ酸。UVスペクトルは、190と400nmの間で記録し、抽出されたクロマトグラムは、210、254及び276nmで採取した。質量スペクトルは、100及び1500amuの間で記録した。

【0211】

(NMR構造解析法)

40

NMRスペクトルは、Bruker Advance 500分光計において、¹H及び¹³Cについて各々、500MHz及び125MHzで操作し、298Kで記録した。標準Brukerパルス配列を用い、¹H-¹H COSY、APT、HMBC及びHMQCスペクトルを獲得した。NMRスペクトルを、その中にそれらを実行した溶媒の残存プロトン又は標準カーボンシグナルに対し参照した。

【0212】

(化合物純度の評価)

精製した化合物を、説明したLCMS法2を用いて分析した。LCMS法2:クロマトグラフィーは、Phenomenex Hyperclone C₁₈-BDSカラム(4.6×150mm、粒子サイズ3μm)上で、水+0.1%ギ酸:アセトニトリル+0.1%ギ酸、(90:10)～(0:100)の勾配で、1mL/分で20分間かけて溶出し、実行した。純度は、MSにより、複数の波長(210、254及び276nm)で評価した。すべて

50

の化合物は、すべての波長で純度 > 95%であった。純度は、 ^1H 及び ^{13}C NMRスペクトルの検証により最終的に確認した。

【 0 2 1 3 】

(抗癌活性のインビトロバイオアッセイ)

単層増殖アッセイでのヒト腫瘍細胞株のパネルにおける抗癌活性について、化合物のインビトロ評価を、Oncotest社のInstitute for Experimental OncologyのOncotest Testing Facility(Freiburg)において行った。選択された細胞株の特徴を、表1にまとめた。

【 0 2 1 4 】

【表 4】

10

表1- 試験細胞株

#	細胞株	特徴
1	CNXF 498NL	CNS
2	CXF HT29	結腸
3	LXF 1121L	肺、大細胞癌
4	MCF-7	乳房、NCIスタンダード
5	MEXF 394NL	メラノーマ
6	DU145	前立腺- PTEN 陽性

20

【 0 2 1 5 】

Oncotest細胞株は、Rothらの論文(1999)に説明されたように、ヒト腫瘍異種移植片から確立した。ドナー異種移植片の起源は、Fiebigらの論文(1999)に説明されている。他の細胞株は、NCI(DU145、MCF-7)から入手したか、又はDSMZ(Braunschweig, 独国)から購入したかのいずれかであった。

【 0 2 1 6 】

別に指定しない限りは、すべての細胞株は、RPMI 1640培地、10%ウシ胎仔血清、及び0.1mg/mLゲンタマイシン(PAA, Colbe, 独国)を含有する「ready-mix」培地において、加湿した大気(95%空気、5%CO₂)中で、37℃で増殖した。

30

【 0 2 1 7 】

改変ヨウ化プロピジウムアッセイを用い、試験化合物(類)のヒト腫瘍細胞株の増殖に対する作用を評価した(Denglerらの論文、(1995))。

【 0 2 1 8 】

簡単に述べると、細胞を、トリプシン処理により対数期培養物から収穫し、カウントし、96ウェル平底マイクロタイタープレートに細胞株に応じた細胞密度(5~10,000個生存細胞/ウェル)で播種した。24時間後、細胞を対数増殖を再開するために回収し、培養培地(6対照ウェル/プレート)又はアンサマイシン類似体含有する培養培地の0.010mLを、これらのウェルに添加した。各濃度は、3つ組で播種した。化合物を、5種の濃度(100;10;1;0.1及び0.01 µM)で適用した。4日間連続曝露後、試験化合物を伴う又は伴わない、細胞培養培地を、ヨウ化プロピジウム(PI)水溶液(7mg/L)0.2mLにより交換した。生存細胞の割合を測定するために、これらのプレートを凍結することにより、細胞を透過性とすることができる。これらのプレートを解凍後、Cytofluor 4000マイクロプレートリーダー(励起530nm、発光620nm)を用い蛍光を測定し、生存細胞の総数に対する直接相関を得た。

40

【 0 2 1 9 】

増殖阻害は、処置/対照 × 100(%T/C)として表した。

【 0 2 2 0 】

(実施例1 マクベシンPKS遺伝子クラスターの配列決定)

50

ゲノムDNAを、Kieserらの論文(2000)に説明された標準プロトコルを用い、アクチノシンネマ・プレチオスム(ATCC 31280)及びアクチノシンネマ・ミルム(DSM 43827, ATCC 29888)から単離した。DNA配列決定を、標準手順を用い、ケンブリッジ大学の生化学部門(Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QW)のシーケンシング施設により行った。

【0221】

プライマー-BIOSG104 5'-GGTCTAGAGGTCAAGTCCCCCGGTACCGTCGT-3' (配列番号:1)、及び BIOSG105 5'-GGCATATGCTTGTGCTCGGGCTCAAC-3' (配列番号:2)を利用し、標準技術を用い、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカスNRRL 3602(配列のアクセッション番号:AY179507)のゲルダナマイシン生合成遺伝子クラスターからのカルバモイル基転移酵素をコードしている遺伝子gdmNを増幅した。サザンブロット実験を、DIG試薬及び「非放射性核酸標識及び検出キット」を製造業者(Roche)の指示に従って用いて行った。DIG-標識したgdmN DNA断片を、異種プローブとして使用した。gdmN作出されたプローブ及びA.プレチオスム2112から単離されたゲノムDNAを用い、サザンブロット分析において、およそ8kb EcoRI断片を同定した。この断片を、標準手順を適用し、Litmus 28ヘクローニングし、並びに形質転換体を、コロニーハイブリダイゼーションにより同定した。クローンp3を単離し、およそ7.7kb挿入断片を、配列決定した。クローンp3から単離されたDNAは、EcoRI及びEcoRI/SacIで消化し、各々およそ7.7kb及び約1.2kbのバンドを単離した。標識反応を、製造業者のプロトコルに従い行った。先に名前を挙げた2種の菌株のコスミドライブラリーを、ベクター-SuperCos 1及びGigapack III XLパッケージングキット(Stratagene)を製造業者の指示に従い用いて作製した。これら2種のライブラリーは、標準プロトコルを用いてスクリーニングし、及びプローブとして、クローンp3由来の7.7kb EcoRI断片のDIG-標識断片を使用した。コスミド52は、A.プレチオスムのコスミドライブラリーから同定し、配列決定のためにケンブリッジ大学の生化学部門のシーケンシング施設へ送付した。同様に、コスミド43及びコスミド46を、A.ミルムのコスミドライブラリーから同定した。サザンブロット分析により示されるように、3種のコスミドすべてが、7.7kb EcoRI断片を含んだ。

【0222】

標準プロトコルを適用し、コスミド43のPKS領域のおよそ0.7kbp断片を、プライマー-BIOSG124 5'-CCCGCCCGCGCGAGCGGCGGTGGCCGCCGAGGGC-3' (配列番号:3)及びBIOSG125 5'-GCGTCTCGCGCAGCCACGCCACCAGCAGCTCCAGC-3' (配列番号:4)を用いて増幅し、クローニングし、重複クローンに関するA.プレチオスムコスミドライブラリーのスクリーニングのためのプローブとして使用した。コスミド52の配列情報も、プライマー-BIOSG130 5'-CCAACCCCGCCGCGTCCCCGGCCGCGCCGAACACG-3' (配列番号:5)及びBIOSG131 5'-GTCGTCGGCTACGGGCCGGTGGGGCAGCTGCTGT-5' (配列番号:6)、それに加えてBIOSG132 5'-GTCGGTGGACTGCCCTGCGCCTGATCGCCCTGCGC-3' (配列番号:7)及びBIOSG133 5'-GGCCGGTGGTGCTGCCCCGAGGACGGGGAGCTGCGG-3' (配列番号:8)により増幅されたDNA断片由来のプローブの作製のために使用し、これをA.プレチオスムのコスミドライブラリーのスクリーニングのために使用した。コスミド311及び352は単離し、並びにコスミド352は、配列決定のために送付した。コスミド352は、コスミド52とのほぼ2.7kbの重複を含む。更なるコスミドのスクリーニングのために、ほぼ0.6kb PCR断片を、標準プロトコルを適用し、プライマー-BIOSG136 5'-CACCGCTCGCGGGGTGGCGCGGCGCACGACGTGGCTGC-3' (配列番号:9)及びBIOSG 137 5'-CCTCCTCGGACAGCGCGATCAGCGCCGCGCACAGCGAG-3' (配列番号:10)及び鋳型としてコスミド311を用いて増幅した。A.プレチオスムのコスミドライブラリーをスクリーニングし、かつコスミド410を単離した。これは、コスミド352とほぼ17kb重複し、配列決定のために送付した。これら3種の重複コスミド(コスミド52、コスミド352及びコスミド410)の配列をまとめた。配列決定された領域は、約100kbpに広がり、マクベシン生合成遺伝子クラスターを構築する可能性のある23個のオープンリーディングフレームが同定された。配列番号:11における各オープンリーディングフレームの位置は、表3に示している。

【0223】

【 表 5 】

表2-コスミドのまとめ

コスミド	菌株
コスミド43	アクチノシンネマ・ミルムATCC 29888
コスミド46	アクチノシンネマ・ミルムATCC 29888
コスミド52	アクチノシンネマ・プレチオスム ATCC 31280
コスミド311	アクチノシンネマ・プレチオスム ATCC 31280
コスミド352	アクチノシンネマ・プレチオスム ATCC 31280
コスミド410	アクチノシンネマ・プレチオスム ATCC 31280

10

【 0 2 2 4 】

【表 6】

表3-ポスト-PKS遺伝子及びスターターユニット生合成遺伝子に関する
各オープンリーディングフレームの位置

配列番号 11での ヌクレオチド位置	遺伝子名	コードされた タンパク質の機能
14925-17909*	<i>mbcRll</i>	転写制御因子
18025-19074c	<i>mbcO</i>	アミノヒドロキナ酸合成酵素
19263-20066c*	<i>mbc?</i>	不明、AHBA 生合成
20330-40657	<i>mbcAl</i>	PKS
40654-50859	<i>mbcAll</i>	PKS
50867-62491*	<i>mbcAIII</i>	PKS
62500-63276*	<i>mbcF</i>	アミド合成酵素
63281-64852*	<i>mbcM</i>	C21モノオキシゲナーゼ
64899-65696c*	<i>PH</i>	ホスファターゼ
65693-66853c*	<i>OX</i>	酸化還元酵素
66891-68057c*	<i>Ahs</i>	AHBA 合成酵素
68301-68732*	<i>Adh</i>	ADHQ 脱水酵素
68690-69661c*	<i>AHk</i>	AHBA キナーゼ
70185-72194c*	<i>mbcN</i>	カルバモイル基転移酵素
72248-73339c	<i>mbcH</i>	メトキシマロニルACP経路
73336-74493c	<i>mbcI</i>	メトキシマロニルACP経路
74490-74765c	<i>mbcJ</i>	メトキシマロニルACP経路
74762-75628c*	<i>mbcK</i>	メトキシマロニルACP経路
75881-76537	<i>mbcG</i>	メトキシマロニルACP経路
76534-77802*	<i>mbcP</i>	C4,5モノオキシゲナーゼ
77831-79054*	<i>mbcP450</i>	P450
79119-79934*	<i>mbcMT1</i>	O-メチル基転移酵素
79931-80716*	<i>mbcMT2</i>	O-メチル基転移酵素

【0225】

[注記1:cは、遺伝子がDNA相補鎖によりコードされていることを示す;注記2:時々、2種以上の可能性のある開始コドンの候補が同定される場合がある。当業者は、これを認め、かつ別の可能性のある開始コドンと同定することができるであろう。本発明者らは、2種以上の可能性のある開始コドンを有する遺伝子を同定し、印「*」を付けた。本発明者らが開始コドンであると考えたものをすべて示したが、当業者は、別の開始コドンを用い、活性タンパク質を作出することが可能であることを理解するであろう。]

【0226】

(実施例2 gdmM不活化菌株の作出)

gdmMのインフレーム欠失は次のように実施される。

(2.1 gdmMの上流フランキング領域に相同なDNAのクローニング)

オリゴgdm1for(配列番号:12)及びgdm1rev(配列番号:13)を用い、標準PCR反応において、鋳型としてのゲノム及びPfu DNAのポリメラーゼを使用し、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌス(NRRL3602)由来のDNAの2268bp領域を増幅する。各オリゴにおける5'伸長は、増幅断片のクローニングを補助するための制限部位を導入する。PCR産物(PCRgdm1)は、gdmMの最初の2アミノ酸を含むまでgdmMの上流相同領域を含んでいる。この2268bp断片を、SmaIで直線化したpUC18へクローニングし、脱ホスホリル化してpUC18gdm1を得る。

【化 3 3】

gdm1 for TTAAGCTTGGACCGGCGCGAACTCGCGGACACCCACCT
 *Hind*III

HindIII

(配列番号 12)

gdm1 rev TTTCTAGAGGTCATGCGCCCGCCAGGATCAGGTCGACC
 XbaI

XbaI

(配列番号 13)

プラスミドpUC18gdm1は、439p、1687bp及び2828bpの3つの断片を与えるNdeI及びSmaIを用いる制限酵素消化により同定される。

【 0 2 2 7 】

(2.2 gdmMの下流フランキンク領域に相同なDNAのクローニング)

オリゴgdm2for(配列番号:14)及びgdm2rev(配列番号:15)を用い、標準PCR反応において、鋳型としてのゲノム及びPfu DNAポリメラーゼを使用し、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌス(NRRL3602)由来のDNAの2267bp領域を増幅する。5'伸長を、各オリゴにおいてデザインし、増幅断片のクローニングを補助するための制限部位を導入する。増幅されたPCR産物(PCRgdm2)は、gdmMの最後の2つのアミノ酸からの領域、停止コドン及びgdmMの下流相同領域を含んでいる。この2267bp断片を、SmaIで直線化したpUC18へクローニングし、プラスミドpUC18gdm2を得る。

【化 3 4】

gdm2 for TTTCTAGACCTTCGTAAGGCTCCCTGCCTGGGCATGG
XbaI

XbaI

(配列番号 14)

gdm2 rev TTGAATTCTCTGCTCGGCTACGGCTTCGGCGACGAGTA
 EcoRI

EcoRI

(配列番号 15)

プラスミドpUC18gdm2は、440bp、1594bp及び2919bpの3つの断片を与えるNdeI及びSmaIを用いる制限酵素消化により同定される。

【 0 2 2 8 】

(2.3 qdmMのインフレーム欠失をもたらすためのプラスミドの作出)

産生物PCRgdm1及びPCRgdm2は、pKC1139へ次のようにクローニングされる。pKC1139は、HindIII及びEcoRIで消化され、作出された骨格断片は、HindIII/XbaI断片上でPCRgdm1と、XbaI/EcoRI断片上でPCRgdm2と単一の3部分連結で連結される。制限酵素消化を使用して、最終プラスミドpKC1139gdm1gdm2を確認する。

【 0 2 2 9 】

(2.4 ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌス(NRRL3602)の形質転換及

びgdmM欠失変異株の選択)

プラスミドpUZ8002を連結している大腸菌ET12567を、電気穿孔法により、pKC1139gdm1gdm2で形質転換し、接合のための大腸菌ドナー株を作出する。この菌株を使用し、標準的方法を使用する接合により、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌス(NRRL3602)を形質転換する(Kieserらの論文、(2000)Practical Streptomyces Genetics)。接合完了体(exconjugant)を、培地2上に播種し、28℃でインキュベートする。24時間後、プレートに50mg/Lアブラマイシン及び25mg/Lナリジクス酸を積層する。pKC1139を基にしたベクターは28℃で自己複製するので、形質転換体は、自己複製プラスミドとしてpKC1139gdm1gdm2を含むと予想される。4~7日後、コロニーを、アブラマイシン(50mg/L)及びナリジクス酸(25mg/L)を含む培地2のプレート上にパッチする。次いで、該プレートを37℃で3~4日間インキュベートする-温度の上昇は、pKC1139を基にした遊離プラスミドの複製を停止し、37℃で機能せず、従ってアブラマイシンでの選択を継続したレプリコンは、相同領域の1つを介する染色体への組込みを選択する。次いで、コロニーを、アブラマイシン及びナリジクス酸を含む培地2のプレート上に再パッチし、37℃で3~4日間インキュベートして、大腸菌細胞が更に継代されないことを確実にする。

【0230】

(二次組換体のための継代培養)

更なる3~4日間のインキュベーションの後、抗生物質を含まない培地2のプレートを使用して、継代培養工程を実施する。これを行うため、各パッチから材料を剥がし取り、培地2の寒天プレート上に播種し、良好な増殖が認められるまで、典型的には3日目に37℃でインキュベートする。同一技術を使用して、第二、第三及び第四回目の継代培養工程を実施する。第四回目の継代培養工程は、孢子形成を可能にするため28℃でインキュベートされる。数日後(典型的には7~10日)に孢子形成が認められたなら、孢子懸濁液を分離し、標準的技術を使用して希釈系列を実施する。希釈系列のアリコート培地1のプレート上に拡げ、コロニーが認められるまで28℃でインキュベートする。単一コロニーを拾い、アブラマイシンを含む又は含まない培地1のプレート上に同時にパッチする。

【0231】

抗生物質のないプレート上で増殖するが、アブラマイシンのプレート上で増殖しないパッチを、+/-アブラマイシンプレート上に再パッチし、抗生物質マーカーの欠失を確認する。変異株は、543個のアミノ酸のインフレーム欠失を伴う不活化GdmMタンパク質をコードしている。

【0232】

gdmM欠失変異株を、培地1上にパッチし、28℃で4日間増殖させる。各パッチからの6mmの円形プラグを用い、10mLの種培地(リットル当たり;グルコース40g、ビート糖蜜10g、酵母エキス2.5g、ペプトン2.5g、トリプトン2.5g、オートミール5g)を含む個別の50mLファルコンチューブに接種する。これらの種培養物を、振り1インチ(2.54cm)の300rpmで、28℃で36~72時間インキュベートする。その後これらを用い、生産培地(種培地と同じ)に接種(10mLに0.5mL)し、28℃で6日間増殖する。二次代謝産物を抽出し、LCMCを用い、全般的な方法で説明されたようにゲルダナマイシン類似体の生成について分析する。1つの変異株は、KOS-1806と区別がつかないと予想される、化合物1を生成するに相違ないS.ハイグロスコピカスgdmM⁻と命名される(Rascherらの論文、2005)。当業者は、例えば、組込みによる、又はRascher(2005)が発表しているように耐性遺伝子の挿入による分裂変異株の作出による代替のgdmM不活化戦略を容易にデザインできる。

【0233】

(実施例3 gdmMノックアウト菌株S.ハイグロスコピカスgdmM⁻へAHBA類似体を供給することによる新規ゲルダナマイシン類似体の作出)

(3.1 S.ハイグロスコピカスgdmM⁻を使用する生体内変換)

その作出が上記実施例2に記載されているS.ハイグロスコピカスgdmM⁻を、MAMプレート(培地1)上にパッチし、28℃で3日間増殖する。6mmの円形プラグを使用し、10mL種培地(リットル当たり;グルコース40g、ビート糖蜜10g、酵母エキス2.5g、ペプトン2.5g、トリブ

トン2.5g、オートミール5g)を含む個別の50mLファルコンチューブに接種する。これらの種培養物を、振り1インチ(2.54cm)の300rpmで、28℃で36~72時間インキュベートする。その後これらの種培養物を用いて生産培地(種培地と同じ)に接種(10mLに0.5mL)し、28℃で24時間増殖する。200mM供給材料ストック液(メタノール中-表4のリスト参照)の0.1mLを、各ファルコンチューブに添加し、2mMの最終供給材料濃度とする。チューブを、28℃で更に6日間インキュベートする。

【0234】

(3.2 LCMSによる培養抽出物中の新規ゲルダナマイシン類似体の同定)

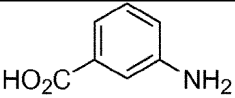
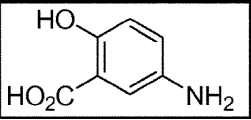
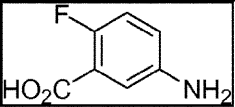
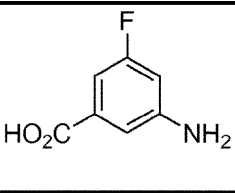
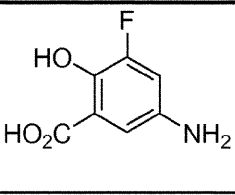
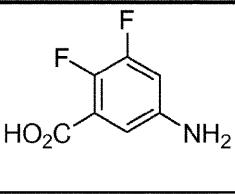
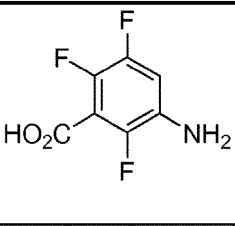
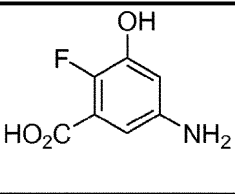
実施例3.1に記載の発酵抽出物を作成し、全般的な方法で記載したようなLCMSによりアッセイする。すべての場合において、観察されると予想される主なアンサマイシン類を表4に記載する。該表には、菌株に供給される置換安息香酸類似体、主なLCMS質量数、及び主な化合物の質量に記載する。図3及び4には、生成されると予想される化合物の構造を示す。

10

【0235】

【表 7】

表4-LCMSにより同定された化合物

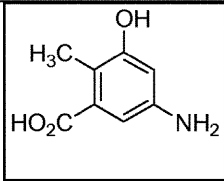
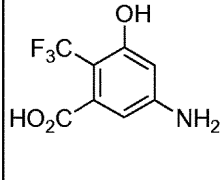
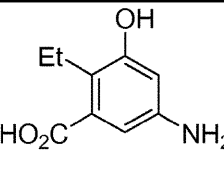
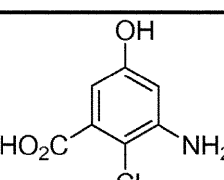
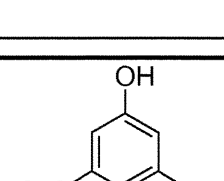
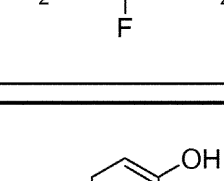
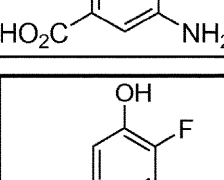
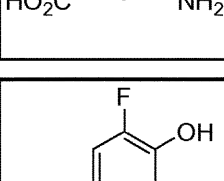
実験番号	供給AHBA類似体	生成化合物	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	質量数
3A		14	541	517	518.3
		15	525	501	502
3B		14	541	517	518.3
		16	541	517	518
3C		14	541	517	518.3
		17	543	519	520
3D		14	541	517	518.3
		18	543	519	520
3E		14	541	517	518.3
		19	559	535	536
3F		14	541	517	518.3
		20	561	537	538
3G		14	541	517	518.3
		21	579	555	556
3H		14	541	517	518.3
		22	559	535	536

10

20

30

40

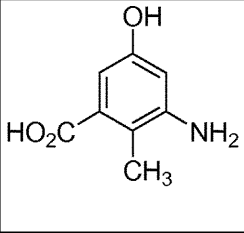
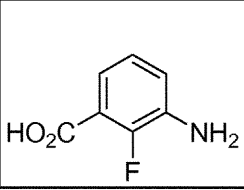
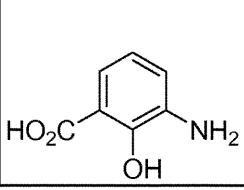
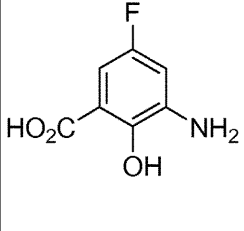
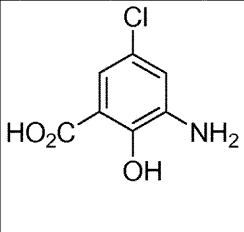
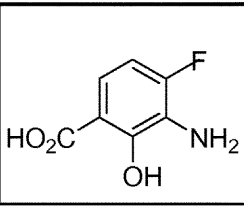
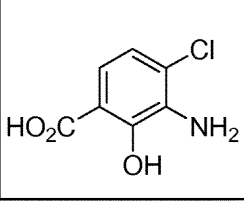
実験番号	供給AHBA類似体	生成化合物	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	質量数
3I		14	541	517	518.3
		23	555	531	532
3J		14	541	517	518.3
		24	609	585	586
3K		14	541	517	518.3
		25	569	545	546
3L		14	541	517	518.3
		26	575	551	552
3M		14	541	517	518.3
		27	559	535	536
3N		14	541	517	518.3
		28	541	517	518
3O		14	541	517	518.3
		29	559	535	536
3P		14	541	517	518.3
		30	559	535	536

10

20

30

40

実験番号	供給AHBA類似体	生成化合物	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	質量数
3Q		14	541	517	518.3
		31	555	531	532
3R		14	541	517	518.3
		32	543	519	520
3S		14	541	517	518.3
		33	541	517	518
3T		14	541	517	518.3
		34	559	535	536
3U		14	541	517	518.3
		35	575	551	552
3V		14	541	517	518.3
		36	559	535	536
3W		14	541	517	518.3
		37	575	551	552

10

20

30

40

【 0 2 3 6 】

(実施例4 AHBA生合成の不活化を伴う菌株の作出)

50

不活化されたAHBA合成に関連する遺伝子を持つ菌株を産生することの利点は、該菌株内での天然AHBAに由来する競合が少ないことである。置換された安息香酸類似体を供給することは、それゆえ、より効率的であり得、より単純な精製にもつながり得る。下記の方法が、Rascherらの論文、2005から構成される。

【 0 2 3 7 】

(4.1 プラスミドpKC1139AHBAdeIの構築)

オリゴLHSfor(配列番号:16)及びLHSrev(配列番号:17)を使用し、鋳型としてゲノムDNA及びKOD DNAポリメラーゼを使用する標準的PCR反応において、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス垂種ゲルダヌス(NRRL3602)由来のDNAの~1.65kbp領域を増幅する。5'伸長は、各オリゴにおいて、増幅断片のクローニングを補助するための制限部位を導入するようにデザインされる。増幅されたPCR産物(PCR LHS)は、AHBAの生成に関連するAHBA 'B' クラスター左手側の領域をカバーする。この~1.65kbp断片を、前以てSmaIで消化され、かつ脱ホスホリル化されたpUC18へクローン化して、pUC18LHSを得る。

【 化 3 5 】

LHSfor CGCAAGCTTAGACCTCGACCACCGGTGTCTGGA

HindIII

(配列番号 16)

LHSrev CCGTCTAGACACGATTTCCAGCGCATGGCCCA

XbaI

(配列番号 17)

オリゴRHSfor(配列番号:18)及びRHSrev(配列番号:19)を使用し、鋳型としてゲノムDNA及びKOD DNAポリメラーゼを使用する標準的PCR反応において、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス垂種ゲルダヌス(NRRL3602)由来のDNAの~0.98kbp領域を増幅する。5'伸長は、各オリゴにおいて、増幅断片のクローニングを補助するための制限部位を導入するようにデザインされる。増幅されたPCR産物(PCR LHS)は、AHBAの生成に関連するAHBA 'B' クラスター右手側の領域をカバーする。この~0.98kbp断片を、前以てSmaIで消化され、かつ脱ホスホリル化されたpUC18へクローン化して、pUC18RHSを得る。

【 化 3 6 】

RHSfor TGCTCTAGACTCACCCGCTCGCCTTCGTCA

XbaI

(配列番号 18)

RHSrev TGCGAATTCTGAGCCACCACGGCGTGTGACA

EcoRI

(配列番号 19)

【 0 2 3 8 】

産生物PCRLHS及びPCRRHSを、pKC1139へ次のように1工程でクローン化する。pKC1139をHindIII及びEcoRIで消化し、作出された骨格断片を、HindIII/XbaI断片上でPCRLHSと、XbaI/EcoRI断片上でPCRRHSと連結し、各PCR断片は、pUC18クローンから単一の3部分連結で採取される。制限酵素消化を使用して、pKC1139AHBAdeIと命名される最終プラスミドを確認する。

【0239】

(4.2 ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌス(NRRL3602)の形質転換及びAHBA 'B'欠失変異株の選択)

プラスミドpUZ8002を連結している大腸菌ET12567を、電気穿孔法により、pKC1139AHBAdeIで形質転換し、接合のための大腸菌ドナー株を作出した。この菌株を使用し、接合により、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌス(NRRL3602)を形質転換する(Kieserらの論文、(2000)Practical Streptomyces Genetics)。接合完了体(exconjugant)を、培地2上に播種し、28℃でインキュベートする。24時間後、プレートに50mg/Lアブラマイシン及び25mg/Lナリジクス酸を積層する。pKC1139を基にしたベクターは28℃で自己複製するので、形質転換体は、自己複製プラスミドとしてpKC1139AHBAdeIを含むと予想される。4~7日後、コロニーを、アブラマイシン(50mg/L)及びナリジクス酸(25mg/L)を含む培地2のプレート上にパッチする。次いで、プレートを37℃で3~4日間インキュベートする。次いで、相同組換えによりプラスミドの染色体への組み込みが起こる。次いで、コロニーを、アブラマイシン及びナリジクス酸を含む培地2のプレート上に再パッチし、37℃で3~4日間インキュベートして、大腸菌細胞が更に継代されないことを確実にする。

10

【0240】

(二次組換体のための継代培養)

更なる3~4日間のインキュベーションの後、抗生物質を含まない培地1のプレートを使用して、継代培養工程を実施する。これを行うため、各パッチから材料を剥がし取り、培地1の寒天プレート上に播種し、良好な増殖が認められるまで、典型的には3日目に37℃でインキュベートする。同一技術を使用して、第二、第三及び第四回目の継代培養工程を実施する。第四回目の継代培養工程は、孢子形成を可能にするため28℃でインキュベートされる。数日後(典型的には7~10日)に孢子形成が認められたなら、孢子懸濁液を分離し、標準的技術を使用して希釈系列を実施する。希釈系列のアリコート培地1のプレート上に拡げ、コロニーが認められるまで28℃でインキュベートする。単一コロニーを拾い、アブラマイシンを含む又は含まない培地1のプレート上に同時にパッチする。

20

【0241】

抗生物質のないプレート上で増殖するが、アブラマイシンのプレート上で増殖しないパッチを、+/-アブラマイシンプレート上に再パッチし、抗生物質マーカーの欠失を確認する。変異株は、AHBA 'B'生合成領域の大きな欠失を含む。

30

【0242】

欠失変異株を、培地1上にパッチし、28℃で4日間増殖させる。各パッチからの6mmの円形プラグを用い、10mLの種培地(リットル当たり;グルコース40g、ビート糖蜜10g、酵母エキス2.5g、ペプトン2.5g、トリプトン2.5g、オートミール5g)を含む個別の50mLファルコンチューブに接種する。これらの種培養物を、振り1インチ(2.54cm)の300rpmで、28℃で36~72時間インキュベートする。その後これらを用い、生産培地(種培地と同じ)に接種(10mLに0.5mL)し、28℃で6日間増殖する。二次代謝産物を抽出し、LCMSを用い、全般的方法で説明されたようにゲルダナマイシン類似体の生成について分析する。1つの変異株はS.ハイグロスコピカスAHBAと命名され、ゲルダナマイシンの生成を欠くことを特徴とする。更に、ゲルダナマイシンの生成は、生成の際にAHBAを24時間供給することによって回復されるはずである。

40

【0243】

(実施例5 ストレプトマイセス・ハイグロスコピカスgdmM⁻のpKC1139AHBAdeIでの形質転換によるgdmM及びAHBA合成の双方が不活化された菌株の作出)

ストレプトマイセス・ハイグロスコピカスgdmM⁻への供給の成功は、AHBAによる競合を除去することによって改善され得る。従って、正確に実施例4と同一手順を使用して、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカスgdmM⁻においてAHBA 'B'欠失を実施して、本発明の化合物を生成するのに優れた菌株を作出する。

【0244】

プラスミドpUZ8002を連結している大腸菌ET12567を、電気穿孔法により、pKC1139AHBAdeI

50

elで形質転換し、接合のための大腸菌ドナー株を作出した。この菌株を使用し、標準的な方法を使用する接合により、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス亜種ゲルダヌス(NRRL3602)を形質転換した(Kieserらの論文、(2000)Practical Streptomyces Genetics)。接合完了体(exconjugant)を、前述(実施例4)のように選択し、二次組換え体を前述のように選択した。最終の二重欠失菌株は、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカスgdmM⁻AHBAB⁻と命名され、ゲルダナマイシン又はゲルダナマイシン類似体の生成の欠失を特徴とする。製造培養物をAHBAで補足すると、KOS-1806の生成が回復される(Rascherらの論文、2005)。

【0245】

(実施例6 gdmM及びAHBA合成の双方が不活化された菌株-ストレプトマイセス・ハイグロスコピカスgdmM⁻AHBAB⁻へ供給することによる新規ゲルダナマイシン類似体の作出)

(16.1 ストレプトマイセス・ハイグロスコピカスgdmM⁻AHBAB⁻を使用する生体内変換)

その作出が前記実施例5に記載されているストレプトマイセス・ハイグロスコピカスgdmM⁻AHBAB⁻を、MAMプレート(培地1)上にパッチし、28℃で3日間増殖する。6mmの円形プラグを用い、10mLの種培地(リットル当たり;グルコース40g、ビート糖蜜10g、酵母エキス2.5g、ペプトン2.5g、トリプトン2.5g、オートミール5g)を含む個別の50mLファルコンチューブに接種する。これらの種培養物を、振り1インチ(2.54cm)の300rpmで、28℃で36~72時間インキュベートする。その後これらを用い、生産培地(種培地と同じ)に接種(10mLに0.5mL)し、28℃で24時間増殖する。200mM供給材料ストック液(メタノール中-表5のリスト参照)の0.1mLを、各ファルコンチューブに添加し、2mMの最終供給材料濃度とする。チューブを、28℃で更に6日間インキュベートする。

【0246】

(16.2 LCMSによる培養抽出物中の新規ゲルダナマイシン類似体の同定)

実施例16.1に記載の発酵抽出物を作出し、全般的な方法で記載したようなLCMSによりアクセスする。すべての場合において、観察されると予想される主なアンサマイシンを表5に記載する。これらのアンサマイシンは、供給されていない発酵抽出物中には見出されないはずである。該表には、菌株に供給される置換安息香酸類似体、LCMS質量数、化合物の質量を記載する。図3及び4には、生成されると予想される化合物の構造を示す。

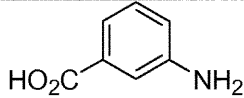
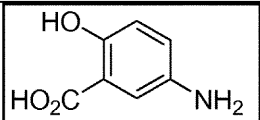
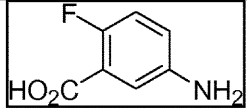
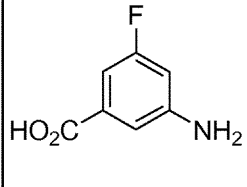
【0247】

10

20

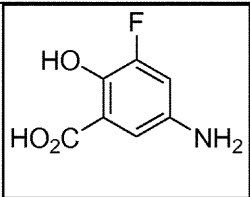
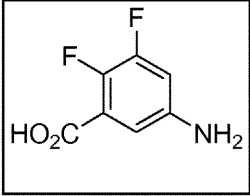
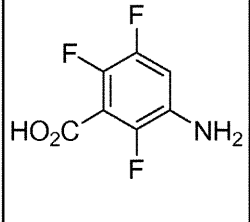
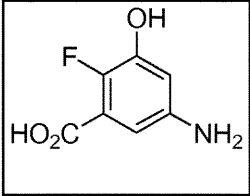
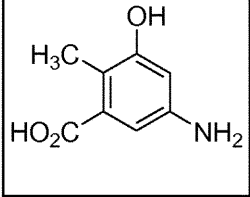
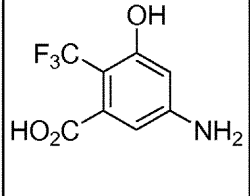
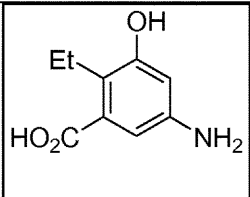
【表 8】

表5-LCMSにより同定された化合物

実験番号	供給AHBA類似体	生成化合物	$[M+Na]^+$	$[M-H]^-$	質量数
6A		15	525	501	502
6B		16	541	517	518
6C		17	543	519	520
6D		18	543	519	520

10

20

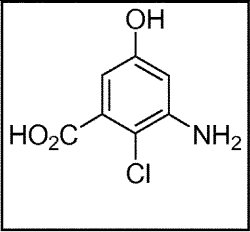
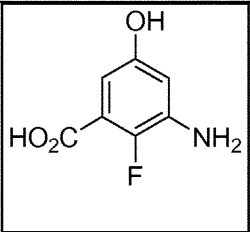
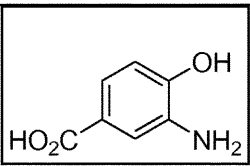
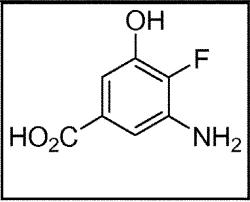
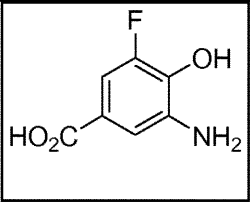
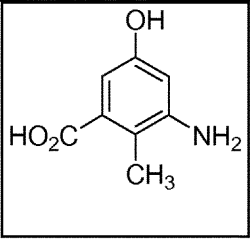
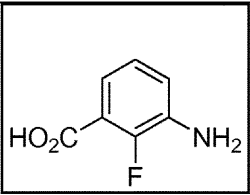
実験番号	供給AHBA類似体	生成化合物	$[M+Na]^+$	$[M-H]^-$	質量数
6E		19	559	535	536
6F		20	561	537	538
6G		21	579	555	556
6H		22	559	535	536
6I		23	555	531	532
6J		24	609	585	586
6K		25	569	545	546

10

20

30

40

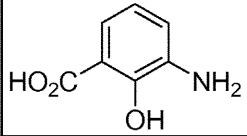
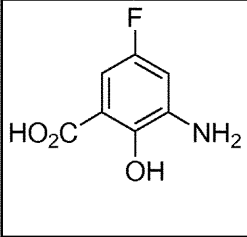
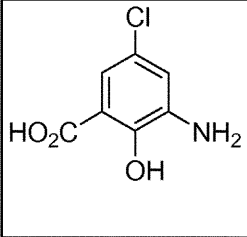
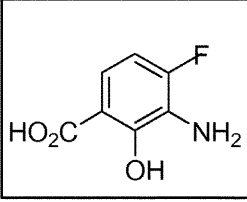
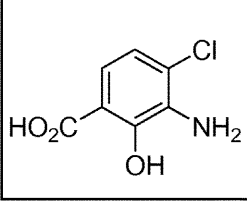
実験番号	供給AHBA類似体	生成化合物	$[M+Na]^+$	$[M-H]^-$	質量数
6L		26	575	551	552
6M		27	559	535	536
6N		28	541	517	518
6O		29	559	535	536
6P		30	559	535	536
6Q		31	555	531	532
6R		32	543	519	520

10

20

30

40

実験番号	供給AHBA類似体	生成化合物	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	質量数
6S		33	541	517	518
6T		34	559	535	536
6U		35	575	551	552
6V		36	559	535	536
6W		37	575	551	552

10

20

30

【 0 2 4 8 】

本出願において言及された特許及び特許出願に含まれる参考文献はすべて、可能な限り完全な範囲で引用により本明細書に組込まれている。

【 0 2 4 9 】

本明細書及び前記「特許請求の範囲」を通じて、そうでなければ状況が必要としない限りは、語句「を含む(comprise)」並びに「を含む(comprises)」及び「を含んでいる(comprising)」などの変形は、陳述された整数もしくはステップ又は整数の群の包含を暗示するが、任意の他の整数もしくはステップ又は整数もしくはステップの群を排除するものではないことが理解されるであろう。

40

【 0 2 5 0 】

(参考文献)

Allen, I. W. 及び Ritchie, D.A. の文献、(1994) 「ゲルダナマイシン生合成をコードしているストレプトマイセス・ハイグロスコピカス由来のDNA配列のクローニング及び分析(Cloning and analysis of DNA sequences from *Streptomyces hygroscopicus* encoding gel

50

danamycin biosynthesis)」、Mol. Gen. Genet. 243: 593-599.

Bagatell, R. 及び Whitesell, L. の文献、(2004)「癌における変化したHsp90機能:独自の治療機会(Altered Hsp90 function in cancer: A unique therapeutic opportunity)」、Molecular Cancer Therapeutics, 3: 1021-1030.

Beliakoff, J. 及び Whitesell, L. の文献、(2004)「Hsp90:乳癌療法のための新たな標的(Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy)」、Anti-Cancer Drugs, 15:651-662.

Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, ET., Nagaraja Rao, R. 及び Schoner, BE. の論文、(1992)「大腸菌からストレプトマイセス種へのDNAの接合伝達のためのプラスミドクローニングベクター(Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from Escherichia coli to Streptomyces spp.)」、Gene 116: 43-49.

Blagosklonny, M.V. の論文、(2002)、「Hsp-90-関連癌タンパク質:ゲルダナマイシン及びその類似体の複数の標的(Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogues)」、Leukemia, 16:455-462.

Blagosklonny, M.V., Toretsky, J., Bohlen, S. 及び Neckers, L. の論文、(1996)「HSP90の機能を必要とするインビトロ又はインビボ翻訳p53の変異体コンホメーション(Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90)」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8379-8383.

Bohlen, S.P. の論文、(1998)「Hsp90-依存型シグナル伝達タンパク質の機能におけるp23及びアンサマイシン抗生物質の遺伝子及び生化学的分析(Genetic and biochemical analysis of p23 and ansamycin antibiotics in the function of Hsp90-dependent signaling proteins)」、Mol Cell Biol 18:3330-3339.

Carreras, C.W., Schirmer, A., Zhong, Z. 及び Santi D.V. の論文、(2003)「ゲルダナマイシン-熱ショックタンパク質90相互作用に関するフィルター結合アッセイ(Filter binding assay for the geldanamycin-heat shock protein 90 interaction)」、Analytical Biochemistry 317:40-46.

Cassady, J.M., Chan, K.K., Floss, H.G. 及び Leistner E. の論文、(2004)「最新のメイタンシノイド抗腫瘍剤開発(Recent developments in the maytansinoid antitumour agents)」、Chem. Pharm. Bull. 52(1) 1-26.

Chiosis, G., Huezo, H., Rosen, N., Mimnaugh, E., Whitesell, J. 及び Neckers, L. の論文、(2003)「17AAG:低い標的結合親和性及び強力な細胞活性-解釈(17AAG: Low target binding affinity and potent cell activity-finding an explanation)」、Molecular Cancer Therapeutics 2:123-129.

【 0 2 5 1 】

Chiosis, G., Vilenchik, M., Kim, J. 及び Solit, D. の論文、(2004)「Hsp90:脆弱なシャペロン(Hsp90: the vulnerable chaperone)」、Drug Discovery Today 9:881-888.

Csermely, P. 及び Soti, C. の論文、(2003)「プロテインキナーゼの特殊な阻害法としてのHsp90阻害(Inhibition of Hsp90 as a special way to inhibit protein kinases)」、Cell Mol. Biol. Lett. 8:514-515.

DeBoer, C. 及び Dietz, A. の論文、(1976)「ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス変種(var.)ゲルダニユスの説明及び抗生物質産生(The description and antibiotic production of Streptomyces hygroscopicus var. geldanus)」、J. Antibiot. 29:1182-1188.

DeBoer, C., Meulman, P.A., Wnuk, R.J., 及び Peterson, D.H. の論文、(1970)「ゲルダナマイシン、新規抗生物質(Geldanamycin, a new antibiotic)」、J. Antibiot. 23:442-447.

Dengler W.A., Schulte J., Berger D.P., Mertelsmann R. 及び Fiebig HH. の論文、(1995)「増殖及び細胞傷害アッセイのためのヨウ化ボジウム蛍光アッセイの開発(Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assay)」、Anti-Cancer Drugs, 6:522-532.

Dikalov, s., Landmesser, U., Harrison, DG. の論文、(2002)「酵素的及び非酵素的レドックス循環によるスーパーオキシド形成につながるゲルダナマイシン(Geldanamycin Le

10

20

30

40

50

ads to Superoxide Formation by Enzymatic and Non-enzymatic Redox Cycling)」The Journal of Biological Chemistry, 277(28), pp25480-25485

Donze O. 及び Picard, D. の論文、(1999)「真核細胞翻訳開始因子キナーゼ Gcn2 のリガンド-誘導型 サブユニットに結合及び調節する Hsp90 (Hsp90 binds and regulates the ligand-inducible subunit of eukaryotic translation initiation factor kinase Gcn2)」Mol Cell Biol 19:8422-8432.

Egorin MJ, Lagattuta TF, Hamburger DR, Covey JM, White KD, Musser SM, Eiseman JL. の論文、(2002)「CD2F1 マウス及び Fischer 344 ラットにおける 17-(ジメチルアミノエチルアミノ)-17-デメトキシゲルダナマイシン (NSC707545) の薬物動態、組織分布、及び代謝 (Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-(dimethylaminoethyl amino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 707545) in CD2F1 mice and Fischer 344 rats.)」Cancer Chemother Pharmacol, 49(1), pp7-19.

10

【 0 2 5 2 】

Eustace, B.K., Sakurai, T., Stewart, J.K. らの論文、(2004)「癌細胞浸潤における hsp 90 の本質的細胞外役割を明らかにする機能性プロテオミックスクリーニング (Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 in cancer cell invasiveness)」Nature Cell Biology 6:507-514.

Fang, Y., Fliss, A.E., Rao, J. 及び Caplan A.J. の論文、(1998)「脊椎動物 p23 タンパク質に相同である酵母 Hsp90 コシャペロンをコードしている SBA1 (SBA1 encodes a yeast Hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins)」Mol Cell Biol 18 :3727-3734.

20

Fiebig HH, Burger AM (編集)の「抗癌剤開発のための腫瘍モデルの関連性 (Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development)」の中の、Fiebig H.H., Dengler W.A. 及び Roth T. の文献、「ヒト腫瘍異種移植片: 新規抗癌剤の予測、特徴決定及び発見 (Human tumor xenografts: Predictivity, characterization, and discovery of new anticancer agents)」Contrib. Oncol. 1999, 54: 29-50.

Gregory, M.A., Till R, 及び Smith, M.C.M. の論文、(2003)「ストレプトマイセスファージ BT1 の組込み部位、及び部位特異的組込みベクターの開発 (Integration site for Streptomyces phage BT1 and the development of site-specific integrating vectors)」Journal of Bacteriology 185: 5320-5323.

30

Goetz, M.P., Toft, D.O., Ames, M.M. 及び Ehrlich, C. の論文、(2003)「癌療法の新規標的としての Hsp90 シャペロン複合体 (The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy)」Annals of Oncology 14:1169-1176.

Harris, S.F., Shiau A.K. 及び Agard D.A. の論文、(2004)「可能性のある基質結合部位を明らかにする大腸菌 Hsp90 である htpG のカルボキシ-末端二量体ドメインの結晶構造 (The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the Escherichia coli Hsp90)」Structure 12: 1087-1097.

Hong, Y.-S., Lee, D., Kim, W., Jeong, J.-K. らの論文、(2004)「抗腫瘍剤ゲルダナマイシンの生合成におけるポスト-ポリケチド合成酵素修飾工程を洗練するカルバモイル基転移酵素遺伝子の不活性化 (Inactivation of the carbamoyltransferase gene refines post-polyketide synthase modification steps in the biosynthesis of the antitumor agent geldanamycin)」J. Am. Chem. Soc. 126:11142-11143.

40

【 0 2 5 3 】

Hostein, I., Robertson, D., DiStefano, F., Workman, P. 及び Clarke, P.A. の論文、(2001)「細胞分裂停止及びアポトーシスを生じる Hsp90 インヒビター 17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシンによるシグナル伝達の阻害 (Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cyto stasis and apoptosis)」Cancer Research 61:4003-4009.

Hu, Z., Liu, Y., Tian, Z.-Q., Ma, W., Starks, C.M. らの論文、(2004)「新規ゲルダナマイシン類似体の単離及び特徴決定 (Isolation and characterization of novel geldana

50

mycin analogues)」J. Antibiot. 57:421-428.

Hur, E., Kim, H.-H., Choi, S.M.らの論文、(2002)「90-kDa熱ショックタンパク質阻害剤ラディシコールによる低酸素症-誘導因子-1 /アリアル炭化水素受容体核輸送体DNA結合の抑制を介した低酸素症-誘導した転写の低下(Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1 /aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol)」Molecular Pharmacology 62:975-982.

Iwai Y, Nakagawa, A., Sadakane, N., Omura, S., Oiwa, H., Matsumoto, S., Takahashi, M., Ikai, T., Ochiai, Y.の論文、(1980)「抗-TMV活性及び除草活性を持つ新規ベンゾキノイドアンサマイシンであるハービマイシンB (Herbimycin B, a new benzoquinoid ansamycin with anti-TMV and herbicidal activities)」The Journal of Antibiotics, 33(10), pp1114-1119.

Jez, J.M., Chen, J. C.-H., Rastelli, G., Stroud, R.M.及びSanti, D.V.の論文、(2003)「ヒトHsp90との複合体における17-DMAGの結晶構造及び分子モデリング(Crystal structure and molecular modeling of 17-DMAG in complex with human Hsp90)」Chemistry and Biology 10:361-368.

【 0 2 5 4 】

Kaur, G., Belotti, D, Burger, A.M., Fisher-Nielson, K., Borsotti, P.らの論文、(2004)「経口的に生体利用可能な熱ショックタンパク質90モジュレーター-17-(ジメチルアミノエチルアミノ)-17-デメトキシゲルダナマイシンの抗血管新生特性(Antiangiogenic properties of 17-(Dimethylaminoethylamino)-17- Demethoxygeldanamycin: an orally bio available heat shock protein 90 modulator)」Clinical Cancer Research 10:4813-4821.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F.,及びHopwood, D.A.の文献、(2000)「実践ストレプトマイセス遺伝学(Practical Streptomyces Genetics)」John Innes Foundation, Norwich

Kumar, R., Musiyenko, A.及びBarik S.の論文、(2003)「プラスモジウム・ファルシパルムの熱ショックタンパク質90及びその阻害剤ゲルダナマイシンの抗マラリア活性(The heat shock protein 90 of Plasmodium falciparum and antimalarial activity of its inhibitor, geldanamycin.)」J Malar 2:30.

Kurebayashi, J., Otsuke, T., Kurosumi, M., Soga, S., Akinaga, S.及びSonoo, H.の論文、(2001)「低酸素症-誘導因子-1 及び血管内皮増殖因子の発現、血管新生及びヒト乳癌異種移植片の増殖を阻害するラディシコール誘導体KF58333(A radicicol derivative, KF58333, inhibits expression of hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor, angiogenesis and growth of human breast cancer xenografts)」Jpn. J. Cancer Res. 92:1342-1351.

Le Brazidec, J.-Y., Kamal, A., Busch, D., Thao, L., Zhang, L.らの論文、(2003)「Hsp90の強力な阻害剤としてのゲルダナマイシン誘導体の新規クラスの合成及び生物学的評価(Synthesis and biological evaluation of a new class of geldanamycin derivatives as potent inhibitors of Hsp90)」J. Med. Chem. 47: 3865-3873.

Lee, MH, Pascopella L, Jacobs WR Jr, Hatfull GFの論文、(1991)「マイコバクテリオファージL5の部位特異的組込み:マイコバクテリウム・スメグマチス、結核菌、及びカルメットゲラン桿菌用の組込み能の高いベクター(Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium tuberculosis, and bacille Calmette-Guerin)」Proc Natl Acad Sci U S A.; 88:3111-5.

Lee, Y.-S., Marcu, M.G.及びNeckers, L.の論文、(2004)「熱ショックタンパク質90はゲルダナマイシンのtrans-cis異性化を触媒することを示す、量子化学計算及び変異分析(Quantum chemical calculations and mutational analysis suggest heat shock protein 90 catalyzes trans-cis isomerization of geldanamycin)」Chem. Biol. 11:991-998.

【 0 2 5 5 】

- Liu, X.-D., Morano, K.A. and Thiele D.J.の論文、(1999)「Hsp90コシャペロンである酵母Hsp110ファミリーメンバーSse1 (The yeast Hsp110 family member, Sse1, is an Hsp90 cochaperone)」J Biol Chem 274:26654-26660.
- Mandler, R., Wu, C., Sausville, E.A., Roettinger, A.J., Newman, D.J., Ho, D.K., King, R., Yang, D., Lippman, M.E., Landolfi, N.F., Dadachova, E., Brechbiel, M.W. 及びWaldman, T.A.の論文、(2000)「ゲルダナマイシン及び抗-HER2モノクローナル抗体の免疫複合体:ヒト乳癌細胞株に対する抗増殖活性(Immunoconjugates of geldanamycin and anti-HER2 monoclonal antibodies: antiproliferative activity on human breast carcinoma cell lines)」Journal of the National Cancer Institute 92:1573-1581. 10
- Matsushima, P., M. C. Broughtonらの論文、(1994)「大腸菌から土壌放線菌へのコスミドDNAの接合伝達:マクロライドA83543産生に対する染色体挿入の作用(Conjugal transfer of cosmid DNA from Escherichia coli to Saccharopolyspora spinosa: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production)」Gene 146(1): 39-45.
- Matsuura, M., Noguchi, T., Yamaguchi, D., Aida, T., Asayama, M., Takahashi, H. 及びShirai, M.の論文、(1996)「sre遺伝子(ORF469)は、R4ファージゲノムの組込みに関与する部位特異的リコンビナーゼをコードする(The sre gene (ORF469) encodes a site-specific recombinase responsible for integration of the R4 phage genome)」J Bact. 178(11):3374-3376.
- McLaughlin S. H., Smith, H.W. 及びJackson S.E.の論文、(2002)「クライアントタンパク質によるヒトHsp90の弱いATPase活性の刺激(Stimulation of the weak ATPase activity of human Hsp90 by a client protein)」J. Mol. Biol. 315: 787-798. 20
- McCammon, M. T. 及びL. W. Parksの論文、(1981)「S-アデノシルホモシステインアナログによるステロールトランスメチル化の阻害(Inhibition of sterol transmethylation by S-adenosylhomocysteine analogs)」J Bacteriol 145(1): 106-12.
- Muroi M, Izawa M, Kosai Y, Asai M.の論文、(1981)「マクベシンI及びIIの構造(The structures of macbecin I and II)」Tetrahedron , 37, pp1123-1130.
- Muroi, M., Izawa M., Kosai, Y., 及びAsai, M.の論文、(1980)「マクベシンI及びII、新規抗腫瘍抗生物質、II.単離及び特徴決定(Macbecins I and II, New Antitumor antibiotics. II. Isolation and characterization)」J Antibiotics 33:205-212. 30

【 0 2 5 6 】

- Neckers, Lの論文、(2003)「小型分子Hsp90阻害剤の開発:薬物同定のためのフォワード及びリバースの両ケモゲノミックスの利用(Development of small molecule Hsp90 inhibitors: utilizing both forward and reverse chemical genomics for drug identification)」Current Medicinal Chemistry 9:733-739.
- Neckers, L.の論文、(2002)「新規癌化学療法薬としてのHsp90阻害剤(Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents)」Trends in Molecular Medicine 8:S55-S61.
- Nimmanapalli, R., O' Bryan, E., Kuhn, D., Yamaguchi, H., Wang, H.-G. 及びBhalla, K.N.の論文、(2003)「17-AAG-誘導したアポトーシスの調節:Akt、Raf-1、及びSrcキナーゼの17-AAG-媒介型ダウンレギュレーションの下流のBcl-2、Bcl-x_L、及びBaxの役割(Regulation of 17-AAG-induced apoptosis: role of Bcl-2, Bcl-x_L, and Bax downstream of 17-AAG-mediated down-regulation of Akt, Raf-1, and Src kinases)」Neoplasia 102: 269-275. 40
- Omura, S., Iwai, Y., Takahashi, Y., Sadakane, N., Nakagawa, A., Oiwa, H., Hasegawa, Y., Ikai, T.の論文、(1979)「ハービマイシン、ストレプトマイセス菌により産生された新規抗生物質(Herbimycin, a new antibiotic produced by a strain of Streptomyces)」The Journal of Antibiotics, 32(4), pp255-261.
- Omura, S., Miyano, K., Nakagawa, A., Sano, H., Komiyama, K., Umezawa, I., Shibata, K, Satsumabayashi, S.の論文、(1984)「ハービマイシンA、8,9-エボキシド、7,9-カ 50

ルバメート、及び17又は19-アミノ誘導体の化学修飾及び抗腫瘍活性(Chemical modification and antitumor activity of Herbimycin A. 8,9-epoxide, 7,9-carbamate, and 17 or 19-amino derivatives)」The Journal of Antibiotics, 37(10), pp1264-1267.

Ono, Y., Kozai, Y. 及び Ootsu, K. の論文、(1982)「新たに単離されたベンゼノイドアンサマイシン、マクベシンIの抗腫瘍活性及び殺細胞活性(Antitumor and cytotoxic activities of a newly isolated benzenoid ansamycin, Macbecin I)」Gann. 73:938-44.

【0257】

Patel, K., M. Piagentini, Rascher, A., Tian, Z. Q., Buchanan, G. O., Regentin, R., Hu, Z., Hutchinson, C. R. 及び McDaniel, R. の論文、(2004)「hsp90阻害に関してゲルダナマイシン類似体の操作された生合成(Engineered biosynthesis of geldanamycin analogs for hsp90 inhibition)」Chem Biol 11(12): 1625-33.

Pfeifer, B. A. 及び C. Khosla の論文、(2001)「異種宿主におけるポリケチド生合成(Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts)」Microbiology and Molecular Biology Reviews 65(1): 106-118.

Rascher, A., Hu, Z., Viswanathan, N., Schirmer, A. らの論文、(2003)「ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス NRRL 3602におけるゲルダナマイシン産生のための遺伝子クラスターのクローニング及び特徴決定(Cloning and characterization of a gene cluster for geldanamycin production in Streptomyces hygroscopicus NRRL 3602)」FEMS Microbiology Letters 218:223-230.

Rascher, A., Z. Hu, Buchanan, G. O., Reid, R. 及び Hutchinson, C. R. の論文、(2005)「遺伝子配列決定及び破壊により得られたベンゾキノアンサマイシン、ゲルダナマイシン及びハービマイシンの生合成への識見(Insights into the biosynthesis of the benzoquinone ansamycins geldanamycin and herbimycin, obtained by gene sequencing and disruption)」Appl Environ Microbiol 71(8): 4862-71.

Rawlings, B. J. の論文、(2001)「細菌におけるI型ポリケチド生合成(パートB) (Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part B))」Natural Product Reports 18(3): 231-281.

Fiebig HH, Burger AM (編集)の「抗癌剤開発のための腫瘍モデルの関連性(Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development)」中のRoth T., Burger A.M., Dengler W., Willmann H. 及び Fiebig H.H. の文献、「抗癌剤スクリーニングの有用なモデルとしての患者腫瘍の特徴を示すヒト腫瘍細胞株(Human tumor cell lines demonstrating the characteristics of patient tumors as useful models for anticancer drug screening)」Contrib. Oncol. 1999, 54: 145-156.

【0258】

Rowlands, M.G., Newbatt, Y.M., Prodromou, C., Pearl, L.H., Workman, P. 及び Aherne, W. の論文、(2004)「熱ショックタンパク質90 ATPase活性のインヒビターに関するハイスループットスクリーニングアッセイ(High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity)」Analytical Biochemistry 327:176-183

Schulte, T.W., Akinaga, S., Murakata, T., Agatsuma, T. らの論文、(1999)「ラディシコールの、分子シャペロン熱ショックタンパク質90ファミリーの一員との相互作用(Interaction of radicicol with members of the heat shock protein 90 family of molecular chaperones)」Molecular Endocrinology 13:1435-1488.

Shibata, K., Satsumabayashi, S., Nakagawa, A., Omura, S. の論文、(1986a)「ハービマイシンCの構造及び殺細胞活性(The structure and cytotoxic activity of herbimycin C)」The Journal of Antibiotics, 39(11), pp1630-1633.

Shibata, K., Satsumabayashi, S., Sano, H., Komiyama, K., Nakagawa, A., Omura, S. の論文、(1986b)「ハービマイシンAの化学修飾:ハービマイシンAのハロゲン化誘導体及び他の関連誘導体の合成及びインビボ抗腫瘍活性(Chemical modification of Herbimycin A: synthesis and in vivo antitumor activities of halogenated and other related derivatives of herbimycin A)」The Journal of Antibiotics, 39(3), pp415-423.

Shirling, E.B.及びGottlieb, D.の論文、(1966) *International Journal of Systematic Bacteriology* 16:313-340

Smith-Jones, P.M., Solit, D.B., Akhurst, T., Afroze, F., Rosen, N. and Larson, S.M.の論文、(2004)「Hsp90阻害剤に反応するHER2分解の薬力学のイメージング(Imaging the pharmacodynamics of HER2 degradation in response to Hsp90 inhibitors)」*Nature Biotechnology* 22:701-706.

Smovkina, T., Mazodier, P., Boccard, F., Thompson, C.J.及びGuerineau, Mの論文、(1990)「放線菌で使用するのための一連のpSAM2ベース組込みベクターの構築(Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes)」*Gene* 94: 53-59.

Spiteller, P., Bai, L., Shang, G., Carroll, B.J., Yu, T.-W.及びFloss, H. G.の論文、(2003)「アクチノシンネマ・プレチオスムによる抗腫瘍剤アンサマイトシンの生合成におけるポスト-ポリケチド合成酵素修飾工程(The post-polyketide synthase modification steps in the biosynthesis of the antitumor agent ansamitocin by *Actinosynnema pretiosum*)」*J Am Chem Soc* 125(47): 14236-7

【 0 2 5 9 】

Sreedhar A.S., Nardai, G.及びCsermely, P.の論文、(2004)「補体-誘導した細胞溶解の増強:Hsp90阻害剤の抗癌作用の新規機構(Enhancement of complement-induced cell lysis: a novel mechanism for the anticancer effects of Hsp90 inhibitors)」*Immunology letters* 92:157-161.

Sreedhar, A.S., Soti, C.及びCsermely, P.の論文、(2004a)「Hsp90の阻害:プロテインキナーゼ阻害の新規戦略(Inhibition of Hsp90: a new strategy for inhibiting protein kinases)」*Biochimica Biophysica Acta* 1697:233-242.

Staunton, J.及びK. J. Weissmanの論文、(2001)「ポリケチド生合成:ミレニアムレビュー(Polyketide biosynthesis: a millennium review)」*Natural Product Reports* 18(4): 380-416.

Stead, P., Latif, S., Blackaby, A.P.らの論文、(2000)「細胞-ベースのオンコスタチンMシグナル伝達アッセイにおいて強力な阻害活性を有する新規アンサマイシンの発見(Discovery of novel ansamycins possessing potent inhibitory activity in a cell-based oncostatin M signalling assay)」*J Antibiotics* 53:657-663.

Supko, J.G., Hickman, R.L., Grever, M.R.及びMalspeis, Lの論文、(1995)「抗腫瘍剤としてのゲルダナマイシンの前臨床薬理的評価(Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent)」*Cancer Chemother. Pharmacol.* 36:305-315.

Takahashi, A., Casais, C., Ichimura K.及びShirasu, K.の論文、(2003)「アラビドプシスにおけるRPS2-媒介型疾患抵抗性に必須のHSP90のRAR1及びSGT1との相互作用(HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*)」*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 20:11777-11782.

【 0 2 6 0 】

Tanida, S., Hasegawa, T.及びHigashide E.の論文、(1980)「マクベシンI及びII、新規抗腫瘍抗生物質、I.産生生物、発酵及び抗微生物薬活性(Macbecins I and II, New Antitumor antibiotics. I. Producing organism, fermentation and antimicrobial activities)」*J Antibiotics* 33:199-204.

Tian, Z.-Q., Liu, Y., Zhang, D., Wang, Z.らの論文、(2004)「新規17-アミノゲルダナマイシン誘導体の合成及び生物学的活性(Synthesis and biological activities of novel 17-aminogeldanamycin derivatives)」*Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12:5317-5329.

Uehara, Y.の論文、(2003)「天然の生成物起源のHsp90阻害剤(Natural product origins of Hsp90 inhibitors)」*Current Cancer Drug Targets* 3:325-330.

Van Mellaert, L., Mei, L., Lammertyn, E., Schacht, S.及びAnne, J.の論文、(1998)

10

20

30

40

50

「ストレプトマイセス・ベネズエラエへのバクテリオファージVWBゲノムの部位特異的組込み、及びVWBベース組込みベクターの構築(Site-specific integration of bacteriophage VWB genome into *Streptomyces venezuelae* and construction of a VWB-based integrative vector)」*Microbiology* 144:3351-3358.

Vasilevskaya, I.A., Rakitina, T.V.及びO'Dwyer, P.J.の論文、(2003)「ヒト結腸腺癌細胞においてシスプラチン作用に拮抗するゲルダナマイシン及びその17-アリルアミノ-17-デメトキシ類似体:相互作用の基礎としての差動的カスパーゼ活性化(Geldanamycin and its 17-Allylamino-17-Demethoxy analogue antagonize the action of cisplatin in human colon adenocarcinoma cells: differential caspase activation as a basis of interaction)」*Cancer Research* 63: 3241-3246.

10

Watanabe, K., Okuda, T., Yokose, K., Furumai, T.及びMaruyama, H.H.の論文、(1982)「抗生物質ノカルジシンの新規産生株であるアクチノシンネマ・ミルム(*Actinosynnema mirum*, a new producer of nocardicin antibiotics)」*J. Antibiot.* 3:321-324.

Weber, J.M., Losick, R.の論文、(1988)「ストレプトマイセス・エリスラエラのマップエリスロマイシン耐性及び産生遺伝子への、染色体組込みベクターの使用(The use of a chromosome integration vector to a map erythromycin resistance and production genes in *Sacharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythraeus*))」*Gene* 68(2), 173-180

【 0 2 6 1 】

Wegele, H., Muller, L.及びBuchner, J.の論文、(2004)「Hsp70及びHsp90-タンパク質折り畳みのためのリレーチーム(Hsp70 and Hsp90-a relay team for protein folding)」*Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151:1-44.

20

Wenzel, S.C., Gross, F., Zhang, Y., Fu, J., Stewart, A.F.及びMuller, R.の論文、(2005)「Red/ET組換えによるシュードモナスにおける粘液細菌の天然生成物構築株の異種発現(Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in *Pseudomonads* via Red/ET recombineering)」*Chemistry & Biology* 12: 249-356.

Whitesell, L., Mimnaugh, E.G., De Costa, B., Myers, C.E.及びNeckers, L.M.の論文、(1994)「ベンゾキノンアンサマイシンによる熱ショックタンパク質HSP90-pp60^{v-src}ヘテロタンパク質複合体の阻害:癌性転換におけるストレスタンパク質の本質的役割(Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60^{v-src} heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: Essential role for stress proteins in oncogenic transformation)」*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8324-8328.

30

Winklhofer, K.F., Heller, U., Reintjes, A.及びTatzelt J.の論文、(2003)「PrP^{Sc}の形成を増大する複合糖鎖形成の阻害(Inhibition of complex glycosylation increases the formation of PrP^{Sc})」*Traffic* 4:313-322.

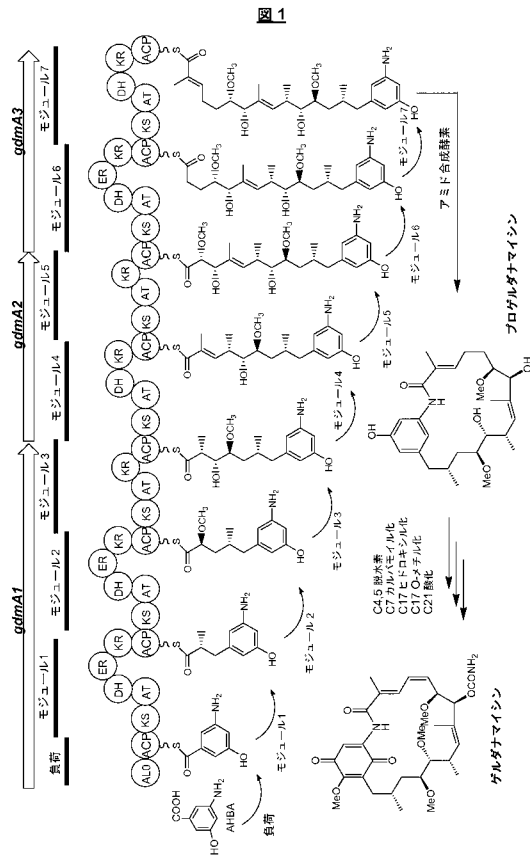
Workman P.の論文、(2003)「Hsp90分子シャペロン阻害剤の薬理的説明の監査:薬物動態と薬力学の間の関係の開き(Auditing the pharmacological accounts for Hsp90 molecular chaperone inhibitors: unfolding the relationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics)」*Molecular Cancer Therapeutics* 2:131-138.

Workman, P.及びKaye, S.B.の論文、(2002)「基本的癌研究の新規癌治療薬への翻訳(Translating basic cancer research into new cancer therapeutics)」*Trends in Molecular Medicine* 8:S1-S9.

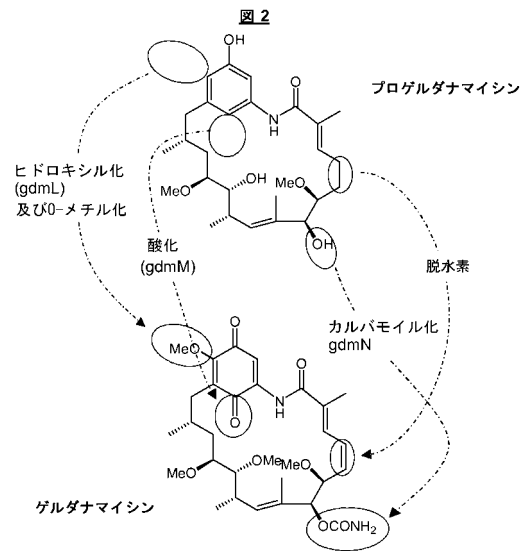
40

Young, J.C.; Moarefi, I.及びHartl, U.の論文、(2001)「Hsp90:特定されるが本質的タンパク質折り畳み道具(Hsp90: a specialized but essential protein folding tool)」*J. Cell. Biol.* 154:267-273.

【図 1】

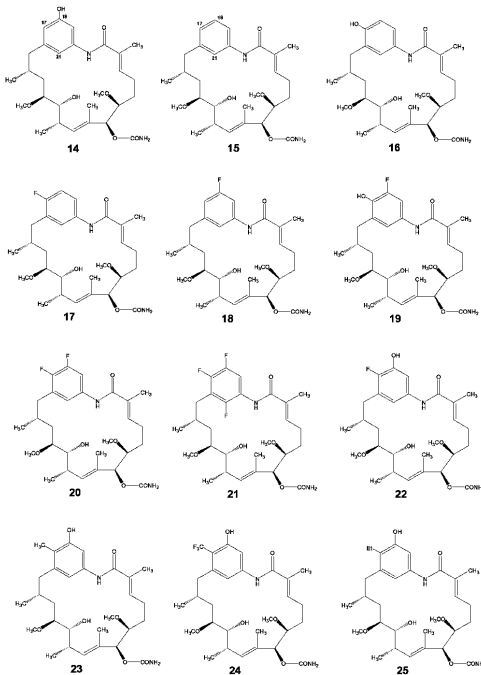


【図 2】



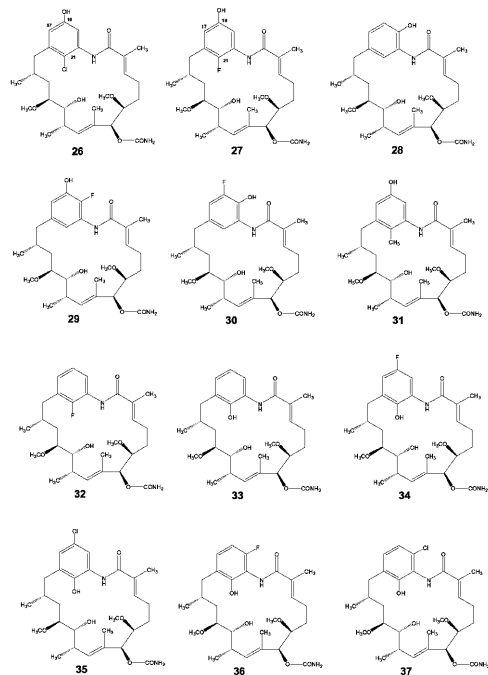
【図 3】

Figure 3



【図 4】

Figure 4



【配列表】

2010509306000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成21年7月10日(2009.7.10)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2010509306000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/050679

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07D225/06 A61K31/395 A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	EP 1 897 871 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP]) 12 March 2008 (2008-03-12) paragraph [0008]; examples 13-16; table 1; compounds 15-19	1-99
P, X	& WO 2007/001049 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP]; YAMAGUCHI SHINPEI; NAKASHIMA TAKAYUKI; KAND) 4 January 2007 (2007-01-04) pages 5,36; examples 13-16; compounds 15-19	1-99
X	WO 2005/061461 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP]; ONODERA HIDEYUKI; HAMANO MASAMI; ICHIMURA M) 7 July 2005 (2005-07-07) Excluded by provisos (ii) /(iii) page 21 ----- -/--	1-3,5, 7-9,11, 16,18-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
2 June 2008		10/06/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Goss, Ilaria

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/050679

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STEAD P ET AL: "Discovery of novel ansamycins possessing potent inhibitory activity in a Cell-based Oncostatin M signalling assay" JOURNAL OF ANTIBIOTICS, JAPAN ANTIBIOTICS RESEARCH ASSOCIATION, TOKYO, JP, vol. 53, no. 7, 1 July 2000 (2000-07-01), pages 657-663, XP002988238 ISSN: 0021-8820 Compounds 1,2 and 3 excluded by proviso (ii) Results and Discussion	1,38,61
X,P	WO 2007/074347 A (BIOTICA TECH LTD [GB]; MARTIN CHRISTINE JANET [GB]; WILKINSON BARRIE []) 5 July 2007 (2007-07-05) Compound TAN-420E, excluded by proviso (1) page 5; compound 11	1-38,61
X	LI M G ET AL: "Isolation and Structure Elucidation of Autolytimycin, A new Compound Produced by Streptomyces Autolyticus JX-47" CHINESE CHEMICAL LETTERS, XX, XX, vol. 12, no. 10, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 903-906, XP002988236 ISSN: 1001-8417 Autolytimycin the whole document	1,38,61
X	TAKATSU T ET AL: "Reblastatin, a novel benzenoid ansamycin-type cell cycle inhibitor" JOURNAL OF ANTIBIOTICS, JAPAN ANTIBIOTICS RESEARCH ASSOCIATION, TOKYO, JP, vol. 53, no. 11, 1 November 2000 (2000-11-01), pages 1310-1312, XP002988237 ISSN: 0021-8820 Reblastatin the whole document	1-38,61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2007/050679

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 63-65 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2007/050679

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1897871	A	12-03-2008	AU 2006263111 A1	04-01-2007
			CA 2613632 A1	04-01-2007
			WO 2007001049 A1	04-01-2007
			KR 20080027896 A	28-03-2008
WO 2007001049	A	04-01-2007	AU 2006263111 A1	04-01-2007
			CA 2613632 A1	04-01-2007
			EP 1897871 A1	12-03-2008
			KR 20080027896 A	28-03-2008
WO 2005061461	A	07-07-2005	NONE	
WO 2007074347	A	05-07-2007	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)		A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/28 (2006.01)		A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)		A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 37/00 (2006.01)		A 6 1 P 37/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00 1 2 1	
C 1 2 P 17/10 (2006.01)		C 1 2 P 17/10	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00 A	

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

(72)発明者 クフリストイネ マルトイン

グレートブリテン及び北アイルランド連合王国 シービー 1 0 1 エックスエル エセックス ノ
ル サフフロン ワルデン リットレ チェステルフォールド チェステルフォールド リサーチ パ
ルク バイオチカ テクノロジー リミテッド内

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA67 CA01 DA08 EA04 GA11 HA08
4B064 AE48 CA03 CA19 CC03 CC24 CD12 DA01
4B065 AA50X AA50Y AB01 AC14 BA02 BB12 CA34 CA44
4C034 EA07
4C084 AA19 NA14 ZA02 ZA15 ZA36 ZB07 ZB26 ZB35 ZB37 ZC75
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 BC33 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA02
ZA15 ZA36 ZB07 ZB26 ZB35 ZB37 ZC75