

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6925344号  
(P6925344)

(45) 発行日 令和3年8月25日(2021.8.25)

(24) 登録日 令和3年8月5日(2021.8.5)

|                                 |                      |
|---------------------------------|----------------------|
| (51) Int. Cl.                   | F I                  |
| <b>C O 7 D 239/49 (2006.01)</b> | C O 7 D 239/49 C S P |
| <b>A 6 1 K 31/505 (2006.01)</b> | A 6 1 K 31/505       |
| <b>C O 7 D 405/06 (2006.01)</b> | C O 7 D 405/06       |
| <b>A 6 1 K 31/506 (2006.01)</b> | A 6 1 K 31/506       |
| <b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>  | A 6 1 P 43/00 1 1 1  |
| 請求項の数 13 (全 40 頁) 最終頁に続く        |                      |

|                    |                               |           |   |
|--------------------|-------------------------------|-----------|---|
| (21) 出願番号          | 特願2018-535383 (P2018-535383)  | (73) 特許権者 | 501315876<br>ユニバーシティ オブ コネチカット<br>アメリカ合衆国 コネチカット 0603<br>2, ファーミントン, ファーミントン<br>アベニュー 400   |
| (86) (22) 出願日      | 平成29年1月9日(2017.1.9)           | (74) 代理人  | 110001210<br>特許業務法人YKI国際特許事務所   |
| (65) 公表番号          | 特表2019-504834 (P2019-504834A) | (72) 発明者  | ライト デニス<br>アメリカ合衆国 コネチカット ストーズ<br>バクスター ロード 166   |
| (43) 公表日           | 平成31年2月21日(2019.2.21)         | (72) 発明者  | アンダーソン エイミー シー<br>アメリカ合衆国 コネチカット ファーミ<br>ントン ファーミントン アベニュー 2<br>63 ザ ユニバーシティ オブ コネチ<br>カット内 |
| (86) 国際出願番号        | PCT/US2017/012702             |           | 最終頁に続く  |
| (87) 国際公開番号        | W02017/120575                 |           |   |
| (87) 国際公開日         | 平成29年7月13日(2017.7.13)         |           |   |
| 審査請求日              | 令和2年1月9日(2020.1.9)            |           |   |
| (31) 優先権主張番号       | 62/276,494                    |           |   |
| (32) 優先日           | 平成28年1月8日(2016.1.8)           |           |   |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US)                       |           |   |

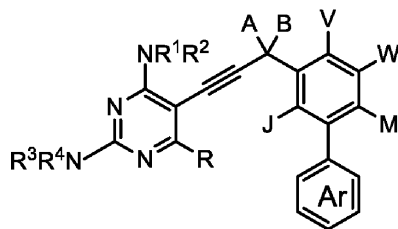
(54) 【発明の名称】 細菌感染症の治療に有用な双性イオンプロパルギル結合抗薬酸剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式Iの化合物

【化1】



(I)

(式中、

Rは、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルであり、

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、それぞれHであり、

AおよびBは、H、およびC<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルから独立して選択され、

VおよびWのうち的一方がメトキシであり、他方はH、およびC<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシから選択され、

JおよびMは、それぞれHであり、

WおよびMは一緒になって、2個の酸素原子を含む5員の複素環式環を形成していてもよく、

A r 環は、メタ位またはパラ位に1つの - C O O H 基または - C H <sub>2</sub> C O O H 基で置換されているフェニル環である)

またはその薬学的に許容される塩。

【請求項2】

請求項1に記載の化合物または塩であって、

Rがメチルまたはエチルであり、

Aが水素であり、

Bが水素またはC<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub>アルキルであり、

VおよびWのうち的一方がメトキシであり、他方はHであることを特徴とする、化合物または塩。

10

【請求項3】

請求項1に記載の化合物または塩であって、

Rがメチルまたはエチルであり、

Aが水素であり、

Bが水素またはC<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub>アルキルであり、

WおよびMが一緒になって、2個の酸素原子を含む5員複素環式環を形成していることを特徴とする、化合物または塩。

20

【請求項4】

請求項1 ~ 3のいずれか1項に記載の化合物または塩であって、

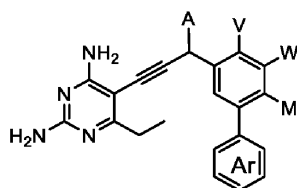
AがHであり、Bがメチルであることを特徴とする、化合物または塩。

【請求項5】

請求項1に記載の化合物または塩であって、

前記化合物が、式

【化2】



30

の化合物であり、

前記化合物が、

— 化合物14 : A = H、V = OCH<sub>3</sub>、W = H、M = H、A r = m - C O O Hフェニル

化合物15 : A = H、V = OCH<sub>3</sub>、W = H、M = H、A r = p - C O O Hフェニル

化合物16 : A = H、V = H、W = OCH<sub>3</sub>、M = H、A r = p - C O O Hフェニル

化合物29 : A = S - CH<sub>3</sub>、V = OCH<sub>3</sub>、W = H、M = H、A r = p - C O O Hフェニル

40

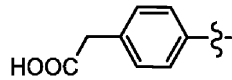
化合物30 : A = R - CH<sub>3</sub>、V = OCH<sub>3</sub>、W = H、M = H、A r = p - C O O Hフェニル

化合物31 : A = R - CH<sub>3</sub>、V = H、W = OCH<sub>3</sub>、M = H、A r = p - C O O Hフェニル

化合物32 : A = S - CH<sub>3</sub>、V = H、W = OCH<sub>3</sub>、M = H、A r = p - C O O Hフェニル

— 化合物35 : A = CH<sub>3</sub>、V = H、W、M = - O - CH<sub>2</sub> - O -、A r =

## 【化3】



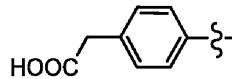
化合物41:  $A = S - CH_3$ 、 $V = H$ 、 $W$ 、 $M = -O - CH_2 - O -$ 、 $Ar = p - C$   
 OOHフェニル

化合物42:  $A = R - CH_3$ 、 $V = H$ 、 $W$ 、 $M = -O - CH_2 - O -$ 、 $Ar = p - C$   
 OOHフェニル

化合物52:  $A = H$ 、 $V = H$ 、 $W = OMe$ 、 $M = H$ 、 $Ar =$

10

## 【化4】



化合物58:  $A = R - CH_3$ 、 $V = H$ 、 $W = OCH_3$ 、 $M = H$ 、 $Ar = p - COOH$   
 フェニル

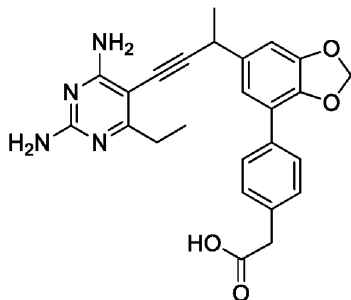
化合物59:  $A = H$ 、 $V = H$ 、 $W = OCH_3$ 、 $M = H$ 、 $Ar = p - COOH$ フェニル  
 に列挙されている化合物から選択されることを特徴とする、化合物または塩。

## 【請求項6】

20

請求項1に記載の化合物または塩であって、  
 前記化合物が、

## 【化5】



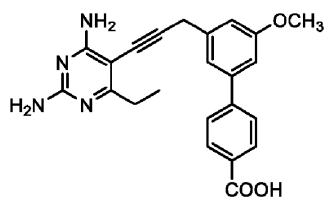
30

であることを特徴とする、化合物または塩。

## 【請求項7】

請求項1に記載の化合物または塩であって、  
 前記化合物が、

## 【化6】



40

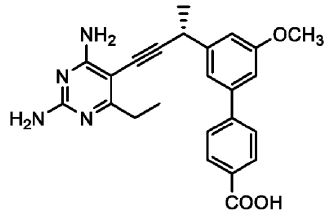
であることを特徴とする、化合物または塩。

## 【請求項8】

請求項1に記載の化合物または塩であって、  
 前記化合物が、

50

## 【化 7】



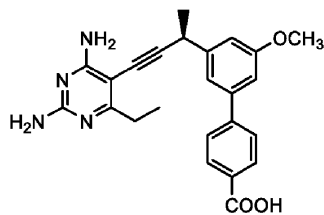
であることを特徴とする、化合物または塩。

10

## 【請求項 9】

請求項 1 に記載の化合物または塩であって、  
前記化合物が、

## 【化 8】



20

であることを特徴とする、化合物または塩。

## 【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、および薬学的に許容される担体を含むことを特徴とする、医薬組成物。

## 【請求項 11】

患者における細菌感染症を治療するための、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の化合物または塩。

## 【請求項 12】

30

請求項 11 に記載の化合物または塩であって、  
前記細菌感染症がグラム陰性菌感染症であることを特徴とする、化合物または塩。

## 【請求項 13】

請求項 11 に記載の化合物または塩であって、  
前記細菌感染症が黄色ブドウ球菌感染症であることを特徴とする、化合物または塩。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、細菌感染症の治療に有用な双性イオンプロパルギル結合抗葉酸剤に関する。

## 【背景技術】

40

## 【0002】

必須代謝酵素のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) は、腫瘍学および感染症徴候の両方のために首尾よくかつ広範にわたって標的にされているタンパク質であり、メトトレキサート (MTX)、トリメトプリム (TMP) およびペメトレキセド (pemetrexed) (PMX) などの有効な薬物がもたらされている。その天然基質である葉酸またはジヒドロ葉酸は、弱塩基性プテリン環と負に荷電したグルタミン酸伸長部とを有し、これらは酵素の結合に重要である。異なる種の DHFR とのいくつかの結晶構造から、メトトレキサート (図 1) およびペメトレキセドなどの古典的抗葉酸剤が、活性部位において酸性残基と強い接触を形成する塩基性窒素環と、塩基性アミノ酸 (黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) DHFR 中の Arg 57) と広範なイオン相互作用

50

用を形成するグルタミン酸部分とを有し、これらの基質のモチーフを模倣していることが明らかである。基質模倣物として、古典的抗葉酸剤は、多くの場合、DHFRに対して非常に高い親和性を有する。例えば、メトトレキサートは、ヒト、大腸菌 (*Escherichia coli*) および黄色ブドウ球菌 DHFR を、それぞれ 3.4 pM、1 pM および 1 nM の  $K_i$  値で阻害する。

#### 【0003】

しかし、これらの古典的抗葉酸剤は、生理的 pH では高度に負に荷電しているため、受動的に拡散しないと思われ、能動輸送によりヒト細胞膜を通過させて生理的濃度を得る必要がある。さらに、それらは、その後、最適な細胞保持および酵素親和性のために、細胞内でポリグルタミル化される。現在、承認されている全ての抗癌 DHFR 阻害剤は、古典的抗葉酸剤として分類されている。対照的に、細菌は、葉酸補因子のデノボ合成に依存しているため、葉酸輸送体を有しない。したがって、古典的抗葉酸剤は、受動拡散によってのみ細胞膜を通過して抗菌効果を達成することができ、したがって、非常に強力な酵素阻害剤である MTX の野生型グラム陰性大腸菌に対する MIC 値は、1 mM を超える。排出ポンプが遺伝的に削除されても、MIC 値は 64 ~ 256  $\mu$ M であり、その化合物が排出基質であることに加えて、限られた透過性しか有しないことが示されている。同様に、グラム陽性メチシリン耐性 (*methicillin-resistant*) 黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対して、メトトレキサートは、20  $\mu$ g/mL の MIC<sub>50</sub> または 100  $\mu$ g/mL の MIC<sub>90</sub> を有する。対照的に、より弱い DHFR 阻害 (IC<sub>50</sub> 値 23 nM および 20 nM) を有する、弱塩基性の非古典的抗葉酸剤 トリメトプリム (図 1) は、実際には MRSA および大腸菌の両方に対する強力な抗菌剤であり (MIC 値 0.3125  $\mu$ g/mL)、スルファメトキサゾールと共に、グラム陰性感染症およびグラム陽性感染症の両方に対する第一選択薬である。

#### 【0004】

細菌ジャイレースを標的とするフルオロキノロン (図 1) または微生物リボソームを標的とするテトラサイクリンなどの、単一の酸性官能基を有する双性イオン化合物は、グラム陽性菌およびグラム陰性菌の両方に対して有用性を示すことが認識されている。これらの化合物の活性は、それらのより低い  $\text{clog} D_{7.4}$  値 (オフロキサシンについては -1.35)、および中性条件下での極性の増加へのより大きな寄与に関連している可能性がある。

#### 【0005】

プロパルギル結合抗葉酸剤 (PLA) は、グラム陽性菌およびグラム陰性菌の両方に対し、DHFR 阻害剤として作用する。発明者ら他は、MRSA および化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) に対する非常に強力な MIC 値を有する PLA (フレイ, K.M. (Frey, K.M.) ら、*Am. Soc. Microbiol.* (2012) 56 (7) : 3556 ~ 3562、ケシペディ, S. (Keshipeddy, S.) ら、*Synfacts* (2015) 11 (10) : 1026; ヴィスワナサン, K. (Viswanathan, K.) ら、*PloS One* (2012) <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029434>)、および肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) の良好な阻害を有する PLA (ラム, K.M. (Lamb, K.M.) ら、*Am. Soc. Microbiol.* (2014) 58 (12) 7484 ~ 7491) を、以前に報告している。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0006】

【非特許文献 1】フレイ, K.M. (Frey, K.M.) ら、*Am. Soc. Microbiol.* (2012) 56 (7) : 3556 ~ 3562

【非特許文献 2】ケシペディ, S. (Keshipeddy, S.) ら、*Synfacts* (2015) 11 (10) : 1026

【非特許文献 3】ヴィスワナサン, K. (Viswanathan, K.) ら、*PloS*

10

20

30

40

50

One (2012) <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029434>

【非特許文献4】ラム, K. M. (Lamb, K. M.)ら、Am. Soc. Microbiol. (2014) 58(12) 7484~7491

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する高い効力を有するDHFR阻害剤の必要性が存在する。本開示は、このような阻害剤および追加の利点を提供し、これらについて以下で論じる。

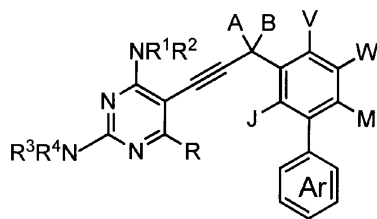
10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示は、式I

【化1】



20

(I)

の化合物およびその薬学的に許容される塩を提供する。

【0009】

式Iにおいて、変数、例えば、R、R<sup>1</sup>~R<sup>4</sup>、A、B、J、M、V、WおよびArは、以下の定義を有する。

【0010】

Rは、H、ヒドロキシル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、またはC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシである。

【0011】

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、H、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルおよびシクロアルキルから独立して選択される。

30

【0012】

AおよびBは、H、ヒドロキシル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、およびC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシから独立して選択される。

【0013】

VおよびWのうち的一方がメトキシであり、他方はH、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、およびC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシから選択される。

JおよびMは、H、ハロゲン、ヒドロキシル、ニトロ、シアノ、-COOH、-CHO、-CONH<sub>2</sub>、シクロアルキル、またはC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルから独立して選択され、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルでは任意のメチレン(-CH<sub>2</sub>)がO、NH、N(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、S、SO<sub>2</sub>、C(O)O、OC(O)、またはC(O)と任意に置き換えられており、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルはヒドロキシル、アミノ、またはハロゲンで任意に置換されている。

40

【0014】

WおよびMは一緒になって、5員もしくは6員の炭素環式環、または、N、O、およびSから独立して選択される1、2もしくは3個のヘテロ原子を含む5員もしくは6員の複素環式環を形成していてもよい。

【0015】

Ar環は、少なくとも1つの-COOH基または-CH<sub>2</sub>COOH基で置換されていて、ハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>

50

～C<sub>2</sub>ハロアルキルおよびC<sub>1</sub>～C<sub>2</sub>ハロアルコキシから独立して選択される1つ以上の置換基で任意に置換されている、フェニル、ピリジルまたはピリミジニル環である。

【0016】

本開示は、式Iの化合物またはその塩、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【0017】

本開示は、DHFRを式Iの化合物またはその塩と接触させることを含む、インビトロまたはインビボでジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を阻害する方法を提供する。

【0018】

本開示はまた、治療有効量の式Iの化合物またはその塩を患者に投与することを含む、患者における細菌感染症、真菌感染症または原生動物感染症を治療する方法を提供する。

10

【0019】

本開示は、式Iの化合物またはその塩が第1の活性薬剤であり、式Iの化合物または塩ではない第2の活性薬剤と組み合わせられるか、または共に投与される、組合せ製剤および治療方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】関連する生理的特性を有する、グラム陽性菌またはグラム陰性菌に対して有効な抗菌剤を示す図である。従来のPLAであるUCP1021を、COOH-PLAと比較している。

20

【図2A】NADPHおよび化合物15または化合物16のいずれかと結晶化した黄色ブドウ球菌DHFRの図である。図2Aは化合物15に結合した黄色ブドウ球菌DHFRを示す図である。

【図2B】図2Bは化合物16に結合した黄色ブドウ球菌DHFRを示す図である。

【図2C】図2Cは化合物15に結合した黄色ブドウ球菌DHFRの複合体の溶媒曝露された表面を示す図である。

【図2D】図2Dは化合物16に結合した黄色ブドウ球菌DHFRの複合体の溶媒曝露された表面を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

30

[用語]

化合物は、標準的命名法を用いて記載する。他に定義されない限り、本明細書で使われる全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野における当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。文脈と明らかに矛盾しない限り、各化合物名は、化合物の遊離酸または遊離塩基形態ならびに化合物の全ての薬学的に許容される塩、溶媒和物および水和物を含む。

【0022】

「式I」という用語は、あらゆるエナンチオマ、ラセミ体および立体異性体、ならびにそのような化合物の全ての薬学的に許容される塩、溶媒和物および水和物を含む、式Iを満たす、全ての化合物を包含する。「式I」には、この語句を使用する文脈と明らかに矛盾しない限り、式Iの全ての亜属群(subgeneric group)が含まれる。

40

【0023】

「a」および「an」という用語は、量の限定を表すのではなく、参照された項目のうち少なくとも1つの存在を表す。「または」という用語は、「および/または」を意味する。非限定移行句「～を含む(comprising)」は、中間的な移行句「～から本質的になる(consisting essentially of)」および限定移行句「～からなる(consisting of)」を包含する。これらの3つの移行句の1つを記載している、または「含有する」または「含む」などの代替的移行句を用いる請求項は、文脈または技術によって明らかに排除されない限り、任意の他の移行句を用いて記述することができる。値の範囲の列挙は、本明細書で特に明記しない限り、単にその

50

範囲内に含まれるそれぞれの別個の値を個々に示すのを省略した方法としての役割を果たすに過ぎず、それぞれの別個の値は、あたかも本明細書に個別に記載されているかのように本明細書に組み込まれる。全ての範囲は、その範囲内に端点を含み、これらの端点は独立して組み合わせることができる。本明細書において特に指示がない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、本明細書に記載されている全ての方法は、好適な順序で実施することができる。あらゆる例、または例示語（例えば、「など」）の使用は、単に説明のためのものであり、別段の請求がない限り、本開示の範囲を限定するものではない。本明細書におけるいずれの文言も、特許請求の範囲に記載されていない要素が、本明細書で使用する本発明の実施に不可欠であることを示すものと解釈するべきではない。他に定義されない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野における当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

10

## 【0024】

式 I の化合物は、任意の位置に同位体置換を有する式 I の全ての化合物を含む。同位体には、原子番号は同じであるが質量数が異なる原子が含まれる。一般的な例として、水素の同位体としては、トリチウムおよび重水素が挙げられ、炭素の同位体としては、 $^{12}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、および  $^{14}\text{C}$  が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、任意の 1 つ以上の水素原子が重水素原子により置き換えられる。

## 【0025】

「活性薬剤」とは、単独で、または別の化合物、元素、もしくは混合物と組み合わせて患者に投与された場合に、直接的または間接的に対象に生理学的効果を与える、化合物（本明細書にて開示された化合物を含む）、元素、または混合物を意味する。間接的な生理学的効果は、代謝産物または他の間接的なメカニズムを介して起こり得る。「活性薬剤」はまた、他の活性薬剤を増強するか、またはより活性にすることがある。例えば、式 I の化合物は、他の抗菌化合物と組み合わせて投与される場合、例えば他の抗菌化合物の MIC を低下させることによって、細菌を死滅させるかまたは細菌増殖を阻害するために直接作用するか、または他の抗菌化合物の活性を増強することがある。

20

## 【0026】

2 つの文字または記号の間がないダッシュ（「-」）は、置換基の結合点を示すために使用する。例えば、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$  は、ケト  $\text{C}(\text{O})$  基の炭素を介して結合している。

## 【0027】

「アルキル」は、特定の数の炭素原子、一般に 1 ~ 約 8 個の炭素原子を有する分枝鎖または直鎖の飽和脂肪族炭化水素基である。本明細書で使用する  $\text{C}_1$  ~  $\text{C}_6$  アルキルという用語は、1、2、3、4、5 または 6 個の炭素原子を有するアルキル基を示す。他の実施形態には、1 ~ 6 個の炭素原子、1 ~ 4 個の炭素原子、または 1 または 2 個の炭素原子を有するアルキル基、例えば、 $\text{C}_1$  ~  $\text{C}_8$  アルキル、 $\text{C}_1$  ~  $\text{C}_4$  アルキルおよび  $\text{C}_1$  ~  $\text{C}_2$  アルキルが含まれる。アルキルの例としては、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、3-メチルブチル、*t*-ブチル、*n*-ペンチルおよび *sec*-ペンチルが挙げられるが、これらに限定されない。

30

## 【0028】

「シクロアルキル」は、特定の数の炭素原子を有する飽和炭化水素環基である。単環式シクロアルキル基は、典型的には 3 ~ 約 8 個の炭素環原子または 3 ~ 6 個（3、4、5 または 6 個）の炭素環原子を有する。シクロアルキル置換基は、置換窒素原子、酸素原子もしくは炭素原子のペンダントであってもよく、または 2 つの置換基を有してもよい置換炭素原子は、スピロ基として結合したシクロアルキル基を有してもよい。シクロアルキル基の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルおよびシクロヘキシルが挙げられる。

40

## 【0029】

「ハロ」または「ハロゲン」は、フルオロ、クロロ、ブロモおよびヨードのいずれかを示す。

## 【0030】

50

「ハロアルキル」は、特定の数の炭素原子を有し、ハロゲン原子の最大許容数までの、1個以上のハロゲン原子で置換された、分枝鎖および直鎖の両方のアルキル基を示す。ハロアルキルの例としては、トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、2-フルオロエチル、2,2,2-トリフルオロエチルおよびペンタ-フルオロエチルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0031】

「ハロアルコキシ」は、酸素架橋（アルコール基の酸素）を介して結合した、本明細書で定義されるハロアルキル基を示す。

【0032】

本明細書で使用する「置換された」という用語は、特定の原子または基上の任意の1つ以上の水素が、特定の原子の通常の原子価を超えない限り、示された基から選択されたもので置き換えられることを意味する。置換基がオキソ（すなわち=O）である場合、原子上の2個の水素が置き換えられる。オキソ基がヘテロ芳香族部分を置換する場合、得られる分子は、時には互変異性形態をとることができる。例えば、2-または4-位でオキソにより置換されたピリジル基は、ピリジンまたはヒドロキシピリジンとして記載されることがある。置換基および/または変数の組合せは、そのような組合せが安定な化合物または有用な合成中間体をもたらす場合にのみ許容される。安定な化合物または安定な構造とは、反応混合物からの単離およびその後の有効な治療剤への処方に耐える、十分に頑強な化合物を示すことを意味する。特に明記しない限り、置換基はコア構造に対し命名される。例えば、アミノアルキルは、この置換基のコア構造への結合点アルキル部分にあることを意味し、アルキルアミノは、結合点アミノ基の窒素への結合であることを意味する。

10

20

【0033】

「剤形」とは、活性薬剤の投与単位を意味する。剤形の例としては、錠剤、カプセル、注射剤、懸濁液、液体、エマルジョン、クリーム、軟膏、座薬、吸入形態、経皮形態などが挙げられる。

【0034】

「医薬組成物」とは、式(I)の化合物またはその塩、溶媒和物または水和物、またはプロドラッグなどの少なくとも1つの活性薬剤と、担体などの少なくとも1つの他の物質とを含む組成物である。薬学的組成物は、1つ以上の、追加の活性薬剤を任意に含有する。指定される場合、医薬組成物は、ヒトまたは非ヒト用薬物の米国FDAのGMP（適正製造基準（good manufacturing practice））基準を満たす。「薬学的組合せ」とは、単一の剤形に組み合わせるか、またはグラム陰性菌感染症などの障害を治療するために、活性薬剤と一緒に使用されるべきであるという説明書と共に別々の剤形で一緒に提供することができる、少なくとも2つの活性薬剤の組合せである。

30

【0035】

「薬学的に許容される塩」には、開示される化合物の誘導体が含まれ、誘導体は、親化合物の無機および有機の非毒性の酸付加塩または塩基付加塩を生成することによって親化合物を修飾したものである。本発明の化合物の塩は、従来の化学的方法によって塩基性または酸性部分を含む親化合物から合成することができる。一般に、このような塩は、遊離酸形態のこれらの化合物を、化学量論量の適切な塩基（Na、Ca、Mg、またはKの水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩など）と反応させるか、または遊離塩基形態のこれらの化合物を、化学量論量の適切な酸と反応させることにより調製することができる。そのような反応は、典型的には、水中または有機溶媒中、またはその2つの混合物中で実施する。本発明の化合物の塩には、化合物の溶媒和物および化合物塩の溶媒和物がさらに含まれる。

40

【0036】

薬学的に許容される塩の例としては、アミンまたは窒素含有ヘテロアリアル環（例えば、ピリジン、キノリン、イソキノリン）などの塩基性残基の無機酸塩（*mineral acid*）または有機酸塩、カルボン酸などの酸性残基のアルカリ塩または有機塩が挙げられるが、これらに限定されない。薬学的に許容される塩としては、従来の非毒性塩およ

50

び例えば非毒性無機酸または有機酸から形成される親化合物の第4級アンモニウム塩が挙げられる。例えば、従来の非毒性酸塩としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸などの無機酸から誘導されるもの、および、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パモ酸、マレイン酸、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、メシル酸、エシル酸、ベシル酸、スルファニル酸、2-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンジスルホン酸、シュウ酸、イセチオン酸、 $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}_2\text{H}$  (式中、 $n$ は0~4)などの有機酸から調製される塩が挙げられる。追加の好適な塩のリストは、例えばG.ステッフェン ポーレクーン (G. Steffen Paulekuhn)ら、*Journal of Medicinal Chemistry* 2007、50、6665、および*Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*、P.ハインリッヒ スタール (P. Heinrich Stahl)およびカミール G.ワームース (Camille G. Wermuth)編、*Wiley-VCH*、2002に見出すことができる。

10

【0037】

本開示の医薬組成物/組合せに適用される「担体」という用語は、活性化合物が提供される希釈剤、賦形剤、またはビヒクルを意味する。

【0038】

「患者」は、医学的治療を必要とするヒトまたはヒト以外の動物である。いくつかの実施形態では、患者はヒト患者である。

20

【0039】

「提供する」とは、供与、投与、販売、頒布、譲渡(営利目的または非営利目的)、製造、調合、または調剤することを意味する。

【0040】

本明細書で使用される「治療」には、式Iの化合物などの本開示の化合物を、唯一の活性薬剤として提供するか、または(a)疾患を阻害する、すなわちその発症を阻止するのに十分である、ならびに(b)疾患を軽減する、すなわち、疾患の退行を引き起こす、および細菌感染症の場合には、対象における感染の病原性を排除または減少させるのに十分である、少なくとも1つの追加の活性薬剤と共に提供するかのいずれかで提供することが含まれる。「治療する」および「治療」とはまた、本開示の化合物の治療有効量を、唯一の活性薬剤として、または少なくとも1つの追加の活性薬剤と共に、細菌感染を有するかまたは細菌感染しやすい対象に提供することを意味する。「予防的治療」には、疾患の素因があるかもしれないが疾患を有しない対象における疾患の発生の可能性を有意に減少させるのに十分な量の、本開示の化合物を投与することが含まれる。

30

【0041】

医薬組成物/組合せの「治療有効量」とは、対象に投与された場合に、細菌感染症に関連する罹患率および死亡率を減少させるおよび/または治癒をもたらすなど、治療効果を提供するのに有効な量である。特定の状況において、微生物感染症に罹患している対象は、感染の症状を示さないことがある。したがって、化合物の治療有効量はまた、対象の血液、血清、他の体液または組織中の微生物の検出可能なレベルを有意に低下させるのに十分な量である。本開示はまた、特定の実施形態において、予防的治療および治療的処置において本開示の化合物を使用することを含む。予防的治療または防御的治療の文脈において、「治療有効量」は、細菌感染症の発生率または細菌感染症に関連する罹患率および死亡率を有意に減少させるのに十分な量である。例えば、嚢胞性線維症または人工呼吸器患者のように、対象が細菌感染のリスクが高まっていることが知られている場合には、予防的治療を施してもよい。有意な減少とは、スチューデントのT検定などの統計的有意性の標準パラメトリック検定において統計的に有意である( $p < 0.05$ )、任意の検出可能な負の変化である。

40

【0042】

50

[ 化合物についての説明 ]

本開示は、グラム陽性菌およびグラム陰性菌の両方のDHF Rの阻害剤として、プロパルギル結合抗葉酸剤(PLA)を提供する。PLAは、受動的に拡散して膜を通過し、DHF R酵素を強力に阻害する弱塩基性非古典的抗葉酸剤として特徴付けられ、多くの場合、サブマイクロモルのMIC値により細菌細胞の増殖を阻害する。本発明者ら他は、MRSAおよび化膿レンサ球菌に対する非常に強力なMIC値および肺炎桿菌の良好な阻害を以前に達成している。本開示は本発明者らが設計した、細菌細胞透過性を維持または増加させながら、負に荷電したグルタミン酸尾部により典型的に接触が行われる、双性イオンPLAおよびエナンチオマ的に純粋な化合物を提供する。黄色ブドウ球菌DHF R酵素についての酵素阻害および高分解能結晶構造の評価は、カルボン酸部分が活性部位でアルギニン残基と重要な相互作用を形成することを明らかにしている。この新規な高親和性接触の組み込みはまた、既知の耐性を付与する変異の効果を相殺するための代償的相互作用を提供し得る。この開示の特定の化合物は、MRSAを強力に阻害する。例えば、本開示の特定の化合物は、これらのMRSAに対しておよそ1 ng/mLのMIC値を示す。本開示の特定の化合物はまた、10 µg/mL以下のMIC値で大腸菌を阻害する。本開示の特定の化合物はまた、優れた薬物様特性を有する。これらの特性としては、例えば、ヒト細胞株の増殖を阻害しないこと、CYP3A4およびCYP2D6などの重要なCYP酵素を阻害しないこと、およびマイクロソーム安定性アッセイにおいて長い半減期を有することを挙げることができる。

10

【0043】

20

中性pHでは、本開示の双性イオンPLAは、2つの主要種に分配される：両者は、カルボキシレート基で脱プロトン化される。ピリミジン環は、種の35%においてプロトン化され、双性イオン阻害剤を形成する、残りは中性のピリミジン環を有し、負に荷電した分子を生じる。特定の実施形態では、カルボン酸は、活性部位において、保持された酸性残基(黄色ブドウ球菌DHF R [SaDHF R]中のAsp27)およびアルギニン(SaDHF R中のArg57)とそれぞれ水素結合を形成する。本開示は、COOH-PLAに、プロパルギル位置で非置換またはメチル置換のC<sub>6</sub>-エチルジアミノピリミジン環を、およびピフェニル系に2'または3'-メトキシ置換基のいずれかを提供する。プロパルギル置換で合成したいずれの阻害剤も、エナンチオマ的に純粋な成分として調製した。

30

【0044】

カルボン酸基の配置の構造-活性分析は、オルトおよびメタ配置がヒト酵素に対して最大の選択性を生じたが、パラ位に配置すると病原体酵素に対して最も高い親和性を生じることを示している。SaDHF Rでは、COOHをパラからメタまたはオルトに移動すると、活性がそれぞれ5分の1および12分の1に低下する。EcDHF Rに対する活性は、カルボン酸がパラ位からメタ位に移動すると、6分の1に減少するが、オルト位に移動した場合には、2.2分の1に減少する。

【0045】

MIC値は、野生型株とポーリンノックアウト株(ompFおよびompC)との間で維持され、化合物が受動的に細胞内に拡散していることを示していた。グラム陽性菌における異常な活性は、メトトレキサートの場合と同様に、負に荷電した官能基を分子に組み込んで、細胞浸透を損なうことなく酵素との重要な接触を作り出すことを示している。あるいは、グラム陰性菌において、高度に陰性のリポ多糖バリアは、静電反発により、PLAの負に荷電した集団の浸透を軽減し得る。

40

【0046】

本開示の特定のPLAは、ヒト結核菌(Myobacterium tuberculosis)(Mtb)DHF Rに対して活性である。DHF Rは現在、結核治療のために用いられていない。臨床的に承認された抗葉酸剤であるメトトレキサート、ピリメタミンおよびトリメトトレキサートは、MtbDHF R酵素の強力な阻害剤であるが、おそらく脂質が豊富な細胞壁に浸透できないため、Mtbの増殖を阻害しない。この開示の特定のP

50

PLAは、Mtb DHFR酵素活性を阻害し、また生存しているMtbの増殖を阻害する。いくつかの化合物は、1 µg/mL未満のMIC値で、Mtbの増殖を強力に阻害する。本開示の特定の化合物は、MDR - およびXDR - TB株の増殖の非常に強力な阻害剤であり、他の知られているメカニズムとの交差耐性を受けない。

【0047】

本開示の特定のPLAは、トリメトプリム - スルファメトキサゾール耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染、特に市中感染型MRSAに関連するものに対して活性である。

【0048】

トリメトプリムはジヒドロ葉酸還元酵素を阻害するが、スルファメトキサゾールはジヒドロ葉酸合成酵素を阻害する。これらの両必須酵素は、代謝における一炭素供与体の生成に重要な葉酸生合成経路に関与する。この組合せは非常に成功している一方で、耐性株が一般的になっている。dfrB染色体遺伝子の変異は、トリメトプリム耐性の主要様式である。追加の耐性メカニズムとしては、S1 DHFRとも呼ばれる遺伝子dfrA、dfrGおよびdfrKによってコードされるプラスミドコードトリメトプリム耐性DHFRの獲得が挙げられる。dfrBにおける点変異により、MIC値 256 µg/mLで耐性を付与し、S1 DHFRの獲得により、MIC値 512 µg/mLで、より高いレベルの耐性を付与する。

【0049】

いくつかの耐性臨床分離株の分析は、変異F98Yは、特に二次変異H149RまたはH30Nと組み合わせられて、非常に一般的であることを示している。TMPのIC<sub>50</sub>値は、Sa(F98Y)酵素で約400倍に増加し、補因子であるNADPH、および基質であるジヒドロ葉酸に結合したF98Y変異を有するSa DHFR酵素の結晶構造が報告されている。S1 DHFRタンパク質は、TMP感受性の表皮ブドウ球菌と比較して、98位のチロシン、ならびに2つの他の重要な変異：G43AおよびV31Iを生来的に含む。G43AおよびF98Yの組み込みは、TMP耐性を付与することを示している。全体として、耐性株の研究は、黄色ブドウ球菌DHFRを標的とする新世代の抗葉酸剤、野生型酵素に加えて、染色体変異体およびプラスミドコード耐性形態を含む酵素の変異形態を阻害しなければならないことを確認している。

【0050】

黄色ブドウ球菌のPLA耐性の一段階変異体および二段階変異体の完全な特性評価は、重要な臨床変異であるF98Y、H30N、H149R、F98Y/H30NおよびF98Y/H149Rの獲得により、より低い変異頻度ではあるが、またTMPに耐性を付与することを示す。本明細書に開示した特定のPLA化合物は、単一および二重変異型酵素ならびに野生型および変異型黄色ブドウ球菌株の両方を非常に強力に阻害する。

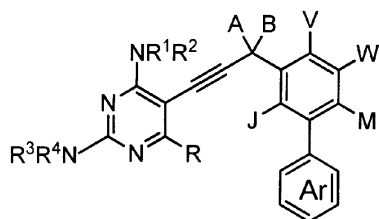
【0051】

まとめると、この一連の新規な化合物は、古典的抗葉酸剤に共通する重要な相互作用のうちの1つを模倣するカルボキシレート部分の使用を、標的酵素であるDHFRにアクセスする能力を損なうことなくプロパルギル結合抗葉酸剤の構造(architecture)にどのように組み込むことができるかを示す。8つの阻害剤の調製および評価は、これらの化合物が、以前のPLAと比較して、高い酵素親和性を有し、MRSAおよび大腸菌に対する抗菌活性を増加させることを示している。黄色ブドウ球菌DHFRを用いた2つの化合物の高分解能結晶構造は、活性部位におけるカルボキシレートとArg57との間の水媒介接触によって、親和性が増強することを明らかにしている。追加のプロファイリングは、抗菌候補物としてのこれらの化合物の開発を支援する。

【0052】

本開示は、式Iの化合物およびその薬学的に許容される塩を提供する。

## 【化2】



(I)

## 【0053】

10

式I中の変数(例えば、 $r$ 、 $R^1 \sim R^4$ 、 $A$ 、 $B$ 、 $W$ 、 $M$ および $J$ )は、発明の概要のセクションに記載の定義を有することができる。さらに、これらの変数は、以下に記載の定義のいずれかを有することができる。

## 【0054】

本開示は、安定な化合物が形成される限りにおいて、本明細書に記載される変更可能な定義の全ての組合せを含む。本開示は、以下の実施形態を含む。

## 【0055】

(1)  $R$ はメチルまたはエチルであり、 $A$ は水素であり、 $B$ は水素または $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 $V$ および $W$ のうちの一方はメトキシであり、他方は $H$ である。

## 【0056】

20

(2)  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ および $R^4$ は、 $H$ である。

## 【0057】

(3)  $J$ および $M$ は、 $H$ 、ハロゲン、ヒドロキシル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_2$ ハロアルキルおよび $C_1 \sim C_2$ ハロアルコキシから独立して選択される。

## 【0058】

(4)  $A$ は $H$ であり、 $B$ はメチルである。

## 【0059】

(5)  $J$ および $M$ は共に $H$ である。

## 【0060】

30

(6)  $Ar$ 環は、パラ位において1つの $-COOH$ 置換基で置換されており、ハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_2$ ハロアルキルおよび $C_1 \sim C_2$ ハロアルコキシから独立して選択される1つ以上の置換基で任意に置換されている。

## 【0061】

(7)  $Ar$ 環は、メタ位において1つの $-COOH$ 置換基で置換されており、ハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_2$ ハロアルキルおよび $C_1 \sim C_2$ ハロアルコキシから独立して選択される1つ以上の置換基で任意に置換されている。

## 【0062】

40

(8)  $Ar$ 環は、オルト位において1つの $-COOH$ 置換基で置換されており、ハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_2$ ハロアルキルおよび $C_1 \sim C_2$ ハロアルコキシから独立して選択される1つ以上の置換基で任意に置換されている。

## 【0063】

(9)  $Ar$ 環は置換フェニル環である。置換フェニル環は、他の実施形態に列挙されている $Ar$ 環の置換基のいずれかを有してもよい。

## 【0064】

(10)  $R$ はメチルまたはエチルであり、 $A$ は水素であり、 $B$ は水素または $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 $W$ および $M$ は一緒になって、2つの酸素原子を含む5員複素環式環を形

50

成している。

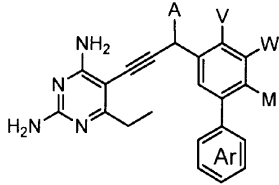
【 0 0 6 5 】

( 1 1 ) 本開示は、以下の式 I の化合物およびそれらの薬学的に許容される塩を含む。

【 0 0 6 6 】

( 1 2 ) 本開示は、式 I - A の化合物またはその薬学的に許容される塩を含み、この化合物は、表 1 に列挙されている化合物から選択される。

【 化 3 】



( I - A )

【 0 0 6 7 】

【表 1】

| 表 1 |                   |                  |                        |   |   |
|-----|-------------------|------------------|------------------------|---|---|
| Cpd | A                 | V                | W                      | M | Ar                                      |
| 13  | H                 | OCH <sub>3</sub> | H                      | H | <i>o</i> -COOH フェニル                     |
| 14  | H                 | OCH <sub>3</sub> | H                      | H | <i>m</i> -COOH フェニル                     |
| 15  | H                 | OCH <sub>3</sub> | H                      | H | <i>p</i> -COOH フェニル                     |
| 16  | H                 | H                | OCH <sub>3</sub>       | H | <i>p</i> -COOH フェニル                     |
| 29  | S-CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H                      | H | <i>p</i> -COOH フェニル                     |
| 30  | R-CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H                      | H | <i>p</i> -COOH フェニル                     |
| 31  | R-CH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub>       | H | <i>p</i> -COOH フェニル                     |
| 32  | S-CH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub>       | H | <i>p</i> -COOH フェニル                     |
| 33  | S-CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H                      | H | <i>p</i> -COOCH <sub>3</sub> フェニル       |
| 34  | R-CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H                      | H | <i>p</i> -COOCH <sub>3</sub> フェニル       |
| 35  | CH <sub>3</sub>   | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |   | <i>p</i> -CH <sub>2</sub> -C(O)-OH フェニル |
| 36  | CH <sub>3</sub>   | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |   | <i>p</i> -OH フェニル                       |
| 37  | H                 | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |   | <i>p</i> -OH フェニル                       |
| 38  | H                 | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |   | 3-F,4-OH-フェニル                           |
| 39  | H                 | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |   | 3,5-ジ-F,4-OH-フェニル                       |
| 40  | H                 | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |   | 3,5-ジ-F,4-OCH <sub>3</sub> -フェニル        |
| 41  | S-CH <sub>3</sub> | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |   | <i>p</i> -COOH-フェニル                     |
| 42  | R-CH <sub>3</sub> | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |   | <i>p</i> -COOH-フェニル                     |
| 43  | CH <sub>3</sub>   | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |   | 2,3,5-トリ-F,4-OH-フェニル                    |
| 44  | CH <sub>3</sub>   | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |   | 2,3,5,6-テトラ-F, 4-OH-フェニル                |
| 45  | CH <sub>3</sub>   | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |   | 3-CN, 4-OH-フェニル                         |

【 0 0 6 8 】

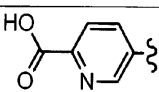
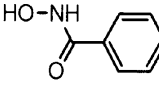
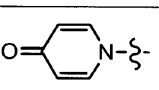
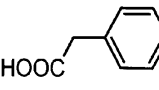
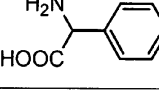
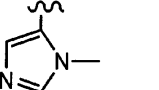
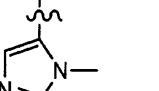
10

20

30

40

【表 2】

| 表 1 |                   |                  |                        |                  |   |
|-----|-------------------|------------------|------------------------|------------------|---|
| Cpd | A                 | V                | W                      | M                | Ar  |
| 46  | CH <sub>3</sub>   | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |                  | 4-CH <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> HN-フェニル   |
| 47  | CH <sub>3</sub>   | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |                  | 4-CH <sub>3</sub> HNSO <sub>2</sub> -フェニル   |
| 48  | CH <sub>3</sub>   | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |                  |    |
| 49  | CH <sub>3</sub>   | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |                  |    |
| 50  | CH <sub>3</sub>   | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |                  | 3,4,-ジ-OH-フェニル  |
| 51  | CH <sub>3</sub>   | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |                  |    |
| 52  | H                 | H                | OMe                    | H                |    |
| 53  | H                 | H                | OMe                    | H                |   |
| 54  | CH <sub>3</sub>   | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |                  |  |
| 55  | R-CH <sub>3</sub> | H                | -O-CH <sub>2</sub> -O- |                  | ピリド-4-イル  |
| 56  | H                 | OCH <sub>3</sub> | H                      | H                |  |
| 57  | R-CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H                      | H                | ピリド-4-イル  |
| 58  | R-CH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub>       | H                | p-COOH フェニル   |
| 59  | H                 | H                | OCH <sub>3</sub>       | H                | p-COOH フェニル   |
| 60  | H                 | H                | OCH <sub>3</sub>       | OCH <sub>3</sub> | 4-ピリジル  |

10

20

30

40

## 【 0 0 6 9 】

## [ 医薬組成物 ]

本開示は、活性薬剤として少なくとも1つの式Iの化合物を、薬学的に許容される担体と共に含有する医薬組成物を含む。

## 【 0 0 7 0 】

本開示の医薬組成物としては、眼用製剤、経口製剤、経鼻製剤、経皮製剤、密封有りまたは無しの局所製剤、静脈内製剤（ボラスおよび注入の両方）、吸入製剤、および注射剤（腹腔内、皮下、筋肉内または非経口）が挙げられる。この組成物は、錠剤、丸薬、カプセル、粉末、顆粒、リポソーム、滅菌眼用溶液、非経口用溶液または懸濁液、計量エアロゾルまたは液体スプレ、滴下、アンプル、自動注入デバイス、または座薬などの投与単

50

位で、眼に、経口的に、鼻腔内に、舌下に、非経口的に、または直腸に、または吸入もしくは吹送によって投与するためのものであってもよい。

【0071】

本開示の組成物を含有する剤形は、選択された投与経路により、治療効果をもたらすのに必要な有効量の活性薬剤を含有する。組成物は、本開示の化合物またはその塩形態を約5,000mg～約0.5mg（好ましくは約1,000mg～約0.5mg）含んでもよく、選択された投与方法に好適な任意の形態に構成することができる。剤形は、遅延放出または持続放出を含む即時放出または制御放出用に、処方することができる。医薬組成物は、式Iの化合物を唯一の活性薬剤として含んでもよく、または1つ以上の追加の活性薬剤と組み合わせてもよい。特定の実施形態では、医薬組成物は、式Iの化合物および少なくとも1つの直接作用性抗生物質（インピボで病原菌を死滅させるのに有効な化合物）を含む。

10

【0072】

[治療方法]

本開示は、本開示の1つ以上の有効量の化合物を、細菌感染のリスクがある対象または細菌感染症に罹患している対象に投与することによって、対象における細菌感染症を治療する方法を含む。本開示は、式Iの化合物を、細菌感染症を治療するために使用する治療方法、および化合物を使用して、細菌を抗菌剤に感作させる方法を含む。この実施形態では、式Iの化合物は、細菌感染症を有する患者に、治療有効量の抗菌剤と同時にまたは連続して投与する。式Iの化合物は、多くの場合、MICを低下させることによって、他の抗菌剤の有効性を高める。

20

【0073】

ヒト患者の治療が特に企図されている。しかし、非ヒト対象の治療は、本開示の範囲内である。本開示は、魚類、両生類、爬虫類または鳥類における微生物感染症の治療または予防を含むが、本開示の好ましい実施形態は、哺乳動物の治療を含む。

【0074】

いくつかの実施形態では、細菌感染症または抗生物質耐性(antibiotic-tolerant)もしくは抗生物質耐性(antibiotic-resistant)感染症は、グラム陽性菌によって引き起こされる。

【0075】

いくつかの実施形態では、細菌感染症または抗生物質耐性(antibiotic-tolerant)もしくは抗生物質耐性(antibiotic-resistant)感染症は、グラム陰性菌によって引き起こされる。

30

【0076】

いくつかの実施形態では、細菌感染症はヒト型結核菌(Mtb)である。いくつかの実施形態では、ヒト型結核菌は、多剤耐性株、例えば、アミカシン、カナマイシンおよび/またはカプレオマイシン耐性株である。本明細書に開示する特定の化合物は、1μg/mL未満のMIC値でMtbを阻害する。

【0077】

本開示の方法のいずれかの実施形態では、微生物感染は、病原菌感染の結果である。病原菌の例としては、エアロバクター属(Aerobacter)、アエロモナス属(Aeromonas)、アシネトバクター属(Acinetobacter)、アグロバクテリウム属(Agrobacterium)、バチルス属(Bacillus)、バクテロイデス属(Bacteroides)、バルトネラ属(Bartonella)、ボルデテラ属(Bordetella)、ブルセラ属(Brucella)、ブルクホルデリア属(Burkholderia)、カリマトバクテリウム属(Calymmatobacterium)、カンピロバクター属(Campylobacter)、シトロバクター属(Citrobacter)、クロストリジウム属(Clostridium)、コリネバクテリウム属(Corynebacterium)、エンテロバクター属(Enterobacter)、エンテロコッカス属(Enterococcus)、エシェリキア

40

50

属 (*Escherichia*)、フランシセラ属 (*Francisella*)、ヘモフィルス属 (*Haemophilus*)、ハフニア属 (*Hafnia*)、ヘリコバクター属 (*Helicobacter*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、レジオネラ属 (*Legionella*)、リステリア属 (*Listeria*)、モルガネラ属 (*Morganella*)、モラクセラ属 (*Moraxella*)、プロテウス属 (*Proteus*)、プロビデンシア属 (*Providencia*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*)、シゲラ属 (*Shigella*)、スタフィロコッカス属 (*Staphylococcus*)、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*)、トレポネーマ属 (*Treponema*)、キサントモナス属 (*Xanthomonas*)、ビブリオ属 (*Vibrio*)、およびエルシニア属 (*Yersinia*) 内の細菌が挙げられるが、これらに限定されない。このような細菌の具体例としては、ビブリオ・ハーベイ (*Vibrio harveyi*)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、ビブリオ・パラヘモリチカス (*Vibrio parahaemolyticus*)、ビブリオ・アルギノリチカス (*Vibrio alginolyticus*)、シュードモナス・ホスホレウム (*Pseudomonas phosphoreum*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、エルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*)、大腸菌、サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、エルシニア・ペスティス (*Yersinia pestis*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化膿レンサ球菌、肺炎桿菌、ブルクホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*)、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、および黄色ブドウ球菌が挙げられる。

【0078】

いくつかの実施形態では、感染はカンジダ・アルビカンスなどの酵母感染である。

【0079】

いくつかの実施形態では、感染は、多微生物感染、例えば、2つ以上の微生物 (*organism*) を含む感染である。いくつかの実施形態では、感染は、上記に列挙した微生物の少なくとも1つ、例えば、シュードモナス、例えば、緑膿菌、クレブシエラ、例えば、肺炎桿菌、および/またはアシネトバクター、例えば、A. バウマンニのうち1つ以上を含む。

【0080】

いくつかの実施形態では、方法はさらに、本開示の化合物と組み合わせて、これらに限定されるものではないが、ペニシリン、セファロスポリン、カルバセフェム、セファマイシン、カルバペネム、モノバクタムなどの  $\beta$ -ラクタム、フルオロキノロンを含むキノロンおよび類似のDNA合成阻害剤、テトラサイクリン、アミノグリコシド、マクロライド、糖ペプチド、クロラムフェニコール、グリシルシクリン、リンコサミド、リポペプチド、ダプトマイシンなどのリポデプシペプチド、およびオキサゾリジノンからなる群から選択される抗生物質などの、追加の活性薬剤を投与するステップを含む。

【0081】

いくつかの実施形態では、細菌感染症は、上気道および下気道感染症、肺炎、菌血症、全身感染症、敗血症および敗血症性ショック、尿路感染症、胃腸感染症、心内膜炎、骨感

10

20

30

40

50

染症、髄膜炎などの中枢神経系感染症、または皮膚および軟部組織の感染症である。

【0082】

いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物、例えばヒトまたは非ヒト哺乳動物である。いくつかの実施形態では、方法は、1つ以上の細胞、例えば培養皿中の細胞を処理することを含む。

【0083】

一態様では、本開示は、対象におけるグラム陰性感染症の治療方法であって、本明細書に記載の化合物の治療有効量を、そのような治療を必要とする前記対象に投与することを含む、方法を特徴とする。

【0084】

いくつかの実施形態では、グラム陰性感染症は、緑膿菌によって引き起こされる。

【0085】

他の実施形態では、本開示は、表皮ブドウ球菌および黄色ブドウ球菌などのグラム陽性菌によって引き起こされる感染症の治療を含む。

【0086】

いくつかの実施形態では、対象は、外傷患者または火傷または皮膚創傷に罹患した熱傷患者である。

【0087】

さらなる態様では、本開示は、対象における細菌の耐性を低減させる方法であって、本明細書に記載の化合物の治療有効量を、前記対象に投与することを含む、方法を特徴とする。

【0088】

いくつかの実施形態では、この方法は、抗菌剤治療に耐性のある細菌による感染症に罹患している前記対象を同定することをさらに含む。

【0089】

本開示は、本開示の化合物または組成物が、経口的に、局所的に、静脈内に、または非経口的に投与されるか、または吸入される治療方法を含む。

【0090】

本開示の化合物は、1日当たり約1～約5回投与してもよい。毎日の投与または定期的投与を行うことができる。投与頻度はまた、使用する化合物、治療する特定の疾患およびその疾患を引き起こす細菌により変化してもよい。しかし、任意の特定の対象の具体的な用量レベルは、使用する特定の化合物の活性、年齢、体重、全身の健康状態、性別、食事、投与時間、投与経路、および排泄率、薬物の組合せおよび治療を受けている特定の疾患の重症度を含む種々の要因に依存することが理解されるであろう。

【0091】

[PLA DHFR 阻害剤の抗結核効果]

発明者らは、細胞増殖阻害のためのメカニズムとして、DHFR 阻害を確立している。本開示の特定の化合物についてはまた、2つの異なるプロモータの制御下でDHFR を過剰発現する2つのM. smegmatis 株における抗菌活性について試験した。UCP1066を除く全ての化合物は、両菌株において少なくとも32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のMIC値を有意に増加させ、これは抗菌活性がおそらくDHFR 阻害に起因すると思われることを示している。この化合物は過剰発現株において4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のMIC値を有し、この値は、エルドマン(Erdman)株に対するその値と同じである。

【0092】

発明者らは、結核菌DHFR (MtbDHFR) タンパク質を発現させ、精製し、340 nmで補因子NADPHの酸化を分光的にモニタする標準的な手順を用いて、酵素阻害を測定した(表6、実施例10を参照)。実験は3連で実施し、2つの異なる日に検証した。アッセイで試験した阻害剤の多くは、MtbDHFR 酵素に対して適度に強力であり、70～600 nMの範囲のIC<sub>50</sub>値を有する。IC<sub>50</sub>値の範囲は、MIC値の範囲よりも比較的狭く、これは酵素に対する活性が、抗菌効力を引き起こす要因の1つに過ぎ

10

20

30

40

50

ないことを、ここでもまた示唆している。表6は、ほとんどの化合物がヒト酵素に対して非常に類似した $IC_{50}$ 値を有することを示す。潜在的なヒト細胞毒性を調べるために、これらの有力な化合物の細胞毒性効果を、ヒト皮膚線維芽細胞であるHepG2およびMCF-10細胞において評価した。全ての場合において、細胞の増殖は、500 $\mu$ M未満の化合物濃度で阻害されない。

【0093】

本開示のPLAはまた、5つの多剤耐性株であるTB株、Mtb365株、Mtb276株、MTb352株、Mtb56株およびMtbC-31株、ならびに1つの超多剤耐性(XDR)株であるMtb5を評価した。表7の実施例10を参照されたい。全体的に、各菌株は、0.25~4 $\mu$ g/mLの間のMIC値で、INHに耐性である。菌株のうち、Mtb5、Mtb365およびMtb56もまた、それぞれ8、64および32 $\mu$ g/mLのMIC値で、リファンピンに高度に耐性である。これらの菌株は、エタンブトール、ストレプトマイシンおよびモキシフロキサシンを含む様々な他の薬剤に対しても耐性である。PLAは、わずかに低下したレベルであるが、大多数のMDR株に対して活性である。この化合物は、C-31株に対して活性を示さなかった。興味深いことに、化合物58および59は、MDR株(Mtb352)およびXDR株(Mtb5)に対して非常に活性であり、それぞれMtb352に対して0.06または0.5 $\mu$ g/mLのMIC値、Mtb5に対して0.25および2 $\mu$ g/mLのMIC値である。

【0094】

[略称]

【表3】

|       |               |       |                                    |
|-------|---------------|-------|------------------------------------|
| BSA   | ウシ血清アルブミン     | MeOH  | メタノール                              |
| DCM   | ジクロロメタン       | NADPH | ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート           |
| DMF   | ジメチルフラン       | Sa    | 黄色ブドウ球菌                            |
| DMSO  | ジメチルスルホキシド    | TES   | N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]-2-アミノエタンスルホン酸 |
| Ec    | 大腸菌           | TFA   | トリフルオロ酢酸                           |
| EDTA  | エチレンジアミンテトラ酢酸 | THF   | テトラヒドロフラン                          |
| EtOAc | 酢酸エチル         | TLC   | 薄層クロマトグラフィー                        |
| HRMS  | 高分解能質量分析法     | TMSCI | 塩化トリメチルシリル                         |
| KOAc  | 酢酸カリウム        | UPLC  | 超高速液体クロマトグラフィー                     |

【実施例1】

【0095】

[一般的方法]

$^1$ Hおよび $^{13}$ C NMRスペクトルは、400MHzでBruker機器にて記録した。化学シフトはppm単位で報告し、DMSO残留溶媒を基準とする、 $^1$ Hおよび $^{13}$ Cについてはそれぞれ、2.50および39.51ppmであった。高分解能質量分析は、University of Connecticut Mass Spectrometry Laboratoryが、DART源を備えるAccuTOF質量分析計を用いて行った。旋光度は、589nmのJasco P-2000偏光計で測定した。TLC分析は、Sorberent TechnologiesシリカゲルHL TLCプレートで行った。全てのガラス器具をオープン乾燥し、アルゴン雰囲気下で冷却した。無水ジクロロメタン、エーテル、およびテトラヒドロフランを、Baker Cycle-Tain

ers から直接入手して使用した。無水ジメチルホルムアミドを Acros から購入し、アルゴンでパージすることによって脱気した。全ての試薬は、特に明記しない限り、商業的供給元から直接入手して使用した。Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中の CuI (10% / w) - (Pd / Cu) の予混合不均一混合物を、菌頭カップリング用に使用した。

【0096】

<実施例1>

[双性イオンPLAの合成]

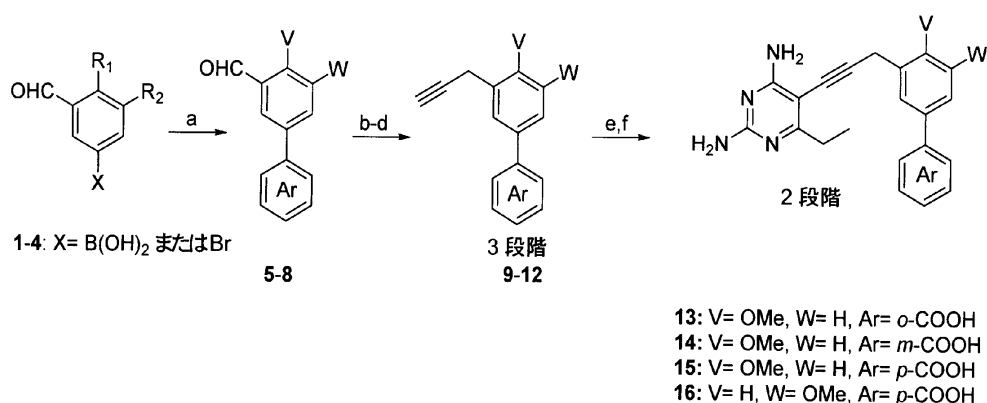
本開示の化合物は、鈴木反応により、t-ブチルベンゾエートを好適なB環ベンズアルデヒド1にカップリングさせ、続いて鎖延長およびジアミノピリミジン頭部基を用いて菌頭カップリングを行うことによって調製した。強酸性条件下でのt-ブチルエステルの最終脱保護は、スムーズかつ良好な収率で進行した(スキーム1)。

10

【0097】

スキーム1. 双性イオンPLAの合成

【化4】



20

【0098】

(a) Ar - B(OH)<sub>2</sub> または Ar - Br、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>、Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、ジオキサン: H<sub>2</sub>O、90、(b) メトキシメチルトリフェニルホスホニウムクロリド、NaO<sup>t</sup>Bu、THF、0、(c) NaI、TMSCl、MeCN、-20、(d) ジメチル(1-ジアゾ-2-オキソプロピル)ホスホネート、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、MeOH (e) ヨードエチルジアミノピリミジン、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、CuI、KOAc、DMF、50、(f) TFA、DCM。

30

【0099】

<実施例2>

[メチル分枝鎖同族体の合成]

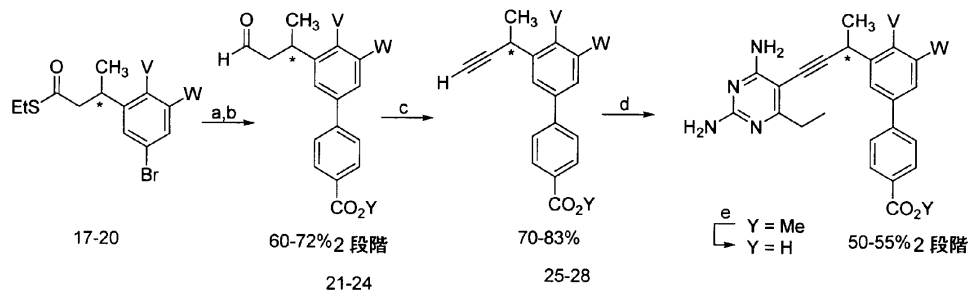
既知の方法を用いて、15および16のメチル分枝鎖同族体を調製した。(ヴィスワナサン, K. (Viswanathan, K.)ら、PloS One (2012) <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029434>) PLA エナンチオマの合成は、先に報告した、鈴木カップリングにより4-メチルベンゾエートボロン酸にカップリングされた非対称チオエステル(17~20)から開始した。ラセミ合成と同様に、最後の合成工程としてメチルエステル開裂を達成することができ、化合物29~34を得ることができた。

40

【0100】

スキーム2. 双性イオンPLAの不斉合成

## 【化5】



29(S), 30(R): V = OMe, W = H, Y = H  
31(R), 32(S): V = H, W = OMe, Y = H

10

## 【0101】

(a) PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、4-メトキシカルボニルフェニルボロン酸、ジオキサン：H<sub>2</sub>O、90、(b) 10% Pd/C、Et<sub>3</sub>SiH、DCM、(c) ノナフルフルオリド、P<sub>1</sub>-t-Bu-トリス(テトラメチレン)ホスファゼン塩基、DMF、-15 ~ 室温、(d) ヨードエチルジアミノピリミジン、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、CuI、KOAc、DMF、50、(e) LiOH、THF：H<sub>2</sub>O、32。

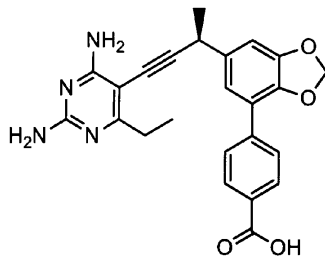
## 【0102】

<実施例3>

[(S)-4-(6-(4-(2,4-ジアミノ-6-エチルピリミジン-5-イル)ブタ-3-イン-2-イル)ベンゾ[D][1,3]ジオキソール-4-イル)安息香酸の合成：(化合物41)]

20

## 【化6】



30

## 【0103】

攪拌子を備えた20 mLのスクリーキャップバイアルに、エチル・ヨードジアミノピリミジン(0.57 mmol、0.15 g、1当量)、Pd/Cu(0.05 mmol、0.03 g、0.08当量)、およびKOAc(5.7 mmol、0.55 g、10当量)を添加した。アルゴンでパージした無水DMF(0.05 M、11.3 mL)を加え、次いでアルキン(0.73 mmol、0.25 g、1.3当量)を加えた。反応混合物をアルゴン下で15分間攪拌し、凍結脱気法により1回脱気した。バイアルをアルゴン下で密閉し、60 に加熱し、反応をTLCでモニタした。反応の最後に暗赤褐色の溶液を濃縮し、生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィ(粗混合物(10% / wのシステイン中のSiO<sub>2</sub> - 1.5 g、NH<sub>2</sub>末端保護されたSiO<sub>2</sub> - 1.5 g)の予備吸着、カラム用SiO<sub>2</sub> 1.3 g、2% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)で精製し、カップリングしたピリミジンを淡褐色の固体として得た(0.2 g、収率72%)。TLC R<sub>f</sub> = 0.4 (5% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。0 に冷却したd-CHCl<sub>3</sub>(0.02 M、2 mL)中のピリミジンカップリングt-ブチルエステル生成物(0.0411 mmol、0.02 g、1当量)を、トリフルオロ酢酸(TFA)(8.22 mmol、200当量、0.63 mL)を用いて脱保護した。滴加後、反応混合物を室温にした。反応の終わりに、NMRによりモニタし、反応混合物を20 で回転蒸発させ、真空下に15分間保持して過剰のTFAを除去した。少量のTFAを含有する生成混合物に、シリカゲル(1 g)に予備吸着させるために無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を添加した。フラッシュカラムクロマトグラフィを最

40

50

初に100% EtOAc、続いてEtOAc中の0.01% TFAで行った(5gシリカゲル); TLC Rf = 0.3 (0.01% TFAを含む10% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。清浄な画分を20で回転蒸発させ、溶媒が確実に完全除去されるようにした。油性TFA塩をpH7のリン酸緩衝液で中和した。得られた白色沈殿物を緩衝溶液と共にエッペンドルフチューブに移し、遠心分離して水を沈殿物から分離した。水層をデカントした後、白色沈殿物をジエチルエーテルおよびメタノールですすぎ、水を除去した。ピンク色を帯びた乾燥した白色固体(0.01g、収率57%)を特性評価および生物学的評価に付した。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d) 8.03 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.28 (広幅, 2H), 6.18 (s, 2H), 6.12 (s, 2H), 4.12 (q, J = 7 Hz, 1H), 2.55 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.54 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.11 (t, J = 7.6 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d) 171.5, 167.1, 164.2, 161.1, 148.1, 143.4, 139.5, 138.4, 129.8, 129.7, 127.5, 120.2, 118.8, 107.3, 101.2, 100.5, 87.8, 76.0, 32.0, 28.8, 24.6, 12.4; HRMS (DART, M+ + H) m/z 431.1708 (C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>の計算値, 431.1719); [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +3.30 (c, 0.146, DMSO).

10

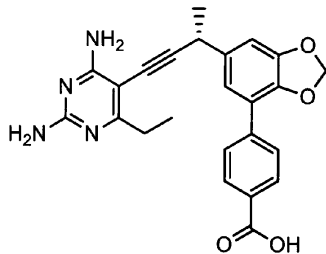
## 【0104】

&lt;実施例4&gt;

[(R)-4-(6-(4-(2,4-ジアミノ-6-エチルピリミジン-5-イル)ブタ-3-イン-2-イル)ベンゾ[D][1,3]ジオキソール-4-イル)安息香酸の合成]

## 【化7】

20



## 【0105】

攪拌子を備えた20mLのスクリュウキャップバイアルに、エチル-ヨードジアミノピリミジン(0.45mmol、0.12g、1当量)、Pd/Cu(0.04mmol、0.025g、0.08当量)、およびKOAc(4.47mmol、0.44g、10当量)を添加した。アルゴンでパージした無水DMF(0.05M、8.9mL)を加え、次いでアルキン(0.58mmol、0.20g、1.3当量)を加えた。(S)エナンチオマと同じ処理後、(R)エナンチオマを淡褐色固体として得た(0.164g、収率75%)。TLC Rf = 0.4 (5% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); 0に冷却したd-CHCl<sub>3</sub>(0.02M、3mL)中のピリミジンカップリングt-ブチルエステル生成物(0.062mmol、0.03g、1当量)を、トリフルオロ酢酸(TFA)(18.50mmol、300当量、1.42mL)を用いて脱保護した。上記と同じ脱保護処理を繰り返し、(R)カルボン酸を、ピンク色を帯びた白色固体として得た(0.015g、収率56%)。TLC Rf = 0.3 (0.01% TFAを含む10% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d) 8.03 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.26 (広幅, 2H), 6.15 (s, 2H), 6.12 (s, 2H), 4.11 (q, J = 7 Hz, 1H), 2.56 (m, 2H), 1.53 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.11 (t, J = 7.5 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d) 171.6, 167.0, 164.2, 161.1, 148.1, 143.4, 139.5, 138.4, 129.8, 129.7, 127.5, 120.2, 118.8, 107.3, 101.2, 100.5, 87.8, 76.0, 32.0, 28.8, 24.6, 12.4; HRMS (DART, M+ + H) m/z 431.1708 (C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>の計算値, 431.1719); [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -5.20 (c, 0.143, DMSO).

30

40

## 【0106】

&lt;実施例5&gt;

50

## [ DHFR 阻害アッセイ ]

PET-41a(+)中の組換えSaDHFRおよびEcDHFRを、大腸菌BL21(DE3)(Invitrogen)細胞で過剰発現させ、ニッケルアフィニティークロマトグラフィ(5Prime)を用いて精製した。タンパク質を、PD-10カラム(GE Healthcare)を用いて、20mM Tris pH7.0、20%グリセロール、0.1mM EDTA、2mM DTTを含む緩衝液中で脱塩し、分注して-80で保存した。

## 【0107】

(黄色ブドウ球菌MIC)

最小阻害濃度は、Isosensitest Broth(Oxoid)中の $5 \times 10^5$  CFU/mLのATCC株43300の最終接種物を用いて、標準微量希釈プロスアッセイのためのClinical and Laboratory Standards Instituteのガイドラインに従って測定した。MICは、増殖を視覚的に阻害する阻害剤の最低濃度として定義した。37で18時間培養した後、A600で増殖をモニタした。Presto Blue(Life Technologies)を用いて比色分析によりMICを確認した。

10

## 【0108】

(大腸菌)

最小阻害濃度を、大腸菌(ATCC 25922)およびIsosensitest Broth(Oxoid)中の $1 \times 10^5$  CFU/mLの接種物を用いた微量希釈プロスアッセイを用いて測定した。Alamar Blueアッセイを用いて、A600で増殖をモニタし、MICは、増殖を完全に阻害する阻害剤の最低濃度として定義する。

20

## 【0109】

黄色ブドウ球菌(Sa)、大腸菌(Ec)およびヒト(Hu)DHFR酵素の阻害(IC50値)について化合物13~16および29~34を評価し、データを表1に示す。340nMの吸光度でDHFRによるNADPH酸化速度をモニタすることにより、酵素阻害アッセイを行って、両SaおよびEcDHFR酵素のIC50値を測定した。反応は、20mM TES pH7.0、50mM KCl、0.5mM EDTA、10mM MEおよび1mg/mL BSA、0.1mM NADPHおよび2μg/mL酵素を含有する緩衝液中で、室温にて行った。DMSO中の阻害剤を酵素/NADPH混合物に添加し、5分間インキュベートした後、50mM TES中の0.1mMジヒドロ葉酸を添加した。SaDHFRおよびEcDHFR IC50カラムの括弧内の数字は、ヒトDHFR酵素の阻害に対する倍選択性を表す。

30

## 【0110】

黄色ブドウ球菌(Sa)、大腸菌(Ec)およびヒト(Hu)DHFR酵素の化合物阻害(表2および表3)を示す。

## 【0111】

【表4】

表 2. 双性イオン PLA 化合物および生物学的活性

| Cpd | A                 | V                | W                | Ar =<br>以下で置<br>換された<br>フェニル     | Sa IC <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | Ec IC <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | Hu IC <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | 黄色ブド<br>ウ球菌<br>43300<br>( $\mu$ g/mL) | 大腸菌<br>25922<br>( $\mu$ g/mL) | 大腸菌<br>NR698<br>( $\mu$ g/mL) |
|-----|-------------------|------------------|------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 13  | H                 | OCH <sub>3</sub> | H                | <i>o</i> -COOH                   | 0.359<br>(10)                     | 0.195<br>(17.9)                   | 3.5                               | >20                                   | >32                           | 20                            |
| 14  | H                 | OCH <sub>3</sub> | H                | <i>m</i> -COOH                   | 0.157<br>(9.5)                    | 0.526<br>(3.4)                    | 1.5                               | 0.625                                 | >20                           | 0.0391                        |
| 15  | H                 | OCH <sub>3</sub> | H                | <i>p</i> -COOH                   | 0.032<br>(25)                     | 0.090<br>(9)                      | 0.817                             | 0.0195                                | >20                           | 0.0098                        |
| 16  | H                 | H                | OCH <sub>3</sub> | <i>p</i> -COOH                   | 0.011<br>(63)                     | 0.507<br>(1.35)                   | 0.688                             | 0.0195                                | >20                           | 0.0049                        |
| 29  | S-CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H                | <i>p</i> -COOH                   | 0.037<br>(7.2)                    | 0.177<br>(1.5)                    | 0.266                             | 0.625                                 | >20                           | 0.0391                        |
| 30  | R-CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H                | <i>p</i> -COOH                   | 0.216<br>(2.4)                    | 0.289<br>(1.8)                    | 0.52                              | 0.0195                                | 20                            | 0.0012                        |
| 31  | R-CH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub> | <i>p</i> -COOH                   | 0.009<br>(28)                     | 0.084<br>(3)                      | 0.254                             | 0.0098                                | 10                            | 0.0024                        |
| 32  | S-CH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub> | <i>p</i> -COOH                   | 0.014<br>(36)                     | 0.166<br>(3)                      | 0.502                             | 0.0098                                | 10                            | 0.0024                        |
| 33  | S-CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H                | <i>p</i> -COOC<br>H <sub>3</sub> | 0.022                             | 0.034                             |                                   | 0.625                                 | >20*                          | 0.156                         |
| 34  | R-CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H                | <i>p</i> -COOC<br>H <sub>3</sub> | 0.205                             | 0.172                             |                                   | 10                                    | >20*                          | 1.875                         |

【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

【表5】

表 3.追加の双性イオンPLA 構造物および生物学的活性

| Cpd | A               | Ar =<br>以下で置換され<br>たフェニル           | Sa IC <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | Ec IC <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | Hu IC <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | 黄色ブドウ<br>球菌<br>43300<br>( $\mu$ g/mL) | 大腸菌<br>25922<br>( $\mu$ g/mL) | 大腸菌<br>NR698<br>( $\mu$ g/mL) |
|-----|-----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 35  | CH <sub>3</sub> | <i>p</i> -CH <sub>2</sub> -C(O)-OH |                                   |                                   |                                   |                                       |                               |                               |
| 36  | CH <sub>3</sub> | <i>p</i> -OH                       |                                   |                                   |                                   |                                       |                               |                               |
| 37  | H               | <i>p</i> -OH                       |                                   | 2.5                               |                                   |                                       | 0.625                         | 0.002                         |
| 38  | H               | 3-F,4-OH                           |                                   | 1.25                              |                                   |                                       | 0.625                         | 0.001                         |
| 39  | H               | 3,5-ジ-F, OH                        |                                   | 0.625                             |                                   |                                       | 0.625                         | 0.001                         |
| 40  | H               | 3,5-ジ-F, OCH <sub>3</sub>          |                                   | >20                               |                                   |                                       | 5                             | 0.78                          |

## 【0113】

&lt;実施例6&gt;

[構造研究]

双性イオン化合物15および16に結合したSaDHFRの構造を、X線結晶学によって測定した。

## 【0114】

(SaDHFR : NADPH : 15)

18 mg/mLタンパク質の精製SaDHFRを、ハンギングドロップ法により、DMSO中の2 mM NADPHおよび1 mM阻害剤15と共結晶化した。タンパク質と補因子との混合物を、氷上で3時間インキュベートした。等体積のタンパク質溶液を、0.1 M MES、pH 5.5、0.2 M 酢酸ナトリウム、17% PEG 10,000および12.5%  $\beta$ -ブチラクトンを含む最適化された緩衝溶液に添加した。4℃で保存すると、通常は7日以内に結晶が形成される。結晶を採取し、25%グリセロールを含む抗凍結(cryo-protectant)緩衝液中で凍結した。データは、SLAC National Accelerator LaboratoryのStanford Synchrotron Radiation Light sourceにてビームライン7-1で遠隔収集した。HKL2000を使用してデータを指数付けし、スケールングした。プローブとしてPDB ID: 3F0Qを使用して、Phaser結晶学ソフトウェア(マッコイ A. J. (McCoy, A. J.))ら、J. Appl. Cryst. (2007) 40: 658~674)を使用して分子置換溶液を同定した。CootおよびPhenixを使用して、許容されるR<sub>work</sub>およびR<sub>free</sub>が達成されるまで、構造を精密化した。

## 【0115】

(SaDHFR : NADPH : 16)

精製SaDHFRを、ハンギングドロップ法により、DMSO中の2 mM NADPHおよび1 mMの16と共結晶化した。結晶化の詳細は、緩衝液を0.1 M MES、pH

5.0に変更したことを除いて上記で使用したものと同様であった。Connecticut大学のProtein X-Ray Crystallography FacilityのRigaku Highflux Homelabシステムで、データを収集した。Structure Studio (d\*Trek)を使用してデータを指数付けし、スケーリングした。上記と同様に、Phaserを使用して分子置換を行い、Coot (エムズリー, P. (Emsley, P.) およびコウタン, K. (Cowtan, K.)), Acta Cryst., (2004) D50: 2126~2132) および Phenix (アダムス, P.D. (Adams, P.D.)), Acta Cryst., (2010) D66: 213~221) を使用して、構造精密化を行った。

#### 【0116】

NADPHおよび阻害剤15または16と複合体を形成したSaDHFRの結晶は、それぞれ2.24 または1.81 までの回折振幅を生じた。構造は、モデルとしてPDB 3F0Q (フレイ, K.M. (Frey, K.M.))<sup>5</sup>、J. Structural Biology (2010) 170(1): 93~97) に基づいて、分子置換法を用いて解明した。両方の構造は、結合した抗葉酸剤および、 $\beta$ -NADPHとその代替の $\beta$ -アノマ(化合物15を有する構造は閉環した互変異性体状態の $\beta$ -アノマを示す)との二重占有(フォックス, K.M. (Fox, K.M.) およびカープラス, P.A. (Karplus, P.A.)), Structure (1994) 2(11): 1089~1105)、または $\beta$ -アノマ(化合物16を用いた構造)の全占有のいずれかを特徴とする。化合物15に結合した構造は、カルボン酸とArg 57の側鎖との間の水分子の配位を示す(図2A)。化合物16(図2B)を用いた構造は、16のカルボン酸と、Arg 57上のアミノ基およびLeu 28のカルボニル酸素との間で配位した、少なくとも4つの水分子を含む広範な水ネットワークを示す。水ネットワークは、Asn 56およびThr 36の側鎖とのさらなる水素結合相互作用を含むように拡大する(図2B)。阻害剤の結合様式は、阻害剤15および16を有する結晶構造における有意差を示す。化合物15のR<sub>1</sub>位におけるメトキシ置換はピアリール系1.2 を溶媒曝露表面にシフトさせ、これは化合物15と16との間の観察される水ネットワークの差異の原因となるようである(図2C)。

#### 【0117】

両方の構造は、補因子結合部位においてNADPHの $\beta$ -アノマを特徴とする。SaDHFR:NADPH:15の構造は40%の占有率を示し、SaDHFR:NADPH:16の構造は100%占有率を示す。 $\beta$ -アノマは、 $\beta$ -NADPHのニコチンアミドホスフェートと、 $\beta$ -NADPHの環化リボース部分が占有するようになる、Asn 18の側鎖との間で配位した水分子を置換する。 $\beta$ -NADPH構造では、3つの水分子が、ニコチンアミドアミドと、Phe 92、Ile 14およびAla 7の骨格との間で配位される。

#### 【0118】

NADPHおよび化合物15、またはNADPHおよび化合物16を用いた、SaDHFRの結晶についてのX線結晶学的測定およびデータ収集および精密化統計を、表4に示す。

#### 【0119】

10

20

30

40

【表6】

| 表4                               |   |   |
|----------------------------------|---|---|
|                                  | Sa(WT):NADPH:15 -                         | Sa(WT):NADPH:16                           |
| PDB ID                           |   |   |
| 空間群                              | <i>P6<sub>3</sub>/22</i>                  | <i>P6<sub>3</sub>/22</i>                  |
| 非対称単位中のモノマー数                     | 1   | 1   |
| 単位格子(Å単位でのa、b、c)                 | 79.09, 79.09, 107.93<br>90.0, 90.0, 120.0 | 79.02, 79.02, 108.25<br>90.0, 90.0, 120.0 |
| 分解能(Å)                           | 32.65–2.24 (2.28–2.24)                    | 25.15–1.81 (1.87–1.81)                    |
| 完全性%(最外殻、%)                      | 100 (99.9)                                | 99.8 (100)                                |
| 独立の反射                            | 10,059                                    | 18,798                                    |
| 冗長性(最外殻)                         | 14 (14.2)                                 | 12.32 (12.03)                             |
| Rsym, (最外殻)                      | 0.055 (0.144)                             | 0.110 (0.644)                             |
| $\langle I/\sigma \rangle$ (最外殻) | 68.5 (31.9)                               | 11.7 (2.3)                                |
| R因子/Rfree                        | 0.2167, 0.1703                            | 0.2322/ 0.1991                            |
| 原子数(タンパク質、リガンド、溶媒)               | 1,499                                     | 1,489                                     |
| Rms偏差結合長(Å)、角度(度)                | 0.008, 1.912                              | 0.009, 1.810                              |
| タンパク質の平均B因子(Å <sup>2</sup> )     | 22.34                                     | 28.01                                     |
| リガンドの平均B因子(Å <sup>2</sup> )      | 17.46 aNADPH<br>16.91 bNADPH<br>31.29阻害剤  | 24.65 NADPH<br><br>24.93阻害剤               |
| 溶媒分子の平均B因子(Å <sup>2</sup> )      | 25.25                                     | 35.10                                     |
| 最も好適な部位における残基(%) <sup>a</sup>    | 96.86                                     | 98.73                                     |
| 許容部位における残基(%) <sup>a</sup>       | 3.14                                      | 1.27                                      |
| 非許容部位における残基(%) <sup>a</sup>      | 0.00                                      | 0   |
| 収集ロケーション                         | SSRL Beamline 7-1                         | Rigaku HighFlux-007                       |

## 【0120】

&lt;実施例7&gt;

[COOH-PLAの細胞活性]

p-COOH PLAは、大部分のMIC値が0.0098~0.625の範囲のSaDHF R酵素および黄色ブドウ球菌に対して、高いレベルの活性を示す(表1)。この化合物は野生型大腸菌に対して活性が低下し、化合物31および32は10 μg/mLのMIC値を示した。グラム陰性菌に対する活性に対しての主なバリアのうちの2つは、外膜を通過する透過性および排出による阻害剤の能動的除去である。固有耐性的手段としての透過性を精査するために、外膜アセンブリに必須のタンパク質をコードするimp遺伝子にインフレーム欠失を含む、操作された株であるNR698に対するMIC値を測定した。化合物15、16、および29~32を用いたNR698株に対する阻害濃度は、およ

10

20

30

40

50

そ2,000分の1~4,000分の1の減少を示し、これは、外膜を通過する浸透の減少が、大腸菌におけるPLA活性を制限することを示している。

【0121】

COOH-PLAが共通のAcrB排出ポンプによって排出されるかどうかを調べるために、我々は、親大腸菌株のMIC値を、AcrBが欠失した菌株(JW0451)のMIC値と比較した。JW0451株に対するMIC値は、NR698株ではなく、親株と類似であるので(表5)、化合物は、AcrBによる排出の影響を受けない可能性が高い。

【0122】

【表7】

10

| 化合物 | 大腸菌 BW25113 | JW0451 |
|-----|-------------|--------|
| 13  | >32         | >32    |
| 14  | >20         | >20    |
| 15  | >20         | >20    |
| 16  | >20         | >20    |
| 29  | >20         | >20    |
| 30  | 20          | 20     |
| 31  | 10          | 5      |
| 32  | 10          | 10     |
| 33  | >20*        | 2.5*   |
| 34  | >20*        | 20*    |

20

【0123】

MIC値は、acrB株、macB株、emrB株、またはacrF株においてもシフトされなかったため、AcrBは生じない可能性が高く、主要ポンプAcrBに対する排出活性が生じない可能性が高いことが、さらに実証された。

【0124】

<実施例8>

[ヒト細胞に対する開示の化合物の効果]

(COOH-PLAは、優れた薬物様特性を有する)

本開示のCOOH-PLA化合物の薬物様ポテンシャル(drug-like potential)を調べるために、一連のインビトロアッセイにより、ヒト細胞に対するこれらの効果、重要なCYPアイソフォームのそれらの阻害およびミクロソーム安定性アッセイにおけるそれらの寿命を精査した。COOH-PLAは、HepG2およびMCF-10および細胞に対して測定可能な細胞毒性(IC<sub>50</sub>>500μM)を有しない。低い細胞毒性を有するグラム陽性菌細胞に対する強力な活性を結合することにより、高い治療指数(>500,000)が得られる。

40

【0125】

<実施例9>

[CYP酵素に対する開示の化合物の効果]

出願人は、本開示の特定の化合物について、シトクロムP450阻害も測定した。最も一般的なアイソフォームのうち2つである、CYP3A4およびCYP2D6に対する化合物15の活性を測定した。両酵素の阻害は、50μMを超える濃度を必要とし、このことは、化合物が、他の同時投与される治療剤の代謝を妨げないと予測され得ることを示す。

【0126】

<実施例10>

50

## [ ミクロソーム安定性 ]

ミクロソーム安定性アッセイにおける化合物15の寿命を測定した。化合物の半減期は、UPLCを用いて親化合物を追跡することによって測定した。フェーズIの半減期は99分であり、フェーズIIの半減期はおよそ87分である。これらのインビトロ実験の結果は、COOH-PLAの優れた薬物様プロファイルを示す。

## 【 0 1 2 7 】

< 実施例 1 1 >

[ ヒト結核菌 DHFR および ヒト DHFR に対する化合物の阻害効果 ]

( 薬物 )

イソニアジド (INH) は、Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO. から購入し、このイソニアジドを - 20 で凍結する前に、100%ジメチルスルホキシド (DMSO) に 1mg/ml の濃度で溶解した。DHFR阻害剤を、100% DMSO に 20mg/ml の濃度で溶解した。

## 【 0 1 2 8 】

( 分離株 )

結核菌 ATCC 35801 エルドマン (Erdman) 株は、the American Type Culture Collection、Manassas、VA. から入手した。臨床分離株は、SUNY Upstate Medical University、Syracuse、NY (Betz Forbes 提供)、University of Stellenbosch、South Africa (Tommy Victor 提供)、National Center of Tuberculosis and Lung Diseases of Georgia、Tbilisi、Georgia (Natalia Shubladze 提供)、National Jewish Center、Denver、CO (Leonid Heifets 提供) から入手した。

## 【 0 1 2 9 】

マイコバクテリア分離株を、改変ミドルブルック 7H10 ブロス (Middlebrook 7H10 broth) (pH 6.6、寒天を有し、マラカイトグリーンを省いた 7H10 寒天配合物) 中で、10% ミドルブルックオレイン酸 - アルブミン - デキストロース - カタラーゼ濃縮物 (Difco Laboratories、デトロイト、MI) および 0.05% Tween 80 を補充して、回転シェーカー上において 37 で 5 ~ 10 日間、増殖させた。この微生物を、7H10 ブロスで 1 クレット単位 (約  $5 \times 10^5$  CFU/ml 当量) に希釈して、光電比色計 (Manostat Corp.、New York、NY) をブロス希釈アッセイに使用した。

## 【 0 1 3 0 】

( マイクロタイターブロス希釈 MIC 試験 )

ポリスチレン 96 ウェル丸底マイクロタイタープレート (Corning Inc.、Corning、NY) を 50  $\mu$ l の改変 7H10 ブロスで満たした。化合物は、試験する最大濃度の 4 倍で調製し、次いで、第 1 のウェルに添加してその後連続的に 2 倍に希釈した。INH は、8  $\mu$ g/ml ~ 0.008  $\mu$ g/ml の範囲の濃度を用いて試験した。DHFR 阻害剤は、32  $\mu$ g/ml ~ 0.03  $\mu$ g/ml の範囲のものを用いて試験した。各菌株に使用する接種物を滴定によって測定し、7H10 寒天プレート上にプレティングして実際の接種物を決定した。7H10 寒天プレートを 37 で 4 週間インキュベートした。50  $\mu$ l の接種物を、化合物を含有する各ウェルに添加して、約  $2.5 \times 10^5$  CFU/ml の初期濃度を得た (試験した種々の分離株の範囲は  $1.25 \times 10^6$  CFU/ml ~  $8 \times 10^4$  CFU/ml であった)。マイクロタイタープレートを Seal Plate 接着密封フィルム (Exel Scientific、Wrightwood、CA) で覆い、周囲空气中、37 で 14 ~ 21 日間インキュベートして、その後結果を読み取った。各分離株を 2 連で試験した。MIC は、目に見える濁りを生じない抗菌剤の最低濃度として定義した。

10

20

30

40

50

## 【0131】

(結核菌およびヒトDHFRの発現ならびに精製)

BL21(DE3)コンピテント大腸菌細胞(New England BioLabs)を、GenScriptによって構築されたdfrA遺伝子を保有する組換えpET-41a(+ )プラスミドで形質転換した。形質転換した細胞を、30 µg/mLのカナマイシンを追加したLB培地において、37 °Cで、OD<sub>600</sub>が0.6~0.7に達するまで増殖させた。細胞を、1 mM IPTGを用いて20 °Cで20時間誘導し、8000 rpmで15分間スピンドウンした。湿った細胞ペレットの各グラムを、200 µg/mLのリゾチームおよび1 mM DNase I(Thermo Scientific)を追加した1× Bug Buster 試薬(Novagen) 5 mlに、再懸濁した。穏やかに回転させながら細胞懸濁液を室温で30分間インキュベートした後、18,000 rpmで30分間遠心分離し、上清を回収した。若干の非標的タンパク質を沈殿させるために、40%硫酸アンモニウムを細胞溶解物に加え、4 °Cで一晩攪拌した。18,000 rpmで15分間遠心分離した後、上清を0.22 µmフィルターに通し、4 CVの平衡緩衝液A(20 mM トリス-HCl、50 mM KCl、2 mM DTT、0.1 mM EDTAおよび15% (v/v) グリセロール、pH 7.5)で予め平衡化したメトトレキサート-アガロースカラムにゆっくりと充填した。カラムを、3 CVの洗浄緩衝液B(20 mM トリス-HCl、500 mM KCl、2 mM DTT、0.1 M EDTAおよび15% (v/v) グリセロール、pH 7.5)で洗浄した。酵素を、3 CVの溶出緩衝液C(20 mM トリス-HCl、50 mM KCl、2 mM DTT、2 mM DHF、0.1 mM EDTAおよび15% (v/v) グリセロール、pH 8.5)で溶出した。DHFR酵素を含む画分を収集し、濃縮し、1 CVの平衡緩衝液A(pH 8.5)で予め平衡化したHi-Prep 26/60 Sephacryl s-200 HRカラムに充填した。タンパク質溶出を、AKTA UV/vis ダイオードアレイ分光光度計を用いて280 nmでモニタした。純粋な酵素を含む画分をプールし、10 mg/mLに濃縮し、液体窒素中で急速凍結し、-80 °Cで保存した。

10

20

## 【0132】

(酵素阻害)

酵素活性および阻害アッセイを、DHFR酵素によって触媒されるジヒドロ葉酸のNADPH依存性の減少をモニタすることにより行った。NADPH酸化速度を、20 mM TES pH 7.0、50 mM KCl、10 mM 2-メルカプトエタノール、0.5 mM EDTAおよび1 mg/mL ウシ血清アルブミンを含有するアッセイ緩衝液中で、340 nmで分光光度的に測定した。全ての測定は、純粋な酵素(2 mg/mL)、100 µMのNADPHおよび100 µMのDHFを緩衝液に添加して、室温で行った。阻害アッセイのために、100% DMSOに溶解した阻害剤を混合物に添加し、5分間インキュベートしてDHFを添加した。平均IC<sub>50</sub>値および標準偏差を3連で測定した。

30

## 【0133】

特定のPLA化合物についてのMtbおよびヒトDHFRに対するIC<sub>50</sub>値およびMtb MIC値を、表6に示す。非DHFR阻害抗生物質であるトリメトプリム(TMP)を陰性対照として使用した。DHFR阻害剤イソニアジド(INH)およびトリメトレキサートを陽性対照として使用した。

40

## 【0134】

【表 8】

| 表 6       |                               |                              |                     |
|-----------|-------------------------------|------------------------------|---------------------|
| 化合物       | MtbDHFR IC <sub>50</sub> (nM) | HuDHFR IC <sub>50</sub> (nM) | MIC (μg/ mL)<br>Mtn |
| 14        | 311                           | 1577                         | 1                   |
| 15        | 173                           | 870                          | 4                   |
| 29        | 111                           | 1955                         | 0.5                 |
| 54        | 326                           | 323                          | 2                   |
| 55        | 206                           | 2914                         | 4                   |
| 56        | 126                           | 1452                         | 2                   |
| 57        | 73                            | 144                          | 2                   |
| 58        | 177                           | 1015                         | <0.03               |
| 59        | 460                           | 688                          | 0.5                 |
| TMP       | 19,560                        | 97,179                       | 256                 |
| トリメトレキセート | 17 <sup>a</sup>               | Nd                           | 4                   |
| INH       | -                             | -                            | 0.03                |

<sup>a</sup>ニクソン,M.(Nixon,M.)ら、Chem.Biol.(2014)21:819~30 からのデータ

【0135】

本開示の特定の化合物を、ヒト結核菌の多剤耐性分離株に対する抗菌活性について評価した。種々の菌株のMIC値を表7に示す。

【0136】

【表 9】

| 表 7  |            |       |         |         |         |       |          |
|------|------------|-------|---------|---------|---------|-------|----------|
| Cmp. | Mtb Erdman | Mtb 5 | Mtb 365 | Mtb 276 | Mtb 352 | Mtb56 | Mtb C-31 |
| 1113 | 8          | 16    | 8       | 16      | 8       | 8     | 16       |
| 15   | 16         | 8     | 4       | 16      | 16      | 16    | >32      |
| 54   | 4          | 8     | 8       | 4       | 4       | 8     | 8        |
| 55   | 8          | 8     | 4       | 8       | 8       | 8     | 16       |
| 56   | 4          | 4     | 4       | 4       | 4       | 4     | 8        |
| 1071 | 8          | 16    | 8       | 16      | 8       | 8     | 32       |
| 1066 | 8          | 16    | 8       | 16      | 16      | 8     | 32       |
| 58   | <0.03      | 0.25  | <0.03   | ND      | 0.06    | 0.06  | 8        |
| 59   | 0.5        | 2     | 0.125   | ND      | 0.5     | 0.5   | 8        |
| INH  | 0.125      | 4     | 2       | ND      | 1       | 1     | 4        |

【0137】

&lt;実施例12&gt;

[化合物Aに耐性のMRSA菌株の生成および特性評価]

化合物Aによる阻害を克服するための黄色ブドウ球菌43300株の潜在的耐性メカニズムについての最初の研究は、以前に報告されている(フリーブキシィ, K.(Freebxy, K.)ら、J. Struct. Biol.(2010)170:93~97)

。

10

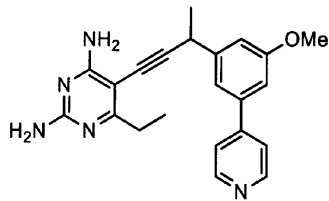
20

30

40

50

## 【化8】



(化合物A)

## 【0138】

これらの研究は、2つの変異体、DHFR遺伝子中のF98YおよびF98Iが、低い変異頻度 ( $10^{-10}$ ) で選択されたことを示した。プロパルギル結合抗葉酸剤の耐性プロファイルをさらに特性評価するために、一段階および二段階選択試験を実施し、得られた菌株を特性評価した。一段階試験では、 $6 \times \text{MIC}$  で化合物1に供されたATCC品質管理株43300を用いた変異体選択により、臨床的に観察された3つの変異、すなわち、F98Y、H30NおよびH149R、ならびに3つの新規変異、すなわち、F151S、F151CおよびD142Yが生じた。化合物AおよびF98YまたはH149Rを有する前駆細胞株を用いた2回目の耐性選択により、一連の新規および臨床的に関連する二重変異体の両方を得た(表8)。H30N/F98Y変異体およびF98Y/H149R変異体を含む菌株が臨床的に単離されたので、単一変異体対応物(F98Y、H30NおよびH149R)を含む、これらの変異型酵素および細菌の適応性の完全な特性評価が、生化学的レベル、構造的レベルおよび細胞レベルで行われた。

10

20

## 【0139】

$6 \times \text{MIC}$  1を含有するIsosensitest(Oxoid)寒天プレート上の前駆細胞株の一晩培養物(およそ $10^{12}$  CFU/mL)  $100 \mu\text{L}$ をプレーティングし、 $37^\circ\text{C}$ で18時間インキュベートして、耐性菌株を選択した。単一のコロニを単離し、コロニPCR産物を直接配列決定して、*df r B*遺伝子を同定した。コロニPCRのために、 $0.1 \text{ M}$  トリス、 $\text{pH} 7.5$ 中の $1 \text{ mg/mL}$  リゾスタフィンおよび $20 \mu\text{g/mL}$  プロテイナーゼKを用いて、細胞を溶解させた。標準的PCR条件に従って、センスプライマ(5'-ATGACTTTATCCATTCTAGTTGC-3')、アンチセンスプライマ(5'-TTATTTTTTACGAATTAATGTAG-3')およびrTaqポリメラーゼ(Takara)を用いて、遺伝子を増幅した。PCR産物をPromega Wizard SV GelおよびPCR Clean Upシステムを用いて精製し、センスプライマを用いて配列決定した。

30

## 【0140】

変異頻度1は、得られたコロニの数を、各前駆細胞株の総接種物( $1 \times 10^{11}$  CFU/mL)で割って決定した。特異的変異の頻度は、阻害剤-菌株対の変異頻度に、特異的変異を含む配列決定されたコロニの数を掛けることによって決定した。

## 【0141】

(最少阻害濃度(MIC))

最小阻害濃度は、Isosensitest Broth(Oxoid)中の $5 \times 10^5$  CFU/mLの最終接種物を用いて、標準微量希釈ブロス20アッセイのためのClinical and Laboratory Standards Instituteのガイドラインに従って測定した。MICは、増殖を視覚的に阻害する阻害剤の最低濃度として定義した。 $37^\circ\text{C}$ で18時間培養した後、 $A_{600}$ で増殖をモニタした。Presto Blue(Life Technologies)を用いて比色分析によりMICを確認した。 $10 \mu\text{g/mL}$ のチミジンを追加したIsosensitestブロスを使用して、全てのオフターゲット抗菌活性を測定した。

40

## 【0142】

(増殖曲線)

LB培地( $50 \text{ mL}$ )に一晩培養物 $1 \text{ mL}$ を接種した。 $30$ 分ごとに、 $A_{600}$ で増殖

50

をモニタした。倍加時間は、増殖曲線の直線部分から以下の式によって決定した：

【数 1】

$$\text{倍加時間} = \frac{\Delta \text{時間} * \log 2}{\log(\text{最終濃度}) - \log(\text{初期濃度})}$$

【0143】

(Sa(F98Y、H149R)およびSa(H149R)DHFR酵素の生成、発現および精製)

Sa(F98Y)、Sa(H30N)およびSa(F98Y、H30N)DHFR酵素の生成、発現および精製については、先に報告している<sup>15, 16</sup>。Sa(H149R)およびSa(F98Y、H149R)DHFRプラスミドの生成は、pET-41a(+)構築物中のSa(WT)およびSa(F98Y)を使用し、QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)により、センスプライマ5'-CTAGATGAGAAAATACAATTCCACGTAC-3'およびアンチセンスプライマ5'-CGAATTA AATGTAGAAAGGTACGTGGGAAT-3'を、製造者の指示に従って使用して実施した。変異誘発は、配列決定により確認した。組換えSa(H149R)およびSa(F98Y、H149R)酵素は、先に報告した手順により、1mM IPTGを含む大腸菌BL21(DE3)(Invitrogen)細胞で過剰発現させた。1x Bug Buster(Novagen)およびDNase A(ThermoFisher Scientific)を用いてペレットを溶解し、ニッケルアフィニティークロマトグラフィ(5Prime)を用いて精製した。タンパク質を、PD-10カラム(GE Healthcare)を用いて、20mM Tris pH7.0、20%グリセロール、0.1mM EDTA、2mM DTTを含む緩衝液中で脱塩し、分注して-80で保存した。

【0144】

【表 10】

表 8.

| DHFR 変異    | 前駆細胞株     | 一塩基多型   | コロニー配列決定(%) | 変異頻度 <sup>a</sup>        | 倍加時間(分) |
|------------|-----------|---------|-------------|--------------------------|---------|
| WT         | --        | --      | --          | --                       | 32.04   |
| F98Y       | Sa43300   | TTT→TAT | 2/19 (10.5) | 3.11 x 10 <sup>-11</sup> | 34.53   |
| H30N       | Sa43300   | CAT→AAT | 3/19 (15.8) | 4.67 x 10 <sup>-11</sup> | 35.62   |
| H149R      | Sa43300   | CAT→CGT | 7/19 (36)   | 1.65 x 10 <sup>-10</sup> | 38.34   |
| F98Y/H30N  | Sa(F98Y)  | CAT→AAT | 2/16 (12.5) | 8.2 x 10 <sup>-12</sup>  | 35.06   |
| F98Y/H149R | Sa(H149R) | TTT→TAT | 1/1 (100)   | 1.23x10 <sup>-11</sup>   | 30.89   |

<sup>a</sup>6×MICで化合物Aによる場合のSa43300株全体の耐性頻度=2.96(±1.58)×10<sup>-10</sup>

6×MICで化合物Aによる場合のSa43300株(H149R)全体の耐性頻度=3.75×10<sup>-11</sup>

6×MICで化合物Aによる場合のSa43300株(F98Y)全体の耐性頻度=6.56(±1.57)×10<sup>-11</sup>

【0145】

化合物Aに曝露された各菌株全体の変異頻度平均は、6×MICで化合物1の濃度を有する複数のプレート上に現れる接種物およびコロニーの数に基づいて計算した。Sa433

00は、 $2.96 \times 10^{-10}$ の非常に低い頻度で化合物Aに対するMICの上昇を示す。全体の変異頻度は、F98YおよびH149Rを有する前駆細胞株に対して $6.56 \times 10^{-11}$ および $3.75 \times 10^{-11}$ の比率で、さらに低くなる。次いで、特定の変異頻度を、特定の変異を有する配列決定されたコロニの数に基づいて計算した。二重変異体の生成が段階的な方式で起こる場合、組み合わせられた変異の頻度は、 $10^{-21}$ と低い可能性がある。倍加時間で測定した細菌の適合度の評価は、倍加時間を維持したか、またはわずかに改善したSa(F98Y/H149R)を除いて、大部分の変異株が、増殖時間においてわずかな損失(野生型の1.08 - 1.2倍の倍加時間)のみを示すことを示している。(表8)。全体的に、これらの研究は、野生型と比較した場合、変異株が比較的適合していることを示している。

10

## 【0146】

組換え変異体DHFR酵素は、野生型酵素の部位特異的変異誘発によって生成し、アフィニティークロマトグラフィを用いて精製した。Michaelis-Menten反応速度論は、先にフレイ(Frey)らが公表したアッセイ条件(2010)を用いて、各酵素について測定した(表9)。全体として、Sa(H149R)以外の全ての酵素は、野生型値のおよそ2倍以内の $k_{cat}/K_M$ 値を有する。Sa(H149R)は、有意に低下した $k_{cat}/K_M$ 値(6分の1に減少)を有し、これは、DHFおよびNADPHの両方についてより高い $K_M$ 値を有する結果である。興味深いことに、Sa(F98Y/H149R)酵素により、DHFおよびNADPHの $K_M$ 値がほぼ野生型の値に回復するので、二重変異体Sa(F98Y/H149R)は、単一Sa(H149R)変異体の低効率を補う。この補償的關係は、二重変異体Sa(F98Y/H30N)でも観察される。単一H30N変異は、NADPH  $K_M$ (31.21 ~ 79.89  $\mu M$ )の有意な低下を被り、この $K_M$ 値は、二重Sa(H30N/F98Y)変異体において野生型に近い値に復元する。

20

## 【0147】

## 【表11】

表9.変異型酵素の特性評価

| DHFR           | $K_M$ DHF<br>( $\mu M$ ) | $V_{max}$ DHF | $K_M$ NADPH<br>( $\mu M$ ) | $k_{cat}$ DHF<br>( $s^{-1}$ ) | $k_{cat}/K_M$<br>DHF |
|----------------|--------------------------|---------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------|
| WT             | 17.5                     | 62.93         | 31.21                      | 41.13                         | 2.4                  |
| F98Y           | 8.38                     | 68.38         | 57.08                      | 44.76                         | 5.3                  |
| H30N           | 24.49                    | 45.76         | 79.89                      | 29.91                         | 1.2                  |
| H30N,<br>F98Y  | 11.24                    | 39.98         | 51.17                      | 26.1                          | 2.3                  |
| H149R          | 63.54                    | 42.44         | 303.4                      | 27.74                         | 0.4                  |
| F98Y,<br>H149R | 5.24                     | 44.98         | 45.08                      | 29.40                         | 5.6                  |

30

40

## 【0148】

&lt;実施例12&gt;

[変異型黄色ブドウ球菌のPLA阻害剤]

表10に示す化合物を、変異型黄色ブドウ球菌の阻害剤として評価した。化合物A~Fは、先に開示されている。

50

【 0 1 4 9 】

【 表 1 2 】

表 10.変異型 DHFR の PLA 阻害剤

| Cmpd | R <sub>p</sub>    | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub>   | Ar             |
|------|-------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|
| A    | CH <sub>3</sub>   | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | ピリジン           |
| B    | CH <sub>3</sub>   | H                | OCH <sub>2</sub> | OCH <sub>2</sub> | ピリジン           |
| 60   | H                 | H                | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | ピリジン           |
| C    | CH <sub>3</sub>   | OCH <sub>3</sub> | H                | H                | ピリジン           |
| D    | R-CH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | ピリジン           |
| E    | R-CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H                | H                | ピリジン           |
| F    | R-CH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>2</sub> | OCH <sub>2</sub> | ピリジン           |
| 15   | H                 | OCH <sub>3</sub> | H                | H                | <i>p</i> -COOH |
| 29   | S-CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H                | H                | <i>p</i> -COOH |
| 16   | H                 | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | <i>p</i> -COOH |
| 31   | R-CH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | <i>p</i> -COOH |
| 32   | S-CH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | <i>p</i> -COOH |

10

20

【 0 1 5 0 】

表 10 の化合物の阻害効果を、以下の DHFR 結合アッセイを用いて測定した。酵素阻害アッセイを、20 mM TES、pH 7.0、50 mM KCl、0.5 mM EDTA、10 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、および 0.1 mM NADPH および 2  $\mu$ g/mL 酵素を用いた 1 mg/mL BSA を含有するアッセイ緩衝液中で、室温で 340 nm の吸光度により、DHFR による NADPH 酸化速度をモニタして行った。DMSO 中の阻害剤を酵素：NADPH 混合物に添加し、5 分間インキュベートした後、50 mM TES、pH 7.0 中の 0.1 mM DHF を添加した。阻害剤濃度および体積は、酵素活性の 50% 低下をもたらす条件に基づく。

30

【 0 1 5 1 】

酵素反応速度論は、DHF  $K_M$  および  $V_{max}$  については 20  $\mu$ M の NADPH を伴う 12.5 ~ 100  $\mu$ M の DHF を使用する、または NADPH の  $K_M$  については 50  $\mu$ M の DHF を伴う 12.5 ~ 100  $\mu$ M の NADPH を使用する酵素活性アッセイによって生成した Lineweaver - Burk plot によって決定した。 $K_M$  値は、Graph Pad を用いた非線形回帰分析によって決定した。表 11 は、WT および変異体 DHFR 酵素に対する PLA 化合物の阻害定数  $K_i$  (nM) を開示する。

40

【 0 1 5 2 】

【表 1 3】

| 表 11 |        |          |          |           |                   |                    |
|------|--------|----------|----------|-----------|-------------------|--------------------|
| Cmpd | Sa(WT) | Sa(F98Y) | Sa(H30N) | Sa(H149R) | Sa(H30N,<br>F98Y) | Sa(F98Y,<br>H149R) |
| TMP  | 3.43   | 14.68    | 6.89     | 240.8     | 595.1             | 1729               |
| A    | 2.83   | 13.14    | 12.98    | 681.7     | 191.7             | 2059               |
| B    | 2.53   | 3.01     | 33.25    | 1363      | 485.9             | 779.3              |
| 60   | 2.09   | 12.13    | 4.54     | 119.3     | 449.3             | 107.1              |
| C    | 4.51   | 19.71    | 5.90     | 1563      | 820.3             | 878.5              |
| D    | 2.68   | 8.57     | 16.72    | 1154      | 801.2             | 894.5              |
| E    | 1.64   | 16.69    | 16.53    | 269.6     | 417.9             | 422.3              |
| F    | 5.21   | 13.60    | 8.85     | 174.0     | 345.7             | 289.1              |
| 15   | 4.76   | 11.75    | 3.89     | 130.9     | 158.3             | 142.2              |
| 29   | 5.51   | 11.83    | 3.74     | 862.4     | 35.87             | 295.3              |
| 16   | 1.64   | 11.36    | 3.36     | 323.9     | 45.17             | 184.4              |
| 31   | 1.33   | 7.88     | 3.54     | 111.5     | 19.10             | 69.41              |
| 32   | 2.09   | 5.57     | 3.34     | 153.1     | 16.57             | 55.77              |

## 【 0 1 5 3】

表 10 の全ての化合物は、野生型と比較してほんのわずかの損失で、単一変異酵素 Sa (F98Y) および Sa (H30N) に対して良好な効力 (15 nM 未満の  $K_i$  値) を示す (表 11)。化合物 B は、Sa (H30N) 酵素に対する親和性の損失が最大で、12.6 倍の損失であった。しかし、単一変異体 Sa (H149R) に対する活性は、より損なわれた。TMP は、Sa (H149R) 変異体に対して活性を 69 倍失う。PLA は、この酵素に対して、185 nM の  $K_i$  値を有する化合物 12 から 1649 nM の  $K_i$  値を有する化合物 B までの範囲の親和性を有する。興味深いことに、拘束されていない 3' および 4' メトキシ基を有する化合物 3 は、化合物 B と比較した場合、妥当な親和性 (144 nM) を維持し、柔軟性が変異酵素に対する親和性にとって重要であり得ることを示した。二重変異体 Sa (F98Y、H30N) に対して、TMP の親和性の損失は、30 倍である。一般に、ジオキサラン化合物 (B および F) ならびに化合物 C ~ E は、Sa (F98Y、H30N) 二重変異酵素に対して親和性を有意に失う (180 ~ 300 倍の損失)。

## 【 0 1 5 4】

化合物 15 ~ 16、29、31 ~ 32 の設計は、保持されるアルギニンとの可能な相互作用を前提として、これらの変異酵素における補償的相互作用を提供する。喜ばしいことに、化合物 29、16 および 31 ~ 32 は、二重変異体 Sa (F98Y、H30N) 酵素に対して、16 ~ 45 nM の範囲の  $K_i$  値を有し、はるかに大きな親和性を示す。化合物 A ~ F、60 および 15 および TMP は、107 ~ 2059 nM の  $K_i$  値を示すので、二

重変異体 Sa ( F 9 8 Y、H 1 4 9 R ) 酵素に対する活性を維持することが明らかにより困難である。しかし、化合物 3 1 および 3 2 は、それぞれ、6 9 および 5 5 n M の  $K_i$  値で、この酵素に対する有意な阻害を示す。ここでも、イオン化されたカルボキシレートの存在は、複合体の他の場所での接触の減少を補償するために、重要な追加の相互作用を提供することができるようである。

【 0 1 5 5 】

黄色ブドウ球菌の野生型株および変異株 ( Sa ( F 9 8 Y )、Sa ( H 3 0 N )、Sa ( H 1 4 9 R )、Sa ( H 3 0 N、F 9 8 Y ) および Sa ( F 9 8 Y / H 1 4 9 R ) ) の増殖の阻害についても試験した ( 表 1 2 )。TMP の抗菌活性は、単一の変異によっても明らかに損なわれ、二重変異株に対して 5 0 ~ 1 0 0  $\mu$  g / m L の MIC 値に達した。P L A A ~ F、6 0、1 5 および 2 9 は、TMP より野生型株に対してより強力であり、多くは単一変異体に対してより強力であった ( 0 . 0 7 8 ~ 5  $\mu$  g / m L の間の MIC 値 )。しかし、P L A A ~ F、6 0、1 5 および 2 9 も、D H F R の二重変異を有する株に対して有意な損失を被った。P L A 1 6、3 1 および 3 2 は、野生型株ならびに単一および二重変異体の両方を有する株に対して、優れた活性を有する。

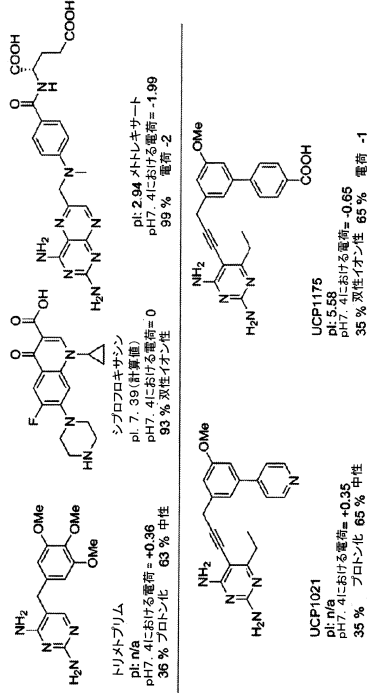
【 0 1 5 6 】

【 表 1 4 】

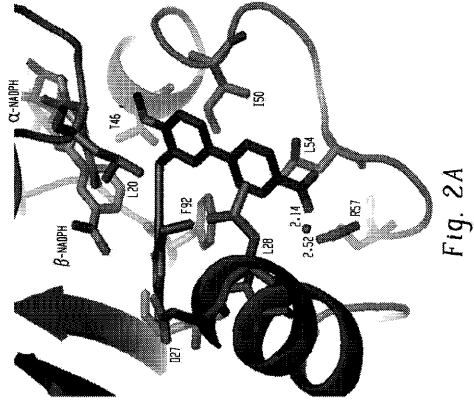
表 12

| Cmpd | Sa43300 | Sa(F98Y) | Sa(H30N) | Sa(H149R) | Sa(H30N, Sa(F98Y, H149R) |        |
|------|---------|----------|----------|-----------|--------------------------|--------|
|      |         |          |          |           | F98Y)                    | H149R) |
| TMP  | 0.3125  | 10       | 2.5      | 2.5       | 50                       | 100    |
| A    | 0.0781  | 2.5      | 2.5      | 2.5       | 20                       | 80     |
| B    | 0.0781  | 1.25     | 5        | 5         | 40                       | 40     |
| 60   | 0.0195  | 0.625    | 0.625    | 0.625     | 20                       | 40     |
| C    | 0.625   | 2.5      | 2.5      | 2.5       | 20                       | 40     |
| D    | 0.0391  | 0.625    | 0.625    | 0.625     | 40                       | 20     |
| E    | 0.0195  | 1.25     | 0.625    | 1.25      | 10                       | 20     |
| F    | 0.0195  | 1.25     | 2.5      | 2.5       | 20                       | 20     |
| 15   | 0.0195  | 0.1563   | 0.1563   | 0.1564    | 6.25                     | >50    |
| 29   | 0.0391  | 0.1563   | 0.1563   | 0.0781    | >40                      | >40    |
| 16   | 0.0195  | 0.1563   | 0.1563   | 0.1563    | 5                        | 10     |
| 31   | 0.0098  | 0.0781   | 0.0781   | 0.0391    | 1.25                     | 2.5    |
| 32   | 0.0098  | 0.0781   | 0.0781   | 0.0781    | 1.25                     | 1.25   |

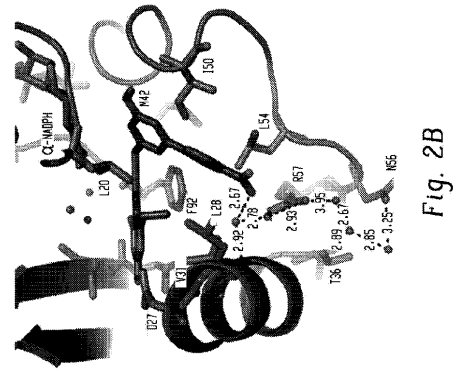
【 図 1 】



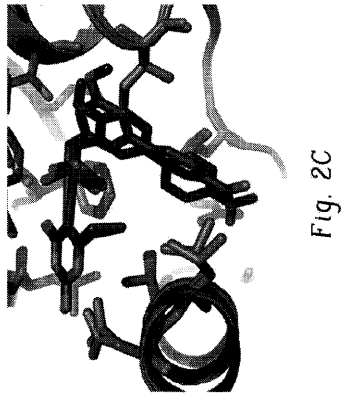
【 図 2 A 】



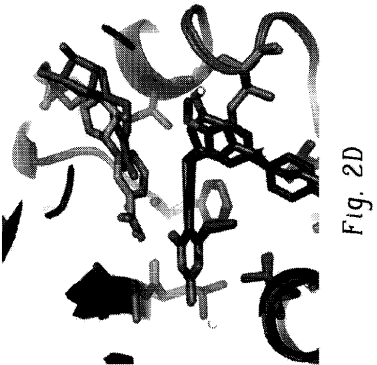
【 図 2 B 】



【 図 2 C 】



【 図 2 D 】



## フロントページの続き

|               |           |         |             |
|---------------|-----------|---------|-------------|
| (51)Int.Cl.   |           | F I     |             |
| A 6 1 P 31/04 | (2006.01) | A 6 1 P | 31/04       |
| A 6 1 P 31/10 | (2006.01) | A 6 1 P | 31/10       |
| A 6 1 P 33/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 33/00       |
| A 6 1 K 45/00 | (2006.01) | A 6 1 K | 45/00       |
|               |           | A 6 1 P | 43/00 1 2 1 |

- (72)発明者 スコッケラ エリック  
アメリカ合衆国 コネチカット マンズフィールド センター ストーズ ロード 526 アパートメント 4
- (72)発明者 ガミューディブーンディ ダヤナン ナレンドラン  
アメリカ合衆国 コネチカット マンズフィールド センター ストーズ ロード 526 アパートメント 4
- (72)発明者 ケシペディー サントシュ  
アメリカ合衆国 コネチカット ハムデン ミックス アベニュー 865 アパートメント #507
- (72)発明者 リーブ ステファニー  
アメリカ合衆国 コネチカット マンチェスター メイン ストリート 843 アパートメントイー
- (72)発明者 ロンバード マイケル エヌ  
アメリカ合衆国 コネチカット マンチェスター メイン ストリート 843 アパートメントエイ

審査官 前田 憲彦

- (56)参考文献 特表2014-532729(JP,A)  
米国特許出願公開第2015/0225353(US,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C07D 239/00  
A61K 31/00  
C07D 405/00  
CAplus/REGISTRY(STN)